บทที่ 2
ทฤษฎีและ/หรือแนวความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย
(Literature Review)

2.1 ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับระบบน้ำในอุตสาหกรรมยา [5-7, 9, 20, 21]

น้ำที่ใช้ในอุตสาหกรรมยาอาจใช้เพื่อผสมในการผลิตยา ใช้ในการล้างทำความสะอาด อุปกรณ์ที่ใช้ในผลิต ตลอดจนใช้ในการทำน้ำร้อนและไอน้ำ เพื่อการอบฆ่าเชื้อหรือผลิตพลังงานคุณสมบัติของน้ำที่ใช้ในอุตสาหกรรมยา แม้จะใช้เพื่อล้างทำความสะอาดอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิต ก็ต้องเป็นน้ำที่บริสุทธิ์ปราศจากสารปนเปื้อนของสารเคมีและเชื้อจุลินทรีย์ มีคุณสมบัติตามที่กำหนดในตำรับยา เช่น United State of Pharmacopoeia (USP), British Pharmacopoeia (BP), European Pharmacopoeia (EP) เป็นต้นซึ่งแบ่งออกได้ ดังนี้

2.1.1 Purified Water เป็นน้ำที่เตรียมขึ้นมาเพื่อใช้ในการผลิตยา อาจจะได้โดยการกลั่น (Distillation) การแลกเปลี่ยนประจุ (Ion exchange) กระบวนการออสโมซิสย้อนกลับ (Reverse Osmosis) หรือ โดยวิธีอื่นใดที่เหมาะสมก็ได้ ถ้าน้ำนั้นมีคุณสมบัติตามที่กำหนดไว้ใน monograph ของ pharmacopoeia ที่สำคัญจะต้องไม่มีการเติมสารอื่นใดลงไป (no added substance) แต่มีข้อยกเว้นว่าถ้าในระบบน้ำใช้ ozone ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ แล้วนั้นการเติม ozone จะไม่นับเป็น added substance ในแต่ละ monograph ที่บ่งถึง water โดยไม่มีข้อกำหนดอื่นใดประกอบแล้วต้องใช้ Purified Water เสมอ

2.1.1.1 Carbon dioxide-free water คือ purified water ที่ต้มมาแล้วเป็นเวลา 5 นาทีหรือมากกว่า และได้ปล่อยให้เย็น ในขณะที่มีการป้องกันการดูดซับคาร์บอนไดออกไซด์ จากบรรยากาศ

2.1.1.2 De-aerated water คือ purified water ที่ได้ผ่านกรรมวิธีที่ลดก๊าซที่ละลาย ด้วยวิธีการที่เหมาะสม เช่นการต้มเป็นเวลา 5 นาที แล้วปล่อยให้เย็น หรือโดยการใช้ ultrasonic vibration

2.1.2 Water for Injection เป็นน้ำที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยการกลั่น (distillation) หรือ ออสโมซิสย้อนกลับ (Reverse osmosis) มีคุณสมบัติความบริสุทธิ์ของ Purified water ที่มีข้อแตกต่างจาก Purified water คือต้องเป็นน้ำที่ปราศจาก pyrogens ดังนั้นในการเตรียม การเก็บ หรือการนำไปใช้ต้องไม่มีเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสาร pyrogens

2.1.3 Sterile Water for Injection เป็นน้ำที่นำไปใช้ในภาชนะที่ปราศจากเชื้อ (sterile package) จุดหลักในการนำไปใช้สำหรับเป็นตัวทำละลาย (solvent) ของ ยาฉีดชนิดผง และขนาดบรรจุต้องไม่เกิน 1 ลิตร

2.1.4 Sterile Bacteriostatic Water for Injection เป็น Water for Injection ที่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และประกอบด้วยสารต้านเชื้อ (antimicrobial) หนึ่งชนิด หรือมากกว่า บรรจุในภาชนะที่เหมาะสม

2.1.5 Sterile Water for Irrigation เป็น Water for Injection ที่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อ และบรรจุในภาชนะที่เหมาะสม แต่ไม่มีส่วนประกอบของสารต้านเชื้อ (antimicrobial) หรือสารอื่นใดเติมปน

2.1.6 Sterile Water for Inhalation เป็น Water for Injection ที่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อและบรรจุในภาชนะที่เหมาะสม ไม่มีส่วนประกอบของสารต้านเชื้อ (antimicrobial) หรือสารอื่นใดเติมปน มี pH ระหว่าง 4.5 ถึง 7.5

2.1.7 Water for Final Rinse เป็นน้ำที่ใช้สำหรับการล้าง ภาชนะ อุปกรณ์ ในการผลิตยาที่เป็นการล้างครั้งสุดท้าย ก่อนนำไปใช้ในกระบวนการผลิต ตลอดจนบรรจุผลิตภัณฑ์ ซึ่งจะต้องเป็นน้ำที่มีคุณสมบัติเดียวกันกับน้ำที่ใช้ในกระบวนการผลิต หรือในสูตรการผลิต ยาน้ำสำหรับรับประทาน (Oral liquid) มีการใช้ purified water เป็นส่วนผสม ก็ต้องใช้ purified water ในการล้างครั้งสุดท้ายของภาชนะหรืออุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตนั้น ในทำนองเดียวกัน ถ้ากระบวนการผลิตนั้น เป็นการผลิตยาปราศจากเชื้อ (Parenteral) ก็จะต้องใช้ Sterile water for injection ในการล้างครั้งสุดท้ายของภาชนะ หรืออุปกรณ์ ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตนั้นด้วย

2.1.8 Clean steam ไอน้ำที่ใช้ในกระบวนการผลิต จะผลิตจากน้ำ ซึ่งต้องคำนึงว่าไอน้ำนั้นนำไปใช้กับกระบวนการผลิตใด ถ้าเป็นการผลิตยาปราศจากเชื้อ (Parenteral) จะต้องใช้ water for injection เป็นแหล่งของน้ำในการผลิตไอน้ำเพื่อใช้ ดังนั้น ไอน้ำที่ผลิตขึ้นมาใช้ จึงต้องมีการตรวจ สอบน้ำที่กลั่นได้ (condensate) ที่ต้องมีคุณสมบัติเทียบเท่ากับ water for injection นั่นคือไอน้ำที่ป้อนเข้าสู่ autoclave จะต้องเป็น clean steam

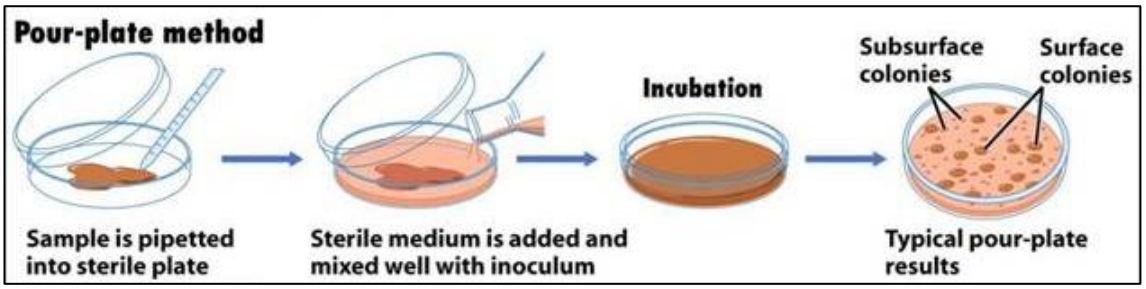
การควบคุมคุณภาพน้ำทางด้านเคมี ชีววิทยาและจุลชีววิทยา เพื่อให้ได้น้ำที่มีคุณภาพเพื่อการผลิตยาค่อนข้างเป็นเรื่องยุ่งยาก เนื่องจากน้ำเป็นสิ่งที่ได้จากแหล่งธรรมชาติ โอกาสปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมเกิดได้ง่ายมาก แต่น้ำที่จะใช้ในการผลิตยาต้องเป็นน้ำที่มีคุณภาพ จึงเป็นความจำเป็นที่จะต้องผ่านกระบวนการทำให้ได้น้ำที่เข้ามาตรฐานก่อนนำไปใช้ และเพื่อการนั้นวิธีการวิเคราะห์ทดสอบที่ใช้ในการควบคุมคุณภาพน้ำ ควรมีการตรวจสอบความถูกของวิธีการวิเคราะห์ทดสอบก่อนนำมาใช้ในการทดสอบจริง เพื่อให้สอดคล้องตามมาตรฐาน PIC/S GMP และเพื่อให้มั่นใจว่าระบบน้ำที่ใช้ในการผลิตภัณฑ์ยามีคุณภาพเป็นไปตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน

2.2 ความรู้เบื้องต้นของวิธีการตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ในระบบน้ำที่ใช้ในอุตสาหกรรมยา [4-8]

ระบบน้ำในอุตสาหกรรมยาอาจใช้เพื่อผสมในการผลิตยา ใช้ในการล้างทำความสะอาดอุปกรณ์ที่ใช้ในผลิต ตลอดจนใช้ในการทำน้ำร้อนและไอน้ำ เพื่อการอบฆ่าเชื้อ หรือผลิตพลังงาน คุณสมบัติของน้ำที่ใช้ในอุตสาหกรรมยา แม้จะใช้เพื่อล้างทำความสะอาดอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิต ก็ต้องเป็นน้ำที่บริสุทธิ์ปราศจากสารปนเปื้อน มีคุณสมบัติตามที่กำหนดในตำรับยา เช่น United State of Pharmacopoeia (USP), *British Pharmacopoeia, European Pharmacopoeia* เป็นต้น ดังนั้น การควบคุมคุณภาพน้ำทางด้านเคมี ชีววิทยาและจุลชีววิทยา เพื่อให้ได้น้ำที่มีคุณภาพเพื่อการผลิตยา โดยแผนกควบคุมคุณภาพจึงเป็นสิ่งสำคัญ [5]-[7], [20]-[21] ซึ่งการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในระบบน้ำที่ใช้ในอุตสาหกรรมยานิยมใช้ Microbial Limit Test Method ในการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในระบบน้ำ ซึ่งวิธีนี้ประกอบด้วย Pour plate method และ Membrane Filtration method ทั้ง 2 วิธีมีรายละเอียดดังนี้

2.2.1 Pour plate method

เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ซึ่งใช้ในการหาปริมาณจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ทั้งที่ใช้ออกซิเจน (aerobic bacteria) และไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic bacteria) โดยปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้อยู่ในช่วง 0.1 – 2.0 มิลลิลิตรวิธีการนี้ต้องทำ Serial dilution ก่อน จึงจะสามารถนับจำนวนจุลินทรีย์ต่อหน่วยปริมาตรได้ แล้วนำตัวอย่างที่ต้องการแยกหรือเพาะเลี้ยงมาผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอุณหภูมิ 44-46 $^{\circ}$C หมุนจานไปมาให้ส่วนผสมเข้ากันดีกับอาหาร ตั้งทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว แล้วจึงกลับจานเพื่อป้องกันไม่ให้น้ำที่ติดบนฝาจานหยดลงมาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มอุณหภูมิที่กำหนด ภายหลังบ่มแล้วโคโลนีของจุลินทรีย์จะเจริญทั้งในและบนอาหารเลี้ยงเชื้อ นับจำนวนจุลินทรีย์ในจานอาหารที่มีจำนวนโคโลนี 30-300 โคโลนี ซึ่งจะทำให้สามารถคำนวณหาเชื้อจุลินทรีย์ต่อมิลลิลิตรหรือต่อกรัมได้ ดังแสดงใน**รูปที่ 1**



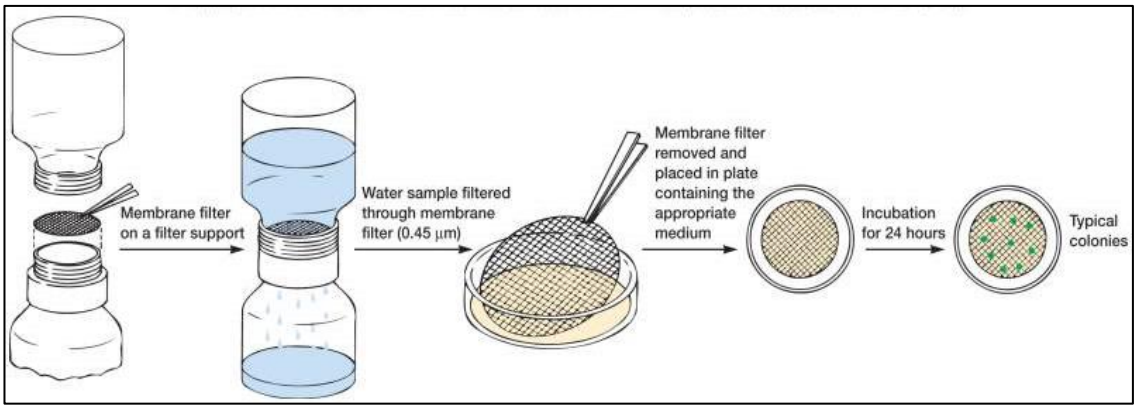
รูปที่ 1 Pour Plate Method

ข้อดีของวิธีนี้ คือ เหมาะสำหรับตัวอย่างที่มีปริมาณมากหรือมีความหนืด

ข้อเสียของวิธีนี้ คือ ใช้เวลามากโคโลนีบางส่วนอยู่ในอาหารวุ้นทำ ให้ไม่สามารถวิเคราะห์ลักษณะของโคโลนี ได้และที่สำคัญจุลินทรีย์ในกลุ่ม psychrophile และ mesophile อาจถูกทำลายด้วยความร้อนจากอาหารวุ้นหลอมเหลวทำให้เกิดการผิดพลาดได้

2.2.2 Membrane Filtration

เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ซึ่งใช้ในการหาปริมาณจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ทั้งที่ใช้ออกซิเจน (aerobic bacteria) และไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic bacteria) โดยใช้กับตัวอย่างปริมาณมาก มีความขุ่นต่ำ และมีปริมาณเชื้อน้อย (<1-10 CFU/mL) โดยปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้อยู่ในช่วง 2-250 มิลลิลิตร จะถูกกรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.45 ไมครอน (แบคทีเรียไม่สามารถผ่านได้) ดังนั้นจุลินทรีย์จะถูกกักอยู่บนกระดาษกรอง นำกระดาษกรองไปวางในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ แล้วนำไปบ่มอุณหภูมิที่กำหนด ภายหลังบ่มแล้วโคโลนีของจุลินทรีย์จะเจริญทั้งบนกระดาษกรอง นับจำนวนจุลินทรีย์ในจานอาหารที่มีจำนวนโคโลนี 20-200 โคโลนี ซึ่งจะทำให้สามารถคำนวณหาเชื้อจุลินทรีย์ต่อมิลลิลิตรตัวอย่าง ดังแสดงใน**รูปที่ 2**



รูปที่ 2 Membrane Filtration Method

2.3 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทดสอบที่ใช้ควบคุมคุณภาพของห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพ [10-19]

วิธีการวิเคราะห์ทดสอบ (Analytical Method) คือ ขั้นตอนอย่างละเอียดที่จำเป็นในการปฏิบัติสำหรับแต่ละการวิเคราะห์ทดสอบ เช่น การเตรียมตัวอย่าง การเตรียมสารมาตรฐานและสารที่ใช้ทดสอบ การใช้เครื่องมือ การสร้างกราฟมาตรฐาน การใช้สูตรสำหรับการคำนวณ เป็นต้น

วิธีการวิเคราะห์ทดสอบที่จะนำมาใช้ภายในแผนกควบคุมคุณภาพต้องผ่านการตรวจสอบความถูกต้องหรือทวนสอบความถูกต้องตามความเหมาะสมของวิธีการวิเคราะห์ทดสอบนั้นก่อนนำมาใช้งานจริง ยกเว้นวิธีการทดสอบทั่วไป (general test) เช่น การวัดค่า pH, conductivity, temperature, water, heavy metal, residue on ignition, loss on drying, melting range เป็นต้น โดยต้องพิจารณาว่าวิธีการวิเคราะห์ทดสอบนั้นเป็นวิธีการวิเคราะห์ทดสอบอะไร มีวัตถุประสงค์อย่างไร ใช้กับ project ไหน และเป็นวิธีมาตรฐานหรือไม่

2.3.1 ถ้าวิธีการวิเคราะห์ทดสอบนั้นไม่ใช่วิธีมาตรฐาน (Non-Compendial method) ต้องผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการทดสอบ (Validation) ก่อนนำมาใช้งาน โดยจะเลือกทดสอบ analytical performance characteristics ในหัวข้อใดนั้นพิจารณาได้จากประเภทของวิธีการวิเคราะห์ทดสอบดังนี้

2.3.1.1 วิธีการวิเคราะห์ทดสอบสำหรับพิสูจน์เอกลักษณ์ (Identification Test)

2.3.1.2 วิธีการวิเคราะห์ทดสอบสำหรับสารเจือปน (Impurity test) ในตัวยาสำคัญหรือผลิตภัณฑ์ยา หรือเป็นวิธีการวิเคราะห์ทางเคมี โดยแบ่งเป็น 2 หัวข้อย่อย ดังนี้

1) การทดสอบหาปริมาณสารเจือปน (Quantitative impurity test) หรือการทดสอบทางเคมีสำหรับหาปริมาณสารเป้าหมายที่ความเข้มข้นใกล้เคียงหรือเท่ากับค่า LOQ

2) การทดสอบหาขีดจำกัดของสารเจือปน (Impurity limit test) หรือวิธีการวิเคราะห์ทดสอบทางเคมีสำหรับหาปริมาณสารเป้าหมายที่สนใจที่ความเข้มข้นต่ำมากๆ อาจมีหรือไม่มีในตัวอย่างนั้น คือ ต้องมีการรายงานว่าตรวจพบหรือตรวจไม่พบในตัวอย่างนั้น

2.3.1.3 วิธีการวิเคราะห์ทดสอบหาปริมาณหรือความแรงของสารออกฤทธิ์หรือการทดสอบการละลายจากวิธีการวัด(Potency/Assay)ของตัวยาสำคัญหรือผลิตภัณฑ์ยาหรือการวิเคราะห์ทางเคมีสำหรับหาปริมาณสารเป้าหมายที่มีความเข้มข้นสูง

2.3.1.4 วิธีการทดสอบเฉพาะ (Specific test) สำหรับใช้ควบคุม drug substance, excipient หรือผลิตภัณฑ์ยา รวมถึงการทดสอบ particle size analysis, droplet distribution, spray pattern, optical rotation, และวิธีการอื่นๆ เช่น DSC, XRD และ Raman spectroscopy เป็นต้น

2.3.1.5 วิธีการวิเคราะห์ทดสอบทางชีววิทยา (Biological Assay)

2.3.1.6 วิธีการวิเคราะห์ทดสอบทางจุลชีววิทยา (Microbiological Method)

1) เป็นวิธีการวิเคราะห์ทดสอบทางจุลชีววิทยาเชิงคุณภาพ (Qualitative microbiological method)

2) เป็นวิธีการวิเคราะห์ทดสอบทางจุลชีววิทยาเชิงปริมาณ (Quantitative microbiological method)

โดยวิธีการวิเคราะห์ทดสอบในแต่ละประเภทข้างต้น มีแนวทางในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ทดสอบ ดังแสดงใน**ตารางที่ 1** (Analytical Method Transfer for Quality Control Division)

ตารางที่ 1 แนวทางในการเลือกทดสอบ analytical performance characteristics ที่จำเป็นต้องดำเนินการ (+) และไม่จำเป็นต้องดำเนินการ (-)

ประเภทวิธีการวิเคราะห์	1.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์	1.2 การทดสอบสารเจือปน		1.3 การหาปริมาณหรือความแรงของสารออกฤทธิ์	1.4 การทดสอบเฉพาะ Specific test
คุณลักษณะเฉพาะ		1.2.1 การหาปริมาณ	1.2.2 การหาขีดจำกัด		
ความแม่น (Accuracy)	-	+	-	+	+(4)
ความเที่ยง (Precision)	-		-		+(4)
- การทวนซ้ำได้ (Repeatability)	-	+	-	+	+(4)
-Intermediate Precision	-	+(1)	-	+(1)	+(4)
ความจำเพาะ (Specificity/Selectivity)	+(2)	+	+	+(5)	-
ขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD)	-	- (3)	+	-	-
ขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณ (LOQ)	-	+	-	-	-
ความเป็นเส้นตรง (Linearity)	-	+	-	+	-
พิสัย (Range)	-	+	-	+	-
ความคงทน (Robustness)	-	+	-(3)	+	+

ประเภทวิธีการวิเคราะห์	1.5 การทดสอบทางชีววิทยา (Biological Assay)	1.6 การทดสอบทางจุลชีววิทยา (Microbiological Method)	
คุณลักษณะเฉพาะ		1.6.1 การทดสอบเชิงคุณภาพ	1.6.2 การทดสอบเชิงปริมาณ
ความแม่น (Accuracy)	+	-	+
ความเที่ยง (Precision)		-	+
- การทวนซ้ำได้ (Repeatability)	-	+	+
- Intermediate Precision	+	+	+

ประเภทวิธีการวิเคราะห์ / คุณลักษณะเฉพาะ	1.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์	1.2 การทดสอบสารเจือปน		1.3 การหาปริมาณหรือความแรงของสารออกฤทธิ์	1.4 การทดสอบเฉพาะ Specific test
		1.2.1 การหาปริมาณ	1.2.2 การหาขีดจำกัด		
ความจำเพาะ (Specificity/Selectivity)(2)	+		+		+
ขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD)	-		+		+
ขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณ (LOQ)	-		-		+
ความเป็นเส้นตรง (Linearity)	-		-		+
พิสัย (Range)	+		-		+
ความคงทน (Robustness)	-(3)		+		+

หมายเหตุ (1) หัวข้อ Intermediate precision ไม่จำเป็นต้องทำในกรณีที่ได้มีการทดสอบความทำซ้ำ (reproducibility) แล้ว, (2) การขาดความจำเพาะของวิธีการวิเคราะห์หนึ่งวิธี สามารถทดแทนโดยวิธีการวิเคราะห์สนับสนุนอื่นๆ, (3) อาจจำเป็นในบางกรณี, (4) อาจไม่จำเป็นในบางกรณี, (5) การขาดความจำเพาะของวิธีการหาปริมาณสารออกฤทธิ์อาจถูกชดเชยได้ด้วยการทดสอบหาปริมาณสารเจือปน

อย่างไรก็ตามการจะเลือกทดสอบ analytical performance characteristics ในหัวข้อใดขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของเทคนิคการวิเคราะห์และวิธีการวิเคราะห์ทดสอบนั้น ซึ่งต้องอาศัยการตัดสินใจบนพื้นฐานความรู้ทางวิทยาศาสตร์

2.3.2 ถ้าวิธีการวิเคราะห์ทดสอบนั้นเป็นวิธีมาตรฐาน (Compendial method) ต้องผ่านการทวนสอบความถูกต้องของวิธีการทดสอบก่อนนำมาใช้งาน (Verification) โดยทดสอบ analytical performance characteristics อย่างน้อยในหัวข้อเรื่อง ความเป็นเส้นตรง, ความแม่น และความเที่ยง

2.3.3 บันทึกรายละเอียดดังนี้

AMV-XXX-YYYY-ZZZ

เมื่อ XXX คือ ชื่อโครงการที่ต้องการใช้วิธีการวิเคราะห์ทดสอบนั้น เช่น WS, MM, PP
YYYY คือ ปี ค.ศ.ที่รับวิธีการวิเคราะห์ทดสอบเข้ามา เช่น 2013, 2014, 2015
ZZZ คือ ลำดับวิธีการวิเคราะห์ทดสอบที่รับเข้ามาภายในปี ค.ศ. นั้น เช่น 000, 001

2.3.4 กรณีที่วิธีการวิเคราะห์ทดสอบนั้นต้องตรวจสอบหรือทวนสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ทดสอบ หัวหน้าแผนกควบคุมคุณภาพต้องมอบหมายให้พนักงานแผนกควบคุมคุณภาพที่รับผิดชอบการวิเคราะห์ทดสอบในแต่ละพารามิเตอร์ และจัดทำโปรโตคอลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ทดสอบโดยมีแนวทางในการศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของความสามารถของวิธีการวิเคราะห์ทดสอบในหัวข้อต่างๆ ดังนี้

2.3.4.1 ความจำเพาะ (Specificity/Selectivity)

วิธีการหาความจำเพาะเจาะจงของวิธีการวิเคราะห์ทดสอบทั่วไป คือ ต้องพิสูจน์ให้ได้ว่าวิธีการวิเคราะห์ทดสอบนั้นสามารถแยกสารเป้าหมายที่เราสนใจออกจากสารที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงหรือมีความสัมพันธ์กันหรือจากสารรบกวนต่างๆ ที่มีอยู่ในตัวอย่างได้ โดยมีแนวทางในการทดสอบดังนี้

วิธีที่ 1 เติมสารชนิดต่าง ๆ ที่คาดว่าสามารถเจือปนหรือเกิดขึ้นได้ระหว่างกระบวนการผลิต และ/หรือมีอิทธิพลในการรบกวนสารเป้าหมายที่สนใจมากที่สุด เช่น สารที่มีลักษณะสูตรโครงสร้างใกล้เคียงหรือสัมพันธ์กันกับสารเป้าหมาย ได้แก่ เมตาบอไลทส์ สารอนุพันธ์ เป็นต้น ลงในสารเป้าหมายมาตรฐานในปริมาณที่มากพอที่อาจก่อการรบกวนการยืนยันชนิดและความเข้มข้นของสารเป้าหมายที่สนใจ เพื่อทดสอบดูว่าวิธีทดสอบสามารถแยกสารเป้าหมายได้ดีเพียงใดและสิ่งรบกวนจะส่งผลต่อการวัดสารเป้าหมายที่ปริมาณมากน้อยเพียงใด

วิธีที่ 2 เปรียบเทียบผลของการวัดตัวอย่างที่ไม่มีสารเป้าหมาย (sample blank) กับตัวอย่างที่มีสารเป้าหมายโดยการเติมสารมาตรฐานเป้าหมายลงไป (spiked sample) หรือสำหรับ separation technique อาจใช้ตัวอย่างที่มีสารเป้าหมายอยู่ แล้วพิจารณาดูว่าช่วงเวลาที่สัญญาณของสารเป้าหมายปรากฏ (retention time) มีสัญญาณของสารอื่นปรากฏหรือไม่ มากน้อยเพียงใด

หากวิธีการวิเคราะห์ทดสอบใดไม่มีการรบกวนจากสารเจือปนที่มีในตัวอย่างทุกระดับความเข้มข้น แสดงว่าวิธีนั้นมีความจำเพาะสูง เช่น การทดสอบด้วยเครื่อง chromatography อาจมีความจำเพาะสูง เนื่องจากสามารถแยกสารเป้าหมายออกจากสารเจือปนได้อย่างมีประสิทธิภาพด้วยคอลัมน์ ในขณะที่การทดสอบด้วยเทคนิคทางการวัดสี (colorimetry) อาจมีความจำเพาะต่ำเนื่องจากโอกาสที่จะมีธาตุรบกวนอื่นๆ เจือปนอยู่ในตัวอย่างสูง ซึ่งธาตุเหล่านี้อาจทำปฏิกิริยากับ reagent แล้วเกิดสีร่วมกับสารเป้าหมายได้ ในกรณีที่วิธีการวิเคราะห์ทดสอบนั้นไม่จำเพาะสำหรับสารเป้าหมายเพียงอย่างเดียวหรือไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสารเป้าหมายกับสารเจือปนในตัวอย่างได้อย่างสมบูรณ์ ควรใช้วิธีการวิเคราะห์อื่นเข้ามาช่วยในการประเมินผล เพื่อแยกความแตกต่างให้อยู่ในระดับที่จำเป็น

สำหรับการวิเคราะห์ตัวยาสำคัญหรือสารออกฤทธิ์ทางยาหรือสารเจือปนในตัวยา ต้องทำในระหว่างการทดสอบความถูกต้องของการพิสูจน์เอกลักษณ์ การหาสารเจือปน การวิเคราะห์หาปริมาณ และการทดสอบเฉพาะ ดังนี้

1) การพิสูจน์เอกลักษณ์ (identification test)

การทดสอบเอกลักษณ์ของสารเป้าหมายในตัวอย่างต้องสามารถแยกสารประกอบที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกันออกจากกันได้ โดยการแยกความแตกต่างของวิธีใดๆ อาจยืนยันได้โดยผลการวิเคราะห์ทดสอบที่เป็นบวกของตัวอย่างที่มีสารเป้าหมายอยู่และผลการวิเคราะห์ทดสอบที่เป็นลบของตัวอย่างที่ไม่มีสารเป้าหมายอยู่ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานอ้างอิง โดยทั่วไปเทคนิคการวิเคราะห์ที่นิยมใช้ในการทดสอบการพิสูจน์เอกลักษณ์ ได้แก่ Infrared spectroscopy (IR), Differential scanning calorimeter (DSC), X-ray diffraction (XRD), Nuclear magnetic resonance (NMR), Raman spectroscopy, chromatography และ Mass spectrometry เป็นต้น โดยการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับสารมาตรฐานอ้างอิง เช่น spectrum profile เป็นต้น การพิสูจน์เอกลักษณ์อาจนำมาใช้กับสารที่มีโครงสร้างทางเคมีที่เหมือนหรือสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับสารเป้าหมายที่สนใจ เพื่อยืนยันว่าสารเหล่านี้ไม่ได้ให้ผลตอบสนองที่เป็นบวก การเลือกสารที่มีแนวโน้มว่าจะรบกวนการวิเคราะห์เช่นนั้น ควรอยู่บนพื้นฐานของการตัดสินใจทางวิทยาศาสตร์ที่ดีด้วยการพิจารณาว่าสารรบกวนดังกล่าวอาจสามารถเกิดขึ้นได้ระหว่างกระบวนการผลิต การ formulations หรือเกิดจากการสลายตัว เป็นต้น

2) การหาปริมาณความแรงของสารออกฤทธิ์และการทดสอบสารเจือปน (Assay and Impurity Tests)

การหาปริมาณความแรงของสารออกฤทธิ์และการทดสอบสารเจือปนด้วยวิธีทางโครมาโท กราฟฟี่ สามารถนำโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์มาใช้แสดงความจำเพาะได้ และควรระบุรายละเอียดส่วนประกอบต่างๆ ในโครมาโทแกรมอย่างเหมาะสม โดยความจำเพาะสามารถพิจารณาได้จากค่าความสามารถในการแยก (resolution) พีคสารเป้าหมายออกจากพีคสารอื่นๆ ที่มีอยู่ในตัวอย่างซึ่งถูกชะออกมาในเวลาใกล้เคียงกัน การพิจารณานี้สามารถประยุกต์ใช้กับเทคนิคการแยกอื่นๆ ได้

ในกรณีที่วิธีการวิเคราะห์ทดสอบไม่จำเพาะเจาะจงต่อสารเป้าหมาย ควรนำวิธีการวิเคราะห์อื่นเข้ามาช่วยเพื่อให้แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะของวิธี เช่น ถ้าต้องการใช้วิธีการไทเทรตในการหาปริมาณตัวยาสำคัญที่ปล่อยออกมาจากผลิตภัณฑ์ยา อาจจำเป็นต้องมีการทดสอบปริมาณสารเจือปนในผลิตภัณฑ์ยาร่วมด้วย

การหาความจำเพาะของวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณ/ความแรงของสารเป้าหมายและการทดสอบสารเจือปน สามารถทำได้ดังนี้

2.1) กรณีที่สามารถหาสารเจือปนได้ (Impurities are available)

สำหรับวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณ/ความแรงของสารเป้าหมาย ควรแสดงให้เห็นว่าวิธีการวิเคราะห์ทดสอบที่ใช้สามารถหาปริมาณสารเป้าหมายได้ถูกต้องในขณะที่มีสารเจือปนอยู่ด้วย โดยการเติมสารเจือปนที่อาจมีได้ในตัวอย่าง (impurity standard) ลงไปในสารมาตรฐานเป้าหมาย (pure active substance) ในปริมาณที่เหมาะสม เพื่อแสดงให้เห็นว่า สารเจือปนที่มีอยู่ดังกล่าวไม่มีผลต่อการหาปริมาณของสารมาตรฐานเป้าหมาย โดยเปรียบเทียบปริมาณสารเป้าหมายที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างที่มีการเติมสารเจือปนลงไป (spiked sample) กับตัวอย่างที่ไม่มีการเติมสารเจือปน (un-spiked sample)

สำหรับวิธีการทดสอบหาสารเจือปน ควรแสดงให้เห็นว่าวิธีการวิเคราะห์ทดสอบที่ใช้สามารถแยกสารเจือปนออกจากสารอื่นๆ ที่มีอยู่ในตัวอย่างได้ โดยการเติมสารเจือปนที่อาจมีได้ในตัวอย่าง (impurity standard) ลงไปในตัวอย่าง (active substance or product) ในปริมาณที่เหมาะสม แล้วพิจารณาว่าสารเจือปนที่เติมลงไปนั้น สามารถแยกออกจากสารประกอบอื่นๆ ที่มีอยู่ใน sample matrix ได้หรือไม่

2.2) กรณีที่ไม่สามารถหาสารเจือปนได้ (Impurities are not available)

ความจำเพาะของวิธีสามารถทำได้โดยเก็บตัวอย่างภายใต้สภาวะเครียด (Stress condition) เช่น แสง ความร้อน ความชื้น กรด/ด่าง hydrolysis และ oxidation เป็นต้น แล้วนำไปทดสอบ

สำหรับวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณ/ความแรงของสารเป้าหมาย ทำได้โดยเปรียบเทียบปริมาณสารเป้าหมายของตัวอย่างที่ได้จากวิธีการวิเคราะห์ที่เลือกใช้กับวิธีมาตรฐานอื่นๆ (second well-characterized procedure) เช่น วิธีในตำรายาหรือวิธีที่ได้รับการตรวจสอบความถูกต้องแล้ว

สำหรับวิธีการทดสอบหาสารเจือปน ทำได้โดยเปรียบเทียบ impurity profiles ของตัวอย่างที่ได้จากวิธีการวิเคราะห์ที่เลือกใช้กับวิธีมาตรฐานอื่นๆ เช่น วิธีในตำรายาหรือวิธีที่ได้รับการตรวจสอบความถูกต้องแล้ว

บางกรณีการทดสอบ peak purity เช่น การทดสอบโดยวิธี diode array และ mass spectrometry อาจเป็นประโยชน์ในการแสดงให้เห็นว่าพีคของสารเป้าหมายบน chromatogram นั้นเป็นพีคที่เกิดขึ้นจากสารเป้าหมายเท่านั้นโดยไม่มีพีคของสารอื่นปนอยู่

2.3.4.2 ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

การประเมินความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงควรทำอยู่ในช่วงพิสัยของวิธีการวิเคราะห์ สามารถทำได้โดยการวิเคราะห์สารมาตรฐานเป้าหมายที่ได้จากการเจือจาง standard stock solution ที่ความเข้นข้นต่างๆ อย่างน้อย 5 ความเข้มข้น จากนั้นนำผลที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกับสัญญาณที่ตรวจวัด (signal) ได้

การหาความเป็นเส้นตรงสามารถทำได้ 2 วิธี

1) System linearity หมายถึง การทดสอบโดยการตรวจวัดสารมาตรฐานอ้างอิงที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของมาตรฐานกับสัญญาณที่ตรวจวัดได้

2) Method linearity หมายถึง การทดสอบตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานเป้าหมายลงไป (Spiked sample) โดยจะแสดงความสามารถของวิธีทดสอบที่ให้ผลเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารเป้าหมายที่มีอยู่จริงในตัวอย่าง วิธีนี้สามารถทำได้โดยเติมสารมาตรฐานที่ความเข้นข้นต่างๆ ลงในตัวอย่างในปริมาณที่เท่ากัน หรือเติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นเดียวกันลงในตัวอย่างในปริมาณที่แตกต่างกัน

ทั้งนี้การจะเลือกใช้วิธีใดนั้นขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของการวิเคราะห์ทดสอบ

การประเมินช่วงความเป็นเส้นตรงสามารถประเมินได้ด้วยการตรวจสอบทางการมองเห็นจากกราฟความสัมพันธ์ข้างต้น หรือถ้าผลการทดสอบมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงสามารถประเมินผลได้ด้วยวิธีทางสถิติ เช่น การคำนวณ regression line โดยวิธี least squares ในบางกรณีเพื่อให้ได้ความเป็นเส้นตรงต้องนำข้อมูลที่ได้มาดัดแปลงทางคณิตศาสตร์ก่อนการหา regression line และต้องมีการบันทึกค่า Correlation coefficient (โดยทั่วไปควร > 0.99), y-intercept, slope of the regression line, residual sum of squares และค่าเบี่ยงเบนของแต่ละจุดความเข้มข้นรวมทั้งกราฟความสัมพันธ์ดังกล่าวด้วย

บางกรณีหากวิธีการวิเคราะห์ทดสอบมีสภาพไวเปลี่ยนแปลงในแต่ละวัน วิธีทดสอบดังกล่าวต้องทำการตรวจสอบสภาพไวโดยพิจารณาได้จากค่า slope ของ Linearity

สำหรับการวิเคราะห์ทดสอบที่ไม่สามารถหาช่วงความเป็นตรงได้หลังจากการ transformation เช่น วิธี immunoassay ควรมีการอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่ตรวจวัดได้จากการวิเคราะห์กับความเข้มข้นของสารเป้าหมายในตัวอย่างอย่างเหมาะสม

2.3.4.3 พิสัย (Range)

การหาค่าพิสัยของวิธีการวิเคราะห์ทดสอบเป็นการแสดงให้เห็นถึงระดับความเข้มข้นและ/หรือปริมาณสารเป้าหมายต่ำสุดและสูงสุดของวิธีการวิเคราะห์ทดสอบนั้น ซึ่งให้ค่าความเป็นเส้นตรง ความแม่น และความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นและ/หรือปริมาณสารเป้าหมายอยู่ในช่วงพิสัยที่กำหนด โดยทั่วไปสามารถหาได้จากการหาช่วงความเป็นเส้นตรง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับจุดมุ่งหมายของวิธีการวิเคราะห์ทดสอบนั้น

การกำหนดค่าพิสัยของวิธีการวิเคราะห์ทดสอบ สามารถทำได้ดังนี้

1) สำหรับการหาปริมาณตัวยาสำคัญหรือผลิตภัณฑ์ยา ปกติกำหนดพิสัยในช่วง 80 ถึง 120 เปอร์เซ็นต์ของความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ

2) สำหรับการทดสอบ content uniformity ปกติกำหนดพิสัยในช่วง 70 ถึง 130 เปอร์เซ็นต์ ถ้าพิสัยที่ทดสอบไม่กว้างพอ สามารถปรับได้ตามพื้นฐานธรรมชาติของยาเตรียม

3) สำหรับการหาปริมาณสารเจือปน กำหนดค่าพิสัยจากระดับของสารเจือปนที่กำหนด ถึง 120 เปอร์เซ็นต์ของข้อกำหนดสำหรับสารเจือปนที่มีความแรงไม่ปกติหรือก่อพิษได้หรือไม่สามารถคาดผลทางเภสัชวิทยาได้ ขีดจำกัดการตรวจพบเชิงปริมาณควรเทียบเท่ากับระดับซึ่งสารเจือปนต้องถูกควบคุม ถ้ามีการหาปริมาณและความบริสุทธิ์ร่วมกันในวิธีการทดสอบเดียวกันและใช้เพียง 100 เปอร์เซ็นต์ของสารมาตรฐาน ความเป็นเส้นตรงควรครอบคลุมพิสัยจากระดับสารเจือปนที่รายงานไว้ 120 เปอร์เซ็นต์ของข้อกำหนดของการหาปริมาณ

4) สำหรับการวิเคราะห์อื่นๆ ควรกำหนดช่วงพิสัยตามความเหมาะสมบนพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ เช่น กำหนดให้ครอบคลุมค่าเกณฑ์การยอมรับสูงสุดและต่ำสุดของการวิเคราะห์ทดสอบนั้น อย่างไรก็ตามทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการวิเคราะห์ทดสอบนั้นๆ ด้วย

2.3.4.4 ความแม่น (Accuracy)

การหาค่าความแม่นควรทำอยู่ในช่วงพิสัยที่กำหนดของวิธีการวิเคราะห์ทดสอบ โดยวิเคราะห์อย่างน้อย 9 ซ้ำ ที่ความเข้มข้น 3 ค่าครอบคลุมช่วงพิสัย (ปกตินิยมทดสอบที่ค่าความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูงของช่วงพิสัย) หรือระดับความเข้มข้น LOQ (หรือ 0.5 เท่า), 1.0 เท่า และ1.5 เท่า (หรือ 2.0 เท่า) ของค่าความเข้มข้นที่กำหนด (target concentration) ทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ (บางกรณีอาจทำถึง 10 ซ้ำ)

การหาความแม่นสามารถทำได้ 3 วิธี ดังนี้

1) การทดสอบกับวัสดุอ้างอิงที่เหมาะสม (Certified reference material; CRM) ซึ่งทราบค่าสารเป้าหมายที่แน่นอน จากนั้นเปรียบเทียบค่าที่วัดได้จากการวิเคราะห์กับค่ามาตรฐานที่วัสดุอ้างอิงกำหนดด้วยการคำนวณทางสถิติ เช่น t-test เป็นต้น

2) การทดสอบเปรียบเทียบกับวิธีการวิเคราะห์มาตรฐานอื่นที่ผ่านการ validate (reference method/standard method) ซึ่งระบุผลของความเที่ยงและความแม่นไว้แล้ว จากนั้นเปรียบเทียบค่าที่วัดได้จากการวิเคราะห์ทั้งสองวิธีด้วยการคำนวณทางสถิติ เช่น t-test, F-test, least squares regression เป็นต้น

จากสองวิธีข้างต้นอาจประเมินค่าความแม่นด้วยวิธีทางสถิติได้ดังนี้

วิธีที่ 1 ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง มีค่าอยู่ในช่วงของค่ามาตรฐานอ้างอิง เช่น ค่ามาตรฐานอ้างอิง มีค่า 40.00±0.15 เปอร์เซ็นต์ ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวิเคราะห์ทดสอบต้องอยู่ในช่วง 39.85 ถึง 40.15 เปอร์เซ็นต์

วิธีที่ 2 ใช้หลักสถิติทดสอบค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดสอบเปรียบเทียบกับค่าอ้างอิงว่าเป็นไปตามเกณฑ์หรือไม่ โดยใช้ t-test จากสูตร ดังนี้

$$t_{cal} = \left(\overline{X} - \mu\right)\frac{\sqrt{n}}{s}$$

เมื่อ t_{cal} = ค่า t ที่ได้จากการคำนวณ

$\overline{X}$ = ค่าเฉลี่ย

μ = ค่าอ้างอิง

s = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation)

n = จำนวนครั้งที่วิเคราะห์

นำค่า t_{cal} ที่คำนวณได้ไปเปรียบเทียบกับค่า t_{crit} จากตาราง ซึ่งต้องระบุระดับความเชื่อมั่นที่เหมาะสม (ปกติทั่วไปใช้ที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์)โดยมีเกณฑ์การยอมรับคือ ถ้าค่า t_{cal} น้อยกว่า t_{crit} แสดงว่าค่าเฉลี่ยของการวิเคราะห์ทดสอบไม่แตกต่างจากค่าอ้างอิงอย่างมีนัยสำคัญ

วิธีที่ 3 คำนวณค่าแตกต่างสัมบูรณ์ (ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวัดกับค่ารับรอง) และค่าความไม่แน่นอนขยายของความแตกต่างระหว่างผลการวัดกับค่าอ้างอิงรับรอง โดยมีขั้นตอนดังนี้

- คำนวณค่าแตกต่างสัมบูรณ์ ได้จากสมการ

$$\Delta_m = \left|C_m - C_{CRM}\right|$$

เมื่อ Δ_m = ค่าแตกต่างสัมบูรณ์

C_m = ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวัด

C_{CRM} = ค่าอ้างอิงรับรอง

- ประมาณค่าความไม่แน่นอนของความแตกต่างระหว่างผลการวัดกับค่าอ้างอิงรับรอง ซึ่งมาจากความไม่แน่นอนของการวัด และค่าความไม่แน่นอนของค่าอ้างอิงรับรอง ดังนี้

$$u_\Delta = \sqrt{{u_m}^2 + {u_{CRM}}^2}$$

เมื่อ u_Δ = ความไม่แน่นอนของความแตกต่างระหว่างผลการวัดกับค่าอ้างอิงรับรอง

u_m = ความไม่แน่นอนของการวัด

u_{CRM} = ความไม่แน่นอนของค่าอ้างอิงรับรอง

- ขยายค่าความไม่แน่นอนของความแตกต่างระหว่างผลการวัดกับค่าอ้างอิงรับรอง ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์โดยคูณด้วย coverage factor (k) = 2 ดังสมการ

$$U_{\Delta} = 2 \times u_{\Delta}$$

เมื่อ U_{Δ} = ความไม่แน่นอนขยายของความแตกต่างระหว่างผลการวัดกับค่าอ้างอิงรับรอง

เกณฑ์การยอมรับ คือ ถ้าค่าความแตกต่างสัมบูรณ์มีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับความไม่แน่นอนขยายของความแตกต่างระหว่างผลการวัดกับค่าอ้างอิงรับรอง แสดงว่าการทดสอบมีความแม่น ไม่มี bias

3) เปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานเป้าหมายที่ทราบปริมาณที่แน่นอนกับตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสารมาตรฐานเป้าหมาย จากนั้นคำนวณออกมาในรูป %recovery ดังสมการ

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(C1 - C2) \times 100}{C3}$$

เมื่อ C1 = ความเข้มข้นของ spiked sample
C2 = ความเข้มข้นของตัวอย่าง un-spiked sample
C3 = ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่าง

โดยเกณฑ์การยอมรับ %recovery ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของแต่ละวิธี ยกตัวอย่างดังแสดงใน**ตารางที่ 2**

ตารางที่ 2 เกณฑ์การยอมรับ %Recovery ตามมาตรฐานทางอาหารและยา AOAC (2002)

% Analyte	Analyte ratio	Unit	% Mean recovery
100	1	100%	98 – 102
10	0.1	10%	98 – 102
1	0.01	1%	97 – 103
0.1	0.001	0.10%	95 – 105
0.01	0.0001	100 ppm	90 – 107
0.001	0.00001	10 ppm	80 – 110
0.0001	0.000001	1ppm	80 – 110
0.00001	0.0000001	100 ppb	80 – 110
0.000001	0.00000001	10 ppb	60 – 115
0.0000001	0.000000001	1 ppb	40 – 120

เกณฑ์การยอมรับตามตารางข้างต้น เป็นเพียงแนวทางเท่านั้น ห้องปฏิบัติการอาจปรับตามความเหมาะสม หรือตามค่าอ้างอิงเฉพาะของการทดสอบแต่ละด้าน เกณฑ์ค่ากลางๆ ทั่วไป

แนะนำให้อยู่ที่ 80 ถึง 120 เปอร์เซ็นต์ และถ้าตรวจสอบแล้วได้ค่าต่ำกว่า 60 เปอร์เซ็นต์หรือสูงกว่า 120 เปอร์เซ็นต์ควรปรับปรุงวิธีใหม่

2.3.4.5 ความเที่ยง (Precision)

การหาค่าความเที่ยงสามารถพิจารณาได้จากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation; s) หรือค่าความแปรปรวน (Variance; s^2) หรือสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of Variation; CV) หรือค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative Standard Deviation; RSD) ของการวิเคราะห์ทดสอบนั้น บางครั้งสามารถหาค่าความเที่ยงได้จากการทดสอบหาค่าความแม่น

การหาค่าความเที่ยงสามารถแบ่งระดับได้ดังนี้

1) การทวนซ้ำได้ (repeatability) เป็นการหาค่าความเที่ยงที่ได้จากการทำการทดลองในห้องปฏิบัติการเดียวกัน เครื่องมือเดียวกัน วิธีการเดียวกัน ผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน ภายในระยะเวลาใกล้เคียงกัน ซึ่งสามารถทำได้โดย

1.1) การทำซ้ำอย่างน้อย 9 ซ้ำ ที่ความเข้มข้น 3 ค่าครอบคลุมช่วงพิสัย (ปกตินิยมทดสอบที่ค่าความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูงของช่วงพิสัย) ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

1.2) ทำซ้ำอย่างน้อย 6 ซ้ำที่ 100 เปอร์เซ็นต์ของความเข้มข้นที่ทดสอบ

2) Intermediate precision เป็นการหาค่าความเที่ยงที่ได้จากการทำการทดลองในห้องปฏิบัติการเดียวกัน เครื่องมือเดียวกัน วิธีการเดียวกัน ผู้วิเคราะห์ต่างกัน และ/หรือ ระยะเวลาต่างกัน (ทำคนละวัน) เพื่อให้สามารถครอบคลุมการเปลี่ยนแปลงที่อาจเกิดขึ้นในสภาวะการทำงานจริง

3) ความทำซ้ำได้ (reproducibility) เป็นการหาค่าความเที่ยงที่ได้จากการวัดตัวอย่างเดียวกันแต่ทำการทดลองคนละห้องปฏิบัติการ เครื่องมือต่างกัน ผู้วิเคราะห์ต่างกัน ภายใต้ระยะเวลาต่างกัน ส่วนใหญ่จะเรียกว่า proficiency test

การประเมินผลค่าความเที่ยงอาจทำได้โดย

วิธีที่ 1 เกณฑ์การยอมรับที่ถูกกำหนดไว้แล้ว ได้แก่ ข้อกำหนดตามกฎหมาย ข้อกำหนดของลูกค้า ตามวิธีมาตรฐานกำหนด เช่น ค่า Repeatability ของห้องปฏิบัติการในแต่ละความเข้มข้น ควรมีค่าน้อยกว่าหรือใกล้เคียงกับค่า Reproducibility ที่วิธีมาตรฐานกำหนด หรือการทดสอบทางเคมีโดยทั่วไปนิยมให้ค่า RSD < 2 เปอร์เซ็นต์

วิธีที่ 2 การประเมินผลตาม Horwitz equation โดยเปรียบเทียบค่า RSD จากการทดสอบซ้ำ (Experimental RSD) กับค่า RSD จากการคำนวณในสูตรของ Horwitz equation (Predicted RSD) ดังนี้

กรณีวัดซ้ำจากห้องปฏิบัติการเดียวกัน; Predicted $RSD_r = \pm 0.67 \times 2^{(1-0.5\log C)}$

กรณีวัดซ้ำจากหลายห้องปฏิบัติการ; Predicted $RSD_R = \pm 2^{(1-0.5\log C)}$

เมื่อ C = Concentration ratio of analyte in the sample ยกตัวอย่าง เช่น ความเข้มข้นของสารเป้าหมาย 500 g/kg ดังนั้น C = 500/1000 = 0.5 หรือ ความเข้มข้นของสารเป้าหมาย 100 mg/kg ดังนั้น C = 0.1/1000 = 0.0001 เป็นต้น

เกณฑ์การยอมรับความเที่ยงตาม Horwitz equation พิจารณาดังนี้

- ค่า RSD จากการทดสอบ ต้องน้อยกว่า Predicted RSD จากสูตรในการคำนวณตามสมการ Horwitz equation

- ถ้า RSD จากการทดสอบ มากกว่า Predicted RSD จากสูตรในการคำนวณ ให้หาค่า HOrRAT จากสูตร ดังนี้

$$\text{HOrRAT} = \text{HoR} = \frac{\text{Experimental RSD}}{\text{Predicted RSD}}$$

เมื่อ ค่า HORRAT ที่ยอมรับได้ต้องอยู่ระหว่าง 0.5-1.5
AOAC ยอมรับ HORRAT น้อยกว่าหรือเท่ากับ 2
EU, Codex ยอมรับ HORRAT น้อยกว่า 2

2.3.4.6 ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD)

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบมีความจำเป็นในกรณีที่สารเป้าหมายที่สนใจมีปริมาณความเข้มข้นต่ำมากๆ และมีการรายงานว่า ตรวจพบหรือไม่พบในตัวอย่าง การหาขีดจำกัดของการตรวจพบขึ้นอยู่กับวิธีการวิเคราะห์ทดสอบเป็นวิธีที่ใช้เครื่องมือหรือไม่ต้องใช้เครื่องมือในการตรวจวัด สามารถทำได้โดย

1) การประเมินด้วยการมองเห็น (Based on Visual Evaluation)

การประเมินด้วยการมองเห็นสามารถใช้ได้กับวิธีการวิเคราะห์ทดสอบที่ไม่ได้มีการใช้เครื่องมือเป็นส่วนใหญ่ โดยการวัดตัวอย่างที่ทราบความเข้มข้นต่ำมากๆ เช่น การตรวจวัดการเจือปนของสีในสารละลายด้วยการมองเห็น โดยอาจมีการเติมสีที่ทราบความเข้มข้นลงในตัวอย่างแล้วหาความเข้มข้นของสีต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ด้วยสายตา เป็นต้น

2) การประเมินด้วยวิธี signal-to-noise

การประเมินด้วยวิธี signal-to-noise สามารถทำได้ในกรณีที่วิธีการวิเคราะห์นั้นแสดงค่า baseline noise โดยเปรียบเทียบสัญญาณที่วัดได้จากตัวอย่างที่มีสารเป้าหมายอยู่ในระดับปริมาณต่ำ กับสัญญาณของ sample blank ซึ่งอัตราส่วนของสัญญาณของตัวอย่างที่มีสารเป้าหมายอยู่ต่อสัญญาณของ sample blank (signal-to-noise) ต้องมีค่าเท่ากับ 3 หรือ 2 : 1

3) การประเมินค่าจาก standard deviation และค่า slope

การประเมินด้วยวิธีนี้สามารถทำได้หลายวิธี ที่นิยมคือการวัดแบลงค์ของตัวอย่าง (sample blank or matrix blank) หรือตัวอย่างที่มีสารเป้าหมายที่สนใจในปริมาณความเข้มข้นที่ต่ำมากๆ อย่างน้อย 7 - 10 ครั้ง จากนั้นคำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และประมาณค่า

ขีดจำกัดในการตรวจพบจากค่าที่คำนวณได้ อย่างไรก็ตามในกระบวนการวัดที่ซับซ้อนหรือมีเนื้อสารหลากหลายที่ไม่สามารถวัดซ้ำถึง 10 ครั้งได้ ควรวัดซ้ำอย่างน้อย 4 ครั้ง

3.1) กรณีที่ sample blank สามารถอ่านค่าได้: ให้ทดสอบ reagent blank (X_1) และ sample blank (X_2) อย่างน้อย 10 ซ้ำ คำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากนั้นคำนวณหาค่า LOD ได้จากสูตร

$$LOD = (X_2 - X_1) + 3SD$$

เมื่อ X : ค่าสัญญาณเฉลี่ยที่ได้จากการวัดซ้ำ

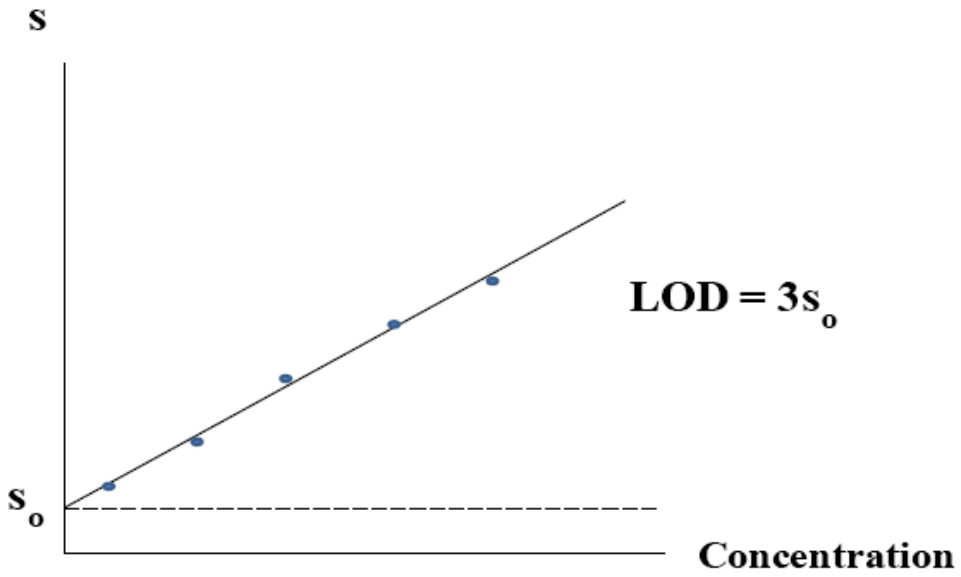
SD : ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นเฉลี่ยที่ได้จากการวัด sample blank และ reagent blank

3.2) กรณีที่ sample blank ไม่มีค่า: ให้ทดสอบ spiked sample blank โดยการเติมสารมาตรฐานให้มีความเข้มข้นที่ใกล้กับค่า LOD ทำการทดสอบอย่างน้อย 7 - 10 ซ้ำ คำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานโดยไม่ต้องหาค่าเฉลี่ย เนื่องจากเป็นสารมาตรฐานที่เติมลงไป และคำนวณหาค่า LOD ได้จากสูตร

$$LOD = 3SD$$

เมื่อ SD : ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นเฉลี่ยที่ได้จากการวัด

3.3) การทดสอบ spiked sample blank ที่ความเข้มข้นต่ำๆ ในช่วง LOD อย่างน้อย 3 ความเข้มข้น ทดสอบแต่ละความเข้มข้นอย่างน้อย 7 - 10 ครั้ง คำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานและหาค่าเฉลี่ยของแต่ละความเข้มข้น เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานกับความเข้มข้นเฉลี่ยแต่ละจุดลากเส้นตัดแกน y ดังแสงใน**รูปที่ 3**



รูปที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานกับความเข้มข้นเฉลี่ยแต่ละจุดลากเส้นตัดแกน y (LOD)

หรือวัด sample blank หลายๆ ครั้งแล้วหาค่าเฉลี่ยของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการวัด

คำนวณหาค่า LOD ได้จากสูตร

$$LOD = 3.3\ \sigma/S$$

เมื่อ σ : ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากจุดตัดแกน y (S_0) หรืออาจเป็นค่าเฉลี่ยของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการวัด sample blank

S : slope ของ calibration curve

เมื่อคำนวณหาค่า LOD แล้วต้องตรวจยืนยันค่า LOD ที่คำนวณได้อีกครั้ง โดยทดสอบกับ sample blank ที่เติมสารเป้าหมายที่ความเข้มข้นต่างๆ ใกล้ค่า LOD แต่ละความเข้มข้นทดสอบอย่างน้อย 10 ซ้ำ โดยวัดแบบสุ่ม เกณฑ์การยอมรับ คือ ความเข้มข้นใดที่สามารถตรวจพบสารที่ต้องการทดสอบทั้ง 10 ซ้ำ ถือว่าเป็นความเข้มข้นนั้นเป็นค่า LOD ของการวิเคราะห์ยกตัวอย่างเช่น เมื่อหาค่า LOD ได้จากวิธีข้างต้นเท่ากับ 75 ppm สามารถตรวจยืนยันค่า LOD ได้ด้วยการตรวจวัด sample blank ที่เติมสารเป้าหมายที่ความเข้มข้น 50, 75, 100, 200 ppm ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ซึ่งให้ผลการทดสอบดังแสดงใน**ตารางที่ 3**

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบของ sample blank ที่เติมสารเป้าหมายความเข้นข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (ppm)	**ผลทดสอบ Positive : Negative**
200	10 : 0
100	10 : 0
75	5 : 5
50	0 : 10

จากผลการทดสอบควรกำหนดค่า LOD เท่ากับ 100 ppm เนื่องจากเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ทุกครั้ง แทนที่จะใช้ค่า 75 ppm ซึ่งตรวจพบได้เพียง 5 ครั้งจากการตรวจวัดทั้งหมด 10 ครั้ง

2.3.4.7 ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantification; LOQ)

การหาขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณมีวิธีการคล้ายกับการหาค่า LOD เพียงแต่ค่า LOQ ที่หาได้นั้นต้องมีความแม่นและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ด้วย ซึ่งเป็นค่าที่ใช้รายงานผลได้

1) การประเมินด้วยการมองเห็น (Based on Visual Evaluation)

การประเมินด้วยการมองเห็นสามารถใช้ได้กับวิธีการวิเคราะห์ทดสอบที่ไม่ได้มีการใช้เครื่องมือเป็นส่วนใหญ่ โดยการวัดตัวอย่างที่ทราบความเข้มข้นต่ำมากๆ ซึ่งต้องพิจารณาค่าความแม่นและความเที่ยงของการวิเคราะห์ร่วมด้วย

2) การประเมินด้วยวิธี signal-to-noise

การประเมินด้วยวิธี signal-to-noise สามารถทำได้ในกรณีที่วิธีการวิเคราะห์นั้นแสดงค่า baseline noise โดยเปรียบเทียบสัญญาณที่วัดได้จากตัวอย่างที่มีสารเป้าหมายอยู่ในระดับปริมาณต่ำ กับสัญญาณของ sample blank ซึ่งอัตราส่วนของสัญญาณของตัวอย่างที่มีสารเป้าหมายอยู่ต่อสัญญาณของ sample blank (signal-to-noise) ต้องมีค่าเท่ากับ 10 : 1

3) การประเมินค่าจาก standard deviation และค่า slope

การประเมินด้วยวิธี signal-to-noise สามารถทำได้หลายวิธี วิธีที่นิยมคือการวัดแบลงค์ของตัวอย่าง (sample blank or matrix blank) หรือตัวอย่างที่มีสารเป้าหมายที่สนใจในปริมาณที่ต่ำมากๆ อย่างน้อย 7 - 10 ครั้ง จากนั้นคำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และประมาณค่าขีดจำกัดในการตรวจพบจากค่าที่คำนวณได้ อย่างไรก็ตามในกระบวนการวัดที่ซับซ้อนหรือมีเนื้อสารหลากหลายที่ไม่สามารถวัดซ้ำถึง 7 - 10 ครั้งได้ ควรวัดซ้ำอย่างน้อย 4 ครั้ง

3.1) กรณีที่ sample blank สามารถอ่านค่าได้: ให้ทดสอบ reagent blank (X_1) และ sample blank (X_2) อย่างน้อย 10 ซ้ำ คำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากนั้นคำนวณหาค่า LOQ ได้จากสูตร

$$LOQ = (X_2 - X_1) + 10SD$$

เมื่อ X : ค่าสัญญาณเฉลี่ยที่ได้จากการวัดซ้ำ

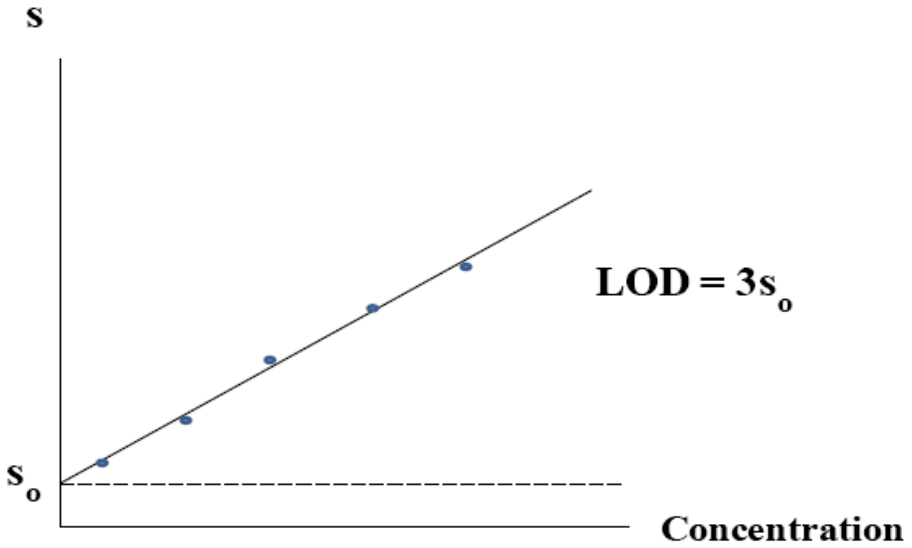
SD : ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นเฉลี่ยที่ได้จากการวัด sample blank และ reagent blank

3.2) กรณีที่ sample blank ไม่มีค่า: ให้ทดสอบ spiked sample blank โดยการเติมสารมาตรฐานให้มีความเข้มข้นที่ใกล้ค่า LOQ ทำการทดสอบอย่างน้อย 10 ซ้ำ คำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานโดยไม่ต้องหาค่าเฉลี่ย เนื่องจากเป็นสารมาตรฐานที่เติมลงไป และคำนวณหาค่า LOQ ได้จากสูตร

$$LOQ = 10SD$$

เมื่อ SD : ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นเฉลี่ยที่ได้จากการวัด

3.3) การทดสอบ spiked sample blank ที่ความเข้มข้นต่ำๆ ในช่วง LOQ อย่างน้อย 3 ความเข้มข้น ความเข้มข้นอย่างน้อย 10 ครั้ง คำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานและหาค่าเฉลี่ยของแต่ละความเข้มข้น เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานกับความเข้มข้นเฉลี่ยแต่ละจุดลากเส้นตัดแกน y ดังแสดงใน**รูปที่ 4**



รูปที่ 4 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานกับความเข้มข้นเฉลี่ยแต่ละจุดลากเส้นตัดแกน y (LOQ)

หรือวัด sample blank หลายๆ ครั้งแล้วหาค่าเฉลี่ยของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการวัดและคำนวณหาค่า LOQ ได้จากสูตร

$$LOQ = 10\ \sigma/S$$

เมื่อ σ : ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากจุดตัดแกน y (S_0) หรืออาจเป็นค่าเฉลี่ยของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการวัด sample blank

S : slope ของ calibration curve

เมื่อคำนวณหาค่า LOQ แล้วต้องตรวจยืนยันค่า LOQ ที่คำนวณได้อีกครั้ง ด้วยวิธีเช่นเดียวกับค่า LOD

2.3.4.8 ความคงทน (Robustness)

ควรมีการประเมินความคงทนของวิธีในระหว่างขั้นตอนการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ (development phase) และขึ้นอยู่กับชนิดของวิธีการศึกษานั้นด้วย การประเมินดังกล่าวควรชี้ให้เห็นถึงความน่าเชื่อถือของการวิเคราะห์ที่สัมพันธ์กับตัวแปรต่างๆที่เปลี่ยนแปลง ถ้าการตรวจวัดมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรต่างๆ ในสภาวะการวิเคราะห์นั้น การวิเคราะห์ทดสอบนั้นต้องมีการระบุสภาวะที่เหมาะสมหรือสภาวะที่ควรระวังด้วย ผลการประเมินความคงทนควรเป็นชุดของตัวแปรที่มีความเหมาะสมของระบบ เพื่อให้แน่ใจว่าวิธีการวิเคราะห์นั้นยังคงมีความถูกต้องอยู่ตลอดเวลาที่ใช้ ตัวอย่างของความผันแปรต่างๆ เช่น ความคงตัวของสารละลายที่วิเคราะห์ เวลาการสกัด เป็นต้น

กรณีของเทคนิค liquid chromatography ตัวอย่างของความผันแปร ได้แก่ อิทธิผลของการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของ mobile phase, การเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของ mobile phase, คอลัมน์ที่แตกต่างกัน(lot ต่างกัน/ผู้ผลิตต่างกัน), อุณหภูมิ, อัตราการไหลของ mobile phase เป็นต้น

กรณีของเทคนิค gas chromatography ตัวอย่างของความผันแปรได้แก่ คอลัมน์ที่แตกต่างกัน (lot ต่างกัน/ผู้ผลิตต่างกัน), อุณหภูมิ, อัตราการไหลของ mobile phase เป็นต้น

2.3.4.9 การตรวจสอบสภาวะของระบบ (System Suitability Testing)

การตรวจสอบสภาวะของระบบควรทำขณะทำการ validate หรือทำเมื่อวิธีการวิเคราะห์ทดสอบนั้นได้เคยถูก validate แล้ว แต่ไม่ได้ทำการวิเคราะห์นาน หรือก่อนการวิเคราะห์ทดสอบในแต่ละวันหรือในแต่ละครั้ง การตรวจสอบสภาวะของระบบส่วนใหญ่เป็นการตรวจสอบสภาวะของเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ทดสอบนั้น โดยการจะเลือกทดสอบตัวแปรใดบ้างนั้นขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของวิธีการวิเคราะห์ทดสอบนั้นๆ เช่น วิธีทางโครมาโทกราฟีสามารถทดสอบ system suitability ได้ดังนี้

1) การทดสอบค่าความเที่ยงของเวลาที่สารเป้าหมายถูกชะออกมา (retention time) เพื่อตรวจสอบความเที่ยงตรงของระบบควบคุมอัตราการไหลของ mobile phase และ/หรือระบบควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ โดยการฉีดสารมาตรฐานเข้าไปไม่น้อยกว่า 6 ครั้ง แล้วคำนวณหาค่า %RSD ของ retention time

2) การทดสอบค่าความเที่ยงของ peak area หรือ peak height เพื่อตรวจสอบการรั่วของระบบและความถูกต้องของระบบฉีดตัวอย่างโดยการฉีดสารมาตรฐานเข้าไปไม่น้อยกว่า 6 ครั้ง แล้วคำนวณหาค่า %RSD ของ peak area หรือ peak height

3) การทดสอบความสามารถในการแยกสาร เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ใช้ในการแยกสาร ทำได้โดยการหาค่า Theoretical plate number, ค่า resolution กับพีคที่อยู่ใกล้เคียง และค่า Peak Asymmetry หรือ Peak tailing

2.3.5 เมื่อพนักงานแผนกควบคุมคุณภาพจัดทำโปรโตคอลการตรวจสอบหรือทวนสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ทดสอบนั้นเสร็จเรียบร้อยแล้วให้ส่งให้หัวหน้าแผนกควบคุมคุณภาพดำเนินการทบทวนโปรโตคอลฯ จากนั้นส่งให้ผู้จัดการฝ่ายควบคุมคุณภาพ ผู้อำนวยการฝ่ายตรวจสอบความถูกต้อง และผู้อำนวยการฝ่ายประกันคุณภาพทบทวน เพื่ออนุมัติการดำเนินการ

2.3.6 เมื่อได้รับการอนุมัติแล้ว หัวหน้าแผนกควบคุมคุณภาพต้องแจ้งให้พนักงานแผนกควบคุมคุณภาพดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ทดสอบที่ได้รับมอบหมายตามโปรโตคอลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ทดสอบนั้น และเมื่อทำเสร็จพนักงานแผนกควบคุมคุณภาพต้องส่งผลการตรวจสอบความถูกต้องทั้งหมดให้หัวหน้าแผนกควบคุมคุณภาพดำเนินการตรวจสอบผล

2.3.7 เมื่อหัวหน้าแผนกควบคุมคุณภาพตรวจสอบรายงานฯ แล้วพบว่ามีข้อผิดพลาดเกิดขึ้นให้แจ้งพนักงานแผนกควบคุมคุณภาพที่รับผิดชอบดำเนินการแก้ไขทันที และเมื่อแก้ไขเรียบร้อยแล้วให้จัดทำรายงานผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ทดสอบนั้น แล้วส่งให้ผู้จัดการฝ่ายควบคุมคุณภาพ ผู้อำนวยการฝ่ายตรวจสอบความถูกต้อง และผู้อำนวยการฝ่ายประกันคุณภาพทบทวนเพื่ออนุมัติรายงานผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ทดสอบนั้น

2.3.8 กรณีที่เกิด deviation แล้วสืบพบสาเหตุว่ามาจากวิธีการในโปรโตคอล เช่น เกณฑ์การยอมรับไม่เหมาะสม ต้องระบุเหตุผลในการขอเปลี่ยนแปลงแก้ไขโปรโตคอลและต้องได้รับการอนุมัติ

จากผู้จัดการฝ่ายควบคุมคุณภาพ ผู้อำนวยการฝ่ายตรวจสอบความถูกต้องและผู้อำนวยการฝ่ายประกันคุณภาพก่อนจึงสามารถดำเนินการเปลี่ยนแปลงโปรโตคอลได้

2.3.9 เมื่อได้รับการอนุมัติรายงานผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ทดสอบแล้ว สามารถนำวิธีการวิเคราะห์ทดสอบนั้นมาเขียนเป็นคู่มือปฏิบัติงานสำหรับใช้ภายในแผนกควบคุมคุณภาพได้ จากนั้นบันทึกรายละเอียดสรุปผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ทดสอบนั้นลงใน Record No. xxx Analytical Method Transfer (Section 2) และเก็บเอกสารนี้ไว้ในแฟ้มเอกสาร Analytical Method Transfer Checklist

2.3.10 กรณีที่มีการเปลี่ยนแปลงสภาวะการทดสอบใดๆ จากที่เคยได้ตรวจสอบความถูกต้องไปแล้ว ซึ่งประเมินความเสี่ยงแล้วพบว่าอาจส่งผลกระทบให้ผลการวิเคราะห์ทดสอบเกิดการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม พนักงานฝ่ายควบคุมคุณภาพต้องแจ้งหัวหน้าแผนกควบคุมคุณภาพขอดำเนินการตรวจสอบหรือทวนสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ทดสอบนั้นซ้ำทันที (re-validation/re-verification) ถ้าผลการตรวจสอบความถูกต้องซ้ำยังคงผ่านเกณฑ์การยอมรับ จึงสามารถใช้วิธีการวิเคราะห์ทดสอบนั้นต่อไปได้ แต่ถ้าผลการวิเคราะห์ทดสอบไม่ผ่านตามเกณฑ์การยอมรับให้ reject วิธีการวิเคราะห์นั้นทันที