



ข้อแนะนำในการทวนสอบวิธี
การทดสอบสารสำคัญในสมุนไพร
ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี
(LA-G-23)

สำนักบริหารและรับรองห้องปฏิบัติการ

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

75/7 ถนนพระรามที่ 6 เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

โทรศัพท์ : 0-2201-7125 0-2201-7165 0-2201-7134

<http://bla.dss.go.th>

บทนำ

เอกสารฉบับนี้จัดทำขึ้นเพื่อเป็นแนวทางในการทวนสอบวิธีทดสอบสารสำคัญในสมุนไพรให้มีความเหมาะสมตามหลักวิชาการ และสอดคล้องกับมาตรฐานที่เกี่ยวข้อง เพื่อเป็นประโยชน์สำหรับการเตรียมความพร้อมของห้องปฏิบัติการในการยื่นขอรับการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตาม ISO/IEC 17025 และมาตรฐานการยอมรับความสามารถห้องปฏิบัติการทดสอบของกรมวิทยาศาสตร์บริการ รวมทั้งคณะผู้ประเมินได้นำไปใช้เป็นแนวทางในการดำเนินการในการรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการ

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	i
สารบัญ	ii
1. ขอบข่าย	1
2. นิยาม	1
3. การทดสอบสารสำคัญในสมุนไพร	2
4. คุณลักษณะที่ใช้ในการทวนสอบวิธีการทดสอบด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี	3
4.1 ความจำเพาะ (Specificity)	3
4.2 ความเป็นเส้นตรงและช่วงการวัด (Linearity and Range)	3
4.3 ความเอนเอียง (Bias)	3
4.4 ความเที่ยง (Precision)	4
4.5 ขีดจำกัดการตรวจพบและขีดจำกัดการหาปริมาณ (LOD และ LOQ)	4
4.6 ความทนทานของวิธี (Robustness)	5
4.7 System Suitability Test	5
เอกสารอ้างอิง	6

1. ขอบข่าย

เอกสารฉบับนี้ใช้สำหรับห้องปฏิบัติการที่ยื่นขอการรับรองหรือได้รับการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการทดสอบตาม ISO/IEC 17025 และมาตรฐานการยอมรับความสามารถห้องปฏิบัติการทดสอบของกรมวิทยาศาสตร์บริการ

2. นิยาม

- 2.1 สมุนไพร หมายถึง พืชที่นำมาใช้เป็นยาหรือเป็นส่วนประกอบในการผลิตยาและผลิตภัณฑ์สมุนไพร โดยอาจใช้ทั้งในรูปของวัตถุดิบสด แห้ง หรือผ่านกระบวนการแปรรูปบางส่วน ทั้งนี้อาศัยสรรพคุณทางยาอันเกิดจากสารสำคัญที่มีอยู่ตามธรรมชาติ เพื่อการป้องกัน บรรเทา รักษาโรค หรือส่งเสริมสุขภาพ
- 2.2 สารสำคัญ หมายถึง สารเคมีหรือกลุ่มของสารเคมีที่พบในสมุนไพร ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่ก่อให้เกิดฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา หรือมีความเกี่ยวข้องกับคุณภาพ ประสิทธิภาพ และความปลอดภัยของสมุนไพรหรือผลิตภัณฑ์สมุนไพร โดยสารสำคัญอาจถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการควบคุมคุณภาพ การกำหนดมาตรฐาน และการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ
- 2.3 การทวนสอบวิธีทดสอบ (Method Verification) หมายถึง กระบวนการยืนยันและแสดงหลักฐานเชิงประจักษ์ว่าวิธีทดสอบที่นำมาใช้สามารถให้ผลการทดสอบที่เหมาะสม ถูกต้อง และน่าเชื่อถือ ภายใต้สภาวะการใช้งานจริงของห้องปฏิบัติการนั้น ในการนำวิธีมาตรฐาน หรือวิธีที่พัฒนาจากแหล่งอื่นมาใช้ เพื่อให้มั่นใจว่าวิธีดังกล่าวสอดคล้องกับวัตถุประสงค์ของการทดสอบและข้อกำหนดที่เกี่ยวข้อง

3. การทดสอบสารสำคัญในสมุนไพร

สมุนไพรเป็นวัตถุดิบสำคัญที่นำมาใช้ในการผลิตยา ผลิตภัณฑ์สมุนไพร และผลิตภัณฑ์สุขภาพ ซึ่งคุณภาพและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ขึ้นอยู่กับปริมาณและความถูกต้องของการตรวจวิเคราะห์สารสำคัญในสมุนไพร วิธีทดสอบที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารสำคัญจำเป็นต้องมีความเหมาะสม มีความน่าเชื่อถือ และให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องแม่นยำ ซึ่งเทคนิคโครมาโตกราฟี เช่น Thin-Layer Chromatography (TLC) สำหรับการตรวจสอบเชิงคุณภาพ และ High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) สำหรับการหาปริมาณสารสำคัญ เป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางที่นำมาใช้ในการตรวจสอบหาปริมาณสารสำคัญในสมุนไพร เนื่องจากมีความไว ความจำเพาะ และความสามารถในการแยกสารที่มีโครงสร้างซับซ้อนได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งการเลือกวิธีทดสอบจะต้องพิจารณา ดังนี้

- โครงสร้างทางเคมี และคุณสมบัติต่าง ๆ ของสารสำคัญ เช่น ความมีขี้ ความไวต่อแสง
- การเลือกชนิดคอลัมน์และองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่เพื่อให้ได้การแยกที่เหมาะสม
- กำหนดสภาวะการตรวจวัด เช่น ความยาวคลื่น อัตราการไหล อุณหภูมิคอลัมน์
- สภาวะที่ให้พีคคมชัดและแยกสารได้ดีที่สุดเป็นวิธีมาตรฐาน

การทวนสอบวิธีทดสอบ (method verification) เป็นกระบวนการสำคัญที่ใช้ยืนยันว่าวิธีทดสอบที่นำมาใช้สามารถให้ผลการทดสอบที่สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ ภายใต้สภาวะการใช้งานจริงของห้องปฏิบัติการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีของการนำวิธีมาตรฐาน วิธีที่ปรับปรุง หรือวิธีที่พัฒนาขึ้นมาใช้กับสมุนไพรซึ่งมีความซับซ้อนขององค์ประกอบทางเคมี ดังนั้นก่อนที่ห้องปฏิบัติการนำวิธีทดสอบมาใช้จำเป็นต้องผ่านการทวนสอบหรือการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี เพื่อยืนยันว่าวิธีการดังกล่าวสามารถให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องและเชื่อถือได้ตามวัตถุประสงค์ที่กำหนด

4. คุณลักษณะที่ใช้ในการทวนสอบวิธีการทดสอบด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี

4.1 ความจำเพาะ (Specificity)

4.1.1 การดำเนินงาน

- เตรียมตัวอย่าง 3 ชนิด ได้แก่ blank สารมาตรฐาน และตัวอย่างสมุนไพร
- วิเคราะห์ตัวอย่างทั้งหมดภายใต้สภาวะเดียวกัน
- เปรียบเทียบค่า retention time และลักษณะพีคของสารมาตรฐานกับตัวอย่างสมุนไพร
- ตรวจสอบว่าพีคของสารสำคัญไม่ถูกรบกวนจากสารอื่น หรือมีการซ้อนทับ
- ในกรณีใช้ Mass Spectrometry (MS) ร่วมกับเทคนิค Gas Chromatography (GC) หรือ GC-MS ให้ยืนยันความบริสุทธิ์ของพีค (peak purity)

4.1.2 เกณฑ์การยอมรับ

- Blank ไม่ปรากฏพีคที่ตำแหน่ง retention time ของสารสำคัญ
- ตัวอย่างสมุนไพรมีพีคที่ retention time ตรงกับสารมาตรฐาน
- ไม่มีการซ้อนทับของพีคที่มีผลต่อการหาปริมาณ
- กรณีใช้ GC-MS ค่า peak purity ผ่านเกณฑ์ที่กำหนด

4.2 ความเป็นเส้นตรงและช่วงการวัด (Linearity and Range)

4.2.1 การดำเนินงาน

- เตรียมสารมาตรฐานอย่างน้อย 7 ระดับความเข้มข้น ครอบคลุมช่วงการใช้งานจริง
- วิเคราะห์สารมาตรฐานแต่ละระดับอย่างน้อย 2-3 ซ้ำ
- สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีค
- คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Coefficient of Correlation, r) ของสมการเส้นตรง
- กำหนดช่วงความเข้มข้นที่ทำให้ความเป็นเส้นตรงดีและมีความแม่นยำเหมาะสม

4.2.2 เกณฑ์การยอมรับ

- ค่า $R^2 \geq 0.990$ และ $r \geq 0.995$
- ช่วงการวัดครอบคลุมระดับการใช้งานจริงของตัวอย่าง

4.3 ความเอนเอียง (Bias)

4.3.1 การดำเนินงาน

- เตรียมตัวอย่างสมุนไพรที่ทราบปริมาณสารสำคัญ หรือใช้ตัวอย่างที่ผ่านการวิเคราะห์แล้ว
- เตรียมสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง
- วิเคราะห์แต่ละระดับอย่างน้อย 10 ซ้ำ
- คำนวณร้อยละการกลับคืน (% Recovery)
- เปรียบเทียบกับเกณฑ์การยอมรับที่กำหนดไว้

4.3.2 เกณฑ์การยอมรับ

- % Recovery ผ่านเกณฑ์ในทุกระดับความเข้มข้นที่ทดสอบ (ต่ำ กลาง สูง) ครอบคลุมช่วงการใช้งาน

ความเข้มข้นของปริมาณสารสำคัญ (%)	% Recovery
100	98 – 101
10	95 – 102
1	92 – 105
0.1	90 – 108
0.01	85 – 110

4.4 ความเที่ยง (Precision)

4.4.1 การดำเนินงาน

- ทดสอบความทำซ้ำได้ในเงื่อนไขความเที่ยงระดับกลางหรือความเที่ยงระหว่างสภาวะภายในห้องปฏิบัติการ (Intermediate precision) โดยวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกันอย่างน้อย 6 – 15 ซ้ำ ภายในห้องปฏิบัติการเดียวกัน แต่มีการแปรผันเงื่อนไขในการวัด เช่น ผู้ปฏิบัติงานต่างกัน เครื่องมือต่างชุดกัน ช่วงระยะเวลาวัดต่างกัน เพื่อให้ได้ค่าความเที่ยงที่สะท้อนถึงแหล่งของความแปรผันทั้งหมดในห้องปฏิบัติการเดียวกัน
- คำนวณค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และ %RSD
- เปรียบเทียบผลกับเกณฑ์การยอมรับ

4.4.2 เกณฑ์การยอมรับ

- % RSD ผ่านเกณฑ์ในทุกระดับความเข้มข้นที่ทดสอบ (ต่ำ กลาง สูง) ครอบคลุมช่วงการใช้งาน

ความเข้มข้นของปริมาณสารสำคัญ (%)	% RSD
100	1
10	1.5
1	2
0.1	3
0.01	4

4.5 ขีดจำกัดการตรวจพบและขีดจำกัดการหาปริมาณ (LOD และ LOQ)

4.5.1 การดำเนินงาน

- วิเคราะห์สารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่ำหลายระดับ
- คำนวณ LOD และ LOQ จากค่า S/N (LOD \approx 3:1, LOQ \approx 10:1) หรือจากสมการกราฟมาตรฐาน
- ยืนยันว่าสามารถตรวจพบและหาปริมาณได้จริงโดยการวิเคราะห์ซ้ำ

4.5.2 เกณฑ์การยอมรับ

- LOD: อัตราส่วนสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (S/N) ≥ 3
- LOQ: อัตราส่วน S/N ≥ 10
- ที่ระดับ LOQ ต้องให้ %RSD $\leq 10\%$
- สามารถระบุพีคของสารได้ชัดเจน

4.6 ความทนทานของวิธี (Robustness)

4.6.1 การดำเนินงาน

- ปรับเปลี่ยนสภาวะการวิเคราะห์เล็กน้อย เช่น อัตราการไหล ± 0.1 mL/min อุณหภูมิคอลัมน์ $\pm 5^\circ\text{C}$ องค์ประกอบเฟสเคลื่อนที่ $\pm 2\%$
- วิเคราะห์ตัวอย่างภายใต้สภาวะที่เปลี่ยนแปลง
- ประเมินผลกระทบต่อ retention time พื้นที่พีค และ %RSD
- สรุปว่าวิธีมีความคงทนเพียงพอหรือไม่

4.6.2 เกณฑ์การยอมรับ

- การเปลี่ยนแปลงสภาวะเล็กน้อยไม่ทำให้ ค่า assay เปลี่ยนเกิน $\pm 2\%$ ค่า %RSD $< 5\%$
- ค่า resolution ยังคง ≥ 1.5
- รูปร่างพีคไม่ผิดปกติ

4.7 System Suitability Test

4.7.1 การดำเนินงาน

- วิเคราะห์สารมาตรฐานก่อนเริ่มการทดสอบตัวอย่างทุกครั้ง
- ตรวจสอบค่าพารามิเตอร์ เช่น %RSD ของพื้นที่พีค, ค่า resolution ระหว่างพีค, ค่า tailing factor และ theoretical plates
- เปรียบเทียบกับเกณฑ์ที่กำหนด หากไม่ผ่านต้องปรับสภาวะก่อนดำเนินการต่อ

4.7.2 เกณฑ์การยอมรับ

- %RSD ของพื้นที่พีคจากการฉีดซ้ำ ($n \geq 5$) $\leq 2.0\%$
- ค่า tailing factor ≤ 2.0
- ค่า theoretical plates $\geq 2,000$ (หรือมากกว่าตามชนิดคอลัมน์)
- ค่า resolution ระหว่างพีคที่สำคัญ ≥ 1.5

เอกสารอ้างอิง

1. คณะทำงานจัดทำคู่มือวิชาการด้านการตรวจสอบและรับรอง กรมวิทยาศาสตร์บริการ. (2568). *แนวทางการจัดทำความใช้ได้ของการวัด*. กรุงเทพมหานคร: กรมวิทยาศาสตร์บริการ.
2. AOAC International. (2023). *Appendix K: Guidelines for dietary supplements and botanicals*. In **Official Methods of Analysis of AOAC International** (22nd ed.). AOAC International.