



วารสาร โดยไทยอินโฟเนชั่น

ปีที่ 5 เดือนมกราคม 2553

บทความพิเศษวิชาการ สำหรับการศึกษาต่อเนื่องทางเภสัชศาสตร์ (on-line)



## การทดสอบความเหมาะสมของระบบในวิธีทางโครมาโทกราฟี (System Suitability Test in Chromatographic Methods)

เภสัชกรหญิง รองศาสตราจารย์ ลาวัลย์ ศรีพงษ์  
ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

รหัส 1-000-SPU-000-1001-01

จำนวน 2.0 หน่วยกิตการศึกษาต่อเนื่อง

วันที่รับรอง: 22 มกราคม 2553

วันที่หมดอายุ: 22 มกราคม 2555

วัตถุประสงค์เชิงพฤติกรรม เพื่อให้สามารถ

1. เข้าใจความหมายของการทดสอบความเหมาะสมของระบบ
2. เข้าใจพารามิเตอร์และเกณฑ์การพิจารณาการทดสอบความเหมาะสมของระบบ
3. เข้าใจเกณฑ์การตัดสินใจว่าเมื่อไรที่ต้องทำการทดสอบความเหมาะสมของระบบ

### บทคัดย่อ

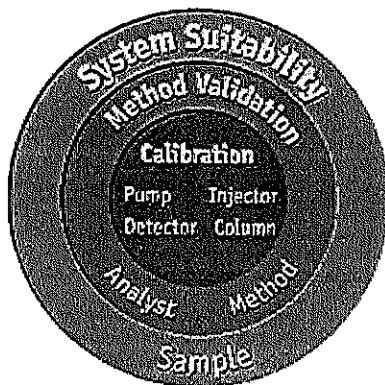
การทดสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability testing) ของวิธีทางโครมาโทกราฟี เป็นงานที่ต้องทำเป็นประจำก่อนทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีในตำรายา พารามิเตอร์ต่าง ๆ ใช้พิจารณาความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟีที่อยู่ในตำรายา และรวมถึงวิธีที่พัฒนาขึ้นเมื่อเร็ว ๆ นี้ ตำรายาของประเทศสหรัฐอเมริกา ฉบับปี ค.ศ. 2008 (USP 31) ได้ออกเกณฑ์การเปลี่ยนแปลงสภาวะการวิเคราะห์มากที่สุด (maximum variation) สำหรับวิธีทางโครมาโทกราฟี คือ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสภาวะการวิเคราะห์แล้วสามารถทำการทดสอบความเหมาะสมของระบบได้โดยไม่ต้องทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี บทความนี้เป็นการนำเสนอความหมาย พารามิเตอร์ทางโครมาโทกราฟี วิธีการทดสอบพารามิเตอร์ เกณฑ์การพิจารณาของการทดสอบความเหมาะสมของระบบ และเกณฑ์การเปลี่ยนแปลงสภาวะการวิเคราะห์มากที่สุดใน USP 31

คำสำคัญ: การทดสอบความเหมาะสมของระบบ วิธีทางโครมาโทกราฟี system suitability test

## บทนำ

การทดสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability test) มีความสำคัญ เนื่องจากเป็นส่วนหนึ่งของวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography คำย่อ HPLC) และ แก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography คำย่อ GC) การทดสอบความเหมาะสมของระบบจำเป็นต้องทำก่อนเริ่มการวิเคราะห์ เพื่อพิสูจน์ว่าระบบโครมาโทกราฟีที่ใช้มีความสามารถในการแยก (resolution) และการวิเคราะห์ให้ผลเหมือนเดิมทุกครั้ง (reproducibility) เพียงพอสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง การทดสอบนี้อยู่บนหลักการของเครื่องมือ ระบบอิเล็กทรอนิกส์ การปฏิบัติงานวิเคราะห์ ซึ่งทั้งหมดทำการประเมินแบบองค์รวม<sup>1</sup>

วิธี HPLC เป็นวิธีทางโครมาโทกราฟีที่ใช้มากในการพัฒนาและผลิตยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในงานวิจัยและการควบคุมคุณภาพยานั้น ส่วนใหญ่ใช้วิธีทางโครมาโทกราฟีสำหรับการหาปริมาณยา ความบริสุทธิ์ และการทดสอบการละลาย รูปที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ของการทดสอบความเหมาะสมของระบบกับการสอบเทียบเครื่องมือ และการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี ซึ่งมีสามขั้นตอนของการประยุกต์ใช้วิธีทางโครมาโทกราฟี เพื่อประกันให้มั่นใจว่าผลการวิเคราะห์ถูกต้องเชื่อถือได้ เริ่มจากขั้นตอนแรกทำการตรวจสอบหรือสอบเทียบเครื่องมือ โดยต้องมั่นใจว่า เครื่องมือที่ใช้มีคุณสมบัติและมีการสอบเทียบเป็นประจำตามตารางที่กำหนดไว้ ขั้นตอนที่สอง ต้องตรวจสอบความถูกต้องของวิธีที่ใช้มาแล้ว เพื่อพิสูจน์ประสิทธิภาพของขั้นตอนปฏิบัติการวิเคราะห์ รวมทั้งการเตรียมตัวอย่าง และขั้นตอนสุดท้าย ต้องทดสอบความเหมาะสมของระบบก่อนการใช้งานประจำ เพื่อพิสูจน์ความสามารถในการทำงานของระบบโครมาโทกราฟีที่ใช้งานบนหลักการวันต่อวัน (day-to-day basis)<sup>2</sup>



รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ของการสอบเทียบเครื่องมือ การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี และการทดสอบความเหมาะสมของระบบ [ที่มา เอกสารอ้างอิงหมายเลขที่ 2]

### การทดสอบความเหมาะสมของระบบ

การทดสอบความเหมาะสมของระบบ ตามเกณฑ์ตำราของประเทศไทยหรืออเมริกา ฉบับปี ค.ศ. 2008 (USP 31) กำหนดให้ทำหัวข้อ resolution ( $R$ ) relative standard deviation (RSD) tailing factor ( $T$ ) และ number of theoretical plates ( $N$ ) การทดสอบทำโดยการเก็บข้อมูลของการฉีดหลายซ้ำของสารละลายมาตรฐาน หรือสารละลายอื่นที่กำหนดในโมโนกราฟ (monograph) โดยใช้สภาวะการปฏิบัติงานที่ระบุในตำรับยา<sup>3</sup>

คู่มือ CDER “Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Method” ฉบับปี ค.ศ. 1994 ได้กำหนดการประเมินพารามิเตอร์ต่าง ๆ สำหรับการตรวจสอบความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์โดยยกตัวอย่างจากการตรวจสอบความเหมาะสมของวิธี reversed-phase HPLC ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมาก ในคู่มือนี้นอกจากมีหัวข้อ  $R$  RSD  $T$  และ  $N$  แล้ว ยังมีการอธิบายถึงหัวข้อ capacity factor ( $k'$ ) และ relative retention ( $\alpha$ ) อย่างไรก็ตามในคู่มือนี้นอกจากใช้กับวิธี HPLC แล้วยังสามารถใช้กับวิธีโครมาโทกราฟีอื่น ๆ ได้

การทดสอบความเหมาะสมของระบบ จำเป็นสำหรับการประกันคุณภาพระบบโครมาโทกราฟี จำนวนหัวข้อการทดสอบขึ้นกับวัตถุประสงค์ของวิธีทดสอบ คู่มือ CDER “Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Method” กำหนดว่า วิธีโครมาโทกราฟีสำหรับการทดสอบการละลาย (dissolution test) หรือการทดสอบเพื่อปล่อยผ่าน (release profile methods) โดยใช้วิธีสารมาตรฐานภายนอก (คือ ใช้สารมาตรฐานตัวเดียวกับสารตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ในการสร้างเส้นกราฟมาตรฐาน) ให้ทดสอบความเหมาะสมของระบบอย่างน้อยที่สุดในหัวข้อ  $k'$   $T$  และ RSD<sup>4</sup> ส่วนการวิเคราะห์ทดสอบเพื่อการยอมรับ การปล่อยผ่าน การวิเคราะห์ความคงสภาพ หรือ การวิเคราะห์สารปนเปื้อนหรือสารสลายตัว โดยใช้วิธีสารมาตรฐานภายนอก หรือสารมาตรฐานภายใน (คือ การเติมสารมาตรฐานอีกตัวคู่กับสารมาตรฐานตัวเดียวกับสารตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ในการสร้างเส้นกราฟมาตรฐาน) ให้ทดสอบความเหมาะสมของระบบในหัวข้อ  $k'$   $T$   $R$  และ RSD เป็นอย่างน้อย<sup>4</sup>

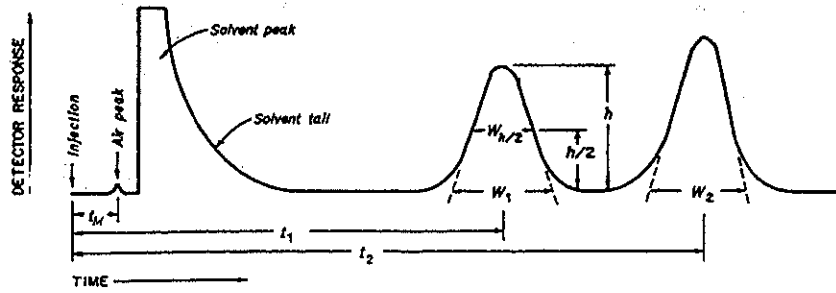
#### Resolution ( $R$ )

การแยกสารสองตัวในของผสม โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม ทำการบันทึกโครมาโทแกรม ดังรูปที่ 2 ค่า  $R$  คำนวณจากสมการ

$$R = 2(t_2 - t_1) / W_1 + W_2$$

เมื่อ  $t_1$  และ  $t_2$  คือ retention time ของสารสองตัวที่แยกกันจากโครมาโทแกรม

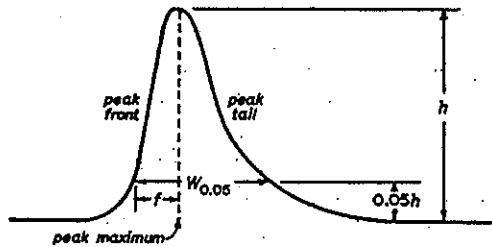
$W_1$  และ  $W_2$  คือ ความกว้างของพีคที่ฐานของสารสองตัว



รูปที่ 2 โครมาโทแกรมของสารสองตัวที่แยกกัน [ที่มา เอกสารอ้างอิงหมายเลขที่ 3]

**Tailing factor (T)**

Tailing factor เป็นการวัดความสมมาตรของพีค ซึ่งค่า  $T$  มีค่าเท่ากับหนึ่ง แสดงว่าพีคมีความสมมาตรอย่างสมบูรณ์ ในบางกรณีพบว่า tailing factor มีค่าน้อยกว่าหนึ่ง ค่า tailing factor จะเพิ่มขึ้น เมื่อพีคมีหางยาวขึ้นดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 โครมาโทแกรมของพีคไม่สมมาตร [ที่มา เอกสารอ้างอิงหมายเลขที่ 3]

ค่า  $T$  คำนวณจากสมการ

$$T = W_{0.05} / 2f$$

เมื่อ  $f$  คือ เวลาของสารจาก peak front ถึง peak maximum

$W_{0.05}$  คือ ความกว้างของพีคที่ความสูง 5 เปอร์เซ็นต์

**Number of theoretical plates หรือ theoretical plate number (N)**

สำหรับพีคแบบ Gaussian ค่า  $N$  คำนวณจากสมการ

$$N = 16 (t / W)^2 = L / H \quad \text{หรือ}$$

$$N = 5.54 (t / W_{h/2})^2$$

เมื่อ  $t$  คือ retention time ของสาร

$W$  คือ ความกว้างของพีคที่ฐาน

$W_{h/2}$  คือ ความกว้างของพีคที่ครึ่งหนึ่งของความสูง

$L$  คือ ความยาวของคอลัมน์

$H$  คือ the height equivalent of a theoretical plate (HETP)

**Relative standard deviation (RSD หรือ  $S_R$ ) หรือ Precision/Injection repeatability**  
เป็นการวัดความแม่นยำของระบบ ทำโดยการฉีดสารละลายมาตรฐานจำนวนห้าครั้ง  
หรือหกครั้งคำนวณหาค่า  $S_R$  จากสมการ

$$S_R (\%) = \frac{100}{\bar{X}} \left[ \frac{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2}{N - 1} \right]^{1/2}$$

เมื่อ  $N$  คือ จำนวนครั้งของชุดการวัด

$X_i$  คือ การวัดแต่ละครั้ง

$\bar{X}$  คือ ค่าเฉลี่ยการวัดในชุด

#### Capacity factor ( $k'$ )

$k' = \frac{\text{amount of substance in stationary phase}}{\text{amount of substance in mobile phase}}$

$k' = \frac{\text{time spent by substance in stationary phase}}{\text{time spent by substance in mobile phase}}$

$$k' = (t / t_M) - 1$$

เมื่อ  $t$  คือ retention time ของสารที่วัดจากเวลาในการฉีดจนถึงเวลาในการชะของพีคสูงสุด

$t_M$  คือ retention time ของสารที่ไม่ถูกกักอยู่ในคอลัมน์ (nonretard compound)  
หรืออากาศ (void volume) เมื่อตรวจวัดด้วย thermal conductivity

#### Relative retention ( $\alpha$ )

การแยกสารสองตัวในของผสมในสภาวะที่เหมาะสม ทำการบันทึกโครมาโทแกรม ดังรูป  
ที่ 2 ค่า  $\alpha$  คำนวณจากสมการ

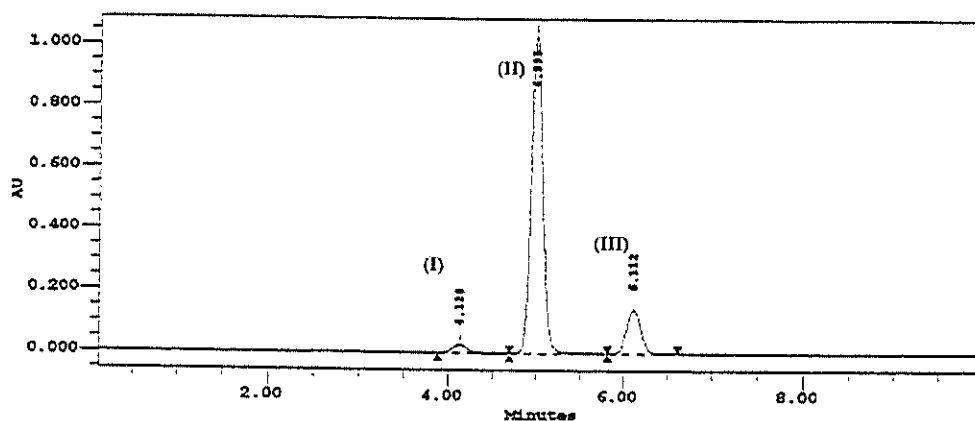
$$\alpha = k'_2 / k'_1 \quad \text{หรือ}$$

$$\alpha = t_2 - t_M / t_1 - t_M$$

เมื่อ  $k'_1$  และ  $k'_2$  คือ ค่า  $k'$  ของสารสองตัว

$t_1$  และ  $t_2$  คือ retention time ของสารสองตัวที่แยกกันจากโครมาโทแกรม

ตัวอย่างการทดสอบความเหมาะสมของระบบสำหรับวิธีที่พัฒนาขึ้น ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่อยู่ในตำรายา เช่น การวิเคราะห์ codeine phosphate (I) paracetamol (II) และ caffeine (III) ด้วยวิธี HPLC ดังรูปที่ 4 มีการทดสอบความเหมาะสมของระบบ โดยการคำนวณค่า  $k'$   $R$   $\alpha$  และ  $T$  พบว่า ค่าการแยก ( $R$ ) ระหว่างแต่ละคู่ของพีคมีค่าไม่น้อยกว่า 3.10 และค่า  $\alpha$  มีค่าไม่น้อยกว่า 1.30 ค่า  $k'$  มีค่า 1.40 1.90 และ 2.56 สำหรับ codeine phosphate paracetamol และ caffeine ตามลำดับ<sup>5</sup>



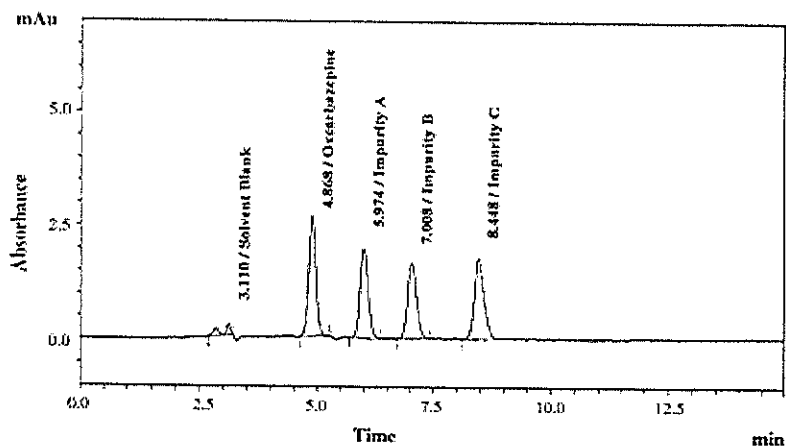
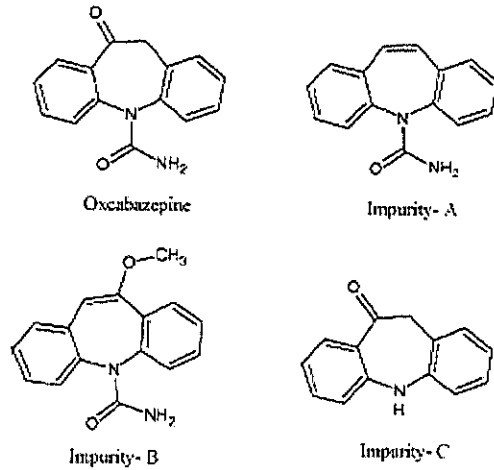
System performance parameters of codeine phosphate, caffeine and paracetamol compound

	$t_r$ ( $n = 9$ , mean)	Area ( $n = 9$ , mean)	$k'$	$R$	$\alpha$	$T$
Codeine Phosphate	4.169 (0.24)	369 674.11 (0.19)	1.40	3.200 (0.70)	1.357 (0.27)	1.254
Paracetamol	5.038 (0.32)	9 865 317.88 (0.10)	1.90			1.167
Caffeine	6.176 (0.37)	1 054 670.50 (0.27)	2.56	4.271 (0.95)	1.344 (0.21)	1.134

R.S.D.% values are given in the parenthesis.

รูปที่ 4 โครมาโทแกรมของ codeine phosphate (I) paracetamol (II) และ caffeine (III) ในตำรับยาเม็ด (GERALGINE-K®) และข้อมูลการทดสอบความเหมาะสมของระบบ [ที่มา เอกสารอ้างอิงหมายเลขที่ 5]

อีกตัวอย่างเป็นการทดสอบความเหมาะสมของระบบการวิเคราะห์ oxcarbazepine และสารปนเปื้อนสามตัวด้วยวิธี HPLC<sup>6</sup> สารทุกตัวแยกกันได้อย่างดีดังรูปที่ 5 โดยมีค่า *R* อยู่ในช่วง 2.8 ถึง 3.6 ค่า *N* ของ oxcarbazepine มีค่า 3921 แสดงถึงประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ดี และค่า *N* ของสารปนเปื้อนตัวอื่นมีค่าเพิ่มขึ้นตาม retention time ที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากทุกพีกมีค่า *T* ใกล้เคียงกันในช่วง 1.20 ถึง 1.30 ทำให้พีกที่ถูกชะออกมาช้าที่สุดคือ impurity C มีค่า *N* มากที่สุด



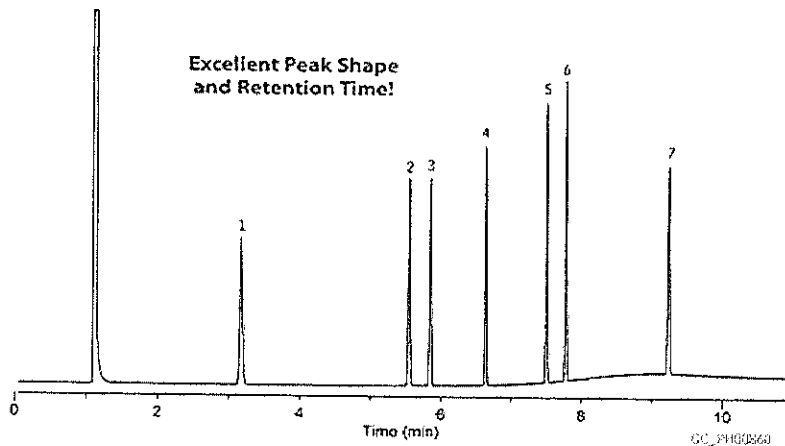
#### System-suitability report

Compound ( <i>n</i> =3)	<i>Rt</i>	<i>RS</i>	<i>N</i>	<i>T</i>
Oxcarbazepine	4.9	—	3921	1.20
Impurity A	6.0	3.3	4715	1.25
Impurity B	7.0	2.8	5565	1.25
Impurity C	8.5	3.6	6419	1.30

รูปที่ 5 โครมาโทแกรมของ oxcarbazepine impurity A impurity B และ impurity C และข้อมูลการทดสอบความเหมาะสมของระบบ [ที่มา เอกสารอ้างอิงหมายเลขที่ 6]

ตัวอย่างการทดสอบความเหมาะสมของระบบการวิเคราะห์ยาตามสลบเฉพาะที่ ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี ในรูปที่ 6 แสดงถึงสภาวะการวิเคราะห์ที่เหมาะสมดี พีกมีลักษณะแหลมแคบ พบว่าค่า  $T$  ของทุกพีกมีค่าใกล้เคียงหนึ่ง และ  $N$  มีค่าสูงมาก ( $N = 55858$  สำหรับพีกที่ออกมาตัวแรกคือ benzocaine) แสดงถึงประสิทธิภาพที่สูงของคอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ และวิธีมีความแม่นยำสูง โดยค่า RSD เฉลี่ยของ peak area และ retention time มีค่า 1.38 และ 0.03 ตามลำดับ<sup>7</sup>

1. benzocaine
2. prilocaine
3. lidocaine
4. procaine
5. tetracaine
6. bupivacaine
7. dibucaine



Column: Rxi™-5ms 30m, 0.53mm ID, 1.00µm (cat.# 13455)  
 Sample: 50µg/mL each component in methanol  
 Inj.: 1.0µL split (10:1), 4mm split inlet liner with wool (cat.# 20781)  
 Inj. temp.: 250°C  
 Carrier gas: helium, constant flow  
 Flow rate: 5.0mL/min.  
 Oven temp.: 200°C (4 min.) to 320°C @ 20°C/min. (hold 3 min.)  
 Det.: FID @ 300°C

Compound	Peak Area (%RSD)	Retention Time (%RSD)	USP Tailing	Column Efficiency
Benzocaine	0.85	0.03	1.00	55858
Prilocaine	1.36	0.02	1.00	(isothermal)
Lidocaine	1.01	0.02	1.00	
Procaine	1.83	0.03	1.00	
Tetracaine	1.78	0.01	1.00	
Bupivacaine	1.64	0.02	1.02	
Dibucaine	1.17	0.06	1.00	
Mean	1.38	0.03	1.00	

รูปที่ 6 โครมาโทแกรมของยาตามสลบเฉพาะที่ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี และข้อมูลการทดสอบความเหมาะสมของระบบ [ที่มา เอกสารอ้างอิงหมายเลข 7]



### เกณฑ์การพิจารณาการทดสอบความเหมาะสมของระบบ

เกณฑ์การพิจารณาทั่วไปของการทดสอบความเหมาะสมของระบบของ USP 31 และ คู่มือ CDER "Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Method" แสดงในตารางที่ 1 กรณีที่โมโนกราฟในตำราวิธีการทดสอบความเหมาะสมของระบบไว้ ต้องทำการทดสอบตามที่ระบุในโมโนกราฟนั้น<sup>3</sup>

ตารางที่ 1 เกณฑ์การพิจารณาการทดสอบความเหมาะสมของระบบ

Topic	USP 31	CDER 1994*
Resolution ( <i>R</i> ) <i>R</i> s between the peak of interest and the closest potential	> 1.5	> 2
Tailing factor ( <i>T</i> )	≤ 2.0	≤ 2
Number of theoretical plates ( <i>N</i> )	> 700	> 2000.
Relative standard deviation ( <i>S<sub>r</sub></i> )	≤ 2 % (n = 5) > 2% (n = 6)	≤ 1% (n = 5)
Capacity factor ( <i>k'</i> )	-	> 2
Relative retention ( <i>α</i> )	-	This is not an essential parameter as long as the resolution ( <i>R<sub>s</sub></i> ) is stated.

\*CDER "Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Method".

### ความสัมพันธ์ระหว่างค่าพารามิเตอร์ทางโครมาโทกราฟีกับสมรรถนะของการวิเคราะห์<sup>8-11</sup>

Resolution บอกระสิทธิภาพการทำงานของคอลัมน์และระบบโครมาโทกราฟีว่า สารประกอบที่ชะออกมาใกล้กันนั้นถูกแยกออกจากกัน และเพื่อเป็นการประกันว่าสารมาตรฐานภายในถูกแยกออกจากด้วยยา กรณีที่มีพีกของสารพีกเดียวในโครมาโทแกรม การวัดประสิทธิภาพของคอลัมน์โดยการวัดความแหลมของพีก ก็สำคัญสำหรับการตรวจวัดองค์ประกอบอื่นที่ปนเปื้อนมาในปริมาณน้อย ๆ

ค่า *R* เป็นการวัดว่าพีกสองพีกแยกจากกันได้ดีเพียงใด พีกที่แยกกันได้ดีจำเป็นกับความน่าเชื่อถือในการหาปริมาณ ค่า *R* เป็นพารามิเตอร์ที่สำคัญ โดยเฉพาะเมื่อพีกของสารรบกวนถูกระหว่างกับสารตัวอย่าง พีกรบกวนได้แก่ พีกจากสารปนเปื้อน สารปรุงแต่ง ผลิตภัณฑ์จากการสลายตัว สารมาตรฐานภายใน เป็นต้น

เมื่อเวลาที่ชะออกมาของพีกสองพีกแตกต่างกันน้อย และไม่ใช้สมมุติฐานที่ว่าความกว้างของพีกทั้งสองไม่เท่ากัน ค่า *R* สามารถเขียนได้ว่า<sup>8</sup>

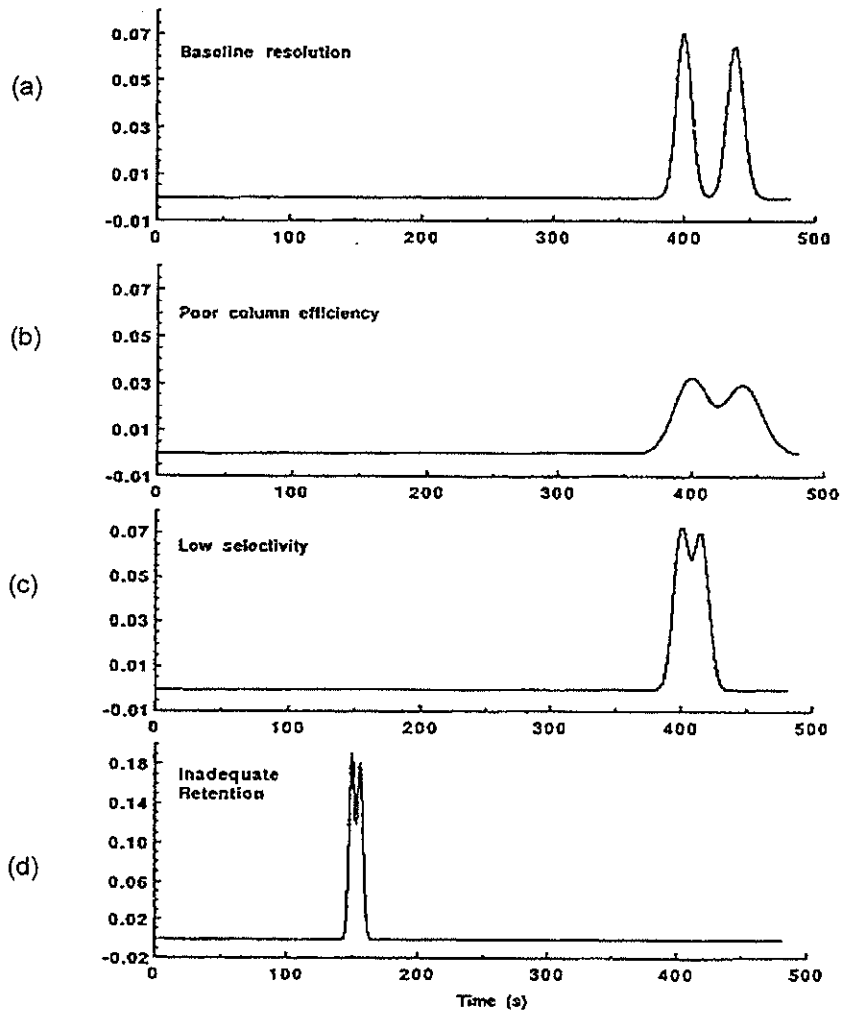
$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \frac{k'}{(k' + 1)} \frac{(\alpha - 1)}{\alpha}$$

จากสมการข้างบนนี้ ปัจจัยที่มีผลต่อการแยก ( $R$ ) มีสามปัจจัย คือ  $\alpha$ ,  $N$  และ  $k'$  ซึ่ง  $\alpha$  เป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุด และเป็นปัจจัยเดียวที่ปรับได้ง่ายที่สุดในการหาสภาวะที่เหมาะสม การแยกที่ดีควรแยกพิกจนถึงเส้นฐาน ( $R = 1.53$ ) ดังรูปที่ 7 (a) อย่างไรก็ตามการแยกที่ไม่ดี ( $R < 1.5$ ) เกิดจากประสิทธิภาพคอลัมน์ต่ำ ( $N = 1000$  และ  $R = 0.68$ ) ดังรูปที่ 7 (b) ความจำเพาะเจาะจงต่ำ ( $\alpha = 1.05$  และ  $R = 0.63$ ) ดังรูปที่ 7 (c) หรือการกักอยู่ในคอลัมน์ไม่เพียงพอ ( $k' = 0.5$  และ  $R = 0.67$ ) ดังรูปที่ 7 (d) ดังนั้นการปรับสภาวะการแยกที่เหมาะสม ต้องพิจารณาก่อนว่าปัจจัยใดมีผลต่อการแยกที่ไม่ดี

ค่า  $\alpha$  เป็นการวัดตำแหน่งสัมพัทธ์ของพีกสองพีก ซึ่งไม่ได้รวมผลของความกว้างของพีกและการขยายออกของแถบ ในขณะที่ค่า  $R$  ได้รวมความแตกต่างของการถูกกักในคอลัมน์ ( $k'$ ) และความกว้างของพีกแล้ว ดังนั้นค่า  $\alpha$  ไม่จำเป็นต้องรายงาน หากมีการแสดงค่า  $R$  ไว้แล้วในการรายงานผล

ค่า  $k'$  เป็นการวัดว่าพีกของสารที่สนใจถูกชะออกมาอยู่ตรงกับตำแหน่งของปริมาตรอากาศหรือตัวทำละลาย (void volume) หรือไม่ โดยทั่วไปพีกที่สนใจควรแยกจากพีกอื่นหรือปริมาตรอากาศหรือตัวทำละลาย และค่า  $k'$  ต้องมากกว่า 2 ช่วงที่เหมาะสมสำหรับ  $k'$  คือ 2 ถึง 10 ดังรูปที่ 8 ดังนั้นควรปรับความแรงของตัวทำละลาย (solvent strength) เพื่อให้พีกที่สนใจอยู่ในช่วงนี้ การลดความแรงของตัวทำละลายทำให้ค่า  $k'$  เพิ่มขึ้น แต่เมื่อค่า  $k'$  มากกว่า 10 ก็ไม่มีผลต่อการแยก ดังรูปที่ 8

นอกจากนี้เมื่อแทนค่า  $N = 5000$  ในสมการข้างบน เมื่อค่า  $\alpha = 1.10$  และ  $k' = 10$  พีกสามารถแยกจนถึงเส้นฐาน ( $R = 1.5$ ) ดังรูปที่ 8 แต่เมื่อ  $\alpha = 1.05$  ถึงแม้ว่า  $k' = 10$  พีกก็ไม่สามารถแยกจนถึงเส้นฐานได้ ( $R < 1.5$ ) ดังนั้นการปรับ  $\alpha$  จึงมีความสำคัญต่อการแยก การเพิ่มประสิทธิภาพคอลัมน์ ( $N$ ) ไม่นิยมทำ เพราะต้องเพิ่มความดันและระยะเวลาในการวิเคราะห์ที่นานขึ้น เนื่องจาก  $R$  เป็นสัดส่วนกับรากที่สองของ  $N$  ดังนั้นการเพิ่ม  $N$  เป็นสองเท่า เช่น การเพิ่มความยาวคอลัมน์เป็นสองเท่า หรือลดเส้นผ่าศูนย์กลางอนุภาคลงครึ่งหนึ่งจะเพิ่มการแยกได้เพียง 1.414



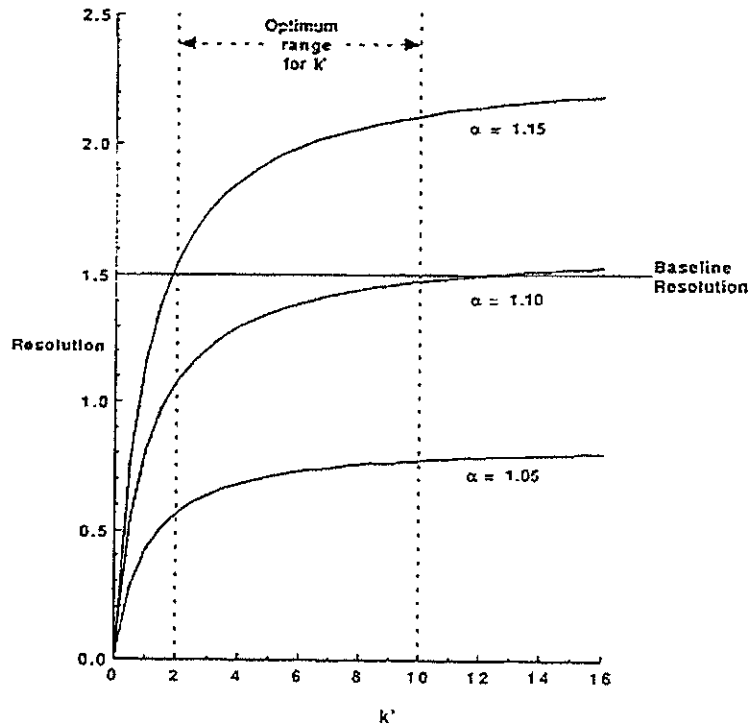
รูปที่ 7 ผลของ  $\alpha$ ,  $N$  และ  $k'$  ต่อการแยก ( $R$ ) [ที่มา เอกสารอ้างอิงหมายเลขที่ 8]

(a)  $k' = 3.0$ ;  $t_0 = 100\text{s}$ ;  $\alpha = 1.13$ ;  $N = 5000$ ;  $R = 1.53$

(b)  $k' = 3.0$ ;  $t_0 = 100\text{s}$ ;  $\alpha = 1.13$ ;  $N = 1000$ ;  $R = 0.68$

(c)  $k' = 3.0$ ;  $t_0 = 100\text{s}$ ;  $\alpha = 1.05$ ;  $N = 5000$ ;  $R = 0.63$

(d)  $k' = 0.5$ ;  $t_0 = 100\text{s}$ ;  $\alpha = 1.13$ ;  $N = 1000$ ;  $R = 0.67$



รูปที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่าง  $R$   $\alpha$  และ  $k'$  เมื่อ  $N = 5000$  [ที่มา เอกสารอ้างอิงหมายเลขที่ 8]

ค่า  $N$  เป็นการวัดประสิทธิภาพของคอลัมน์ ซึ่งบอกว่ามีพีคจำนวนกี่พีคต่อหน่วยเวลาที่ใช้ (unit run-time) ของโครมาโทแกรม ค่า  $N$  ค่อนข้างคงที่สำหรับแต่ละพีคในสภาวะการทำงานชุดหนึ่ง ๆ ส่วนค่า  $H$  เป็นการวัดประสิทธิภาพของคอลัมน์ต่อหน่วยความยาวของคอลัมน์ พารามิเตอร์ที่มีผลต่อค่า  $N$  หรือ  $H$  ประกอบด้วย ตำแหน่งของพีค ขนาดอนุภาคในคอลัมน์ อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ อุณหภูมิของคอลัมน์ ความหนืดของวัฏภาคเคลื่อนที่ และน้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่างที่วิเคราะห์

ความแม่นยำในการฉีดแสดงด้วยค่า  $S_R$  ซึ่งบ่งชี้ว่าสมรรถนะของระบบโครมาโทกราฟี ณ เวลาที่สารตัวอย่างถูกวิเคราะห์ ที่ประกอบด้วย ป้อน คอลัมน์ และ สภาวะแวดล้อม โดยไม่พิจารณาเกี่ยวกับการเตรียมตัวอย่าง และความแปรผันของการผลิต

ค่า  $T$  สูงขึ้นเมื่อพีคมีความไม่สมมาตรเพิ่มขึ้น ซึ่งทำให้การหาปริพันธ์และความแม่นยำมีความน่าเชื่อถือน้อยลง ความถูกต้องของการหาปริมาณลดลงเมื่อพีคมีหางมากขึ้น เพราะเครื่องหาปริพันธ์ทำการหาจุดปลายของพีคและคำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟได้ยากขึ้น

### ข้อกำหนดของการตัดแปลงสภาวะการวิเคราะห์<sup>3</sup>

ข้อกำหนดสำหรับการทดสอบความเหมาะสมของระบบ ต้องเป็นไปตามเกณฑ์ที่ระบุในตำรายา ซึ่งไม่ใช่กับสภาวะการวิเคราะห์อื่นนอกจากที่ระบุไว้ในโมโนกราฟ อย่างไรก็ตามการปรับสภาวะการวิเคราะห์สามารถทำได้ เมื่อมีสารมาตรฐานสำหรับสารทุกตัวที่ใช้ในการทดสอบความเหมาะสมของระบบ และเมื่อสารมาตรฐานที่ใช้แสดงให้เห็นว่า การปรับนั้นทำให้คุณภาพของโครมาโทกราฟีตรงตามข้อกำหนดของทดสอบความเหมาะสมของระบบ ในกรณีที่เกิดข้อผิดพลาดและระบบทำงานผิดปกติ ไม่จำเป็นต้องปรับสภาวะการวิเคราะห์ หรือทำการทดสอบความเหมาะสมของระบบ

การเปลี่ยนแปลงมากที่สุด (maximum variation) ใน USP 31 สำหรับวิธี HPLC ระบุในตารางที่ 2 และวิธี GC ระบุในตารางที่ 3 หรือให้เป็นตามที่ระบุในโมโนกราฟ อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงต่อไปนี้ อาจจำเป็นต้องมีข้อมูลการตรวจสอบความถูกต้อง (validation data) เพิ่มเติม ดังนั้นผู้ใช้ควรพิสูจน์ความเหมาะสมภายใต้สภาวะใหม่ โดยการประเมินคุณสมบัติของสมรรถนะของระบบการวิเคราะห์ที่มีผลมาจากการเปลี่ยนแปลง การปรับหลายอย่างสามารถเกิดผลแบบรวมต่อสมรรถนะของระบบ จึงควรพิจารณาอย่างระมัดระวังก่อนการประยุกต์ใช้

### ตารางที่ 2 การเปลี่ยนแปลงสภาวะการวิเคราะห์มากที่สุดของวิธี HPLC ใน USP 31<sup>3</sup> ที่ต้องทำการทดสอบความเหมาะสมของระบบโดยไม่ต้องทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

Adjustment of operating conditions	Maximum variation
pH of mobile phase	± 0.2 unit of aqueous buffer used in the preparation of mobile phase
Concentration of salts in buffer	± 10% of the concentration of salts used in preparation of mobile phase
Ratio of component in mobile phase	Limits apply to minor component (50% or less) adjusted by ± 30% relative. However, the change in any component cannot exceed ± 10% absolute (i.e. in retention to the total mobile phase)
Wavelength of UV-visible detector	Not permitted. The procedure specified by the detector manufacturer, or another validated procedure, is to be used to verify that error in the detector wavelength is, at most ± 3 nm.
Column length	± 70%
Column inner diameter	± 25%
Particle size	can be reduced as much as 50%
Flow rate	± 50%
Injection volume	can be reduced as far as is consist with accepted precision and detection limits
Column temperature	± 10°. Column thermostating is recommended.

**ตารางที่ 3 การเปลี่ยนแปลงสภาวะการวิเคราะห์มากที่สุดของวิธี GC ใน USP 31<sup>3</sup> ที่ต้องทำการทดสอบความเหมาะสมของระบบโดยไม่ต้องทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี**

Adjustment of operating conditions	Maximum variation
Column length	± 70%
Column inner diameter	± 50%
Film thickness (capillary GC)	- 50% to 100%
Particle size	going from a larger to a smaller or a smaller to a larger (if it is the same "Range Ratio" which is the largest particle divided by the diameter of the smallest particle) particle size GC mesh support is acceptable, provided the chromatography meet the requirements of the system suitability
Flow rate	±50%
Injection volume	can be reduced as far as is consist with accepted precision and detection limits
Oven temperature	± 10%
Oven temperature program	± 20%

ตัวอย่างของการปรับอัตราส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ชนิดของผสมสององค์ประกอบ (binary mixtures) และของผสมสามองค์ประกอบ (ternary mixtures) สำหรับวิธี HPLC ใน USP 31 โดยพิจารณาจากอัตราส่วนที่ระบุไว้ (specified ratio) ในโมโนกราฟ เป็นดังนี้

**ของผสมสององค์ประกอบ**

เมื่ออัตราส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่ระบุไว้ 50 : 50 จากเกณฑ์ในตารางที่ 2 สามารถปรับวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เป็นองค์ประกอบส่วนน้อยได้ ± 30% ดังนั้นสามสิบเปอร์เซ็นต์ของ 50 คือ ค่าสัมบูรณ์ของ ± 15% แต่ค่านี้เกินค่าสูงสุดของค่าสัมบูรณ์ของ ± 10% ที่อนุญาตให้เปลี่ยนแปลงได้ของแต่ละองค์ประกอบในตารางที่ 2 ดังนั้นอัตราส่วนสามารถปรับได้เฉพาะในช่วง 40 : 60 ถึง 60 : 40

เมื่ออัตราส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่ระบุไว้ 2 : 98 สามสิบเปอร์เซ็นต์ของ 2 คือ ค่าสัมบูรณ์ของ ± 0.6% ซึ่งไม่เกินค่าสูงสุดของค่าสัมบูรณ์ของ ± 10% ดังนั้นอัตราส่วนสูงสุดที่สามารถปรับได้ คือ ช่วง 1.4 : 98.6 ถึง 2.6 : 97.4

**ของผสมสามองค์ประกอบ**

เมื่ออัตราส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่ระบุไว้ 60 : 35 : 5 สำหรับองค์ประกอบที่สอง สามสิบเปอร์เซ็นต์ของ 35 คือ ค่าสัมบูรณ์ของ ± 10.5% แต่ค่านี้เกินค่าสูงสุดของค่าสัมบูรณ์ของ ± 10% ที่อนุญาตให้เปลี่ยนแปลงได้ของแต่ละองค์ประกอบ ดังนั้นอัตราส่วนขององค์ประกอบที่สอง

สามารถปรับได้เฉพาะในช่วงค่าสัมบูรณ์ 25% ถึง 45% สำหรับองค์ประกอบที่สาม สามสิบเปอร์เซ็นต์ของ 5 คือ ค่าสัมบูรณ์ของ  $\pm 1.5\%$  ในทุกกรณี ปริมาณที่เพียงพอขององค์ประกอบที่หนึ่ง ใช้สำหรับการปรับค่ารวมให้เป็น 100% ดังนั้นช่วงของสารละลายผสมที่ตรงตามข้อกำหนดคือ 50 : 45 : 5 ถึง 70 : 25 : 5 หรือ 58.5 : 35 : 6.5 ถึง 61.5 : 35 : 3.5

### บทสรุป

การวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี เป็นวิธีที่ใช้อย่างแพร่หลายและนิยมใช้มากในการวิเคราะห์ยา ซึ่งการใช้วิธีตามตำรายาต้องทำการตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ ตามเกณฑ์ที่กำหนดในตำรายาหรือคู่มือที่ใช้อ้างอิง ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของการตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ บอกระดับประสิทธิภาพของวิธีที่ใช้ การปรับหรือเปลี่ยนแปลงสภาวะการวิเคราะห์จากวิธีในตำรายาสามารถทำได้ ซึ่งเกณฑ์การเปลี่ยนแปลงสภาวะการวิเคราะห์มากที่สุดโดยไม่ต้องทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี เริ่มมีกำหนดในตำรายา USP 31 ส่วนการเปลี่ยนแปลงที่มากกว่าเกณฑ์ที่กำหนดนี้ หรือการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ใหม่ จำเป็นต้องทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

### เอกสารอ้างอิง

1. ICH-Q2(R1) Validation on Analytical Procedures: Text and Methodology (online). Available at [www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf](http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf) (5 March 2009).
2. Dong M, Paul R, Gershanov L. Getting the peaks perfect: System suitability for HPLC (online). Available at <http://pubs.acs.org/subscribe/archive/tcaw/10/i09/html/09dong.html> (5 March 2009).
3. System suitability in <621> Chromatography. The 31<sup>st</sup> United States Pharmacopoeia. Rockville: the U.S. Pharmacopoeial Commission, Inc. 2008: 241-243.
4. CDER "Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Method" (online). Available at [www.fda.gov/CDER/GUIDANCE/cmc3.pdf](http://www.fda.gov/CDER/GUIDANCE/cmc3.pdf) (5 March 2009).
5. Kartal M. LC method for the analysis of paracetamol, caffeine and codeine phosphate in pharmaceutical preparations. J Pharm Biomed Anal 2001; 26(5-6): 857-64.
6. Pathare DB, Jadhav AS, Shingare MS, A validated stability indicating LC method for oxcarbazepine. J Pharm Biomed Anal 2007; 43(5): 1825-30.
7. Lake R. Assaying Local Anesthetics by GC/FID Optimizing System Suitability, Using an Rxi™-5ms Column (online). Available at [http://www.restek.com/aoi\\_pharm\\_A008.asp](http://www.restek.com/aoi_pharm_A008.asp) (5 March 2009).

8. Riley, CM, Efficiency, retention, selectivity and resolution in chromatography, In: Lough WJ, Wainer IW (ed) High performance liquid chromatography: Fundamental principles and practices. Glasgow: Backie academic & Professional 1996: 29-35.
9. Miller JM. Chromatographic principle, In: Miller JM, Crowther JB (ed) Analytical chemistry in a GMP practical guide. Toronto: John Wiley and Sons Inc., 2000: 185-216.
10. Rubinson JF, Rubinson KA, Separation and Chromatography, In: Contemporary Chemical Analysis. New Jersey: Prentice-Hall International Inc., 1998: 410-7.
11. Stout TH, Dorsy JG. High performance liquid chromatography, In: Onanessian L, Streeter AJ (ed) Handbook of Pharmaceutical Analysis. Basel: Marcel Dekker, Inc., 2002: 87-105.



## คำถาม

1. การทดสอบความเหมาะสมของระบบโดยทั่วไป ตามเกณฑ์ตำราของสหรัฐอเมริกา (USP) ไม่ได้มีการกำหนดให้ทำการทดสอบในหัวข้อใดต่อไปนี้
  1. Resolution
  2. Relative standard deviation
  3. Number of theoretical plates
  4. Capacity factor
  5. Tailing factor
2. ตามคู่มือ CDER “Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Method” สำหรับการวิเคราะห์ความคงสภาพ ไม่ได้กำหนดให้ทดสอบความเหมาะสมของระบบในหัวข้อใดต่อไปนี้
  1. Resolution
  2. Relative standard deviation
  3. Number of theoretical plates
  4. Capacity factor
  5. Tailing factor
3. พารามิเตอร์ใดที่มีผลสำคัญที่สุดต่อพารามิเตอร์การแยก ( $R$ )
  1.  $N$
  2.  $K'$
  3.  $\alpha$
  4.  $T$
  5.  $t_R$
4. ช่วงของค่า  $K'$  ในข้อใด ไม่เหมาะสมสำหรับการแยก
  1. 1-10
  2. 2-10
  3. 3-10
  4. 2-9
  5. 3-6

5. ข้อใดผิดเกี่ยวกับการทดสอบความเหมาะสมของระบบ
1. เกณฑ์ตามตำรายา USP ให้ทดสอบโดยใช้สภาวะการปฏิบัติงานที่ระบุในตำรายา เท่านั้น
  2. คู่มือ CDER "Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Method" สามารถใช้ได้กับวิธีโครมาโทกราฟีผิวบาง (TLC)
  3. ประสิทธิภาพของคอลัมน์เป็นปัจจัยที่มีผลต่อค่า  $\alpha$
  4. ความแรงของตัวทำละลายเป็นปัจจัยที่มีผลต่อค่า  $k'$
  5. น้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่างที่วิเคราะห์เป็นปัจจัยที่มีผลต่อค่า  $N$
6. การเปลี่ยนแปลงสภาวะการวิเคราะห์มากที่สุดที่ต้องทำการทดสอบความเหมาะสมของระบบ โดยไม่ต้องทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ เริ่มกำหนดในตำรายาของประเทศสหรัฐอเมริกา มาตั้งแต่เล่มใด
1. USP 24
  2. USP 27
  3. USP 29
  4. USP 30
  5. USP 31
7. เมื่อสภาวะการวิเคราะห์ในตำรายาของประเทศสหรัฐอเมริกา กำหนดว่า (a) a stainless steel column (25 cm x 4.6 mm) packed with *octadecylsilyl silica gel for chromatography* (5 $\mu$ m), (b) as the mobile phase with a flow rate of 1.0 ml per minute a mixture of 1 volume of trifluoroacetic acid, 30 volumes of acetonitrile and 69 volumes of water and (c) a detection wavelength of 271 nm. การเปลี่ยนแปลงสภาวะการวิเคราะห์ในข้อใดต่อไปนี ต้องทำการทดสอบความเหมาะสมของระบบ โดยไม่ต้องทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ตามเกณฑ์ในตำรายาของประเทศสหรัฐอเมริกา
1. mobile phase with a flow rate of 1.7 ml per minute
  2. a column (15 cm x 4.6 mm) packed with *octadecylsilyl silica gel for chromatography* (3  $\mu$ m)
  3. detection wavelength of 217 nm.
  4. a column (5 cm x 4.6 mm) packed with *octadecylsilyl silica gel for chromatography* (1.7  $\mu$ m)
  5. ถูกทุกข้อ

8. จากข้อ 7. การเปลี่ยนแปลงสภาวะการวิเคราะห์ใดต่อไปนี้ ที่ต้องทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์
1. a column (5 cm x 4.6 mm) packed with *octylsilyl silica gel for chromatography* (3.5  $\mu$ m)
  2. detection wavelength of 267 nm.
  3. a flow rate of 2.0 ml per minute
  4. a column (25 cm x 4.6 mm) packed with *octadecylsilyl silica gel for chromatography* (1.7  $\mu$ m)
  5. ถูกทุกข้อ
9. จากข้อ 7. การเปลี่ยนแปลงสภาวะการวิเคราะห์ของ mobile phase ใดต่อไปนี้ ที่ต้องทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์
1. 1.3 volume of trifluoroacetic acid, 30 volumes of acetonitrile and 68.7 volumes of water
  2. 0.7 volume of trifluoroacetic acid, 30.3 volumes of acetonitrile and 70 volumes of water
  3. 1 volume of trifluoroacetic acid, 39 volumes of acetonitrile and 60 volumes of water
  4. 1 volume of trifluoroacetic acid, 20 volumes of acetonitrile and 79 volumes of water
  5. 1 volume of trifluoroacetic acid, 21 volumes of acetonitrile and 70 volumes of water
10. เมื่อสภาวะการวิเคราะห์กำหนดให้ใช้ 0.4% ammonium acetate : methanol (15 : 85) การเปลี่ยนแปลงของ mobile phase ใดต่อไปนี้ ที่ต้องทำการทดสอบความเหมาะสมของระบบ โดยไม่ต้องทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ตามเกณฑ์ในตำรายาของประเทศสหรัฐอเมริกา
1. 0.5% ammonium acetate : methanol (15 : 85)
  2. 0.5% ammonium acetate : methanol (11 : 89)
  3. 0.4% ammonium acetate : methanol (19.5 : 80.5)
  4. 0.4% ammonium acetate : methanol (10 : 90)
  5. 0.4% ammonium acetate : methanol (20 : 80)