

การประเมินความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์กรดซาลิซิลิก ในเครื่องสำอางครีมโดยห้องปฏิบัติการ ด้านเครื่องสำอางของอาเซียน

สุดธิดา หมี่ทอง ชุณหะภุสตา แก้วเอียน และจำเริญ ดวงงามยิ่ง

สำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ประเทศไทยได้นำเสนอวิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดซาลิซิลิก โดยใช้เอชพีแอลซี ซึ่งมีห้องปฏิบัติการของประเทศสมาชิกอาเซียนสมัครเข้าร่วมทดสอบวิธีจำนวน 8 แห่ง แต่ละแห่งได้รับวิธีวิเคราะห์ที่ได้ผ่านการทดสอบความถูกต้องของวิธีโดยห้องปฏิบัติการเดียว และตัวอย่างผลิตภัณฑ์ครีมผสมกรดซาลิซิลิกร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก จำนวน 1 ตัวอย่าง ผลที่ได้คือมีห้องปฏิบัติการสมาชิกส่งผลทดสอบ 5 แห่ง ไม่ส่งผลทดสอบ 3 แห่ง ปรับเปลี่ยนวิธีวิเคราะห์ 1 แห่ง จึงมีข้อมูลที่ใช้ได้จำนวน 4 แห่ง จากการศึกษาและประเมินผลทางสถิติ โดยประเมินค่าที่ผิดปกติด้วย Cochran's test และ Grubb's test ไม่พบผลทดสอบเป็น outlier และการประเมินความเที่ยงของวิธีอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ โดยมีค่า repeatability standard deviation (S_r) เท่ากับ 0.002, repeatability relative standard deviation ($RSD_r, \%$) เท่ากับ 0.43, repeatability limit (r_{95}) เท่ากับ 0.006, reproducibility standard deviation (S_R) เท่ากับ 0.039, reproducibility relative standard deviation ($RSD_R, \%$) เท่ากับ 7.68, reproducibility limit (R_{95}) เท่ากับ 0.109 และร้อยละการกลับคืน (% R) อยู่ระหว่าง 95.60-101.38 จากผลการศึกษาจึงได้ถูกกำหนดเป็นวิธีวิเคราะห์เครื่องสำอางของอาเซียนชื่อ ACM 009 และให้ประเทศไทยเป็นหน่วยงานจัดการทดสอบความชำนาญทางห้องปฏิบัติการของการวิเคราะห์ด้วยวิธี ACM 009

Accepted for publication, 20 August 2018

บทนำ

งานด้านเครื่องสำอางภายใต้ประชาคมเศรษฐกิจอาเซียน (ASEAN Economic Community; AEC) เริ่มดำเนินการตั้งแต่ปี พ.ศ. 2540 โดยคณะกรรมการเครื่องสำอางอาเซียน หรือ ASEAN Cosmetic Committee; ACC ภายใต้คณะกรรมการที่ปรึกษาด้านมาตรฐานและคุณภาพผลิตภัณฑ์ของอาเซียน (ASEAN Consultative Committee on Standards and Quality; ACCSQ) ได้ดำเนินการปรับกฎระเบียบด้านเครื่องสำอางของประเทศสมาชิก (ASEAN Member States; AMS) เรียกว่า บทบัญญัติเครื่องสำอางแห่งอาเซียน (ASEAN Cosmetic Directive; ACD) ในการประชุม ACC ครั้งที่ 9 เมื่อปี 2550 ได้ให้การรับรองการจัดตั้ง ASEAN Cosmetics Reference Laboratories (ACRL) จำนวน 4 ประเทศ ได้แก่ สาธารณรัฐอินโดนีเซีย, สหพันธรัฐมาเลเซีย, สาธารณรัฐสิงคโปร์ และราชอาณาจักรไทย ACC ได้แต่งตั้งคณะกรรมการห้องปฏิบัติการเครื่องสำอางอาเซียน (ASEAN Cosmetic Testing Laboratory Committee; ACTLC) เมื่อวันที่ 12 กรกฎาคม 2555 โดยมีหน้าที่ความรับผิดชอบพัฒนาศักยภาพของห้องปฏิบัติการของประเทศสมาชิกตามวิธีทดสอบที่ได้กำหนดเป็นวิธีวิเคราะห์เครื่องสำอางอาเซียน (ASEAN Cosmetic Method; ACM) ACRL ทำหน้าที่ให้ความช่วยเหลือด้านเทคนิคให้แก่ภาครัฐเกี่ยวกับกิจกรรมการกำกับดูแลหลังออกสู่ตลาด และด้านห้องปฏิบัติการอาเซียน การทดสอบความชำนาญทางห้องปฏิบัติการ (proficiency testing) ที่เกี่ยวข้อง และพัฒนาวิธีการใหม่ เพื่อรองรับความต้องการการทดสอบในอนาคต⁽¹⁾

การจัดทำวิธีวิเคราะห์เครื่องสำอางเพื่อกำหนดเป็นวิธีวิเคราะห์เครื่องสำอางอาเซียน (ASEAN Cosmetic Method: ACM) มีขั้นตอนตาม Guideline on Establishing ASEAN Cosmetic Method (ACM)⁽²⁾ กล่าวคือ ACTLC จะคัดเลือกสารที่สนใจซึ่งอาจเป็นสารห้ามใช้ หรืออยู่ในรายการสารควบคุมที่ระบุไว้ใน ACD และมีวิธีวิเคราะห์ที่ได้ทดสอบความถูกต้องของวิธีแล้ว หรืออาจเป็นการทดสอบสารที่ ACC ร้องขอ หลังจากนั้นจะเวียนเอกสารวิธีวิเคราะห์ให้ประเทศสมาชิกทบทวนและให้ข้อคิดเห็นเพื่อเสนอเป็นร่างวิธีวิเคราะห์ ซึ่งจะจัดให้มีการทดสอบความถูกต้องของวิธี โดยห้องปฏิบัติการหลายแห่งที่มีความเชี่ยวชาญ (interlaboratory comparison study) โดยประเทศที่เป็นห้องปฏิบัติการเริ่มต้น (initiating laboratory) จะส่งร่างวิธีวิเคราะห์ที่นำเสนอ พร้อมตัวอย่างทดสอบให้ห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมการทดสอบ และนำผลการวิเคราะห์ที่ดำเนินการทดสอบตามร่างวิธีวิเคราะห์ที่นำเสนอมาทดสอบทางสถิติเพื่อประเมินความถูกต้องและแม่นยำของวิธี เป็นข้อมูลในการปรับปรุง หรือนำเสนอวิธีเป็น ACM ใหม่ต่อไป

กรดซาลิซิลิก (Salicylic Acid) เป็นกรดอินทรีย์ที่เป็นอนุพันธ์ของสารฟีนอล ใช้เป็นส่วนผสมเครื่องสำอางหลายชนิด โดยเป็นสารสำคัญสำหรับใช้ลอกผิว และผลัดเซลล์ผิว ซึ่งจะช่วยให้กระบวนการผลัดเซลล์ผิวทำให้ผิวหนังมีความสม่ำเสมอ ช่วยต้านเชื้อแบคทีเรีย ลดอาการเกิดสิว และการอุดตันของผิว การออกฤทธิ์สำหรับการลอกผลัดเซลล์ผิวของกรดซาลิซิลิกเกิดจากการออกฤทธิ์ลดความเป็นกรด-ด่างของผิว ทำให้เกิดการบวมตัวของเคราตินในชั้นผิวหนัง แรงการผลัดผิวของชั้นถัดไป นอกจากนี้ยังใช้เป็นส่วนผสมของน้ำยาทำความสะอาดที่ใช้สำหรับร่างกาย และเป็นส่วนประกอบของเคมีภัณฑ์เครื่องสำอางเพื่อจุดประสงค์ในการต้าน และกำจัดเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ โดยกรดซาลิซิลิกทำให้สารละลายมีสภาพเป็นกรด ช่วยต่อต้าน และยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้^(3, 4, 5)

ASEAN Cosmetic Document (Update September 2007)⁽⁵⁾ กำหนดสารควบคุมปริมาณและเงื่อนไขใน Annex III Part 1 - List of Substances Which Cosmetic Products Must Not Contain Except Subject to Restrictions and Conditions Laid Down ลำดับที่ a 98 อนุญาตให้ใช้กรดซาลิซิลิกในผลิตภัณฑ์สำหรับเส้นผมที่ใช้แล้วล้างออกในปริมาณไม่เกิน 3.0% ผลิตภัณฑ์ประเภทอื่นๆ ใช้ในปริมาณไม่เกิน 2.0% และห้ามใช้ในผลิตภัณฑ์ที่ใช้กับเด็กอายุต่ำกว่า 3 ปี และกำหนดปริมาณและเงื่อนไขสารที่ใช้เป็นวัตถุกันเสียใน Annex VI - List of preservatives allowed for use in cosmetic products ลำดับที่ a 3 อนุญาตให้ใช้กรดซาลิซิลิกและเกลือของสารนี้เป็นวัตถุกันเสียในเครื่องสำอางได้ในปริมาณไม่เกิน 0.5% (คำนวณในรูปกรด) ห้ามใช้ในผลิตภัณฑ์ที่ใช้กับเด็กอายุต่ำกว่า 3 ปี ยกเว้นในแชมพู ทั้งนี้ข้อกำหนดดังกล่าวราชอาณาจักรไทยได้นำมาเป็นประกาศกระทรวงสาธารณสุขด้วย^{(6), (7)}

ราชอาณาจักรไทยโดยสำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงของประเทศด้านเครื่องสำอางได้เสนอวิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดซาลิซิลิกในเครื่องสำอางครีม โดยวิธีเอชพีแอลซีให้เป็นวิธีวิเคราะห์ของอาเซียนครั้งแรกในการประชุมคณะกรรมการเครือข่ายห้องปฏิบัติการอาเซียน (ASEAN Cosmetic Testing Laboratory Network; ACTLN) ซึ่งเป็นคณะกรรมการเริ่มต้นก่อนที่จะเป็น ACTLC วิธีนี้ได้รับการทวนสอบโดยห้องปฏิบัติการเดียว (single laboratory validation) ของสำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย และได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2005 สำหรับการวิเคราะห์กรดซาลิซิลิก ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เพื่อควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของกรดซาลิซิลิกตามข้อกำหนดของอาเซียน และราชอาณาจักรไทย

การศึกษานี้เป็นการทำ Interlaboratory comparison study จัดเป็น multi-laboratory method validation ที่มีการดำเนินการตามขั้นตอน (protocol) ที่นานาชาติยอมรับ เพื่อได้ข้อมูลสนับสนุนให้วิธีมีความน่าเชื่อถือ และยอมรับให้เป็นวิธีวิเคราะห์เครื่องสำอางอาเซียน

วัสดุและวิธีการ

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการเดียว

1. การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์⁽⁸⁾ กรดซาลิซิลิกในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางโดยวิธีเอชพีแอลซี

1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Waters, USA) ประกอบด้วย ระบบ HPLC (Alliance 2698, Waters, USA) คอลัมน์ (Hypersil gold, 5 μ m, 4.6 mm x 150 mm (Thermo SCIENTIFIC) และ photodiode array detector (2998, Waters, USA), Hot air incubator (Thermark, Germany)

1.2 สารเคมีและสารมาตรฐาน

- สารเคมี : methyl alcohol (HPLC), glacial acetic acid (AR), น้ำบริสุทธิ์ (pure water)
- สารมาตรฐาน : salicylic acid พร้อมใบรับรอง (COA)

1.3 ตัวอย่างทดสอบ

ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางประเภทครีมผลิตจากสูตรครีมพื้นฐานผสมกรดซาลิซิลิกความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก จำนวน 1 ตัวอย่าง (ความเข้มข้นนี้กำหนดให้ใช้ได้สูงสุดในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่ไม่ต้องล้างออก เช่น ประเภทครีม)

1.4 วิธีวิเคราะห์

ละลายตัวอย่างด้วย methyl alcohol 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายโมบายเฟส ฉีดสารละลายและวิเคราะห์ปริมาณสารกรดซาลิซิลิกด้วยเครื่องของเหลวประสิทธิภาพสูง (HPLC) โดยมีรายละเอียดตามวิธีวิเคราะห์ที่ส่งให้ห้องปฏิบัติการในการทำ interlaboratory comparison

1.5 การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการทดสอบ (Linearity and Range)

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดซาลิซิลิก 5 ระดับความเข้มข้น 2, 6, 10, 20 และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 0.995

1.6 การทดสอบความเที่ยง (precision)

1.6.1 ความทำซ้ำได้ (repeatability)

วิเคราะห์ปริมาณกรดซาลิซิลิกในตัวอย่างครีม ซ้ำ 7 ครั้ง คำนวณค่าเฉลี่ยและร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, % RSD)

1.6.2 Intermediate precision

วิเคราะห์ปริมาณกรดซาลิซิลิกในตัวอย่างครีม ซ้ำ 7 ครั้ง 5 วัน คำนวณค่าเฉลี่ยและร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

1.7 การทดสอบความแม่นยำ (accuracy)

เตรียมตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานกรดซาลิซิลิกที่ 3 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ คือ ร้อยละ 50, 100 และ 150 ของระดับความเข้มข้นที่พบกรดซาลิซิลิกในตัวอย่างครีมที่เตรียม คำนวณค่าร้อยละของการคืนกลับ (% recovery)

1.8 การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด (measurement uncertainty)

ประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์กรดซาลิซิลิก โดยการคิดความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์เป็นค่ารวมของทุกแหล่งที่มีผลกระทบต่อผลทดสอบที่เป็นเชิงปริมาณ

$$\frac{u_c(\text{salicylic acid})}{\text{content of salicylic acid}} = \sqrt{\left[\frac{u(W)}{W}\right]^2 + \left[\frac{u(V)}{V}\right]^2 + \left[\frac{u(C_x)}{C_x}\right]^2 + \left[\frac{u(C_0)}{C_0}\right]^2 + \left[\frac{u(\text{Pre})}{\text{Pre}}\right]^2 + \left[\frac{u(\text{Rec})}{\text{Rec}}\right]^2}$$

2. การทดสอบคุณสมบัติ⁽²⁾ ของตัวอย่างที่ผลิตขึ้นโดยห้องปฏิบัติการก่อนนำเสนอขั้นตอนการดำเนินงาน

เตรียมตัวอย่างครีมจากสูตรพื้นฐานผสมกรดซาลิซิลิกความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก จำนวน 40 หลอด หลอดละ 20 กรัม เพื่อทดสอบคุณสมบัติที่มีความเป็นเนื้อเดียวกันและมีความคงตัวต่อสภาวะต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิบ่มเร่ง และสภาวะขนส่ง

2.1 การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity test)

โดยการสุ่มตัวอย่างแบบคละ จำนวน 10 หลอด ทดสอบหลอดละ 2 ซ้ำ นำผลวิเคราะห์ที่ได้ประเมินผลทางสถิติ โดยทดสอบความเบี่ยงเบนภายในตัวอย่าง (within sample variation) เพื่อศึกษาความเที่ยง (precision) ของเนื้อครีมในแต่ละหลอดใช้ Cochran's test ค่า C_{cal} ต้องน้อยกว่าค่าจากตาราง (Cochran's table: C_{table}) ซึ่ง C_{table} เท่ากับ 0.602 (C95%, n = 10) และทดสอบความเบี่ยงเบนระหว่างตัวอย่าง (between-sample variation) โดยประเมินค่า between-sample standard deviation; s_s ต้องน้อยกว่า $0.3\sigma_p$ ที่คำนวณจาก Horwitz's equation ($\sigma_p = 0.02 c^{0.8495}$) แสดงว่า ตัวอย่างมีความเป็นเนื้อเดียวกันเพียงพอ

2.2 ทดสอบความคงตัว (stability test)

โดยสุ่มตัวอย่างแบบคละ จำนวน 10 หลอด แบ่งตัวอย่างเก็บในสภาวะอุณหภูมิห้อง (25 ± 5 องศาเซลเซียส : °C) จำนวน 5 ตัวอย่าง และเก็บตัวอย่างในสภาวะอุณหภูมิบ่มเร่ง (42 ± 1 °C) จำนวน 5 ตัวอย่าง นำมาทดสอบแต่ละสภาวะทุก 10 วัน รวมทดสอบ 5 ครั้ง เป็นเวลา 50 วัน เปรียบเทียบค่าความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของผลทดสอบทุก 10 วัน กับค่าเฉลี่ยจากการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันจากข้อ 2.1 ต้องมีค่าน้อยกว่า $0.3\sigma_p$ แสดงว่า ตัวอย่างมีความคงตัวเพียงพอตลอดระยะเวลาการศึกษา

การทดสอบคุณสมบัติของตัวอย่าง⁽²⁾ ก่อนส่งให้ห้องปฏิบัติการสมาชิก

1. ตัวอย่างทดสอบ

ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางประเภทครีม ผลิตจากสูตรครีมพื้นฐานผสมกรดซาลิซิลิกเช่นเดียวกับการทดสอบคุณสมบัติตัวอย่างโดยห้องปฏิบัติการเดียวก่อนนำเสนอให้เป็นวิธีใหม่ เพื่อคัดเลือกเป็นวิธีวิเคราะห์เครื่องสำอางอาเซียน (ACM) แต่ปรับให้มีส่วนผสมของกรดซาลิซิลิกเข้มข้นร้อยละ 0.50 โดยน้ำหนัก จำนวน 1 ตัวอย่าง เนื่องจากกรดซาลิซิลิกที่ความเข้มข้นดังกล่าวถูกกำหนดให้เป็นวัตถุกันเสียในเครื่องสำอางที่ยังไม่มีข้อจำกัดด้านความปลอดภัยเหมือนวัตถุกันเสียชนิดอื่น เช่น สารกลุ่มพาราเบน เป็นต้น

2. การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน

ทดสอบและประเมินเช่นเดียวกับการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของการทดสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการเดียว

3. การทดสอบความคงตัว

ทดสอบและประเมินผลความคงตัวของตัวอย่าง 2 ช่วงเวลา คือ ก่อนส่งตัวอย่างให้ห้องปฏิบัติการสมาชิก และหลังจากห้องปฏิบัติการสมาชิกส่งผลทดสอบ ดังนี้

3.1 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของผลวิเคราะห์ตัวอย่างก่อนส่งให้ห้องปฏิบัติการสมาชิก ($\bar{y}_1$) กับค่าเฉลี่ยจากการศึกษาความเป็นเนื้อเดียวกัน ($\bar{x}$) จากข้อ 2. ค่าแตกต่างต้องไม่เกิน $0.3\sigma_p$

3.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของผลวิเคราะห์ตัวอย่างหลังจากห้องปฏิบัติการสมาชิกส่งผลการทดสอบ ($\bar{y}_2$) กับค่าเฉลี่ยจากการศึกษาความเป็นเนื้อเดียวกัน ($\bar{x}$) จากข้อ 2. ค่าแตกต่างต้องไม่เกิน $0.3\sigma_p$

3.3 เปรียบเทียบค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของผลวิเคราะห์ตัวอย่างก่อนส่งตัวอย่างให้สมาชิก ($\bar{y}_1$) กับค่าเฉลี่ยของผลวิเคราะห์ตัวอย่างหลังสมาชิกส่งผลการทดสอบ ($\bar{y}_2$) ต้องไม่เกิน $0.3\sigma_p$

การส่งตัวอย่างทดสอบและเอกสารสำหรับห้องปฏิบัติการสมาชิก

บรรจุตัวอย่างครีมผสมกรดซาลิซิลิกความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก จำนวน 1 หลอด ที่ห่อหุ้มด้วยวัสดุกันกระแทก วิธีวิเคราะห์ แบบตอบรับตัวอย่าง คำแนะนำ แบบรายงานผล รวมไปถึงซองกระดาษปิดผนึก ส่งทางไปรษณีย์ลงทะเบียนด่วนพิเศษ

ในคำแนะนำระบุให้ห้องปฏิบัติการเก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง ตรวจวิเคราะห์ตามวิธีที่กำหนด ส่งผลกลับภายในกำหนด โดยรายงานข้อมูลสารมาตรฐานที่ใช้ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน 5 ระดับ และข้อมูลของกราฟมาตรฐานที่ได้ สภาวะเครื่องมือ ผลทดสอบในรูปแบบฟอร์มที่กำหนดด้วยทศนิยม 2 ตำแหน่ง ร้อยละของการคืนกลับ

วิธีวิเคราะห์ประกอบด้วยรายละเอียดของวิธีวิเคราะห์ การทดสอบร้อยละการคืนกลับของกรดซาลิซิลิก ดังนี้

1. การทดสอบตัวอย่างครีมผสมกรดซาลิซิลิก

1.1 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง (sample preparation)

1.1.1 ชั่งตัวอย่างครีม 0.5 กรัม หรือน้ำหนักที่ได้จากการคำนวณให้ได้ความเข้มข้นอยู่ในช่วงกราฟมาตรฐาน (ความละเอียด ± 0.0001 กรัม) ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มล. ซ้ำ 2 ครั้ง ระบุฉลาก A และ B

1.1.2 เติมนเมทิลแอลกอฮอล์ 10 มล. ละลายตัวอย่างด้วยเครื่องวอร์เทคสลับกับเครื่องเขย่าความถี่สูง ปรับปริมาตรด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase)

1.1.3 กรองด้วยแผ่นกรองชนิด PVDF ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ใส่ในขวดฉีดสำหรับเครื่องเอชพีแอลซี

1.2 การคำนวณ (calculation)

$$\text{กรดซาลิซิลิก (ร้อยละของน้ำหนัก)} = \frac{c \times 25 \times 100}{w \times 100000}$$

เมื่อ c = ความเข้มข้นของกรดซาลิซิลิกที่ได้จากสมการเส้นตรง (ไมโครกรัมต่อกรัม)

w = น้ำหนักของตัวอย่างครีมผสมกรดซาลิซิลิก (กรัม)

2. การทดสอบร้อยละการคืนกลับของกรดซาลิซิลิก (% recovery)

2.1 การเตรียมสารละลายตัวอย่างครีมที่เติมสารมาตรฐานกรดซาลิซิลิก

2.1.1 ซึ่งตัวอย่างครีมเช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายตัวอย่าง ข้อ 1.1.1 โดยทำ 2 ขั้ว ระบุผลลาก

C และ D

2.1.2 เติมน้ำละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้นเท่ากับปริมาณกรดซาลิซิลิกที่พบในตัวอย่างครีมที่ยังไม่ได้เติมน้ำละลายมาตรฐานกรดซาลิซิลิก (คิดเป็นร้อยละ 100 ของปริมาณกรดซาลิซิลิกที่พบในตัวอย่างครีม)

2.1.3 ทำตามขั้นตอน ข้อ 1.1.2 และ 1.1.3

2.2 การคำนวณ

$$\% \text{ recovery} = \frac{(C_1 - C_2)}{C_3} \times 100$$

เมื่อ

C_1 = ปริมาณกรดซาลิซิลิกในตัวอย่างครีมรวมกับปริมาณกรดซาลิซิลิกที่เติมในตัวอย่างครีม (ร้อยละโดยน้ำหนัก)

C_2 = ปริมาณกรดซาลิซิลิกที่พบในตัวอย่างครีม (ร้อยละโดยน้ำหนัก)

C_3 = ปริมาณกรดซาลิซิลิกที่เติมในตัวอย่างครีม (ร้อยละโดยน้ำหนัก)

การประเมินผลทดสอบของสมาชิกด้วยวิธีทางสถิติ^(2, 9) (statistic evaluation of member results)

1. ทดสอบหาค่าผิดปกติระหว่างห้องปฏิบัติการ (interlaboratory outlier test)

1.1 ทดสอบความแตกต่างของผล within-laboratory ของห้องปฏิบัติการสมาชิกจาก Cochran test โดยเปรียบเทียบค่า C จากการคำนวณกับตาราง Cochran สำหรับค่า $P = 2.5\%$ (1-tail) และ L = จำนวนห้องปฏิบัติการ

$$C = \frac{S_{\max}}{\sum S_i}$$

1.2 ทดสอบความแตกต่างของผล between-laboratory ของห้องปฏิบัติการสมาชิกจากกรณีค่าสงสัยมีค่าเดียว (single Grubbs' test)

คำนวณค่าเฉลี่ยผลการทดสอบแต่ละห้องปฏิบัติการสมาชิก ($\bar{x}$) คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของผลทดสอบจากห้องปฏิบัติการสมาชิก (S) คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของข้อมูลเมื่อไม่มีค่าต่ำสุดของข้อมูล (S_L) และคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของข้อมูลเมื่อไม่มีค่าสูงสุดของข้อมูล (S_H) คำนวณค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ลดลง ดังนี้

$$G_L = 100 \times [1 - (S_L/S)] \text{ และ } G_H = 100 \times [1 - (S_H/S)]$$

เมื่อ G_L = ร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ลดลงเมื่อไม่มีค่าต่ำสุดของข้อมูล

G_H = ร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ลดลงเมื่อไม่มีค่าสูงสุดของข้อมูล

เปรียบเทียบค่า G_L และค่า G_H ที่คำนวณได้กับค่าวิกฤติในตาราง Grubb's table ที่จำนวน L ข้อมูล ถ้าค่า G สูงกว่าค่าวิกฤติที่ $P = 2.5\%$ (2-tail) แสดงว่า ค่าที่สงสัยนั้นเป็นค่าผิดปกติ

2. คำนวณความเที่ยงของวิธี (precision)

คำนวณจากผลการทดสอบจากห้องปฏิบัติการสมาชิกที่ทดสอบค่าผิดปกติแล้ว ถ้าไม่พบให้ใช้ผลการทดสอบทั้งหมดในการคำนวณ

2.2.1 Reproducibility standard deviation (S_R)

$$S_R = \sqrt{(S_L^2 + S_r^2)}$$

เมื่อ y_i = ค่าเฉลี่ยของการทำ 2 ซ้ำของแต่ละห้องปฏิบัติการสมาชิก

p = จำนวนห้องปฏิบัติการสมาชิก

$$S_L^2 = \frac{pT_2 - T_1^2}{p(p-1)} - \frac{S_r^2}{2}$$

$$T_1 = \sum_{i=1}^p y_i$$

$$T_2 = \sum_{i=1}^p y_i^2$$

2.2.2 Reproducibility relative standard deviation (% RSD_R)

$$\%RSD_R = \frac{S_R \times 100}{X}$$

เมื่อ X = ค่าเฉลี่ยผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการสมาชิก

2.2.3 Reproducibility limit, $R = 2.8S_R$

2.2.4 The Horwitz Ratio (HORRAT)

ค่า HORRAT ใช้เป็นค่าการยอมรับความเที่ยงของวิธี คำนวณจาก

$$HORRAT = \frac{RSD_R(Calc.)\%}{RSD_R(Exp.)\%}$$

เมื่อ

$$RSD_R(\text{Calc.})\% = \% \text{ RSD ที่คำนวณได้จากการทดสอบ}$$

$$RSD_R(\text{Exp.})\% = \% \text{ RSD ที่คำนวณได้จาก Horwitz's equation}$$

2.2.5 Repeatability standard deviation (S_r)

$$S_r = \sqrt{\frac{T_3}{2p}}$$

เมื่อ $T_3 = \sum_{i=1}^P w_i^2$

w_i = ค่าต่างของการทำ 2 ซ้ำของแต่ละห้องปฏิบัติการสมาชิก

p = จำนวนห้องปฏิบัติการสมาชิก

2.2.6 Repeatability relative standard deviation ($\% RSD_r$)

$$\% RSD_r = \frac{S_r \times 100}{X}$$

เมื่อ X = ค่าเฉลี่ยผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการสมาชิกที่ทดสอบค่าผิดปกติแล้ว

2.2.7 Repeatability limit, $r = 2.8S_r$

3. การทดสอบความแม่นยำของวิธี

คำนวณค่าร้อยละการคืนกลับของกรดซาลิซิลิก (% recovery) จากการวิเคราะห์ตัวอย่างครีมที่เติมสารมาตรฐานกรดซาลิซิลิกในความเข้มข้นเท่ากับค่าความเข้มข้นของกรดซาลิซิลิกที่ตรวจพบในตัวอย่าง ต้องได้ค่าร้อยละของการคืนกลับไม่น้อยกว่าร้อยละ 90

ผล

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์และคุณสมบัติของตัวอย่างโดยห้องปฏิบัติการเดียว

ทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์กรดซาลิซิลิกในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางโดยวิธีเอสพีแอลซี

ผลการทดสอบและประเมิน ความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 2 ถึง 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมของห้องปฏิบัติการด้านเครื่องสำอางทางเคมีของสำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9996 ทดสอบความเที่ยงของวิธีได้ร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์ เท่ากับ 0.04 อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ($\% RSD < 3$) ความแม่นยำจากการทดสอบตัวอย่างเติมสารมาตรฐานในช่วงใช้งาน 3 ระดับ ระดับละ 7 ซ้ำ ได้ค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ระหว่างร้อยละ 96.79 ถึง 104.57 จากการทดสอบค่าขีดจำกัดของการตรวจพบเชิงคุณภาพ (LOD) เท่ากับร้อยละ 0.005 และทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบเชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับร้อยละ 0.01 ค่าความไม่แน่นอนของวิธีวิเคราะห์ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เท่ากับร้อยละ 0.11 โดยน้ำหนัก (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์กรดซาลิซิลิกในเครื่องสำอางโดยวิธีเอชพีแอลซี

Parameter	Results
1. Linearity and range	
1.1 System linearity: standard solution	1 – 30 µg/mL
– correlation coefficient (r)	0.9996
1.2 Method linearity: spiked sample at level 50%, 100% and 150% of salicylic acid in cream sample	0.9988
2. Precision	
2.1 Precision (method)	
2.1.1 Repeatability: % RSD: n = 7	0.04%
2.1.2 Intermediate precision: % RSD	
– between days: 5 days, n = 7	0.08%
– between analysts: n = 2	0.04%
3. % recovery:	97 – 104%
(spiked sample at levels 50%, 100%, and 150% of salicylic acid in cream sample)	
4. Limit of Detection (LOD)	0.005% w/w
5. Limit of Quantitation (LOQ)	0.01% w/w
6. Expanded uncertainty at 95% confidence level, U_{95}	0.11% w/w

การทดสอบคุณสมบัติของตัวอย่างที่ผลิตขึ้นโดยห้องปฏิบัติการก่อนนำเสนอวิธีดำเนินการ

ความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างทดสอบสูตรตำรับ

จากการทดสอบตัวอย่างครีมผสมกรดซาลิซิลิกเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก จำนวน 10 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 2 ขั้ว นำผลการทดสอบประเมินทางสถิติ โดยคำนวณจาก Cochran test ได้ค่า $C_{cal} = 0.393 < C_{table} = 0.602$ แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างภายในตัวอย่าง และคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (s_s) ได้เท่ากับ 0.0001 เปรียบเทียบกับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเป้าหมายที่คำนวณจาก Horwitz's equation ได้ค่า $0.3\sigma_p$ เท่ากับร้อยละ 0.0217 โดยน้ำหนัก จึงได้ ค่า $s_s < 0.3\sigma_p$ แสดงว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง ดังนั้น ตัวอย่างที่ผลิตขึ้นโดยห้องปฏิบัติการมีความเป็นเนื้อเดียวกันเพียงพอ

ความคงตัวของตัวอย่างทดสอบสูตรตำรับ

จากการทดสอบตัวอย่างครีมผสมกรดซาลิซิลิกเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก โดยสุ่มตัวอย่างแบบคละ จำนวน 10 หลอด แบ่งตัวอย่างเก็บในสภาวะอุณหภูมิห้อง ($25 \pm 5^\circ\text{C}$) จำนวน 5 ตัวอย่าง นำมาทดสอบแต่ละสภาวะ ทุก 10 วัน รวมทดสอบ 5 ครั้ง เป็นเวลา 50 วัน เปรียบเทียบค่าความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของผลทดสอบ ทุก 10 วัน กับค่าเฉลี่ยจากการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (ร้อยละ 2.0071 โดยน้ำหนัก) ได้ค่าความแตกต่าง ร้อยละ 0.0021, 0.0069, 0.0036, 0.0013 และ 0.0034 ตามลำดับ และเก็บตัวอย่างในสภาวะอุณหภูมิบ่มเร่ง ($42 \pm 1^\circ\text{C}$) จำนวน 5 ตัวอย่าง นำมาทดสอบเช่นเดียวกัน ได้ค่าความแตกต่างร้อยละ 0.0026, 0.0072, 0.0036, 0.0048 และ 0.0014 ตามลำดับ ซึ่งทุกค่ามีค่าน้อยกว่า $0.3\sigma_p$ (ร้อยละ 0.0217 โดยน้ำหนัก) แสดงว่า ตัวอย่างมีความคงตัวเพียงพอต่อสภาวะทดสอบตลอดระยะเวลาศึกษา

การทดสอบคุณสมบัติของตัวอย่างก่อนส่งให้ห้องปฏิบัติการสมาชิก

ความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างทดสอบ

จากการทดสอบตัวอย่างครีมผสมกรดซาลิซิลิกเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก จำนวน 10 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 2 ขั้ว นำผลการทดสอบประเมินทางสถิติ จาก Horwitz's equation ได้ค่า $0.3\sigma_p$ เท่ากับ 0.007 คำนวณจาก Cochran test ได้ค่า $C_{cal} = 0.333 < C_{table} = 0.602$ แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างภายในตัวอย่าง และคำนวณค่า s_s เท่ากับ 0.001 มีค่าน้อยกว่า $0.3\sigma_p$ แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง ดังนั้น ตัวอย่างทดสอบจึงมีความเป็นเนื้อเดียวกันเพียงพอสำหรับใช้ประเมินผลทดสอบวิธีวิเคราะห์

ความคงตัวของตัวอย่างทดสอบ

จากการทดสอบตัวอย่างครีมผสมกรดซาลิซิลิกเข้มข้นร้อยละ 0.5 จำนวน 2 ตัวอย่าง ก่อนส่งให้ห้องปฏิบัติการสมาชิก $|\bar{y}_1|$ มีค่าความเข้มข้นเฉลี่ยร้อยละ 0.5487 และหลังห้องปฏิบัติการสมาชิกส่งผลทดสอบ $|\bar{y}_2|$ มีค่าความเข้มข้นเฉลี่ยร้อยละ 0.5491 เมื่อเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยของตัวอย่างจากการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (ความเข้มข้นเฉลี่ยร้อยละ 0.5483) พบว่า น้อยกว่า $0.3\sigma_p$ แสดงว่า ตัวอย่างทดสอบมีความคงตัวเพียงพอตลอดระยะเวลาศึกษา

การประเมินผลการทดสอบตัวอย่างโดยห้องปฏิบัติการสมาชิก

สมาชิกสมัครเข้าร่วมทวนสอบวิธีวิเคราะห์กรดซาลิซิลิกในผลิตภัณฑ์ครีม จำนวน 8 แห่ง แต่เมื่อครบกำหนดเวลาห้องปฏิบัติการสมาชิกส่งผลเพียง 5 แห่ง ซึ่งห้องปฏิบัติการสมาชิกที่ 4 ใช้สภาวะของเครื่องมือในการทดสอบต่างไปจากวิธีวิเคราะห์ที่กำหนดให้ทวนสอบ จึงมีข้อมูลที่ใช้ในการประเมินผลเพียง 4 แห่ง โดยรายงานผลทดสอบปริมาณกรดซาลิซิลิกของตัวอย่าง A และ B จากห้องปฏิบัติการสมาชิกที่ 1 เท่ากับร้อยละ 0.46 และ 0.46 โดยน้ำหนัก, จากห้องปฏิบัติการสมาชิกที่ 2 เท่ากับร้อยละ 0.521 และ 0.527 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ, จากห้องปฏิบัติการสมาชิกที่ 3 เท่ากับร้อยละ 0.5487 และ 0.5499 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และห้องปฏิบัติการสมาชิกที่ 5 เท่ากับร้อยละ 0.492 และ 0.491 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าค่าร้อยละการคืนกลับของห้องปฏิบัติการจำนวน 4 แห่ง อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ทั้งหมด (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลทดสอบของห้องปฏิบัติการสมาชิกที่ใช้วิธีวิเคราะห์เหมือนกัน 4 แห่ง

ห้องปฏิบัติการ ที่	ปริมาณกรดซาลิซิลิก (% w/w)		ร้อยละการคืนกลับ (%)	
	A	B	C	D
1	0.46	0.46	101.38	100.12
2	0.521	0.527	NR	NR
3	0.5487	0.5499	96.29	95.60
4*	-	-	-	-
5	0.492	0.491	98.2	100.2
mean	0.51		98.63	
SD	0.04		2.33	
RSD (%)	7.84		2.36	

หมายเหตุ NR หมายถึง ห้องปฏิบัติการสมาชิกไม่ได้รายงาน

*ห้องปฏิบัติการที่ 4 ใช้สภาวะของระบบเครื่องมือในการทดสอบต่างไปจากวิธีวิเคราะห์ที่กำหนด จึงไม่นำผลทดสอบมาประเมิน

การทดสอบหาค่าผิดปกติระหว่างห้องปฏิบัติการ (interlaboratory outlier test) คำนวณโดยใช้สถิติ Cochran's test; $P = 2.5\%$ (1-tail) ไม่พบค่าสุดต่าง โดยค่า Cochran statistic $C_{cal} = 78.67 < C_{tab} = 94.30$ ที่จำนวนห้องปฏิบัติการ $L = 4$ และผลทดสอบจากห้องปฏิบัติการสมาชิกมีค่าที่น่าสงสัยที่อาจเป็นค่าผิดปกติ คือ ค่าต่ำสุดเท่ากับ 0.46 ค่าสูงสุดเท่ากับ 0.5499 (ตารางที่ 2) และจากการคำนวณโดยใช้ Grubb's test; $P = 2.5\%$ (1-tail) ไม่พบค่าผิดปกติของผลทดสอบจากห้องปฏิบัติการสมาชิกในทุกแห่ง โดยค่า G_L เท่ากับร้อยละ 28.14 และ G_H เท่ากับร้อยละ 9.47 ดังนั้นค่า G ของค่าที่น่าสงสัยทั้ง 2 มีค่าน้อยกว่า G_{table} ที่จำนวนห้องปฏิบัติการ $L = 4$ ค่าเท่ากับร้อยละ 86.1 แสดงว่า ค่าที่น่าสงสัยต่ำสุดและค่าที่น่าสงสัยสูงสุดไม่เป็นค่าสุดต่าง

การศึกษาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการสมาชิก ทำโดยการคำนวณค่า S_r , % RSD_r , r พบว่า Repeatability standard deviation (S_r), repeatability relative standard deviation (% RSD_r) และ Repeatability limit (r) เท่ากับ 0.002, 0.43 และ 0.006 ตามลำดับ โดยที่ค่า Reproducibility standard deviation (S_R), reproducibility relative standard deviation (% RSD_R) และ Reproducibility limit (R) เท่ากับ 0.039, 7.68 และ 0.109 ตามลำดับ ค่า HORRAT เท่ากับ 1.73 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 สรุปผลการประเมินคุณลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์กรดซาลิซิลิกในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางประเภทครีมของผลทดสอบจากห้องปฏิบัติการสมาชิก 4 ประเทศ รวม 4 แห่ง

หัวข้อการประเมิน	ผลลัพธ์
ความเข้มข้นของกรดซาลิซิลิกเฉลี่ยจากผลทดสอบของห้องปฏิบัติการสมาชิก 4 แห่ง (g/100 g)	0.5063
จำนวนห้องปฏิบัติการสมาชิก (L)	4
Repeatability standard deviation (S_r)(g/100 g)	0.002
Reproducibility standard deviation (S_R)(g/100 g)	0.039
Repeatability standard deviation (RSD_r)	0.43
Reproducibility standard deviation (RSD_R)	7.68
Repeatability (r) (g/100 g)	0.006
Reproducibility (R) (g/100 g)	0.11
relative reproducibility standard deviation (Horwitz equation) (RSD_R) (Exp.)	4.43
HORRAT value	1.73

วิจารณ์

การทำ interlaboratory comparison study เป็น multi-laboratory method validation ซึ่งเป็นการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่สมบูรณ์และน่าเชื่อถือ มีขั้นตอนที่ยอมรับในระดับสากล ตั้งแต่การเตรียมและการประเมินคุณสมบัติของตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่าง การประเมินความแตกต่างภายในตัวอย่าง จากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานภายในตัวอย่าง (within standard deviation) ด้วยการเปรียบเทียบค่า C_{cal} กับค่า C_{table} (Cochran's table) โดยต้องได้ค่า $C_{cal} < C_{table}$ และการประเมินความแตกต่าง

ระหว่างตัวอย่าง จากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานระหว่างตัวอย่าง (between standard deviation) ด้วยการเปรียบเทียบค่า s_s กับค่า $0.3\sigma_p$ จากการ predicted standard deviation โดยใช้ The Modified Horwitz Equation ได้ค่า $s_s \leq 0.3\sigma_p$ แสดงว่าตัวอย่างมีความเป็นเนื้อเดียวกันเพียงพอ และการทดสอบความคงตัวของตัวอย่างโดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณของกรดซาลิซิลิกในตัวอย่างก่อนการส่งตัวอย่างให้ห้องปฏิบัติการสมาชิกและหลังห้องปฏิบัติการสมาชิกส่งผลทดสอบได้น้อยกว่า $0.3\sigma_p$ แสดงว่าตัวอย่างมีความคงตัวเพียงพอตลอดระยะเวลาศึกษา

การศึกษานี้ไม่รวมผลทดสอบของห้องปฏิบัติการสมาชิกที่ใช้วิธีวิเคราะห์ต่างจากวิธีที่เสนอประเมินจึงประเมินผลทดสอบที่ได้จากห้องปฏิบัติการสมาชิกทั้งหมด 4 แห่ง ไม่พบผลทดสอบจากห้องปฏิบัติการสมาชิกเป็น outlier จากการทดสอบด้วย Cochran's test และ Grubb's test ความเที่ยงของวิธีเมื่อแสดงด้วยค่า Repeatability Relative Standard Deviation; RSD_r เท่ากับ 0.43, Reproducibility Relative Standard Deviation; RSD_R เท่ากับ 7.68 ค่า HORRAT เท่ากับ 1.73 ซึ่งมีค่าสูงกว่า 1.5 แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ไม่มีความเที่ยงในการวิเคราะห์ต่างห้องปฏิบัติการ แม้ว่าจำนวนห้องปฏิบัติการสมาชิกที่ส่งผลทดสอบถูกต้องตามเกณฑ์มีจำนวนน้อยเกินค่ามาตรฐานกำหนดคือ ต้องไม่ต่ำกว่า 6 แห่ง แต่ได้มติดียอมรับโดยหลักการให้เป็นวิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดซาลิซิลิกในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางโดยวิธีเอชพีแอลซีและประกาศใช้เป็น ASEAN Cosmetic Method (ACM) ชื่อ ACM 009⁽¹⁰⁾ อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์โดยการเปรียบเทียบผลทางห้องปฏิบัติการในรูปแบบการทดสอบความชำนาญทางห้องปฏิบัติการที่ใช้วิธีวิเคราะห์ที่กำหนด

ห้องปฏิบัติการสมาชิกทั้ง 4 แห่ง ทดสอบความแม่นยำของวิธีโดยการทดสอบร้อยละการคืนกลับของกรดซาลิซิลิกในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางประเภทครีม ซึ่งเป็นตัวอย่างเดียวกับที่ใช้ทดสอบวิธีวิเคราะห์ โดยการเติมสารมาตรฐานกรดซาลิซิลิกเพิ่มในตัวอย่างครีมด้วยความเข้มข้นเท่ากับปริมาณกรดซาลิซิลิกที่พบในตัวอย่าง (คิดเป็นความเข้มข้นร้อยละ 100 ของปริมาณกรดซาลิซิลิกที่พบในตัวอย่างครีม) ผลทดสอบของห้องปฏิบัติการสมาชิกได้ค่าเฉลี่ยของร้อยละการคืนกลับของกรดซาลิซิลิกร้อยละ 98.63 อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด (ในช่วงร้อยละ 97-104 ดังแสดงในตารางที่ 1) แสดงว่ามีการสูญเสียกรดซาลิซิลิกระหว่างการเตรียมตัวอย่างให้อยู่ในรูปของสารละลายตัวอย่างน้อยมากถึงไม่สูญเสียเลย

วิธีวิเคราะห์ที่จัดทำขึ้นจึงเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจกรดซาลิซิลิกในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ได้แก่ ทำให้เส้นผมอ่อนนุ่ม (ความเข้มข้นของกรดซาลิซิลิกไม่เกินร้อยละ 3.0 โดยน้ำหนัก)^(5,6) ลดรอยหยากริ้วของผิวหนัง (ความเข้มข้นของกรดซาลิซิลิกไม่เกินร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก)^(5,6) และเป็นวัตถุกันเสียในการยับยั้งการเกิดเชื้อจุลินทรีย์ (ความเข้มข้นของกรดซาลิซิลิกไม่เกินร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก)^(5,6)

สรุป

การประเมินความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยการทำ Interlaboratory comparison study ในครั้งนี้ทำให้ได้วิธีวิเคราะห์กรดซาลิซิลิก หรืออีกในชื่อเรียกว่า เบต้าไฮดรอกซีแอซิดในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง โดยวิธีเอชพีแอลซีและได้รับมติเห็นชอบจากคณะกรรมการเครื่องสำอางอาเซียน (ASEAN Cosmetic Testing Laboratory Committee; ACTLC) และจากคณะกรรมการเครื่องสำอางอาเซียน (ASEAN Cosmetic Committee; ACC) ให้เป็นวิธีวิเคราะห์เครื่องสำอางอาเซียน รหัส ACM 009 พร้อมทั้งให้ประเทศไทยเป็นหน่วยงานจัดการทดสอบความชำนาญทางห้องปฏิบัติการการวิเคราะห์ด้วยวิธีดังกล่าวด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการสมาชิกอาเซียนที่ให้ความร่วมมือในการเข้าร่วมประเมินความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์กรดซาลิซิลิกในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางโดยวิธีเอชพีแอลซี ดังรายชื่อต่อไปนี้ Cosmetic Laboratory National, Quality Control Laboratory of Drug and Food Indonesia สาธารณรัฐอินโดนีเซีย, Cosmetic Testing Unit, Center of Quality Control, National Pharmaceutical Regulatory Agency, Ministry of Health สหพันธรัฐมาเลเซีย, ห้องปฏิบัติการเครื่องสำอางด้านเคมี สำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ราชอาณาจักรไทย, Laboratory for Testing of Cosmetics (NIDQC) สาขาเมืองฮานอย สาธารณรัฐสังคมนิยมเวียดนามและ Cosmetics Analysis Department-Institute of Drug Quality control (IDQC-HCMC) สาขาเมืองโฮจิมินห์ซิตี สาธารณรัฐสังคมนิยมเวียดนาม

เอกสารอ้างอิง

1. Terms of reference of ASEAN cosmetic testing laboratories committee (ACTLC), Adopted at 3rd ACTLN, 2012 Jul 10.
2. ASEAN guideline on establishing ASEAN cosmetic method (ACM). Jakarta: ASEAN Secretariat; 2016.
3. Nikitakis JM, Rieger MM, Hewitt GT. CTEA cosmetic ingredient handbook. Washington, D.C.: Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association; 1988.
4. ASEAN consumer information handbook on cosmetic product. [Online]. 2014 [cited 2017 May 27]; [20 screens]. Available from: URL: <http://www.asean.org/storage/images/Community/AEC/Sectoral/standarandconformance/Handbook%20web%20publishing.pdf>.
5. ASEAN cosmetic documents (update September 2007). Bangkok: The Thai Cosmetic Manufacturers Association, 2008. Annex III Part 1, Annex VI Part 1.
6. พระราชบัญญัติเครื่องสำอาง พ.ศ. 2535 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง กำหนดชื่อและปริมาณของวัตถุที่อาจใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตเครื่องสำอาง. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 125 ตอนพิเศษ 162 ง (วันที่ 9 ตุลาคม 2551).
7. พระราชบัญญัติเครื่องสำอาง พ.ศ. 2558 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง กำหนดวัตถุกันเสียที่อาจใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตเครื่องสำอาง (พ.ศ. 2560). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 134 ตอนพิเศษ 167 ง (วันที่ 22 มิถุนายน 2560).
8. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
9. Baker CD. Statistical methods for collaborative analytical trials. [Online]. 1989 [cited 2017 May 27]; [3 screens]. Available from: URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/j.2050-0416.1989.tb04629.x>.
10. Report reference number 10th meeting of ACTLC, Final. Summary report The tenth meeting of the ASEAN cosmetic testing laboratories committee (ACTLC). 2017 Nov 14-15; Bandung, Indonesia; 2017

Multi-laboratory Method Validation on Determination of Salicylic Acid in Cosmetic Cream by ASEAN Cosmetic Testing Laboratory Network

Sudthida Meethong Chungrida Kao-ian and Jumrern Duangamyong

Bureau of Cosmetics and Hazardous Substances. Department of Medical Sciences. Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand

Abstract Thailand proposed a testing for determination of salicylic acid in cosmetic cream using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method. There were 8 ASEAN laboratories participating in validation of the test. A sample of skincare cream containing 0.5% w/w salicylic acid and a protocol to perform the test were distributed to each laboratory. A total of five laboratories submitted their results while no results were obtained from the rest. However, only results from 4 participating laboratories could be analyzed due to the fact that one laboratory did not conduct the test according to the protocol provided. Cochran's test and Grubb's test were used for statistical analysis. We found no outliers of the results and precision of the method was within acceptable criteria: repeatability standard deviation (S_r) was 0.002, repeatability relative standard deviation (RSD_r , %) was 0.43, repeatability limit (r_{95}) was 0.006, reproducibility standard deviation (S_R) was 0.039, reproducibility relative deviation (RSD_R , %) was 7.68, reproducibility limit (R_{95}) was 0.109 and a mean percentage of recovery was in a range of 95.60–101.38. Taken together, the proposed testing method “Determination of Salicylic Acid (Beta Hydroxy Acid) in Cosmetic Products by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)” is approved to be used as a new ASEAN Cosmetic Method (ACM) entitled ACM 009. In addition, Thailand has been assigned as the Proficiency Testing Provider (PTP) for the ASEAN cosmetic laboratories on determining BHA using the ACM 009.

Keywords: BHA analysis, salicylic acid analysis, ASEAN cosmetic method, ACM 009