

สรุปบทเรียนการพัฒนาความรู้

หลักสูตร การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการทดสอบทางเคมี

ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นางสาวนภัสสร โน้ตศิริ

ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ

สังกัด กลุ่มวิจัยเคมีดิน สำนักวิทยาศาสตร์เพื่อการพัฒนาที่ดิน

วันที่อบรม 14 สิงหาคม 2568

วัตถุประสงค์ของหลักสูตร

เพื่อให้บุคลากรในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ดิน มีความเข้าใจในหลักการ แนวคิด และวิธีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการทดสอบทางเคมี ตลอดจนสามารถนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนางานวิเคราะห์ให้มีคุณภาพ และเกิดประโยชน์สูงสุดต่อหน่วยงานและผู้รับบริการ

สรุปบทเรียน

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการทดสอบทางเคมี (Method validation) เป็นขั้นตอนสำคัญของห้องปฏิบัติการทดสอบ เพื่อแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการพัฒนา ดัดแปลง หรือ ใช้นอกขอบเขตวิธีมาตรฐาน สามารถให้ผลการทดสอบที่ถูกต้อง แม่นยำ และสอดคล้องกับวัตถุประสงค์การใช้งานที่กำหนด

แนวทางการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการทดสอบ ตาม Eurachem Guide, 2025 สำหรับวิธีการใหม่ที่พัฒนาขึ้น หรือวิธีที่ปรับใช้เฉพาะภายในห้องปฏิบัติการ ใช้แนวทางการตรวจสอบแบบ **ห้องปฏิบัติการเดียว (Single-laboratory approach)** โดยมุ่งเน้นการประเมินความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์เชิงปริมาณ การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีอาศัยเครื่องมือและวิธีการที่เหมาะสม เพื่อพิสูจน์ผลการวัดด้านคุณลักษณะต่าง ๆ ที่สะท้อนสมรรถนะของวิธีการวิเคราะห์ ทั้งนี้เพื่อยืนยันว่าวิธีดังกล่าว สอดคล้องกับเกณฑ์ที่กำหนด ก่อนนำไปประยุกต์ใช้งานจริงในห้องปฏิบัติการ การตรวจสอบความได้ของวิธีการทดสอบทางเคมี มีองค์ประกอบสำคัญสองประการที่ทำให้การตรวจสอบสมบูรณ์และได้มาตรฐาน ได้แก่ **เครื่องมือและวิธีการในการตรวจสอบความได้ของวิธีการทดสอบ (Method Validation tools)** และ **คุณลักษณะเฉพาะแสดงสมรรถนะของวิธีการวิเคราะห์ที่ต้องตรวจสอบ (Method Performance Characteristics)**

Method validation tools คือ ชุดของเครื่องมือ เทคนิค และแนวทางทางสถิติ ใช้สำหรับพิสูจน์และประเมินประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ เช่น การทดสอบแบบลงค์ (Blank) การใช้มาตรฐานการวัด (Measurement standard) ตลอดจนการใช้การวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อยืนยันความถูกต้องและความเชื่อมั่นของผลการทดสอบ ในขณะเดียวกัน Method performance characteristics ทำหน้าที่เป็นตัวชี้วัดหรือพารามิเตอร์ที่สะท้อนสมรรถนะของวิธีการวิเคราะห์ ได้แก่ ความจำเพาะ (Selectivity) ฟังก์ชันการหาปริมาณโดยเทียบค่ามาตรฐาน (Calibration function) ขีดจำกัดการตรวจพบ (LOD) ขีดจำกัดการหาปริมาณ (LOQ) ช่วงการทำงาน (Working range) ความไวในการวิเคราะห์ (Analytical sensitivity) ความถูกต้อง (Trueness) รวมถึงความเป็นเส้นตรง (Linearity) ความเที่ยงจากการวิเคราะห์ซ้ำ (Repeatability and reproducibility) ความสามารถในการกลับคืน (Recovery) และความทนทานของวิธีวิเคราะห์ (Robustness)

Method Validation Tools

เครื่องมือ เทคนิค และแนวทางทางสถิติ สำหรับพิสูจน์และประเมินประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ ได้แก่

1. **Blank** (ตัวอย่างควบคุมว่าง) ตัวอย่างที่ปราศจากสารวิเคราะห์เป้าหมาย (Analyte) ใช้เพื่อตรวจสอบการรบกวน (Interference) จากสารเคมี สารละลาย หรือองค์ประกอบในตัวอย่างที่อาจส่งผลกระทบต่อความถูกต้องของผลการวิเคราะห์ แบ่งออกเป็น
 - ◆ Reagent blank: ใช้เฉพาะตัวทำละลายหรือสารเคมี โดยไม่มีตัวอย่างทดสอบ เพื่อประเมินการปนเปื้อนจากสารเคมีที่ใช้เตรียมสารละลาย
 - ◆ Sample blank: ใช้ตัวอย่างที่มีองค์ประกอบของ matrix แต่ไม่มีสารวิเคราะห์เป้าหมาย เพื่อตรวจสอบผลกระทบของเมทริกซ์ต่อสัญญาณการวัด
2. **Routine test samples** (ตัวอย่างทดสอบประจำ) ตัวอย่างจริง (Real samples) ที่ใช้ในงานวิเคราะห์ตามปกติ ช่วยสะท้อนสภาพการทำงานจริงในห้องปฏิบัติการ ใช้สำหรับประเมิน ความแม่นยำ (Precision) ของผลการวิเคราะห์ และตรวจสอบการรบกวนจากเมทริกซ์จริง (Real matrix interference)
3. **Spiked sample/solutions** (ตัวอย่างเติมสารมาตรฐาน) เป็นการเติมสารวิเคราะห์เป้าหมาย (analyte) ในปริมาณที่ทราบลงในตัวอย่างหรือสารละลาย เพื่อใช้ตรวจสอบความสามารถในการกลับคืน (Recovery) หรือความสามารถของวิธีในการวัดและความสามารถในการกลับคืนสารวิเคราะห์จากตัวอย่าง
4. **Incurred materials** (ตัวอย่างที่มีสารปนเปื้อนตามธรรมชาติ) ตัวอย่างที่มีสารเป้าหมายปนเปื้อนอยู่จริงตามธรรมชาติ หรือเกิดขึ้นในสถานะที่ใกล้เคียงกับธรรมชาติ ใช้เพื่อยืนยันว่าวิธีการสามารถตรวจจับสารในสถานะจริงได้อย่างมีประสิทธิภาพ
5. **Measurement standard** (มาตรฐานการวัด) วัสดุหรือสารอ้างอิงที่ใช้รับรองความถูกต้อง ความแม่นยำ และความน่าเชื่อถือของผลการวิเคราะห์ แบ่งออกเป็น 3 ประเภทหลัก ได้แก่
 - ◆ Calibrants/Calibrators (สารหรือวัสดุสอบเทียบ) สารละลายหรือวัสดุที่มีความเข้มข้นของสารเป้าหมายที่ทราบค่าแน่นอน ใช้สร้างเส้นสอบเทียบ (Calibration curve)
 - ◆ Reference Materials (RMs) วัสดุอ้างอิงมาตรฐาน ใช้เป็นเกณฑ์เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์
 - ◆ Certified Reference Materials (CRMs) วัสดุอ้างอิงมาตรฐานที่ได้รับการรับรองพร้อมค่าความไม่แน่นอน (Uncertainty) ตามมาตรฐานสากล เช่น ISO/IEC 17034 ใช้ยืนยัน ความถูกต้อง (Trueness) ของวิธีการวิเคราะห์
6. **Statistics** (การวิเคราะห์ทางสถิติ) วิธีทางสถิติที่ใช้สำหรับการสรุปผลข้อมูล การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดข้อมูล (Significance testing) และการตัดสินใจอย่างเป็นกลาง เพื่อยืนยันว่าผลการวิเคราะห์มีความน่าเชื่อถือและเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน

Method Performance Characteristics

ตัวชี้วัดสมรรถนะของวิธีการวิเคราะห์ ที่ใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการทดสอบ มีดังนี้

1. **ความจำเพาะ** (Selectivity) ความสามารถของวิธีในการตรวจหาสารเป้าหมายโดยไม่ถูกรบกวนจากสารอื่นในตัวอย่าง
2. **ฟังก์ชันการหาปริมาณโดยเทียบค่ามาตรฐาน** (Calibration function) ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณตอบสนองของเครื่องมือและความเข้มข้นของสารในช่วงการทำงาน โดยอาจใช้หลายวิธี เช่น การเทียบค่ามาตรฐาน

ภายนอก (External calibration) การเติมสารมาตรฐาน (Standard addition) การใช้สารมาตรฐานที่มีเมทริกซ์ใกล้เคียงตัวอย่าง (Matrix-matched standards) หรือการใช้สารมาตรฐานภายใน (Internal standard)

3. **ขีดจำกัดการตรวจพบ (Limit of Detection, LOD) และขีดจำกัดการหาปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)** ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ และระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดเชิงปริมาณได้อย่างน่าเชื่อถือ ซึ่งคำนวณจากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน S_0 คูณด้วยตัวประกอบที่เหมาะสม

4. **ช่วงการทำงาน (Working range)** ช่วงความเข้มข้นที่วิธีการสามารถให้ผลวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้องและมีความไม่แน่นอนที่ยอมรับได้

5. **ความไวในการวิเคราะห์ (Analytical sensitivity)** ความสามารถของเครื่องมือ ในการเปลี่ยนแปลงสัญญาณตอบสนองที่สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารวิเคราะห์

6. **ความถูกต้อง (Trueness)** ความใกล้เคียงของผลการวิเคราะห์กับค่าจริงหรือค่าอ้างอิง ความแตกต่างดังกล่าวเรียกว่า Bias โดยสามารถประเมินได้จากการใช้วัสดุอ้างอิง (RM หรือ CRM) การเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานที่ยอมรับแล้ว หรือการทดสอบความสามารถในการกลับคืนสารเป้าหมายจากการวิเคราะห์ (Recovery test)

7. **ความแม่นยำ ความเที่ยง (Precision)** ความใกล้เคียงกันของผลการวิเคราะห์ภายใต้สภาวะที่กำหนด แบ่งเป็น

- ◆ Repeatability (RSD_r) ความสามารถในการทำซ้ำภายในห้องปฏิบัติการ ภายใต้สภาวะเดียวกัน
- ◆ Reproducibility (RSD_R) ความสามารถในการทำซ้ำระหว่างห้องปฏิบัติการ หรือต่างผู้วิเคราะห์

8. **ความไม่แน่นอนของการวัด (Measurement uncertainty)** ช่วงการกระจายของค่าที่วัดได้อย่างสมเหตุสมผล ซึ่งบ่งชี้ความน่าเชื่อถือของผลการวิเคราะห์ และให้ข้อมูลว่าผลการวิเคราะห์อาจแปรผันในช่วงใด

9. **ความทนทานของวิธีวิเคราะห์ (Ruggedness)** ความสามารถของวิธีในการรักษาความถูกต้องและความแม่นยำ แม้จะมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยในเงื่อนไขการทำงาน เช่น ผู้วิเคราะห์ อุปกรณ์ อุณหภูมิ เวลา หรือสารเคมี

การประเมินผลทางสถิติและการประยุกต์ใช้

การประเมินผลทางสถิติเป็นหัวใจของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method validation) เพราะช่วยยืนยัน

ความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของวิธีการวิเคราะห์ ทั้งการตรวจสอบ Matrix effect, Residual plots และการทดสอบทางสถิติ เช่น t-test หรือ Confidence interval เพื่อตรวจสอบ Bias และ Accuracy นอกจากนี้ การทำ Proficiency Testing (PT) และ Interlaboratory Comparison ยังช่วยยืนยันสมรรถนะของห้องปฏิบัติการและสร้างความมั่นใจต่อผู้ใช้บริการในระดับประเทศและนานาชาติ

ประโยชน์ที่ได้รับตนเอง

- ❖ ได้รับความรู้ความเข้าใจเชิงลึกเกี่ยวกับหลักการและแนวทางการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการทดสอบทางเคมี (Method validation)
- ❖ สามารถประยุกต์ใช้เครื่องมือและเทคนิคทางสถิติในการประเมินสมรรถนะของวิธีวิเคราะห์ เช่น การทดสอบ Selectivity, LOD, LOQ, Precision, Trueness

ประโยชน์ที่ได้รับต่อหน่วยงาน

- ❖ บุคลากรที่มีศักยภาพสูงขึ้น สามารถปฏิบัติงานตรวจสอบและรับรองความใช้ได้ของวิธีการทดสอบได้อย่างถูกต้องและเชื่อถือได้
- ❖ เพิ่มความมั่นใจในคุณภาพผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการ ตอบสนองต่อข้อกำหนดของ ISO/IEC 17025 และมาตรฐานสากลอื่น ๆ