

# คู่มือ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทางเคมี  
ของห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร  
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



โดย นางวิไล ประยูรหงษ์  
เจ้าหน้าที่บริการวิทยาศาสตร์  
ตุลาคม 2564

## คำนำ

คู่มือปฏิบัติงานการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทางเคมีของห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เล่มนี้จัดทำขึ้นเพื่อให้ผู้ปฏิบัติงานทราบแนวทางในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทางเคมี และเข้าใจขั้นตอนการดำเนินงานและสามารถนำไปใช้ปฏิบัติงานได้ ซึ่งมีเนื้อหาเกี่ยวกับองค์ประกอบที่จำเป็นเกี่ยวกับการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีเชิงปริมาณ ได้แก่ ประเภทวิธีวิเคราะห์ เครื่องมือที่ใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี สถิติที่ใช้ คุณลักษณะของวิธี ขอบเขตของการทดสอบวิธี การตรวจสอบคุณลักษณะของวิธี ขั้นตอนการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี โดยมุ่งเน้นที่ขั้นตอนการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี พร้อมยกตัวอย่างประกอบเพื่อความเข้าใจและนำไปสู่การปฏิบัติงานจริงได้

ผู้เขียนได้รวบรวม เรียบเรียง และเขียนจากความรู้ที่ได้จากการศึกษาค้นคว้าจากหนังสือและเอกสารทางวิชาการต่างๆ ที่ตีพิมพ์เผยแพร่และยอมรับกันในระดับนานาชาติ รวมถึงรวบรวมจากประสบการณ์การทำงานทางด้านการตรวจวิเคราะห์อาหารทางเคมีของผู้เขียน

ผู้เขียนหวังว่าคู่มือปฏิบัติงานการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทางเคมีของห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เล่มนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้อ่านและผู้ปฏิบัติงานทุกท่าน ทำให้เข้าใจแนวทางการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับงานทางด้านอื่นๆ ได้ หากมีข้อผิดพลาดประการใด ผู้จัดทำขอน้อมรับความผิดพลาดดังกล่าวไว้เพื่อแก้ไขปรับปรุงให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้นต่อไป

วิไล ประยูรหงษ์  
เจ้าหน้าที่บริการวิทยาศาสตร์  
ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร  
ตุลาคม 2564

## สารบัญ

|                                                                               | หน้า |
|-------------------------------------------------------------------------------|------|
| คำนำ                                                                          | ก    |
| สารบัญ                                                                        | ข    |
| สารบัญภาพ                                                                     | ง    |
| สารบัญตาราง                                                                   | จ    |
| สารบัญตัวอย่าง                                                                | ฉ    |
| บทที่ 1 บทนำ                                                                  | 1    |
| ความสำคัญและที่มาของการจัดทำคู่มือ                                            | 1    |
| วัตถุประสงค์                                                                  | 2    |
| ขอบเขต                                                                        | 2    |
| นิยามศัพท์                                                                    | 2    |
| บทที่ 2 บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบ และโครงสร้างการบริหารจัดการ                 | 4    |
| โครงสร้างการบริหารจัดการ                                                      | 4    |
| บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบของกลุ่มงาน                                          | 5    |
| บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบ และลักษณะงานที่ปฏิบัติของตำแหน่ง                    | 9    |
| คุณภาพ ความยุ่งยากและความซับซ้อนของงานในหน้าที่ความรับผิดชอบ                  | 9    |
| ความรู้ความสามารถที่จำเป็นสำหรับตำแหน่ง                                       | 10   |
| บทที่ 3 หลักการและวิธีการ                                                     | 11   |
| 3.1 วิธีวิเคราะห์                                                             | 11   |
| 3.1.1 แบ่งตามความสมบูรณ์ของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี                        | 11   |
| 3.1.2 แบ่งตามลักษณะของวิธีวิเคราะห์                                           | 11   |
| 3.1.3 แบ่งตามระดับความเข้มข้นของสารที่ต้องการศึกษา                            | 12   |
| 3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Tools of validation study) | 12   |
| 3.3 สถิติ (Statistical)                                                       | 13   |
| 3.4 คุณลักษณะของวิธี (Method performance characteristics)                     | 18   |
| 3.4.1 Specificity/Selectivity                                                 | 18   |
| 3.4.2 ช่วงการใช้งานหรือช่วงของการวัด (Working range)                          | 18   |
| 3.4.3 ความสัมพันธ์เชิงเส้นหรือช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity)                 | 18   |
| 3.4.4 ขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)                           | 18   |
| 3.4.5 ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)                 | 18   |
| 3.4.6 ความแม่นยำ (Accuracy)                                                   | 19   |
| 3.4.7 ความเที่ยง (Precision)                                                  | 19   |
| 3.4.8 ความแข็งแกร่งหรือความคงทนของวิธี (Ruggedness/Robustness)                | 20   |
| 3.5 ขอบเขตของการทดสอบวิธี                                                     | 21   |
| 3.6 การตรวจสอบคุณลักษณะของวิธี                                                | 22   |
| 3.6.1 ความจำเพาะเจาะจง (Specificity/Selectivity)                              | 22   |

## สารบัญ (ต่อ)

|                                                                     | หน้า |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| 3.6.2 ช่วงการใช้งาน (Working range)                                 | 23   |
| 3.6.3 ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity)                               | 24   |
| 3.6.4 ขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)                 | 25   |
| 3.6.5 ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)       | 26   |
| 3.6.6 ความแม่นยำ (Accuracy)                                         | 27   |
| 3.6.7 ความเที่ยง (Precision)                                        | 29   |
| 3.6.8 ความทนของวิธี (Ruggedness/Robustness)                         | 32   |
| 3.6.9 Matrix effect                                                 | 32   |
| 3.6.10 ความไม่แน่นอนของการวัด (Measurement uncertainty)             | 33   |
| 3.7 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี                                     | 33   |
| ข้อควรระวังในการปฏิบัติงาน                                          | 34   |
| แนวทางการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่เกี่ยวข้อง                      | 38   |
| บทที่ 4 กระบวนการและขั้นตอนการปฏิบัติงานการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี | 40   |
| ขั้นตอนที่ 1 กำหนดวัตถุประสงค์                                      | 44   |
| ขั้นตอนที่ 2 เลือกวิธีวิเคราะห์                                     | 44   |
| ขั้นตอนที่ 3 กำหนดขอบเขตคุณลักษณะวิธี                               | 46   |
| ขั้นตอนที่ 4 กำหนดความต้องการทางด้านเทคนิค                          | 47   |
| ขั้นตอนที่ 5 จัดทำเอกสารวิธีวิเคราะห์                               | 48   |
| ขั้นตอนที่ 6 เตรียมวัสดุอ้างอิง                                     | 50   |
| ขั้นตอนที่ 7 ตรวจสอบคุณลักษณะเฉพาะ                                  | 51   |
| ขั้นตอนที่ 8 คำนวณผล และประเมินผล                                   | 51   |
| 1. Selectivity                                                      | 51   |
| 2. Range และ Linearity                                              | 52   |
| 3. LOD และ LOQ โดยประมาณ                                            | 55   |
| 4. Accuracy และ Precision                                           | 63   |
| 4.1 Accuracy                                                        | 63   |
| 4.2 Precision                                                       | 70   |
| 5. Matrix Effects                                                   | 81   |
| ขั้นตอนที่ 9 ตรวจสอบผลการประเมิน                                    | 86   |
| ขั้นตอนที่ 10 สรุปผล และจัดทำรายงาน                                 | 86   |
| บทที่ 5 ปัญหาอุปสรรคและแนวทางแก้ปัญหาและการพัฒนา                    | 87   |
| บรรณานุกรม                                                          | 92   |
| ภาคผนวก                                                             | 93   |
| การวิเคราะห์ปัญหาในการปฏิบัติงานโดยใช้ผังก้ำงปลา                    | 93   |
| ประวัติผู้เขียน                                                     | 94   |

## สารบัญภาพ

|                                                                              | หน้า |
|------------------------------------------------------------------------------|------|
| ภาพที่ 2.1 โครงสร้างการบริหารงานของ คณะวิทยาศาสตร์                           | 6    |
| ภาพที่ 2.2 โครงสร้างการบริหารงานของ ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร         | 7    |
| ภาพที่ 2.3 โครงสร้างบุคลากร                                                  | 8    |
| ภาพที่ 3.1 แสดงความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision)               | 20   |
| ภาพที่ 3.2 การหา LOD โดยหาค่า $s_b$ (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นศูนย์) | 26   |
| ภาพที่ 3.3 ความสัมพันธ์ของ Horwitz's curve                                   | 30   |
| ภาพที่ 3.4 การเลือก การพัฒนา และการประเมินวิธีทดสอบ (URACHEM Guide (1998))   | 34   |

## สารบัญตาราง

|                                                                                     | หน้า |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ตารางที่ 3.1 Critical values of G for a two-tailed test ( $p = 0.05$ )              | 14   |
| ตารางที่ 3.2 Critical values of F for a one-tailed test ( $p = 0.05$ )              | 15   |
| ตารางที่ 3.3 The $t$ -distribution (two-tailed)                                     | 16   |
| ตารางที่ 3.4 เกณฑ์การยอมรับ LOD, LOQ                                                | 27   |
| ตารางที่ 3.5 Recovery ที่ความเข้มข้นต่างๆ (ตาม AOAC)                                | 29   |
| ตารางที่ 3.6 Recovery ของสารพิษตกค้าง ยาฆ่าแมลง และยาสัตว์ตกค้างในอาหาร (ตาม Codex) | 29   |
| ตารางที่ 3.7 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับ Predicted Horwitz                    | 31   |
| ตารางที่ 3.8 เกณฑ์การยอมรับ HORRAT                                                  | 31   |
| ตารางที่ 3.9 ข้อควรระวังในการปฏิบัติงาน                                             | 35   |
| ตารางที่ 4.1 แผนผังการปฏิบัติงาน (Work Flow)                                        | 40   |
| ตารางที่ 4.2 การเลือกวิธีวิเคราะห์และขอบเขตการตรวจสอบคุณลักษณะของวิธี               | 45   |
| ตารางที่ 4.3 ตัวอย่างการกำหนดขอบเขตคุณลักษณะวิธี                                    | 46   |
| ตารางที่ 5.1 ปัญหาอุปสรรคในการปฏิบัติงาน และแนวทางการแก้ปัญหา                       | 87   |

## สารบัญตัวอย่าง

|                                                                                    | หน้า |
|------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ตัวอย่างที่ 4.1 การตรวจสอบ Selectivity                                             | 52   |
| ตัวอย่างที่ 4.2 การตรวจสอบ Range และ Linearity                                     | 53   |
| ตัวอย่างที่ 4.3 LOD และ LOQ โดยประมาณ กรณีมี Sample blank                          | 56   |
| ตัวอย่างที่ 4.4 LOD และ LOQ โดยประมาณ กรณีวิเคราะห์ Spiked sample blank            | 57   |
| ตัวอย่างที่ 4.5 LOD และ LOQ โดยประมาณ กรณีคำนวณจากจุดตัดกราฟเส้นตรง                | 58   |
| ตัวอย่างที่ 4.6 การยืนยันค่า LOQ                                                   | 60   |
| ตัวอย่างที่ 4.7 การตรวจสอบ Accuracy กรณีที่มี CRM / RM                             | 65   |
| ตัวอย่างที่ 4.8 การตรวจสอบ Accuracy กรณีที่ไม่มี CRM / RM                          | 68   |
| ตัวอย่างที่ 4.9 การตรวจสอบ Precision กรณีใช้ CRM / RM                              | 71   |
| ตัวอย่างที่ 4.10 การตรวจสอบ Precision กรณีไม่มี CRM / RM                           | 72   |
| ตัวอย่างที่ 4.11 การเปรียบเทียบผลระหว่างผู้วิเคราะห์ 2 คน                          | 75   |
| ตัวอย่างที่ 4.12 การเปรียบเทียบผลระหว่างวิธีวิเคราะห์ 2 วิธี โดยใช้ F-test, t-test | 79   |
| ตัวอย่างที่ 4.13 การเปรียบเทียบผลระหว่างวิธีวิเคราะห์ 2 วิธี                       | 80   |
| ตัวอย่างที่ 4.14 Matrix Effects                                                    | 82   |

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความสำคัญและที่มาของการจัดทำคู่มือ

ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร เป็นหน่วยงานภายใต้การกำกับดูแลของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เปิดให้บริการตรวจวิเคราะห์ทางด้านเคมี จุลชีววิทยา และชีววิทยาโมเลกุล ให้แก่ผู้ประกอบการทั้งในประเทศและต่างประเทศ รวมทั้งให้บริการทางด้านงานวิจัยให้แก่นิสิต นักศึกษา และบุคลากรภายในและภายนอกมหาวิทยาลัย นอกจากนี้ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหารเป็นหน่วยงานที่ได้รับการรับรองระบบคุณภาพตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 กับทางสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ซึ่งระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025 เป็นมาตรฐานสากล ด้วยการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการทดสอบและห้องปฏิบัติการสอบเทียบให้มีมาตรฐานไปในทางเดียวกันในทุกประเทศ โดยให้ความสำคัญกับทุกๆ กิจกรรมในห้องปฏิบัติการ เพื่อให้มั่นใจได้ว่าผลการทดสอบหรือผลการสอบเทียบจากห้องปฏิบัติการ มีความถูกต้องแม่นยำ และน่าเชื่อถือ เป็นที่ยอมรับในระดับสากล สามารถลดการกีดกันทางการค้า อันเนื่องมาจากการทดสอบและลดการตรวจซ้ำจากประเทศคู่ค้า

การจัดทำระบบคุณภาพตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ผู้ปฏิบัติงานจะต้องมีความรู้ ความสามารถ และต้องผ่านการฝึกอบรมในเรื่องที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ทดสอบ ในส่วนของเครื่องมือและอุปกรณ์ต้องอยู่ในสภาพสมบูรณ์พร้อมใช้งาน ประกอบกับสภาพแวดล้อมต้องเหมาะสมกับการปฏิบัติงาน นอกจากนี้ยังต้องมีการประกันคุณภาพของผลการวิเคราะห์ ซึ่งมีหลากหลายวิธีด้วยกัน เช่น การวิเคราะห์ซ้ำ การวิเคราะห์แบ่งงค์ การวิเคราะห์ตัวอย่างควบคุม การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ค่ากลับคืน การทดสอบความชำนาญ การเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ เป็นต้น เพื่อให้ได้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method validate) จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากเป็นส่วนหนึ่งในการประกันคุณภาพ ในการเลือกใช้วิธีวิเคราะห์ไม่ว่าจะเป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับเป็นมาตรฐานสากล วิธีที่ผู้อื่นพัฒนาขึ้น หรือเป็นวิธีที่ทางห้องปฏิบัติการพัฒนาขึ้นเอง วิธีเหล่านี้ต้องผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีก่อนนำมาใช้ปฏิบัติงาน ถูกต้องตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ ทั้งในช่วงการใช้งาน ประเภทตัวอย่างที่ทดสอบ องค์ประกอบของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีจะมี วิธีวิเคราะห์ วัสดุอ้างอิง วิธีทางสถิติที่ใช้ การกำหนดขอบเขตของการทดสอบวิธี ลำดับขั้นตอนการทดสอบวิธีและคุณลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์ ซึ่งในการยืนยันคุณลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์ (Method performance characteristics) จะประกอบด้วย ความจำเพาะเจาะจง (Specificity/Selectivity) ความแม่นยำ (Accuracy) ความเที่ยง (Precision) ช่วงการใช้งาน (Working range) และความเป็นเส้นตรง (Linearity) ขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of detection) ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation) และความทนของวิธี (Ruggedness/Robustness) เป็นต้น ซึ่งสามารถเลือกทำได้ ขึ้นอยู่กับวิธีวิเคราะห์และวัตถุประสงค์ในการใช้งาน

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทางเคมี มีวิธีดำเนินการที่ค่อนข้างยุ่งยากซับซ้อน ผู้ปฏิบัติงานต้องมีความรู้ความเข้าใจในหลักการ ซึ่งในการปฏิบัติงานจริง ผู้ปฏิบัติงานมักเกิดความสับสนในขั้นตอนการทำงาน จึงไม่สามารถปฏิบัติงานได้อย่างถูกต้อง เนื่องจากไม่ทราบว่า จะเริ่มปฏิบัติงานจากขั้นตอนใดก่อน เมื่อได้ผลแล้วต้องใช้สถิติแบบไหนในการคำนวณผล และจะประเมินผลอย่างไร ดังนั้นทางผู้จัดทำจึงได้จัดทำคู่มือการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทางเคมีขึ้น เพื่อให้ผู้ปฏิบัติงานของห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหารมีความเข้าใจที่ตรงกันในพารามิเตอร์ต่างๆ ตัวชี้วัด คำนียาม และดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทางเคมีเป็น



แนวทางเดียวกัน ผู้ปฏิบัติงานสามารถนำไปใช้ปฏิบัติงานได้อย่างถูกต้องเหมาะสมและเกิดประสิทธิภาพมากที่สุด

### วัตถุประสงค์

1. เพื่อใช้เป็นแนวทางในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทางเคมี
2. เพื่อให้ผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการเข้าใจการดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทางเคมี และสามารถนำไปใช้ปฏิบัติงานได้

### ขอบเขต

คู่มือนี้ เป็นแนวทางการดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ทางเคมี ซึ่งจะเริ่มตั้งแต่การเลือกวิธีวิเคราะห์ เครื่องมือที่ใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Tools of validation study) การยืนยันคุณลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์ โดยจะกล่าวถึงเฉพาะ ความจำเพาะเจาะจง (Specificity/Selectivity) การหาขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of detection) การหาขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation) การหาช่วงการใช้งาน (Working range) และความเป็นเส้นตรง (Linearity) การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) การทดสอบ Matrix effect การประเมินผลทางสถิติ สรุปผล โดยในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์นั้นจะต้องทำให้เสร็จก่อนใบรับรองระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025 จะหมดอายุ 6 เดือน ใบรับรองระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025 จะมีอายุ 2 ปี

### นิยามศัพท์

ความจำเพาะเจาะจง (Specificity/Selectivity) หมายถึง คุณสมบัติที่บอกว่าวิธีนั้นจะไม่ตอบสนองต่อสารอื่นที่ไม่ใช่สารที่กำลังศึกษา

ขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) หมายถึง ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่วิธีนี้ตรวจพบได้ แต่ไม่สามารถยืนยันได้ว่ามีความถูกต้อง

ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ) หมายถึง ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่วิธีนี้ตรวจพบได้โดยมีความแม่นยำและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ช่วงการใช้งาน (Working range) หมายถึง ช่วงความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ระหว่างค่าต่ำสุดและค่าสูงสุดที่เป็นเส้นตรง และให้ผลการทดสอบที่มีความเที่ยง ความแม่นยำ ตามเกณฑ์ที่ยอมรับ

ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) หมายถึง ความสามารถของวิธีที่ให้ผลการทดสอบเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์

ความแม่นยำ (Accuracy) หมายถึง ค่าแสดงความใกล้เคียงระหว่างผลการทดสอบกับค่าอ้างอิงที่ยอมรับ

ความเที่ยง (Precision) หมายถึง การกระจายของค่าแต่ละค่าที่วิเคราะห์ได้รอบๆ ค่าเฉลี่ย อาจเป็นค่า Repeatability, Intra-laboratory (within laboratory) reproducibility, Inter-laboratory reproducibility

ความทวนซ้ำได้ (Repeatability) หมายถึง ความเที่ยงภายใต้สภาวะการทดลองเดียวกัน โดยวิเคราะห์ซ้ำในห้องปฏิบัติการเดียวกัน นักวิเคราะห์คนเดียวกัน และเครื่องมือเดียวกัน ในช่วงเวลาใกล้เคียงกัน

ความทำซ้ำได้ (Reproducibility) หมายถึง ความเที่ยงเมื่อทำการทดลองซ้ำๆ กัน โดยทำการทดลองวิธีเดียวกันภายใต้สถานการณ์ที่แตกต่างกัน ได้แก่ เครื่องมือต่างกัน ห้องปฏิบัติการต่างกัน และผู้วิเคราะห์คนละคนกัน

Matrix หมายถึง คุณสมบัติของเนื้อสาร

Matrix effect หมายถึง การเพิ่มขึ้นหรือลดลงของสัญญาณจากเครื่องมือวัดเป็นผลมาจากส่วนประกอบอื่นๆ ที่มีในตัวอย่าง แต่ไม่ใช่สารที่กำลังศึกษา

ร้อยละการกลับคืน (%Recovery) หมายถึง การวิเคราะห์สารที่ทราบค่า หรือการเติมสารที่ทราบความเข้มข้นที่เติมลงไป วิเคราะห์ตามขั้นตอน แล้วคำนวณค่า %Recovery ของสารที่ได้กลับคืนมา

ISO 17034 หมายถึง มาตรฐานด้านการรับรองความสามารถผู้ผลิตวัสดุอ้างอิงตามมาตรฐาน

ISO 10012 หมายถึง มาตรฐานด้านการควบคุมเครื่องมือวัด

Relative percent difference (%RPD) หมายถึง ค่าความแตกต่างของการทดสอบระหว่างการทำ 2 ซ้ำ

## บทที่ 2

### บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบ และโครงสร้างการบริหารจัดการ

#### โครงสร้างการบริหารจัดการ

คณะวิทยาศาสตร์เป็นคณะหนึ่งของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประกอบด้วยภาควิชาต่าง ๆ 14 ภาควิชา ที่ทำการสอนทั้งในระดับปริญญาบัณฑิต และปริญญาดุษฎีบัณฑิต นอกจากนี้ยังให้การสอนวิชาวิทยาศาสตร์ พื้นฐานให้กับนิสิตจากคณะอื่น ๆ เช่น คณะวิศวกรรมศาสตร์ คณะครุศาสตร์ คณะอักษรศาสตร์ และคณะ แพทยศาสตร์ และยังทำหน้าที่เป็นศูนย์กลาง สำหรับการแสวงหาทางวิชาการ และภูมิปัญญาและให้บริการ ทางวิชาชีพ ในรูปของการให้คำปรึกษาในการทำวิจัย การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ งานสัมมนา การประชุม ระดับชาติและระดับนานาชาติ และการสอนและการพัฒนาเทคโนโลยีต่าง ๆ

คณะวิทยาศาสตร์ มีวิสัยทัศน์และภารกิจดังนี้

#### วิสัยทัศน์

- ใส่ใจในบริการ สนับสนุนงานการศึกษา มุ่งพัฒนาบุคลากร

#### พันธกิจ

- งานวิชาการและจัดการศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีนโยบายในการ สนับสนุน และพัฒนาการเรียนการสอน หลักสูตรต่างๆ ภายในคณะฯ เพื่อการผลิตบุคลากรที่มีคุณภาพ มี ความสามารถในการสาขาวิชา ที่เป็นที่ต้องการของประเทศชาติ

คณะวิทยาศาสตร์ ประกอบด้วย

1. ภาควิชา/หลักสูตร มี 14 ภาควิชา/หลักสูตร
2. กลุ่มงานบริหาร มี 4 กลุ่มงาน
3. กลุ่มงานวิชาการ มี 2 กลุ่มงาน แบ่งออกเป็น
  - 3.1 งานวิจัยและบริการวิชาการ ได้แก่
    - สายงานบริหารวิจัย
    - สายงานบริการวิชาการและวิเคราะห์ทดสอบด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
    - สายงานบริการวิทยทรัพยากรและพิพิธภัณฑ์วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
    - ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร
    - ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านโรงงานต้นแบบแปรรูปอาหาร
    - ศูนย์วิทยาศาสตร์โอมิกส์และชีวสารสนเทศ
  - 3.2 งานวิชาการและกิจการนิสิต

## บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบของกลุ่มงาน

ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร เป็นหน่วยงานที่อยู่ภายใต้การกำกับดูแลของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเป็นองค์กรของรัฐ มีวิสัยทัศน์และภารกิจดังนี้

### วิสัยทัศน์

- เป็นห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองตามระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025 : 2017 และเป็นผู้นำในการให้บริการวิเคราะห์ด้าน เคมี จุลชีววิทยา และชีววิทยาโมเลกุล
- เป็นแหล่งพัฒนาวิธีวิเคราะห์อาหารที่มีประสิทธิภาพทั้งในด้านความถูกต้อง ความแม่นยำและความรวดเร็ว
- เป็นแหล่งเผยแพร่ความรู้ด้านการวิเคราะห์อาหาร

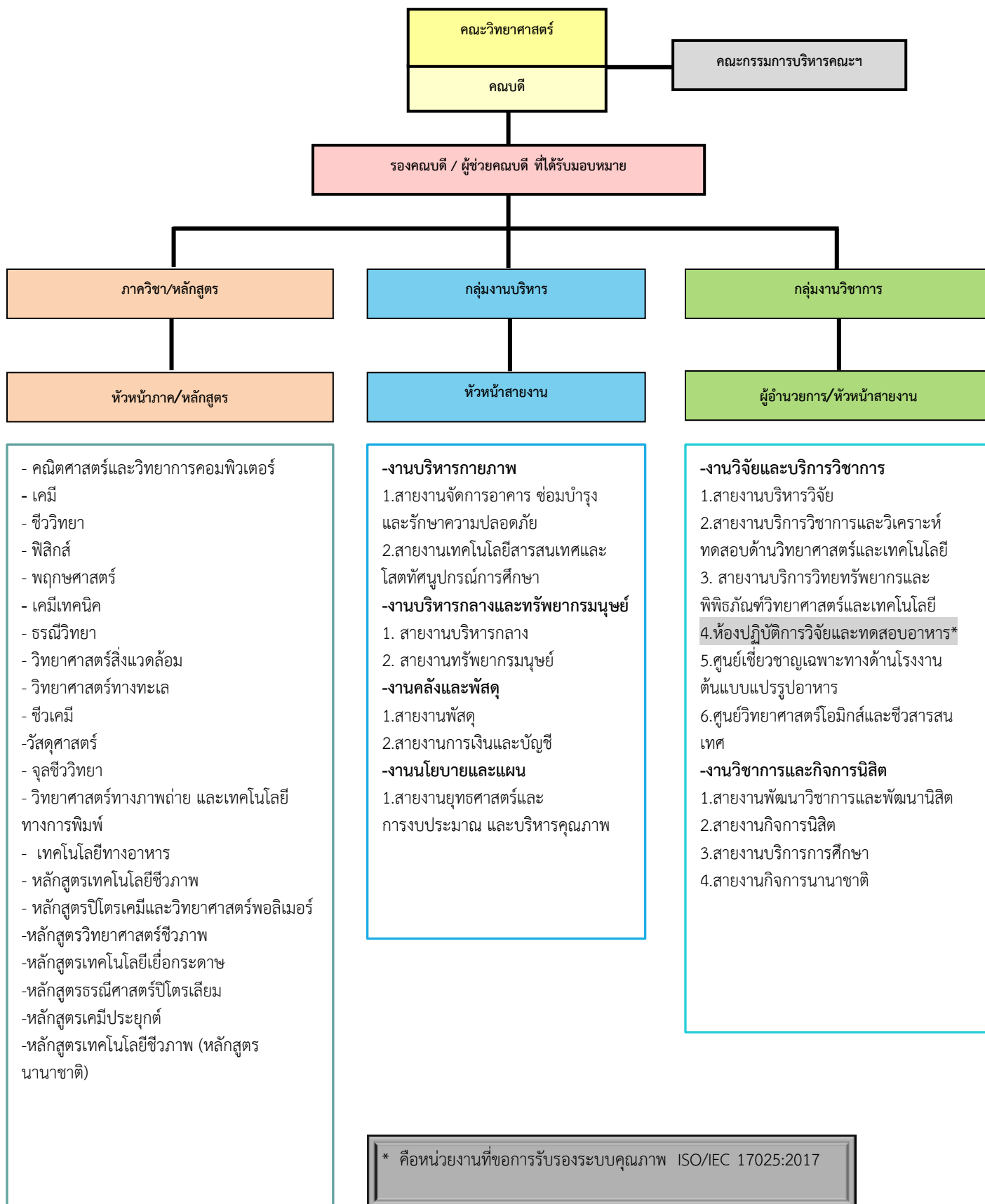
### ภารกิจ

- ให้บริการด้านการวิเคราะห์แก่ผู้ประกอบการทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ ในด้านอาหาร ยา หรือ ผลิตภัณฑ์อื่นที่มีลักษณะคล้ายกันด้วยวิธีมาตรฐานอย่างมีประสิทธิภาพและใช้เวลาสั้น
- วิจัยเพื่อพัฒนาประสิทธิภาพหรือพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ที่มีความรวดเร็ว ความถูกต้องและความแม่นยำสูง
- ฝึกอบรมด้านการวิเคราะห์เพื่อเพิ่มพูนความรู้แก่บุคลากรทั้งจากภาครัฐและภาคเอกชนเพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพและขีดความสามารถของห้องปฏิบัติการอื่นๆให้มีประสิทธิภาพในการพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศโดยรวม

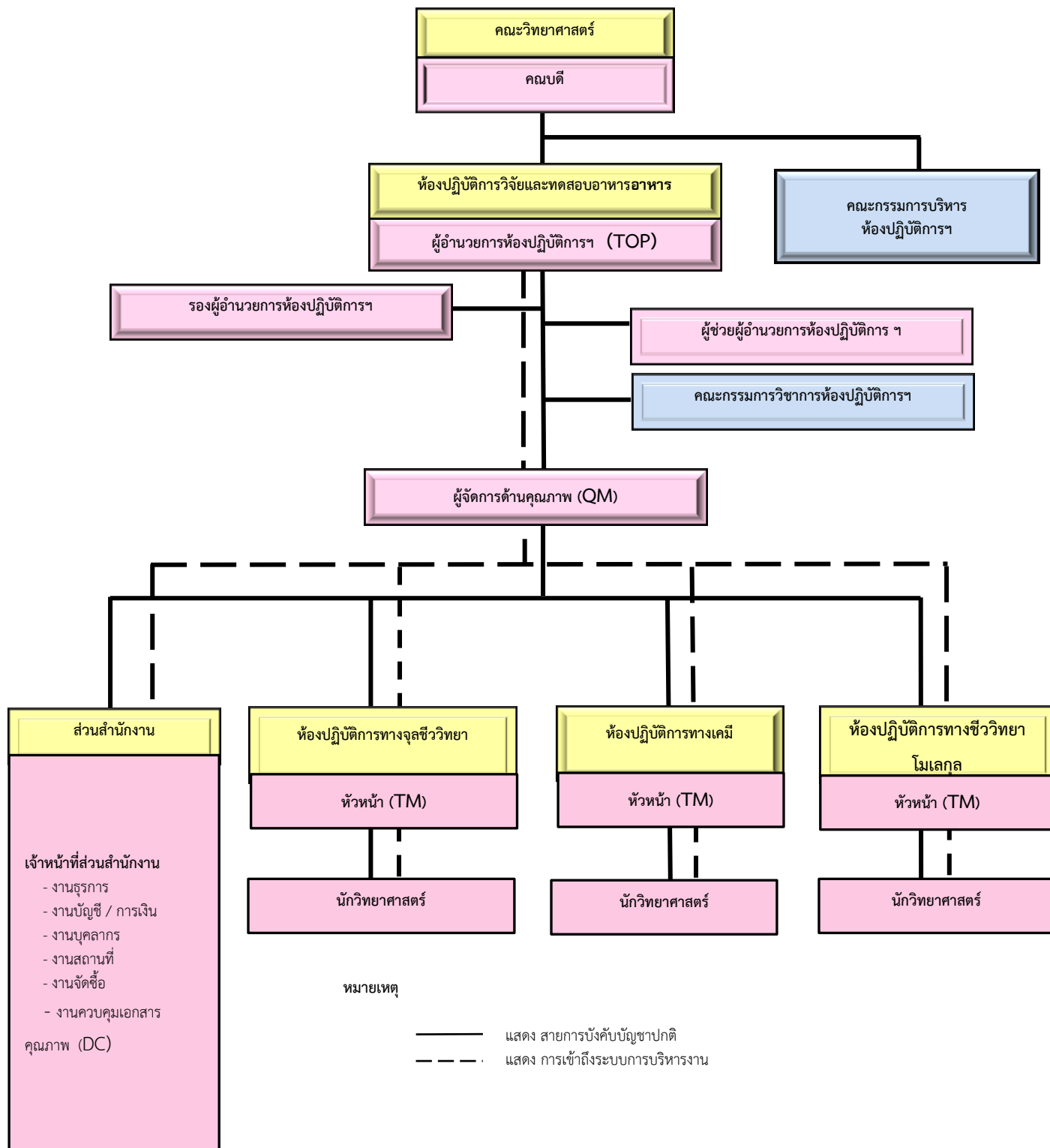
ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร แบ่งการดำเนินงานเป็น 4 ส่วนงาน ดังนี้

1. ส่วนสำนักงาน รับผิดชอบการบริการลูกค้า การรับตัวอย่าง การให้รหัสตัวอย่าง การจัดแยก จัดเก็บตัวอย่าง รวมทั้งรับผิดชอบงานธุรการ อาคารสถานที่ งบประมาณ จัดซื้อจัดหา เก็บรักษา ประวัติบุคลากร การออกและจัดส่งรายงานผลการทดสอบ การรักษาความสะอาด ประสานงาน เรื่อง การฝึกอบรม ประสานงานระหว่างหน่วยงานต่าง ๆ และบริการข้อมูลวิชาการ
2. ห้องปฏิบัติการทางเคมี รับผิดชอบการทดสอบทางเคมีที่ใช้เครื่องมือเฉพาะ คือ HPLC, GC, GC/MS, GC/MS/MS, ICP และการทดสอบทางเคมีทั่วไปที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติหรือองค์ประกอบทางเคมี ภายภาพ รวมทั้งจัดทำประวัติเครื่องมือมาตรฐานอ้างอิงหรือวัสดุอ้างอิงที่ใช้ในการทวนสอบ วางแผนการสอบเทียบเครื่องมือ การดูแลบำรุงรักษาเครื่องมือให้อยู่ในสภาพใช้งานได้ การเก็บรักษาและเบิกจ่ายตัวอย่าง ควบคุมและร่วมในกิจกรรมทดสอบความชำนาญ
3. ห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา รับผิดชอบการทดสอบจุลชีววิทยา การครอบครองเชื้อ จัดทำประวัติเครื่องมือมาตรฐานอ้างอิง หรือวัสดุอ้างอิงที่ใช้ในการทวนสอบ รวมทั้งการดูแลบำรุงรักษาเครื่องมือให้อยู่ในสภาพใช้งานได้ และร่วมในกิจกรรมทดสอบความชำนาญ
4. ห้องปฏิบัติการทางชีววิทยาโมเลกุล รับผิดชอบการทดสอบด้านชีววิทยาโมเลกุล (GMOs) จัดทำประวัติเครื่องมือ มาตรฐานอ้างอิงหรือวัสดุอ้างอิง ที่ใช้ในการทวนสอบ รวมทั้งการดูแลบำรุงรักษาเครื่องมือให้อยู่ในสภาพใช้งานได้ และร่วมในกิจกรรมทดสอบความชำนาญ

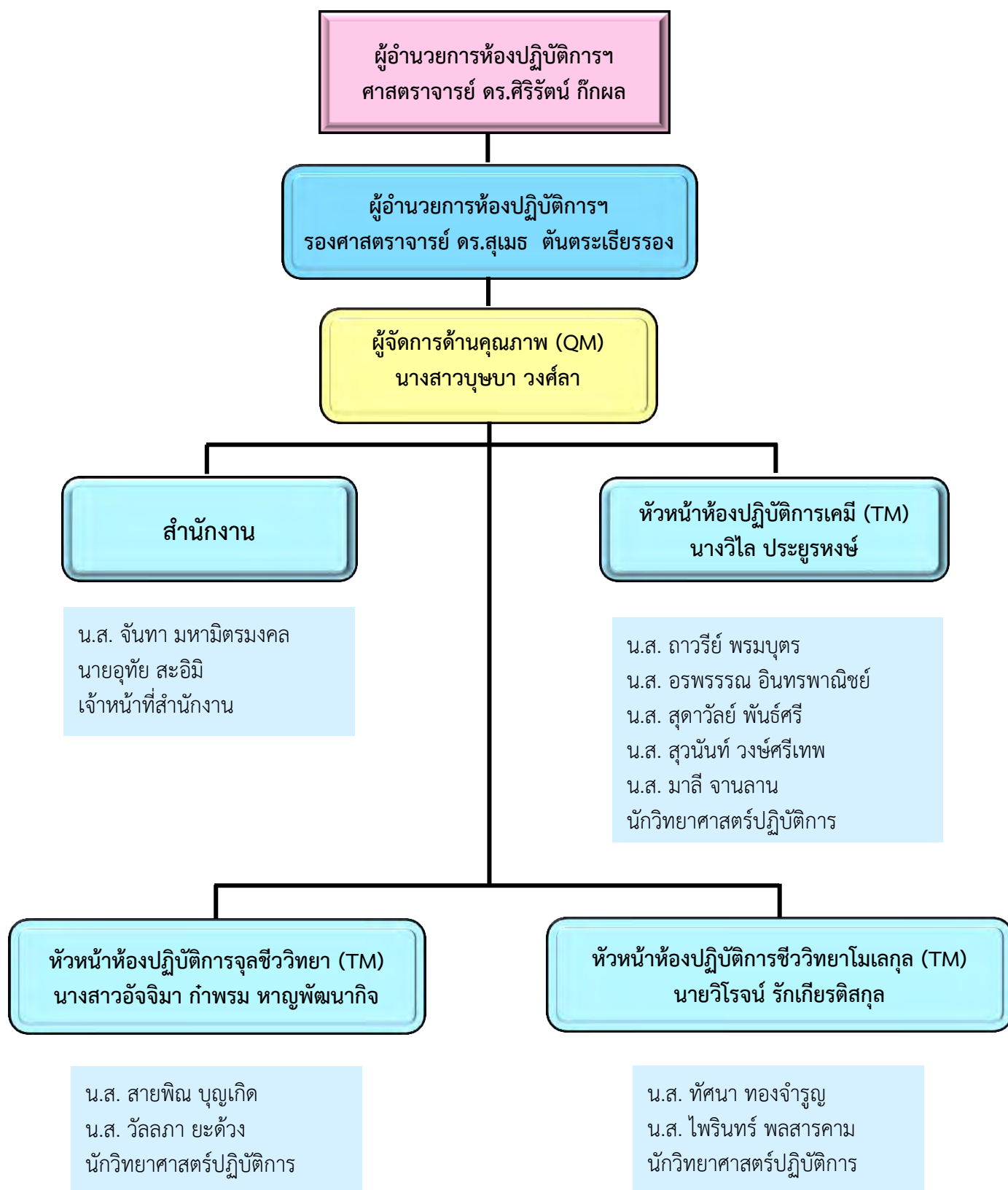
ภาพที่ 2.1 โครงสร้างการบริหารงานของ คณะวิทยาศาสตร์



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างการบริหารงานของ ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างบุคลากร



## บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบ และลักษณะงานที่ปฏิบัติของตำแหน่ง

หัวหน้าห้องปฏิบัติการเคมี มีหน้าที่ความรับผิดชอบ ดังนี้

1. ทำหน้าที่เป็นผู้จัดการด้านวิชาการ ตามมาตรฐานข้อกำหนด ISO/IEC 17025
2. ควบคุมดูแลการปฏิบัติงานของนักวิทยาศาสตร์ภายในห้องปฏิบัติการเคมี
3. รับผิดชอบตรวจผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการเคมี พิมพ์รายงานผล และลงนามรับรอง รายงานผลการทดสอบทางด้านเคมี
4. จัดทำหรือแก้ไข ปรับปรุง เปลี่ยนแปลง เอกสารวิธีการทดสอบ วิธีปฏิบัติงาน และแบบบันทึกที่เกี่ยวข้องของห้องปฏิบัติการเคมี
5. ดำเนินการฝึกอบรมภายใน และประเมินความสามารถบุคลากรของห้องปฏิบัติการเคมี
6. ร่วมประชุมทบทวนระบบการบริหารงานของห้องปฏิบัติการประจำปี
7. ดำเนินการด้านการตรวจติดตามคุณภาพ ตามที่ได้รับมอบหมายจากผู้จัดการด้านคุณภาพ
8. วางแผนเข้าร่วมการทดสอบความชำนาญทางด้านเคมีประจำปี และดำเนินการตามแผน
9. วางแผนการทวนสอบ/สอบเทียบเครื่องมือของห้องปฏิบัติการเคมีประจำปี และดำเนินการตามแผน รวมทั้งมีแผนการบำรุงรักษาเครื่องมือของห้องปฏิบัติการเคมี
10. กำหนดรายละเอียดของครุภัณฑ์ที่จะจัดซื้อให้เหมาะสมกับความต้องการของหน่วยงาน
11. จัดทำประวัติเครื่องมือ วัสดุอ้างอิงหรือมาตรฐานอ้างอิง

## คุณภาพ ความยุ่งยากและความซับซ้อนของงานในหน้าที่ความรับผิดชอบ

1. คุณภาพของงาน

การปฏิบัติงานในหน้าที่ความรับผิดชอบในฐานะหัวหน้าห้องปฏิบัติการเคมี เป็นงานที่ต้องให้ความสำคัญกับความถูกต้องของผลการทดสอบเป็นลำดับแรก เนื่องจากผลการทดสอบที่ถูกต้องจะสร้างความน่าเชื่อถือให้กับลูกค้า ดังนั้นการเลือกใช้วิธีวิเคราะห์จึงมีความสำคัญ ซึ่งหนึ่งในหน้าที่หลัก คือ เลือกวิธีการวิเคราะห์ วิธีการเตรียมตัวอย่าง และวิธีการสกัดตัวอย่าง ให้เหมาะสมกับชนิดของตัวอย่าง และตรงตามวัตถุประสงค์ของผู้ขอรับบริการ ปรับปรุงหรือดัดแปลงวิธีการทดสอบให้เหมาะสมกับชนิดของตัวอย่าง วางแผนการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ดำเนินการตามแผน และจัดทำเป็นเอกสารที่ใช้ในการปฏิบัติงาน รวมทั้งฝึกอบรมเจ้าหน้าที่ทำการวิเคราะห์ให้เข้าใจในรายละเอียดขั้นตอนการวิเคราะห์และสามารถทำการวิเคราะห์ตัวอย่างได้อย่างถูกต้อง นอกจากนี้ยังมีหน้าที่ความรับผิดชอบในการวางแผน ควบคุม กำกับดูแลการปฏิบัติงานภายในห้องปฏิบัติการเคมีให้เป็นไปตามระบบการบริหารงานด้านวิชาการภายใต้ระบบมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ISO/IEC 17025 ตามเงื่อนไขของหน่วยรับรอง และรับผิดชอบพัฒนาวิธีวิเคราะห์รายการใหม่ๆ วิธีวิเคราะห์ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี เพื่อขอขยายขอบข่ายการรับรองตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 และสามารถเปิดรับบริการได้ ตรงตามความต้องการของผู้ขอรับบริการ



## 2. ความยุ่งยากและความซับซ้อนของงาน

งานวิเคราะห์ทางด้านเคมี มีขั้นตอน วิธีการ และรายละเอียดที่ค่อนข้างมาก โดยแต่ละขั้นตอนต้องอาศัยทักษะ ความรู้ ความสามารถ และประสบการณ์ในการวิเคราะห์เพื่อดำเนินการหรือแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้น ไม่ว่าจะเป็นการตัดสินใจเลือกวิธีวิเคราะห์ วิธีการเตรียมตัวอย่าง และวิธีการสกัดตัวอย่าง ให้เหมาะสมกับชนิดของตัวอย่าง โดยพิจารณาจากองค์ประกอบของตัวอย่าง ซึ่งอาจต้องมีการดัดแปลงวิธีการเตรียมตัวอย่างให้เหมาะสมกับการวิเคราะห์ การแก้ไขปัญหาเฉพาะหน้ากรณีที่เครื่องมือมีปัญหา ผลการวิเคราะห์ไม่เป็นไปตามหลักการทางวิชาการ และไม่เป็นไปตามระบบคุณภาพมาตรฐาน ISO 17025 : 2017 ความยุ่งยากซับซ้อนในการคำนวณผลหรือในการรายงานผล ต้องใช้ความรู้ ประสบการณ์ และศึกษาหาความรู้เพิ่มเติมเกี่ยวกับธรรมชาติของรายการวิเคราะห์ในตัวอย่างนั้นๆ เมื่อมีรายการวิเคราะห์ใหม่ๆ ต้องทำการศึกษา ค้นคว้าเกี่ยวกับรายการวิเคราะห์นั้นๆ ทั้งด้านวิธีการวิเคราะห์ และข้อกำหนดด้วย

### ความรู้ความสามารถที่จำเป็นสำหรับตำแหน่ง

1. มีความรู้ความสามารถและประสบการณ์เกี่ยวกับการวิเคราะห์ทางด้านเคมี
2. มีความรู้ความสามารถและประสบการณ์เกี่ยวกับการใช้เครื่องมือวิเคราะห์พื้นฐานในห้องปฏิบัติการเคมี และการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ขั้นสูง
3. มีความรู้ความเข้าใจข้อกำหนดตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025
4. มีความรู้ความเข้าใจและประสบการณ์การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี และการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด
5. มีความรู้ความเข้าใจทางด้านสถิติและสามารถนำมาประยุกต์ใช้งานได้
6. มีทักษะในการใช้เทคโนโลยีสารสนเทศ และอุปกรณ์สำนักงาน เช่น คอมพิวเตอร์ (Word/Excel/Power Point / Access) เครื่องส่งโทรสาร และเครื่องถ่ายเอกสาร เป็นต้น
7. มีความรู้ความสามารถในการศึกษาข้อมูลและการวิเคราะห์ปัญหา
8. มีทักษะในการติดต่อประสานงานภายในองค์กรและภายนอก

## บทที่ 3

### หลักการและวิธีการ

ในการจัดทำคู่มือครั้งนี้ ผู้จัดทำได้ทำการศึกษารวบรวมหลักการและวิธีการจากตำราเอกสารทางวิชาการ เอกสารประกอบการฝึกอบรม อินเทอร์เน็ต เพื่อใช้เป็นแนวทางในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทางเคมี ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

#### 3.1 วิธีวิเคราะห์ สามารถสามารถแบ่งประเภทได้ดังนี้

##### 3.1.1 แบ่งตามความสมบูรณ์ของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

- 3.1.1.1 วิธีที่ผ่านการตรวจสอบโดยการศึกษาจากหลายๆ ห้องปฏิบัติการ (Collaborative study) ซึ่งอาจเป็นวิธีการทดสอบที่เป็นไปตามกระบวนการที่แต่ละหน่วยงานกำหนด แต่วิธีการทดสอบนั้นๆ เป็นวิธีที่นานาชาติยอมรับ
- 3.1.1.2 วิธีที่ผ่านการตรวจสอบโดยห้องปฏิบัติการตั้งแต่ 2 แห่งขึ้นไป (Multi-laboratory validation) อาจทำได้โดยให้ห้องปฏิบัติการตั้งแต่ 2 ห้องปฏิบัติการ ทำการทดสอบโดยใช้วิธีเดียวกัน แต่วิธีนี้ยังไม่สมบูรณ์เหมือนข้อ 1.1 เนื่องจากยังไม่เป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับในระดับนานาชาติ
- 3.1.1.3 วิธีที่ผ่านการตรวจสอบโดยห้องปฏิบัติการเดียว (Single laboratory method validation) เช่น การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบในแต่ละห้องปฏิบัติการว่าวิธีทดสอบที่ใช้มีความน่าเชื่อถือ แต่ไม่สามารถยอมรับได้ในระดับนานาชาติ
- 3.1.1.4 วิธีที่ผ่านการตรวจสอบคุณลักษณะเฉพาะบางรายการ (Partially validated)
- 3.1.1.5 วิธีที่ไม่มีข้อมูลการตรวจสอบ (Validation not known) เป็นวิธีที่ไม่ได้ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

##### 3.1.2 แบ่งตามลักษณะของวิธีวิเคราะห์

- 3.1.2.1 Empirical method หมายถึง วิธีวิเคราะห์ที่ผลการวิเคราะห์ขึ้นกับวิธีการที่กำหนดไว้ในวิธีนั้น (Method-dependent result) มักเป็นวิธีที่มีการกำหนดขึ้นมาให้ผู้เกี่ยวข้องใช้ตามเพื่อใช้ในการตัดสินใจ โดยไม่เน้นที่จะหาค่าจริง วิธีเหล่านี้ไม่จำเป็นต้องหาประสิทธิภาพของวิธี ผลการวิเคราะห์โดยวิธีเหล่านี้จะสอกลับไปที่วิธีวิเคราะห์ ไม่สามารถสอกลับถึงหน่วยในระบบสากล (International system of unit ; SI unit) เช่น การหาความชื้นในตัวอย่างที่อุณหภูมิ 135°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ถ้าอบที่อุณหภูมิ หรือเวลาต่างกัน ผลการทดสอบจะต่างกัน ดังนั้น การทดสอบด้วยลักษณะวิธีแบบนี้ห้ามดัดแปลงวิธีทดสอบ ต้องทำตามวิธีที่กำหนด
- 3.1.2.2 Rational method หมายถึงวิธีวิเคราะห์ที่ผลการวิเคราะห์ไม่ขึ้นกับวิธี (Method-independent result) หมายความว่า การใช้วิธีที่แตกต่างกัน แต่ผ่านการยืนยันความเหมาะสมแล้ว จะให้ผลการวิเคราะห์ที่ไม่แตกต่างกัน ผลการวิเคราะห์โดยวิธีเหล่านี้จะสอกลับไปที่ SI unit ได้โดยตรงหรือผ่าน CRM

### 3.1.3 แบ่งตามระดับความเข้มข้นของสารที่ต้องการศึกษา

เป็นการแบ่งวิธีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณโดยพิจารณาจากระดับความเข้มข้นที่สนใจ

- 3.1.3.1 วิธีวิเคราะห์สำหรับสารที่มีความเข้มข้นต่ำๆ เช่น สารปนเปื้อนและสารตกค้าง การทดสอบประเภทนี้ ห้องปฏิบัติการต้องตรวจสอบหาค่าขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation ; LOQ) โดยมีหลักฐานเป็นรูปธรรมที่แสดงว่าปริมาณต่ำสุดเท่าไรที่ห้องปฏิบัติการสามารถทดสอบได้ โดยมีความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) เป็นที่ยอมรับ
- 3.1.3.2 วิธีวิเคราะห์สำหรับสารที่มีความเข้มข้นสูงๆ เช่น วิธีวิเคราะห์สารประกอบหลักในผลิตภัณฑ์ ห้องปฏิบัติการต้องตรวจสอบว่าความเข้มข้นที่สามารถทดสอบได้อยู่ระหว่างเท่าไร การทดสอบประเภทนี้ไม่จำเป็นต้องหาค่า LOD และ LOQ
- 3.1.3.3 Limit test หมายถึงการทดสอบธาตุปริมาณต่ำมากๆ ซึ่งอาจมีหรือไม่มีธาตุนั้นในตัวอย่างก็ได้ การรายงานผลคือตรวจพบหรือตรวจไม่พบ การทดสอบประเภทนี้ต้องหาค่า ขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of detection ; LOD)

### 3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Tools of validation study)

วัสดุ (Materials) เป็นเครื่องมือที่นำมาใช้ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี วัสดุจะต้องมีความเป็นเนื้อเดียวกัน มีความคงตัว ไม่สลายหรือเปลี่ยนแปลงง่ายตลอดระยะเวลาที่ดำเนินการทดสอบวิธี มีเนื้อสาร (Matrix) และความเข้มข้นของสารใกล้เคียงกับตัวอย่างที่วิเคราะห์ประจำ ชนิดของวัสดุแบ่งได้เป็น

1. Blank มีหลายชนิด ได้แก่
  - Reagent blank คือ Reagent ที่ใช้ในกระบวนการวิเคราะห์ รวมทั้งตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดหรือละลาย Reagent blank ใช้ในการศึกษาการรบกวนของสารอื่นในขั้นตอนการวัด
  - Sample blank คือ ตัวอย่างที่ไม่มีสารที่สนใจที่จะศึกษา
2. Sample คือ ตัวอย่างที่มีสารที่สนใจศึกษาอยู่
3. Fortified หรือ Spiked materials / solution คือ วัสดุที่มีการเติมสารที่กำลังศึกษา โดยเติมลงในตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์
4. Incurred materials คือ วัสดุที่มีสารที่จะวิเคราะห์อยู่ในเนื้อตัวอย่างโดยธรรมชาติหรือจงใจทำให้เกิดขึ้นเหมือนธรรมชาติ
5. Reference materials (RM) หมายถึง วัสดุใดๆ ที่มีการเตรียมอย่างดี มีความเป็นเนื้อเดียวกัน ไม่เปลี่ยนแปลงหรือสลายง่าย และทราบค่าความเข้มข้นหรือคุณสมบัติที่กำลังศึกษา
6. Certified reference materials (CRM) หมายถึง วัสดุที่ทราบค่าและสามารถสอบกลับได้ไปที่ SI unit และมีใบรับรองค่า

### 3.3 สถิติ (Statistical)

สถิติเป็นเครื่องมือที่ใช้ในการประเมินผลการวิเคราะห์ คุณลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์หาได้ โดยการคำนวณผลการวิเคราะห์และประเมินด้วยสถิติ สถิติที่เกี่ยวข้อง ได้แก่

1. ค่าเฉลี่ย (Mean) เป็นค่าบอกจุดตรงกลางของข้อมูล สำหรับค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างที่สุ่มมา (Sample) จะใช้สัญลักษณ์  $\bar{x}$

$$\bar{x} = \frac{\sum(x_i)}{n} \dots\dots\dots(\text{สูตรที่ 1})$$

โดย  $x_i$  เป็นค่าของข้อมูลหรือผลการวิเคราะห์แต่ละค่า และ  $n$  เป็นจำนวนข้อมูล

2. ค่าแปรปรวน (Variance) ผลการวิเคราะห์ที่ทำซ้ำๆ แต่ละค่าไม่เท่ากัน และมีความแตกต่างจากค่าเฉลี่ยต่างกัน แสดงว่าข้อมูลมีความแปรปรวน ถ้าข้อมูลมีความแปรปรวนมากความน่าเชื่อถือจะลดลง จึงต้องหาค่าความแปรปรวนสำหรับกลุ่มตัวอย่าง ใช้สัญลักษณ์  $s^2$

$$s^2 = \frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{(n-1)} \dots\dots\dots(\text{สูตรที่ 2})$$

โดย  $n - 1$  คือ Degree of freedom

3. ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation) เป็นค่าบอกความมากน้อยของการกระจายข้อมูล แสดงความคลาดเคลื่อนของผลการวิเคราะห์ที่เกิดขึ้นเป็นครั้งคราว (Random error) สำหรับกลุ่มตัวอย่างใช้สัญลักษณ์  $s$

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}} \dots\dots\dots(\text{สูตรที่ 3})$$

4. ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Standard error หรือ Standard deviation of mean) ใช้สัญลักษณ์  $s(\bar{x})$  เป็นค่าที่แสดงการกระจายตัวของ  $\bar{x}$

$$s(\bar{x}) = \frac{s}{\sqrt{n}} \dots\dots\dots(\text{สูตรที่ 4})$$

Standard error ใช้ในการวัดความคลาดเคลื่อนที่เกิดเป็นประจำในวิธีวิเคราะห์ (Systematic error)

5. สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of variation : CV) คือค่าที่แสดงความคลาดเคลื่อนของวิธีที่เกิดขึ้นครั้งคราว เช่นเดียวกับ Standard deviation แสดงเป็นค่าร้อยละ จึงใช้ในการเปรียบเทียบความคลาดเคลื่อนที่ความเข้มข้นต่างระดับ และบอก Precision ของวิธีได้

$$\%CV = \%RSD = \frac{s \times 100}{\bar{x}} \dots\dots\dots(\text{สูตรที่ 5})$$

6. การทดสอบค่าสุดต่าง (Outlier) ด้วย Grubb's test ค่าสุดต่าง หมายถึง ค่าที่แตกต่างจากค่าอื่นๆ ในกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญเป็นค่าที่ควรกำจัดออกเพื่อไม่ให้มีผลกระทบกับค่าเฉลี่ย

$$G = \frac{|suspectvalue - \bar{x}|}{s} \dots\dots\dots(\text{สูตรที่ 6})$$

ค่า  $s$  คือ Standard deviation ที่มีค่าที่สงสัยรวมอยู่ด้วย จากนั้นจึงเปรียบเทียบค่า  $G$  ที่คำนวณได้ กับค่า  $G$  จากตาราง โดยเลือกใช้ตารางที่ระดับนัยสำคัญที่ต้องการ เช่น 0.05 ถ้า  $G$  จากการคำนวณน้อยกว่า แสดงว่าไม่มีค่าสุดต่างในกลุ่มข้อมูลนี้

ตารางที่ 3.1 Critical values of G for a two-tailed test ( $p = 0.05$ )

| Sample size | Critical value |
|-------------|----------------|
| 3           | 1.155          |
| 4           | 1.481          |
| 5           | 1.715          |
| 6           | 1.887          |
| 7           | 2.020          |
| 8           | 2.126          |
| 9           | 2.215          |
| 10          | 2.290          |

## 7. การทดสอบความแปรปรวน (Variance) ด้วย F-test

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \dots\dots\dots(\text{สูตรที่ 7})$$

$s_1^2$  = ค่าความแปรปรวนของข้อมูลกลุ่มที่ 1

$s_2^2$  = ค่าความแปรปรวนของข้อมูลกลุ่มที่ 2

โดย  $s_1^2 > s_2^2$

เปรียบเทียบค่า  $F$  จากการคำนวณกับค่า  $F_c$  จากตาราง  $F$

ตารางที่ 3.2 Critical values of F for a one-tailed test ( $p = 0.05$ )

| df <sub>2</sub> | df <sub>1</sub> |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |  |
|-----------------|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
|                 | 1               | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 12    | 15    |  |
| 1               | 161.4           | 199.5 | 215.7 | 224.6 | 230.2 | 234.0 | 236.8 | 238.9 | 240.5 | 241.9 | 243.9 | 245.9 |  |
| 1               | 647.8           | 799.5 | 864.2 | 899.6 | 921.8 | 937.1 | 948.2 | 956.7 | 963.3 | 968.6 | 976.7 | 984.9 |  |
| 2               | 38.51           | 39.00 | 39.17 | 39.25 | 39.30 | 39.33 | 39.36 | 39.37 | 39.39 | 39.40 | 39.41 | 39.43 |  |
| 3               | 17.44           | 16.04 | 15.44 | 15.10 | 14.88 | 14.73 | 14.62 | 14.54 | 14.47 | 14.42 | 14.34 | 14.25 |  |
| 4               | 12.22           | 10.65 | 9.979 | 9.605 | 9.364 | 9.197 | 9.074 | 8.983 | 8.905 | 8.844 | 8.751 | 8.657 |  |
| 5               | 10.01           | 8.434 | 7.764 | 7.388 | 7.146 | 6.978 | 6.853 | 6.757 | 6.681 | 6.619 | 6.525 | 6.428 |  |
| 6               | 8.813           | 7.260 | 6.599 | 6.227 | 5.988 | 5.820 | 5.695 | 5.600 | 5.523 | 5.461 | 5.366 | 5.269 |  |
| 7               | 8.073           | 6.542 | 5.890 | 5.523 | 5.285 | 5.119 | 4.995 | 4.899 | 4.823 | 4.761 | 4.666 | 4.568 |  |
| 8               | 7.571           | 6.059 | 5.416 | 5.053 | 4.817 | 4.652 | 4.529 | 4.433 | 4.357 | 4.295 | 4.200 | 4.101 |  |
| 9               | 7.209           | 5.715 | 5.078 | 4.718 | 4.484 | 4.320 | 4.197 | 4.102 | 4.026 | 3.954 | 3.868 | 3.769 |  |
| 10              | 6.937           | 5.456 | 4.826 | 4.468 | 4.236 | 4.072 | 3.950 | 3.855 | 3.779 | 3.717 | 3.621 | 3.522 |  |
| 11              | 6.724           | 5.256 | 4.630 | 4.275 | 4.044 | 3.881 | 3.759 | 3.664 | 3.588 | 3.526 | 3.430 | 3.330 |  |
| 12              | 6.554           | 5.096 | 4.474 | 4.121 | 3.891 | 3.728 | 3.607 | 3.512 | 3.436 | 3.374 | 3.277 | 3.177 |  |
| 13              | 6.414           | 4.965 | 4.347 | 3.996 | 3.767 | 3.604 | 3.483 | 3.388 | 3.312 | 3.250 | 3.153 | 3.053 |  |
| 14              | 6.298           | 4.857 | 4.242 | 3.892 | 3.663 | 3.501 | 3.380 | 3.285 | 3.209 | 3.147 | 3.050 | 2.949 |  |
| 15              | 6.200           | 4.765 | 4.153 | 3.804 | 3.576 | 3.415 | 3.293 | 3.199 | 3.123 | 3.060 | 2.963 | 2.862 |  |

df<sub>1</sub> = number of degrees of freedom of the numerator and

df<sub>2</sub> = number of degrees of freedom of the denominator

ถ้า  $F$  จากการคำนวณน้อยกว่า  $F_c$  แสดงว่าค่าความแปรปรวนทั้งสองไม่แตกต่างกัน  
สามารถใช้ F-test ในการทดสอบความแตกต่างของ Precision ได้

8. การทดสอบค่าเฉลี่ยด้วย t-test ใช้ในการทดสอบค่าเฉลี่ยของข้อมูล 1 กลุ่มตัวอย่าง และ 2 กลุ่มตัวอย่าง

การทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย t-test ทำได้โดยการคำนวณค่า  $t$  ด้วยสูตรที่เหมาะสม และเปรียบเทียบค่า  $t$  กับค่า  $t_c$  ( $t_c$  คือค่า Critical) จากตาราง  $t$

ตารางที่ 3.3 The  $t$ -distribution (two-tailed)

| Degree of freedom | Confidence level |       |       |       |
|-------------------|------------------|-------|-------|-------|
|                   | 90%              | 95%   | 98%   | 99%   |
| 1                 | 6.31             | 12.71 | 31.82 | 63.66 |
| 2                 | 2.92             | 4.30  | 6.96  | 9.92  |
| 3                 | 2.35             | 3.18  | 4.54  | 5.84  |
| 4                 | 2.13             | 2.78  | 3.75  | 4.60  |
| 5                 | 2.02             | 2.57  | 3.36  | 4.03  |
| 6                 | 1.94             | 2.45  | 3.14  | 3.71  |
| 7                 | 1.89             | 2.36  | 3.00  | 3.50  |
| 8                 | 1.86             | 2.31  | 2.90  | 3.36  |
| 9                 | 1.83             | 2.26  | 2.8   | 3.25  |
| 10                | 1.81             | 2.23  | 2.76  | 3.17  |
| 12                | 1.78             | 2.18  | 2.68  | 3.05  |
| 14                | 1.76             | 2.14  | 2.62  | 2.98  |
| 16                | 1.75             | 2.12  | 2.58  | 2.92  |
| 18                | 1.73             | 2.10  | 2.55  | 2.88  |
| 20                | 1.72             | 2.09  | 2.53  | 2.85  |
| 30                | 1.70             | 2.04  | 2.46  | 2.75  |
| 50                | 1.68             | 2.01  | 2.40  | 2.68  |
| $\infty$          | 1.64             | 1.96  | 2.33  | 2.58  |

ถ้า  $t$  จากการคำนวณน้อยกว่า  $t_c$  แสดงว่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยไม่มีนัยสำคัญ  
สูตรการคำนวณ มีดังนี้

- สำหรับข้อมูล 1 กลุ่มตัวอย่าง

$$t = \frac{(\bar{x} - \mu)}{(s / \sqrt{n})} \dots\dots\dots(\text{สูตรที่ 8})$$

$t$  เป็นอัตราส่วนระหว่างความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์กับค่าอ้างอิง ( $\mu$ )  
ซึ่งแสดงถึงความคลาดเคลื่อนแบบ Systematic error กับ Standard error

- สำหรับข้อมูล 2 กลุ่มตัวอย่างที่เป็นอิสระต่อกัน และมีค่าความแปรปรวนไม่แตกต่างกัน  
ทดสอบความแปรปรวนโดยใช้ F-test (ข้อ 2.7 สูตรที่ 6)

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \dots\dots\dots(\text{สูตรที่ 9})$$

โดย  $s$  ได้จาก

$$s^2 = \frac{[(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2]}{(n_1 + n_2 - 2)} \quad \dots\dots\dots(\text{สูตรที่ 10})$$

โดย Degree of freedom,  $df = (n_1 + n_2 - 2)$  .....(สูตรที่ 11)

- สำหรับข้อมูล 2 กลุ่มตัวอย่างที่เป็นอิสระต่อกัน และมีค่าความแปรปรวนแตกต่างกัน  
ทดสอบความแปรปรวนโดยใช้ F-test (ข้อ 2.7 สูตรที่ 6)

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad \dots\dots\dots(\text{สูตรที่ 12})$$

$$df = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{s_1^4}{n_1^2(n_1 - 1)} + \frac{s_2^4}{n_2^2(n_2 - 1)}} \quad \dots\dots\dots(\text{สูตรที่ 13})$$

- สำหรับข้อมูล 2 กลุ่มตัวอย่างที่มีความสัมพันธ์กัน เช่น ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกัน  
จาก 2 วิธี (Paired t-test)

$$t = \frac{\bar{d}}{\left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)} \quad \dots\dots\dots(\text{สูตรที่ 14})$$

$\bar{d}$  คือ ค่าเฉลี่ยของความแตกต่างระหว่างผลที่ได้จาก 2 วิธี

$s$  คือ Standard deviation ของความแตกต่างเหล่านั้น

สามารถใช้ t-test ในการทดสอบ Accuracy ของวิธีวิเคราะห์ได้

9. สมมุติฐานทางสถิติ (statistical hypothesis) ในการทดสอบทางสถิติ (จะกล่าวเฉพาะ t-test และ F-test) ถ้าเป็นการทดสอบว่าข้อมูลมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ (เป็นการทดสอบแบบ two-tailed) สามารถทำได้โดยตั้งสมมุติฐาน (Statistic hypothesis) ว่าข้อมูลที่ต้องการนั้นไม่มีความแตกต่าง (เรียกว่า Null hypothesis) แล้วจึงทำการพิสูจน์สมมุติฐานนั้น การตั้งสมมุติฐานทางสถิติจะต้องทำเป็นคู่เสมอ คือ Null hypothesis ( $H_0$ ) กับสมมุติฐานอื่น เรียกว่า Alternative hypothesis ( $H_a$ ) เช่น

- Null hypothesis ( $H_0$ )

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

- Alternative hypothesis ( $H_1$ )

$$H_a: \mu_1 \neq \mu_2$$

(เป็นสมมุติฐานแบบ two-tailed เพราะ  $\mu_1$  อาจมากกว่าหรือน้อยกว่า  $\mu_2$  ก็ได้)

10. ระดับความเชื่อมั่น (Level of significance / Level of confidence) การทดสอบทางสถิติเกี่ยวข้องกับระดับความมีนัยสำคัญหรือระดับความเชื่อมั่น (Level of significant / Level of confidence) ซึ่งเป็นขอบเขตที่กำหนดทางสถิติ ใช้สัญลักษณ์  $p$  หรือ  $\alpha$  เช่น  $P$



= 0.05 จะบอกโอกาสที่ไม่ยอมรับ Null hypothesis ที่ถูกด้วย 0.05 (หรือ 5% ของจำนวนการทดลองทั้งหมด) หรือที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p = 0.05$ ) หมายความว่าทดสอบ 100 ครั้ง จะมีโอกาสที่ยอมรับ Null hypothesis ถึง 95 ครั้ง มีเพียง 5 ครั้งที่ไม่ยอมรับ Null hypothesis

### 3.4 คุณลักษณะของวิธี (Method performance characteristics)

- 3.4.1 Specificity/Selectivity** ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ เป็นคุณลักษณะที่แสดงความสามารถของวิธีที่จะตรวจวัดได้เฉพาะสิ่งที่ต้องการ เป็นการศึกษาว่าวิธีนั้นสามารถตอบสนองต่อสารที่ต้องการศึกษาเพียงอย่างเดียว ถึงแม้ว่าสารที่ต้องการศึกษาจะมีสารอื่นอยู่ด้วยก็ตาม เช่น ในการวัดสารละลายตัวอย่าง ซึ่งอาจมีสาร a สาร b และสาร c อยู่ แต่สิ่งที่เราต้องการหาคือสาร c เครื่องมือควรจะอ่านค่าเพียงแค่สาร c เท่านั้น เครื่องมือไม่ควรอ่านค่าสารตัวอื่นที่นอกเหนือจากสารที่เราต้องการศึกษา ถ้ามีการอ่านค่าสารอื่น แสดงว่าวิธีนี้ไม่มีความจำเพาะเจาะจง
- 3.4.2 ช่วงการใช้งานหรือช่วงของการวัด (Working range)** เป็นช่วงของความเข้มข้นของสารซึ่งวิธีนั้นๆ จะใช้ได้ ครอบคลุมระดับความเข้มข้นของสารที่ต้องการศึกษา (lower และ upper levels) โดยจะเริ่มตั้งต้นจาก LOD หรือ LOQ
- 3.4.3 ความสัมพันธ์เชิงเส้นหรือช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity)** เป็นค่าที่แสดงความสัมพันธ์อย่างเป็นสัดส่วนโดยตรงระหว่างสัญญาณจากเครื่องมือวัดและความเข้มข้นของสาร ช่วงความเป็นเส้นตรง จะเป็นส่วนหนึ่งของช่วงการใช้งาน จะเริ่มต้นที่ LOQ สามารถแบ่งออกได้เป็น
- 3.4.1.1 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของเครื่องมือ (System linearity) เป็นค่าที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณจากเครื่องมือวัดและความเข้มข้นของสารในช่วงของการใช้งานทดสอบโดยการวัดสารมาตรฐาน และจะแสดงผลวิเคราะห์เป็นสัดส่วนของสัญญาณกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน แล้วสร้างกราฟมาตรฐาน
- 3.4.1.2 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ (Method linearity) เป็นค่าที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของสารมาตรฐานที่วัดกับปริมาณที่วัดได้ การวิเคราะห์โดยวัดตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (Spike sample blank) จะแสดงความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่ให้ผลเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารที่มีอยู่จริงในตัวอย่าง
- 3.4.4 ขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)** ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่องสามารถตรวจวัดได้ แต่ไม่สามารถแสดงปริมาณได้อย่างถูกต้อง โดยทั่วไปจะเป็นระดับความเข้มข้นของสารที่ให้สัญญาณเป็น 3 เท่า ของ SD ของ blank
- 3.4.5 ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)** ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่เครื่องสามารถตรวจวัดและอ่านค่าได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ สามารถรายงานค่าได้ โดยทั่วไป LOQ จะเป็นระดับความเข้มข้นของสารที่ให้สัญญาณเป็น 3 เท่าของ LOD หรือ 10 เท่า ของ SD ของ blank

**3.4.6 ความแม่นยำ (Accuracy)** เป็นคุณลักษณะที่บ่งบอกว่าผลการทดสอบมีค่าเข้าใกล้ค่าจริงหรือค่าอ้างอิงหรือค่าที่ยอมรับมากน้อยเพียงใด การตรวจสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ สามารถทำได้ 2 แบบ ดังนี้

3.4.6.1 เปรียบเทียบกับค่าอ้างอิงหรือค่าที่ยอมรับ สามารถทำได้ 2 วิธี คือ

1. ใช้ CRM หรือ RM ที่สอบกลับได้ไปที่ SI unit
2. เปรียบเทียบกับวิธีวิเคราะห์อื่นที่อ้างอิงได้ และประเมินผลโดยใช้หลักสถิติ

3.4.6.2 ทดสอบค่ากลับคืน (Recovery) กรณีที่ไม่มีวัสดุอ้างอิง ทำการตรวจสอบความแม่นยำ โดยเติมสารมาตรฐานที่ทราบค่าแน่นอน (Spiked sample) ปริมาณน้อยๆ ลงในตัวอย่าง วิเคราะห์ตามวิธี แล้วคำนวณค่ากลับคืน

มาตรฐานต่างๆ ให้ความหมาย Accuracy มี 2 องค์ประกอบ คือ Trueness (คุณสมบัติที่บ่งบอกว่าค่าเฉลี่ยของผลวิเคราะห์ใกล้เคียงกับค่าจริงมากน้อยเพียงใด) และ Precision (ความเที่ยงเป็นตัววัดว่าผลการวิเคราะห์แต่ละค่าอยู่ใกล้กันมากน้อยเพียงใดรอบๆ ค่าเฉลี่ย)

การประเมิน Trueness ของวิธีวิเคราะห์ ทำได้โดยเปรียบเทียบผลจากการวิเคราะห์กับค่าจริงหรือค่าอ้างอิงโดยใช้สถิติที่เหมาะสม

ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวิเคราะห์กับค่าจริงหรือค่าอ้างอิง เรียกว่า ความเบี่ยงเบน (Bias)

Bias มีองค์ประกอบ 2 อย่าง คือ

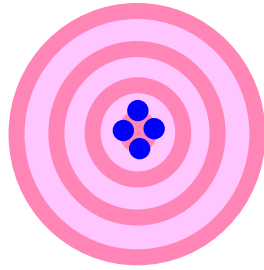
1. Method bias เกิดจาก ความคลื่อนของระบบ (Systematic error) ที่ติดมากับวิธีวิเคราะห์ ไม่ว่าจะห้องปฏิบัติการใดนำวิธีนี้ไปใช้ก็จะมี Method bias เกิดขึ้นเสมอ
2. Laboratory bias เป็น bias ที่นอกเหนือจาก Method bias เกิดขึ้นจากห้องปฏิบัติการที่ใช้วิธีนี้ bias ของแต่ละห้องปฏิบัติการหาได้จะเป็น Overall bias คือผลรวมของ Method bias และ Laboratory bias

**3.4.7 ความเที่ยง (Precision)** เป็นคุณลักษณะที่แสดงถึงความสามารถในการวัดซ้ำหลายๆ ครั้ง แล้วให้ผลที่ใกล้เคียงกันหรือไม่ ซึ่งการวัดที่ได้ค่าใกล้เคียงกันไม่ได้หมายความว่าค่าที่วัดได้จะเป็นค่าที่ถูกต้องเสมอไป ไม่ได้บอกถึงความถูกต้องของผลการทดสอบ แบ่งออกเป็น 3 แบบด้วยกัน ได้แก่

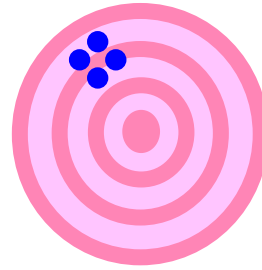
3.4.7.1 Repeatability เป็นการวิเคราะห์ซ้ำๆ ภายใต้สภาวะคงที่ ซึ่งการวิเคราะห์จะต้องทำโดยห้องปฏิบัติการเดียวกัน ตัวอย่างเดียวกัน ภาวะแวดล้อมเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกันและภายใต้เวลาใกล้เคียงกัน ข้อมูลที่ได้นี้สามารถยืนยันคุณสมบัติของวิธีได้แต่ไม่สามารถใช้ควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์ในระยะยาวได้

3.4.7.2 Intermediate precision เป็นการวิเคราะห์ซ้ำภายใต้สภาวะเดิม โดยห้องปฏิบัติการเดียวกัน แต่นักวิเคราะห์อาจเป็นคนละคนกัน หรือนักวิเคราะห์คนเดียวกัน แต่ทำการวิเคราะห์ต่างวัน หรือใช้เครื่องมือต่างชุดกัน ข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้ในการควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์ในระยะยาวของห้องปฏิบัติการได้

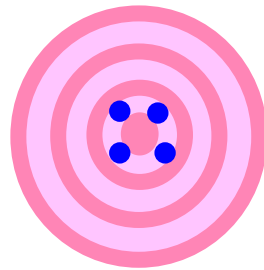
3.4.7.3 Reproducibility เป็นการวิเคราะห์ตัวอย่างเดิม แต่นักวิเคราะห์อาจเป็นคนละคนกัน ใช้เครื่องมือต่างชุดกัน ห้องปฏิบัติการต่างกัน การตรวจสอบด้วยสภาวะนี้ใช้ในกรณีที่ต้องการให้วิธีวิเคราะห์นั้นเป็นวิธีมาตรฐาน สามารถใช้ได้กับห้องปฏิบัติการทั่วไป ภาพที่ 3.1 แสดงความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision)



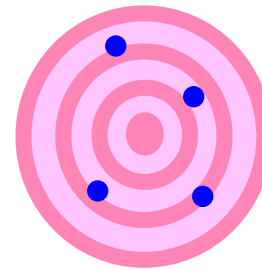
แม่นยำและเที่ยงตรง



ไม่แม่นยำแต่เที่ยงตรง



แม่นยำแต่ไม่เที่ยงตรง



ไม่แม่นยำและไม่เที่ยงตรง

3.4.8 ความแข็งแกร่งหรือความคงทนของวิธี (Ruggedness/Robustness) เป็นคุณลักษณะที่บ่งบอกถึงความสามารถของวิธีที่ให้ผลการวิเคราะห์ยอมรับได้ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงเงื่อนไขบางอย่างเพียงเล็กน้อย เช่น การใช้อุณหภูมิที่ต่างกัน ความเข้มข้นของสารละลายในการย่อยตัวอย่าง ตัวทำละลายที่ใช้สกัดตัวอย่าง เป็นต้น โดยปกติการทำ Robustness จะทำเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงวิธีทดสอบ หรือมีการทำวิธีทดสอบขึ้นมาใหม่เท่านั้น

### 3.5 ขอบเขตของการทดสอบวิธี

ควรมีการกำหนดขอบเขตของการทดสอบ โดยมีแนวทางในการพิจารณาดังนี้

- 3.5.1 วิธีที่ห้องปฏิบัติการดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน ขอบเขตการศึกษาคุณลักษณะเฉพาะขึ้นอยู่กับว่ามีการดัดแปลงไปจากวิธีเดิมในขั้นตอนใด อย่างไรก็ตามควรทำการศึกษา
  - 3.5.1.1 ช่วงการใช้งาน (Working range) และความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของวิธี โดยศึกษาจากกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจากสารละลายมาตรฐาน เพื่อกำหนดช่วงที่เหมาะสม และตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของวิธี รวมทั้งศึกษา Matrix effect
  - 3.5.1.2 ความจำเพาะเจาะจง (Specificity/Selectivity) โดยศึกษาการรบกวนจากสารหรือสิ่งต่างๆ ที่อาจมีในตัวอย่างจริง
  - 3.5.1.3 ความแม่นยำ (Accuracy) โดยการวิเคราะห์ CRM และ Recovery ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในช่วงของการใช้งาน
  - 3.5.1.4 ความเที่ยง (Precision) โดยศึกษาที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ด้วยการซ้ำซ้ำ (Repeatability และ within laboratory reproducibility)
  - 3.5.1.5 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีนี้กับวิธีอื่น (ถ้าสามารถทำได้)
  - 3.5.1.6 หาค่า LOD, LOQ ในกรณีเป็นวิธีที่ใช้การสารในระดับต่ำ  
 ถ้านำวิธีมาตรฐานที่ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องอย่างสมบูรณ์ และไม่มีการเปลี่ยนแปลงการใช้งาน ให้ทำการทวนสอบ (Verify) วิธี เพื่อเป็นการยืนยันสมรรถนะของห้องปฏิบัติการว่าสามารถทำได้ตามคุณลักษณะที่วิธีกำหนด และเหมาะสมตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน โดยให้ทดสอบ ความแม่นยำ (Accuracy) ความเที่ยง (Precision) ความเป็นเส้นตรง
- 3.5.2 วิธีที่พัฒนาโดยผู้อื่นพัฒนาขึ้นและต้องการนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการ อย่างน้อยต้องมีการทดสอบ ดังนี้
  - 3.5.2.1 วิธีที่ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องอย่างสมบูรณ์ และนำมาใช้กับ Matrix ที่แตกต่างจากที่กำหนดในขอบข่ายของวิธี ต้องแสดงให้เห็นว่า Matrix ใหม่ไม่ทำให้เกิดความคลาดเคลื่อน ควรทำการทดสอบ ความแม่นยำ (Accuracy) ความเที่ยง (Precision) ความเป็นเส้นตรง และ Matrix effect
  - 3.5.2.2 วิธีที่มีการพัฒนาอย่างดีและผ่านการศึกษา Single laboratory method validation แต่ไม่มีการทำ Collaborative study ควรทำการทดสอบ ความแม่นยำ (Accuracy) ความเที่ยง (Precision) ความเป็นเส้นตรง และ Matrix effect
  - 3.5.2.3 วิธีที่เผยแพร่ในวารสารวิทยาศาสตร์ ควรทำการทดสอบ ความแม่นยำ (Accuracy) ความเที่ยง (Precision) ความเป็นเส้นตรง Matrix effect และความทน  
 วิธี Empirical method ถ้าเป็นวิธีที่ไม่มีข้อมูลการทำ Collaborative study ควรศึกษาความเที่ยงโดยเปรียบเทียบกับ Horwitz equation

- 3.5.3 วิธีที่พัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการ (Laboratory-developed methods) ต้องมีการทดสอบ ดังนี้
- 3.5.3.1 ช่วงการใช้งาน (Working range) และความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของวิธี โดยศึกษาจากกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจากสารละลายมาตรฐาน เพื่อกำหนดช่วงที่เหมาะสม และตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของวิธี รวมทั้งศึกษา Matrix effect
  - 3.5.3.2 ความจำเพาะเจาะจง (Specificity/Selectivity) โดยศึกษาการรบกวนจากสารหรือสิ่งต่างๆ ที่อาจมีในตัวอย่างจริง
  - 3.5.3.3 ความแม่นยำ (Accuracy) โดยการวิเคราะห์ CRM และ Recovery ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในช่วงของการใช้งาน
  - 3.5.3.4 ความเที่ยง (Precision) โดยศึกษาที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ด้วยการซ้ำซ้ำ (Repeatability และ within laboratory reproducibility)
  - 3.5.3.5 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีนี้กับวิธีอื่น (ถ้าสามารถทำได้)
  - 3.5.3.6 หาค่า LOD, LOQ ในกรณีเป็นวิธีที่ใช้การสารในระดับต่ำ ถ้าผลการทดสอบวิธีไม่ผ่านเกณฑ์ที่กำหนดไว้ ควรทบทวนขั้นตอนต่างๆ ของวิธีปรับปรุงและทำการทดสอบใหม่

### 3.6 การตรวจสอบคุณลักษณะของวิธี

ตามมาตรฐานของ EURACHEM Guide 1998 มีแนวทางดังนี้

#### 3.6.1 ความจำเพาะเจาะจง (Specificity/Selectivity) ทำได้ดังนี้

##### 3.6.1.1 กรณีที่มี Sample blank

วิเคราะห์ Sample blank กับ Spiked sample blank ถ้าสัญญาณที่ได้จาก Sample blank น้อยมากหรือไม่มีเลย เมื่อเทียบกับสัญญาณที่ได้จาก Spiked sample blank แสดงว่าไม่มีการรบกวนจากสารอื่น แสดงผลการเปรียบเทียบโดยแสดง Chromatogram ของ Sample blank เปรียบเทียบกับ Spiked sample blank

##### 3.6.1.2 กรณีที่ไม่มี Sample blank

วิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้วิธีที่กำลังศึกษา และยืนยันวิธีด้วยเทคนิคอื่น ที่สามารถเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานได้ วิธีนี้ต้องทำ Reagent blank ด้วยเพื่อยืนยันสิ่งรบกวนอื่นๆ ที่นอกเหนือจากตัวอย่าง (ไม่กล่าวถึงรายละเอียดในคู่มือนี้)

##### 3.6.1.3 กรณีที่มีวิธีมาตรฐานที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อตัวอย่างนั้นๆ

วิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้วิธีที่กำลังศึกษา เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน ถ้าพบว่ามี การรบกวนการวิเคราะห์ ต้องหาสาเหตุและดำเนินการแก้ไข หากพบว่ามาจาก Matrix ในตัวอย่าง จะต้องทำการปรับหรือดัดแปลงวิธีให้ดีขึ้น (ไม่กล่าวถึงรายละเอียดในคู่มือนี้)

##### 3.6.1.4 เติมสารที่สงสัยว่าจะรบกวนลงในตัวอย่าง (Spiked sample)

วิเคราะห์ Sample และ Spiked sample โดยการซ้ำซ้ำ (n ครั้ง) แล้วเปรียบเทียบผลที่ได้โดยใช้ t-test

### การประเมินผลการตรวจสอบความจำเพาะเจาะจง Specificity/Selectivity

- หากไม่มีผลต่อการทดสอบ ไม่ต้องเปลี่ยนแปลงวิธี แต่ให้ระบุปริมาณที่รบกวน
- หากมีผลต่อการทดสอบ ให้ทำการปรับหรือตัดแปลงวิธี แล้วทำการตรวจสอบใหม่
- หากไม่สามารถแก้ไขปัญหาได้ ให้เปลี่ยนวิธี

### 3.6.2 ช่วงการใช้งาน (Working range)

มีความสัมพันธ์กับการตรวจสอบความแม่นยำ (Accuracy) ความเที่ยง (Precision) ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity) (กรณีที่มีกราฟมาตรฐาน) และ LOQ (ถ้ามี LOQ) สามารถทำการทดสอบไปพร้อมกันได้ โดยตรวจสอบความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ที่ความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง และตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (กรณีที่มีกราฟมาตรฐาน) ข้อมูลการตรวจสอบความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ที่ความเข้มข้นต่ำที่สุดกับที่ความเข้มข้นสูงที่สุดที่ให้ค่าความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) คือช่วงการใช้งานสามารถหาได้โดย

#### 3.6.2.1 กรณีที่ไม่มีกราฟมาตรฐาน

วิเคราะห์ CRM หรือ RM ที่มีค่าต่ำและที่มีค่าสูง เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับค่าอ้างอิงโดยใช้สถิติ t-test (สูตรที่ 7) หรือถ้าไม่มี CRM / RM ให้วิเคราะห์ Spiked sample blank ที่ระดับความเข้มข้นต่ำและระดับความเข้มข้นสูง คำนวณ %Recovery ตามสูตร

$$\% \text{ Recovery} = \left( \frac{C_{Sp} - C_S}{C_A} \right) \times 100 \quad \dots\dots\dots(\text{สูตรที่ } 15)$$

เมื่อ  $C_{Sp}$  คือ ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน

$C_S$  คือ ความเข้มข้นของตัวอย่าง

$C_A$  คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไปในตัวอย่าง

#### การประเมินผล

- กรณีใช้ CRM หรือ RM เปรียบเทียบ ค่า t ที่คำนวณได้ กับค่า  $t_c$  จากตาราง ถ้าค่า t น้อยกว่า  $t_c$  แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างค่าจากการวิเคราะห์กับค่าอ้างอิง ช่วงการใช้งาน (Working range) ที่ความเข้มข้นต่ำและที่ความเข้มข้นสูง มีความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision)
- กรณีใช้ %Recovery ถ้าค่าที่คำนวณได้อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ แสดงว่า ช่วงการใช้งาน (Working range) ที่ระดับความเข้มข้นต่ำและระดับความเข้มข้นสูง มีความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision)

### 3.6.2.2 กรณีที่มีกราฟมาตรฐาน

- เตรียมสารละลายมาตรฐาน หรือ Spiked sample blank ให้มีความเข้มข้นอย่างน้อย 6 ระดับ ให้ครอบคลุมช่วงการใช้งาน
- วัดสัญญาณจากเครื่องมือ 1 ซ้ำ
- สร้างกราฟมาตรฐานโดย plot สัญญาณจากเครื่องมือบนแกน y และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานบนแกน x (ให้รวมค่า Blank ด้วย)
- หาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r)

#### การประเมินผล

- ประเมินความเป็นเส้นตรงด้วยสายตา
- ค่า r ที่ได้ควรเข้าใกล้ 1 (r ต้องมากกว่า 0.995)
- ทำการตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity)

### 3.6.3 ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) สามารถหาได้โดย

- เตรียมสารละลายมาตรฐาน หรือ Spiked sample blank ที่ความเข้มข้นต่างๆ อย่างน้อย 6 ระดับ ให้ครอบคลุมช่วงที่ต้องการศึกษา และแต่ละระดับให้มีปริมาณเพียงพอในการวัดซ้ำ 3-4 ซ้ำ
- วัดสัญญาณจากเครื่องมือความเข้มข้นระดับละ 3 ซ้ำ
- สร้างกราฟมาตรฐานโดย Plot สัญญาณจากเครื่องมือบนแกน y และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานบนแกน x (ให้รวมค่า Blank ด้วย)
- หาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r)

#### การประเมินผล

- ค่า r ที่ได้ควรเข้าใกล้ 1 (r ต้องมากกว่า 0.995)
- สร้าง Regression line โดยใช้ Method of least square ซึ่งในการ Plot ความสัมพันธ์ระหว่าง x และ y มีสมมติฐานว่าความผิดพลาดทั้งหมดเกิดบนแกน y ดังนั้นจะต้องลากเส้นที่ทำให้มีความผิดพลาดน้อยที่สุด คือให้ความผิดพลาดระหว่างค่าสัญญาณที่อ่านได้จากการวัด (Observe  $y_i$ ) และค่าสัญญาณที่ได้จากการคำนวณ ( $y_{\text{predicted}}$ ) ในแกน y มีน้อยที่สุด ค่าแตกต่างกันี้เรียกว่า y-residuals ซึ่งมีทั้งค่าบวกและลบ จึงต้องหาค่า Minimum sum of square of the residuals ซึ่งหาได้โดย

$$\text{Slope ของเส้นตรง } (b) = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum (x_i - \bar{x})^2} \dots\dots\dots(\text{สูตรที่ 16})$$

$$\text{Intercept } (a) = \bar{y} - b\bar{x} \dots\dots\dots(\text{สูตรที่ 17})$$

- ทำ Residual plots เพื่อยืนยันความเป็นเส้นตรง
- กรณีที่ช่วงความเป็นเส้นตรง เริ่มตั้งแต่ LOQ ค่า LOQ ต้องมีค่าความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

### 3.6.4 ขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

ทำการวิเคราะห์ Sample blank หรือ Spiked sample blank โดยวัดค่าซ้ำ 7-10 ซ้ำ คำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) แล้วประมาณค่าขีดจำกัดในการตรวจพบ (LOD) ซึ่งในการประมาณค่า LOD สามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้

**3.6.4.1 กรณีมี Sample blank** (Sample blank ต้องอ่านค่าสัญญาณได้ ค่า SD ไม่เท่ากับศูนย์)

- วิเคราะห์ Sample blank 7-10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ครั้ง
- คำนวณหาค่าความเข้มข้น ความเข้มข้นเฉลี่ย ( $\bar{x}$ ) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

ของ Sample blank

- คำนวณค่า LOD จากสูตร

$$LOD = \bar{x} + 3SD \quad \dots\dots\dots(\text{สูตรที่ 18})$$

**3.6.4.2 กรณีวิเคราะห์ Spiked sample blank** (กรณีนี้ Sample blank ไม่สามารถอ่านค่าสัญญาณได้)

- เติมสารมาตรฐานที่สนใจลงใน Sample blank โดยเติมที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ยอมรับได้ เช่น ที่ระดับ LOQ หรือเติมที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (ใกล้ค่า LOD)

- วิเคราะห์ Spiked sample blank 7-10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ครั้ง
- คำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)
- คำนวณค่า LOD จากสูตร

$$LOD = 3SD \quad \dots\dots\dots(\text{สูตรที่ 19})$$

**3.6.4.3 การคำนวณจากจุดตัดกราฟเส้นตรงที่ Plot ระหว่างค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของ Spiked sample blank กับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)**

- เติมสารมาตรฐานที่สนใจลงใน Sample blank ให้มีความเข้มข้นหลายระดับ โดยระดับแรกไม่ห่างจากศูนย์มากนัก และระดับอื่นๆ มีระยะห่างที่เท่าๆ กัน

- วิเคราะห์ Spiked sample blank ระดับละ 7-10 ซ้ำ
- คำนวณหาค่าความเข้มข้นเฉลี่ย ( $\bar{x}$ ) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของแต่ละระดับความเข้มข้น

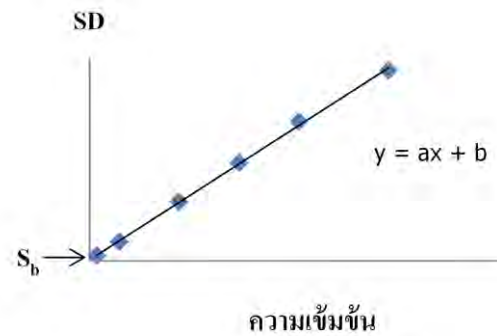
- Plot กราฟระหว่างความเข้มข้นเฉลี่ย ( $\bar{x}$ ) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) โดยให้  $\bar{x}$  อยู่บนแกน x และ SD อยู่บนแกน y

- หาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ระหว่าง  $\bar{x}$  และ SD
- ลากเส้นกราฟตัดแกน y จุดตัดแกน y คือค่า  $s_b$  (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นศูนย์)
- คำนวณค่า LOD จากสูตร

$$LOD = 3S_b \quad \dots\dots\dots(\text{สูตรที่ 20})$$



ภาพที่ 3.2 การหา LOD โดยหาค่า  $s_b$  (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นศูนย์)



### 3.6.5 ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

การหาค่า LOQ มีอยู่ 2 ขั้นตอนคือ การหาค่า LOQ โดยประมาณ และการยืนยันค่า LOQ ที่มีความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ สามารถทำได้ดังนี้

#### 3.6.5.1 หาค่า LOQ โดยประมาณ จากการหาค่า LOD ดังนี้

- การหาค่า LOD ตามข้อ 3.6.4.1 LOQ โดยประมาณ

$$LOQ = \bar{x} + 10SD \quad \dots\dots\dots(\text{สูตรที่ } 21)$$

- การหาค่า LOD ตามข้อ 3.6.4.2 LOQ โดยประมาณ

$$LOQ = 10SD \quad \dots\dots\dots(\text{สูตรที่ } 22)$$

- การหาค่า LOD ตามข้อ 3.6.4.3 LOQ โดยประมาณ

$$LOQ = 10S_b \quad \dots\dots\dots(\text{สูตรที่ } 23)$$

#### 3.6.5.2 การยืนยันค่า LOQ ที่มีความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ทำได้โดย

- เตรียม Spiked sample blank ให้มีความเข้มข้นเท่ากับค่า LOQ ที่ประมาณได้ หรือค่าที่ใกล้เคียง

- ทำการวิเคราะห์ 7-10 ซ้ำ
- คำนวณหาค่าความเข้มข้นเฉลี่ย ( $\bar{x}$ ) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)
- ประเมินการยอมรับความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision)

การกำหนดเกณฑ์ยอมรับ LOD และ LOQ ความเหมาะสมของค่า LOD และ/หรือ LOQ จะขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการใช้งาน ตาม Codex committee on methods and sampling ได้เสนอเกณฑ์ LOD และ LOQ สำหรับการวิเคราะห์ Trace element ในอาหาร เพื่อให้ห้องปฏิบัติการใช้เป็นแนวทางในการพิจารณาความเหมาะสมของ LOD และ LOQ ดังนี้

ตารางที่ 3.4 เกณฑ์การยอมรับ LOD, LOQ

| LOD หรือ LOQ | เกณฑ์การยอมรับ          |
|--------------|-------------------------|
| LOD          | < 1/20 ของ Target value |
| LOQ          | < 1/10 ของ Target value |

Target value อาจหมายถึง ค่ามาตรฐาน หรือสเปคของผลิตภัณฑ์ เป็นต้น

### 3.6.6 ความแม่นยำ (Accuracy) สามารถทำได้ 3 วิธี ดังนี้

#### 3.6.6.1 กรณีที่มี CRM / RM ทำได้ดังนี้

- วิเคราะห์ Reagent blank และ CRM / RM อย่างละ 7-10 ซ้ำ
- คำนวณค่าเฉลี่ยของ Blank และลบออกจากค่าของ CRM / RM ที่ได้จากการวิเคราะห์แต่ละค่า

- เกณฑ์การยอมรับ ให้เลือกวิธีใดวิธีหนึ่ง ดังนี้

วิธีที่ 1 พิจารณาค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวิเคราะห์ ว่ามีค่าอยู่ในช่วงของค่ารับรอง เช่น ค่ารับรองมีค่า  $55.00 \pm 0.20$  g/100g ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวิเคราะห์ต้องมีค่าอยู่ในช่วง 54.80 – 55.20 g/100g

วิธีที่ 2 เปรียบเทียบค่าจริงของ CRM / RM โดยใช้สถิติ t-test (สูตรที่ 8) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

$$t = \frac{(\bar{x} - \mu)}{(s / \sqrt{n})}$$

t คือ ค่าที่ได้จากการคำนวณ ซึ่งเป็นอัตราส่วนระหว่าง Bias  $(\bar{x} - \mu)$  แสดงถึงความคลาดเคลื่อนแบบ Systematic error กับ Standard error  $(s / \sqrt{n})$

$\bar{x}$  คือ ค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์

$\mu$  คือ ค่าจริง หรือค่าอ้างอิง

s คือ Standard deviation

n คือ จำนวนครั้งที่วิเคราะห์

เปรียบเทียบค่า t ที่ได้จากการคำนวณ กับค่า Critical  $t_c$  จากตาราง ซึ่งค่านี้ขึ้นอยู่กับระดับความเชื่อมั่น และค่า Degree of freedom (df) ถ้าค่า t น้อยกว่าค่า  $t_c$  แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่าง ค่าจากการวิเคราะห์กับค่าจริงหรือค่าอ้างอิง

วิธีที่ 3 คำนวณ %Recovery (สูตรที่ 14) ค่าที่คำนวณได้ต้องอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

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

เมื่อ  $C_1$  คือ ความเข้มข้นของสารใน CRM / RM ที่วิเคราะห์ได้  
 $C_2$  คือ ความเข้มข้นของ Blank  
 $C_3$  คือ Certified value ของ CRM / RM

### 3.6.6.2 กรณีที่ไม่มี CRM / RM ทำได้ดังนี้

- เตรียม Sample blank ให้มีปริมาณมากพอสำหรับการวิเคราะห์
- เตรียม Spiked sample blank โดยการเติมสารมาตรฐานให้มีความเข้มข้นระดับต่างๆ ให้อยู่ในช่วงการใช้งาน (Working range) อย่างน้อย 3 ระดับ และเตรียมให้มีปริมาณมากพอสำหรับการวิเคราะห์
- วิเคราะห์ Sample blank 7-10 ซ้ำ
- วิเคราะห์ Spiked sample blank ระดับละ 7-10 ซ้ำ
- คำนวณ %Recovery (สูตรที่ 14)

$$\% \text{Recovery} = \left( \frac{C_{sp} - C_s}{C_A} \right) \times 100$$

เมื่อ  $C_{sp}$  คือ ความเข้มข้นของสารใน Spiked sample blank  
 $C_s$  คือ ความเข้มข้นของสารใน Sample blank  
 $C_A$  คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไป

- พิจารณาเกณฑ์การยอมรับ %Recovery มีดังนี้

1. ตาม AOAC Peer-Verified methods Program, Manual on Policies and Procedures (1998) AOAC INTERNATIONAL ได้กำหนดแนวทางการพิจารณาเกณฑ์การยอมรับ %Recovery โดยทั่วไป ตามตารางที่ 3.5
2. ตาม Codex ได้กำหนดแนวทางการพิจารณาเกณฑ์การยอมรับ %Recovery สำหรับงานด้านสารพิษตกค้าง ยาฆ่าแมลง และยาสัตว์ตกค้างในอาหาร ตามตารางที่ 3.6

ตารางที่ 3.5 Recovery ที่ความเข้มข้นต่างๆ (ตาม AOAC)

| ความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง         | %Recovery |
|-------------------------------------|-----------|
| 100%                                | 98 - 102  |
| 10%                                 | 98 - 102  |
| 1%                                  | 97 - 103  |
| 0.1%                                | 95 - 105  |
| 100 ppm (mg/kg)                     | 90 - 107  |
| 10 ppm (mg/kg)                      | 80 - 110  |
| 1 ppm (mg/kg)                       | 80 - 110  |
| 100 ppb ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) | 80 - 110  |
| 10 ppb ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )  | 60 - 115  |
| 1 ppb ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )   | 40 - 120  |

ตารางที่ 3.6 Recovery ของสารพิษตกค้าง ยาฆ่าแมลง และยาสัตว์ตกค้างในอาหาร (ตาม Codex)

| ความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง                                 | Range of mean Recovery |
|-------------------------------------------------------------|------------------------|
| $< 1 \mu\text{g}/\text{kg}$                                 | 50 - 120               |
| $> 1 \mu\text{g}/\text{kg} \leq 0.01 \text{ mg}/\text{kg}$  | 60 - 120               |
| $> 0.01 \text{ mg}/\text{kg} \leq 0.1 \text{ mg}/\text{kg}$ | 70 - 120               |
| $> 0.1 \text{ mg}/\text{kg} \leq 1 \text{ mg}/\text{kg}$    | 70 - 110               |
| $> 1 \text{ mg}/\text{kg}$                                  | 70 - 110               |

เกณฑ์การยอมรับข้างต้น เป็นเพียงแนวทาง ห้องปฏิบัติการอาจปรับให้เหมาะสมกับการวิเคราะห์แต่ละด้าน เกณฑ์ค่ากลางๆ ทั่วไปแนะนำให้อยู่ที่ 80 - 120% ถ้าได้ต่ำกว่า 60 - 70% หรือสูงกว่า 120% ควรปรับปรุงวิธีใหม่

### 3.6.7 ความเที่ยง (Precision)

ความเที่ยง (Precision) จะแสดงในรูป Repeatability ได้แก่ Repeatability standard deviation (SD) หรือ Relative standard deviation (RSD) หรือ Repeatability limit (2.8s) สามารถทำได้ ดังนี้

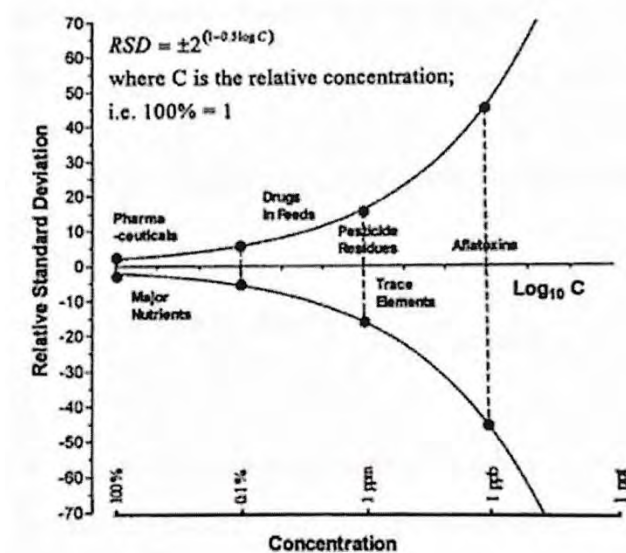
- วิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำ ในช่วงความเข้มข้นที่ครอบคลุมช่วงการใช้งาน (Working range) วิเคราะห์ความเข้มข้นละ 7-10 ซ้ำ สามารถใช้ข้อมูลชุดเดียวกับการหาความแม่นยำได้ โดยใช้ผลการทดสอบ CRM / RM หรือ Spiked sample blank
- วิเคราะห์ห้อย่างน้อย 3 ความเข้มข้น คือ ความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง
- คำนวณค่า Standard deviation (SD) ของแต่ละความเข้มข้น
- คำนวณค่า %Relative standard deviation (%RSD)
- นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับเกณฑ์ที่กำหนด โดยให้เลือกวิธีใดวิธีหนึ่ง ดังนี้

วิธีที่ 1 เปรียบเทียบกับเกณฑ์ยอมรับที่กำหนดไว้แล้ว เช่น ข้อกำหนดตามกฎหมาย ข้อกำหนดของลูกค้า ตามวิธีมาตรฐานกำหนด เช่น ค่า Repeatability ของห้องปฏิบัติการในแต่ละความเข้มข้น ควรมีค่าน้อยกว่าหรือใกล้เคียงกับค่า Reproducibility ที่วิธีมาตรฐานกำหนด

วิธีที่ 2 ประเมินผลด้วย Horwitz equation

Horwitz equation เป็นสมการที่พัฒนาขึ้นโดย Dr. William Horwitz แห่งสถาบัน AOAC ได้ทำการศึกษาข้อมูลการทำ Collaborative study โดยสร้างจากความสัมพันธ์ระหว่าง %RSD กับ log ความเข้มข้น โดยไม่คำนึงถึงวิธีวิเคราะห์ที่ใช้และตัวอย่างที่วิเคราะห์ เนื่องจากพบว่าวิธีวิเคราะห์และลักษณะตัวอย่างไม่มีอิทธิพลต่อ %RSD (ความสัมพันธ์แสดงได้ดังภาพที่ 3.3)

ภาพที่ 3.3 ความสัมพันธ์ของ Horwitz's curve



Horwitz equation ใช้ในการคาดคะเน %RSD ที่ควรจะเป็นที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ได้ จากความสัมพันธ์ดังกล่าว พบว่า

การทดสอบซ้ำจากหลายห้องปฏิบัติการ  $RSD = \pm 2^{(1-0.5 \log C)}$

การทดสอบซ้ำภายในห้องปฏิบัติการเดียวกันจะมีค่า RSD อยู่ที่ 2 ใน 3 (~0.66) ของการทดสอบจากหลายห้องปฏิบัติการ สรุปเป็นสมการ Horwitz equation ได้ดังนี้

$$RSD_R = 2^{(1-0.5 \log C)} \dots\dots\dots(\text{สูตรที่ } 24)$$

$$RSD_r = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \dots\dots\dots(\text{สูตรที่ } 25)$$

เมื่อ C = Concentration ratio

จากสมการ Horwitz equation ข้างต้น เมื่อคำนวณ RSD ที่ความเข้มข้นต่างๆ จะได้ Predicted Horwitz (PRSD) ดังตารางที่ 3.7

ตารางที่ 3.7 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับ Predicted Horwitz

( $RSD_R$  = ทดสอบซ้ำจากหลายห้องปฏิบัติการ และ  $RSD_r$  = ทดสอบซ้ำภายในห้องปฏิบัติการเดียวกัน)

| ความเข้มข้นของสาร                   | Conc. Ratio : C         | Predicted Horwitz |           |
|-------------------------------------|-------------------------|-------------------|-----------|
|                                     |                         | % $RSD_R$         | % $RSD_r$ |
| 100%                                | 1                       | 2                 | 1.3       |
| 10%                                 | $10^{-1} = 0.1$         | 3                 | 1.9       |
| 1%                                  | $10^{-2} = 0.01$        | 4                 | 2.7       |
| 0.1%                                | $10^{-3} = 0.001$       | 6                 | 3.7       |
| 100 ppm (mg/kg)                     | $10^{-4} = 0.0001$      | 8                 | 5.3       |
| 10 ppm (mg/kg)                      | $10^{-5} = 0.00001$     | 11                | 7.3       |
| 1 ppm (mg/kg)                       | $10^{-6} = 0.000001$    | 16                | 11        |
| 100 ppb ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) | $10^{-7} = 0.0000001$   | 22                | 15        |
| 10 ppb ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )  | $10^{-8} = 0.00000001$  | 32                | 21        |
| 1 ppb ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )   | $10^{-9} = 0.000000001$ | 45                | 30        |

เกณฑ์การยอมรับการประเมินตาม Horwitz equation มีดังนี้

- ค่า %RSD จากการวิเคราะห์ < %RSD จากสูตรคำนวณตามสมการ Horwitz equation

- ถ้าค่า %RSD จากการวิเคราะห์ > %RSD จากสูตรคำนวณตามสมการ Horwitz equation ให้คำนวณหาค่า HORRAT

$$HORRAT = \frac{\%RSD}{\%PRSD} \dots\dots\dots(\text{สูตรที่ 26})$$

โดยค่ายอมรับ HORRAT ต้องอยู่ระหว่าง 0.5 – 1.5

อาจใช้เกณฑ์การยอมรับ HORRAT ที่ AOAC และ CODEX กับ EU กำหนดไว้ทุกๆ ไป ดังนี้

ตารางที่ 3.8 เกณฑ์การยอมรับ HORRAT

| แหล่งอ้างอิง | ค่า HORRAT ที่ยอมรับ |
|--------------|----------------------|
| AOAC         | < 2                  |
| CODEX, EU    | $\leq 2$             |

### 3.6.8 ความทนของวิธี (Ruggedness/Robustness)

สามารถทำได้ 2 แบบ ดังนี้

- 3.6.8.1 วิเคราะห์ CRM หรือ RM ที่ทราบความเข้มข้น เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ CRM หรือ RM ที่ปรับปัจจัยที่ต้องการศึกษา ครั้งละ 1 ตัวแปร ประเมินผลโดยใช้สถิติ F-test และ t-test หรือใช้ ANOVA
- 3.6.8.2 ตรวจสอบตามแนวทางที่ AOAC แนะนำ โดยใช้วิธีของ Youden Ruggedness Trial ที่ศึกษาโดย Youden, W.J. & Steiner, E.H. ในปี 1975 ซึ่งเหมาะสำหรับพัฒนาวิธีวิเคราะห์ใหม่ๆ (ไม่กล่าวถึงรายละเอียดในคู่มือนี้)

### 3.6.9 Matrix effect สามารถทำได้ดังนี้

- เตรียม Spiked sample blank ให้มีความเข้มข้นที่ระดับต่างๆ เหมือนกับสารละลายมาตรฐานที่ใช้สร้างกราฟมาตรฐาน
- วัดสัญญาณจากเครื่องมือวัด และคำนวณค่าความเข้มข้น
- ประเมิน Matrix effect ซึ่งอาจทำได้หลายวิธี ดังนี้
  1. โดยการ Plot ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน บนแกน x กับความเข้มข้นของ Spiked sample blank บนแกน y ทดสอบความเป็นเส้นตรงและทดสอบช่วงความเชื่อมั่น (Confidential interval : CI) ของ Slope กลุ่ม 1 หรือไม่ ถ้ากลุ่มแสดงว่าไม่มี Matrix effect

วิธีการทดสอบว่า Slope กลุ่ม 1 หรือไม่ ใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$Cl_{slope} = b \pm t_{(n-2)}s_b \quad \dots\dots\dots(\text{สูตรที่ } 27)$$

$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad \dots\dots\dots(\text{สูตรที่ } 28)$$

เมื่อ  $s_b$  คือ Standard deviation ของ Slope

ถ้า  $Cl_{slope}$  ผ่าน 1 แสดงว่าไม่มี Matrix effect

ในบางกรณีสำหรับวิธีที่มีความเป็นเส้นตรงสูง อาจทดสอบว่า Calibration curve ผ่าน origin ( $x=0, y=0$ ) หรือไม่ โดยหา Confidential interval (CI) ของ a (คือ y-intercept) จาก

$$Cl_a = a \pm t_{(n-2)}s_a \quad \dots\dots\dots(\text{สูตรที่ } 29)$$

โดย  $s_a = s_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2}}$  \dots\dots\dots(\text{สูตรที่ } 30)

และ  $s_{y/x} = \sqrt{\frac{[\sum (y_i - \bar{y}_{predicted})^2]}{(n-2)}}$  \dots\dots\dots(\text{สูตรที่ } 31)

เมื่อ  $s_a$  คือ Standard deviation ของ a  
 $s_{y/x}$  คือ Standard deviation ของ Regressionline  
 $y_i - y_{predicted}$  คือ y-residual

ค่า t อ่านได้จากตาราง t (two-tailed ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ Degree of freedom ที่ (n-2)

ถ้า CI ผ่านศูนย์ แสดงว่ากราฟมาตรฐานผ่าน origin

## 2. ทดสอบด้วย Paired t-test

### 3.6.10 ความไม่แน่นอนของการวัด (Measurement uncertainty)

เป็นค่าที่บอกช่วงของผลการวิเคราะห์ที่เป็นได้ ค่าความไม่แน่นอนของการวัดจะบอกถึงคุณสมบัติการสอบกลับได้ของผลการวิเคราะห์ ความไม่แน่นอนของการวัดเป็นค่ารวมของผลกระทบทั้งหมดที่มีต่อผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณ ความไม่แน่นอนของการวัด มีทั้งค่าบวกและลบ ( $\pm$ ) ในการทดสอบวิธีวิเคราะห์จึงควรมีการประมาณค่าความไม่แน่นอนด้วยเพื่อใช้ในการพิจารณาความเหมาะสมของวิธี (ไม่กล่าวถึงรายละเอียดในคู่มือนี้)

## 3.7 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี มีขั้นตอนดังนี้

### 3.7.1 กำหนดวัตถุประสงค์ (Objectives)

กำหนดวัตถุประสงค์ว่าต้องการทำไปเพื่ออะไร เช่น เพื่อหาคุณลักษณะของวิธี (เช่น Accuracy, Precision, LOD, LOQ เป็นต้น) เพื่อยืนยันความเหมาะสมต่อการใช้งานตามวัตถุประสงค์ หรือเพื่อใช้ในการศึกษาความสามารถของนักวิเคราะห์ เป็นต้น

### 3.7.2 เลือกวิธีวิเคราะห์

เลือกวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสมกับประเภทของตัวอย่าง และปริมาณสารที่ต้องการวิเคราะห์ โดยต้องทราบว่าวิธีที่เลือกใช้เป็นวิธีประเภทใด เช่น เป็น Empirical method หรือ Rational method เป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับเป็นมาตรฐานสากล หรือวิธีที่ผู้อื่นพัฒนาขึ้น หรือเป็นวิธีที่ทางห้องปฏิบัติการพัฒนาขึ้นเอง มีข้อมูลคุณลักษณะเฉพาะของวิธีแล้วหรือไม่ ผลการวิเคราะห์จะนำไปใช้งานประเภทใด เช่น ทางด้านกฎหมาย การสำรวจวิจัย การตรวจติดตาม การตรวจตามข้อกำหนด หรือการควบคุมคุณภาพ เป็นต้น

### 3.7.3 กำหนดขอบเขตคุณลักษณะวิธีที่ต้องการศึกษา

กำหนดขอบเขต เช่น ต้องการศึกษา Accuracy, Precision, Range & Linearity, LOD, LOQ เป็นต้น พร้อมทั้งกำหนดเกณฑ์การยอมรับและสถิติที่ใช้ในการตรวจสอบคุณลักษณะเฉพาะแต่ละตัว

### 3.7.4 กำหนดความต้องการทางด้านเทคนิค

จัดหา/เตรียมเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี ให้พร้อมสำหรับการวิเคราะห์ โดยเครื่องมือวัดต้องมีความสามารถในการวัดได้ตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

### 3.7.5 จัดทำเอกสารวิธีวิเคราะห์

จัดทำเอกสารวิธีวิเคราะห์เป็นคู่มือการปฏิบัติงาน ที่มีรายละเอียดการวิเคราะห์ครบถ้วน



### 3.7.6 เตรียมวัสดุอ้างอิง

จัดเตรียมวัสดุอ้างอิง เช่น CRM, RM, Spiked sample เป็นต้น ให้มีปริมาณมากพอสำหรับการวิเคราะห์ โดยพิจารณาจากคุณลักษณะที่ต้องการศึกษาว่า จะทำที่ระดับความเข้มข้นใดบ้าง ระดับละกี่ซ้ำ คุณลักษณะเฉพาะใดที่สามารถศึกษาไปพร้อมกันได้ ปริมาณที่เตรียมจะต้องมากกว่าที่ใช้จริงเพื่อไว้สำหรับกรณีที่ต้องมีการวิเคราะห์เพิ่มเติมด้วย

### 3.7.7 ดำเนินการตรวจสอบคุณลักษณะเฉพาะ

ตรวจสอบคุณลักษณะเฉพาะที่กำหนดไว้ โดยวิเคราะห์ตามขั้นตอนที่ระบุไว้ในวิธีวิเคราะห์

### 3.7.8 คำนวณผล และประเมินผล

เมื่อได้ผลการวิเคราะห์แล้ว ให้ดำเนินการคำนวณผล และประเมินผล โดยใช้สถิติที่เหมาะสม (พิจารณาค่าสุดต่างที่อาจมีด้วย)

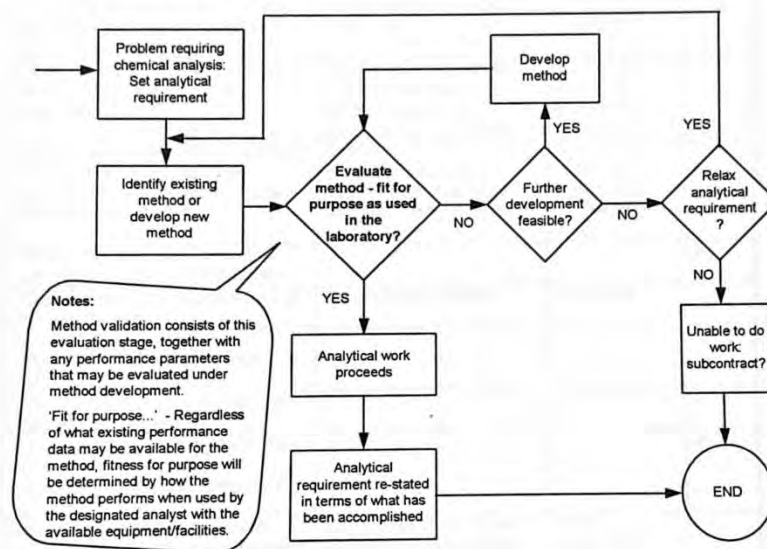
### 3.7.9 ตรวจสอบผลการประเมิน

ตรวจสอบผลการประเมินว่าผ่านเกณฑ์ที่กำหนดไว้หรือไม่ หากพบว่ามีคุณลักษณะอย่างใดอย่างหนึ่งไม่ผ่านเกณฑ์การยอมรับ ควรพิจารณาหาสาเหตุที่ทำให้เกิดความผิดพลาด และอาจจำเป็นต้องตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีใหม่ หรือปรับเปลี่ยนวิธีวิเคราะห์ หรือปรับเกณฑ์การยอมรับใหม่

### 3.7.10 สรุปผล และจัดทำรายงาน

สรุปผลการวิเคราะห์ โดยสรุปผลการวิเคราะห์ทั้งหมด วิธีที่ใช้ ค่าที่ได้ ผ่านหรือไม่ผ่านเกณฑ์ยอมรับ จัดทำเป็นรายงาน และมีข้อความที่สรุปว่าวิธีเหมาะสมต่อการนำไปใช้งานตามวัตถุประสงค์หรือไม่ รวมทั้งขีดจำกัดอื่นๆ ของวิธีที่อาจมี และควรระบุรายชื่อผู้วิเคราะห์ และผู้ทบทวน

ภาพที่ 3.4 การเลือก การพัฒนา และการประเมินวิธีทดสอบ (URACHEM Guide (1998))



## ข้อควรระวังในการปฏิบัติงาน

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทางเคมีก่อนนำมาใช้ปฏิบัติงาน เป็นกระบวนการยืนยันความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ตรงตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้หรือไม่ ทั้งในช่วงการใช้งาน ประเภทตัวอย่างที่ทดสอบ ห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่มักปฏิบัติตามแนวทางของ URACHEM Guide (1998) ซึ่งมีรายละเอียดดังกล่าวข้างต้น นอกจากหลักการและวิธีการดังกล่าวแล้ว ยังมีข้อควรระวังในการปฏิบัติงาน ดังตารางที่ 3.9

ตารางที่ 3.9 ข้อควรระวังในการปฏิบัติงาน

| เรื่อง           | รายละเอียด                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. วิธีวิเคราะห์ | 1.1 การเลือกวิธีวิเคราะห์ ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ควรเลือกใช้วิธีวิเคราะห์ที่ได้รับการยอมรับในระดับนานาชาติ ก่อน ถ้าไม่มีจึงเลือกใช้วิธีวิเคราะห์ที่ได้รับการยอมรับในระดับชาติ ถ้าไม่มีวิธีวิเคราะห์ในระดับชาติจึงเลือกวิธีวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการพัฒนาขึ้นเอง ตามลำดับ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 2. วัสดุ         | <p>2.1 Blank</p> <p>2.1.1 Reagent blank ในการวิเคราะห์ ค่า Reagent blank จะเป็นค่าที่แสดงถึงการปนเปื้อนของสารหรือการรบกวนของสารในระบบ ดังนั้นในการวิเคราะห์จึงต้องมีการระมัดระวังการปนเปื้อนใน Reagent blank โดยทั่วไปมักกำหนดเกณฑ์ยอมรับของ Reagent blank ให้น้อยกว่าค่า LOD</p> <p>2.1.2 Sample blank ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการจะหาตัวอย่างที่ไม่มีสารที่สนใจศึกษาหรือมีอยู่ในปริมาณต่ำๆ จะหาได้ค่อนข้างยาก แต่ยังคงจำเป็นต้องใช้ Sample blank ในการศึกษา Matrix effect ในกรณีที่ไม่สามารถหา Sample Blank ได้ และจำเป็นต้องหาค่า LOD, LOQ อาจใช้วิธีอื่นในการหาค่า LOD, LOQ เช่น การคำนวณจากจุดตัดกราฟเส้นตรงที่ Plot ระหว่างค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของ Spiked sample blank กับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) แล้วคำนวณหาค่า <math>s_b</math> เป็นต้น</p> <p>2.2 Sample ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีควรจะทำการศึกษาตัวอย่างให้หลากหลาย เพื่อให้ครอบคลุมประเภทตัวอย่างที่ต้องการ</p> <p>2.3 Incurred materials ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนตามธรรมชาติหรือทำให้เกิดขึ้นเหมือนธรรมชาติจะหาได้ค่อนข้างยาก ในการวิเคราะห์จะนิยมใช้ Fortified หรือ Spiked sample แทน</p> <p>2.4 Certified reference materials (CRM) การหา CRM ที่มีเนื้อสาร (Matrix) และความเข้มข้นที่เหมาะสมกับสารที่สนใจศึกษาจะหาได้ยาก และมีราคาแพง ควรเลือกใช้ CRM จากแหล่งผู้ผลิตที่น่าเชื่อถือ เป็นที่ยอมรับ และสามารถสอบกลับค่าไปที่ SI unit ได้ เช่น LGC, Fapas เป็นต้น ถ้าไม่สามารถหา CRM ได้ อาจใช้ RM แทนได้</p> |

| เรื่อง                                           | รายละเอียด                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|--------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3. เครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมี                    | <p>3.1 เครื่องมือที่มีผลต่อการวัดต้องได้รับการสอบเทียบก่อนนำมาใช้ เช่น ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีรายการความชื้นในแป้ง เครื่องชั่งที่ใช้ชั่งน้ำหนักตัวอย่างจะต้องผ่านการสอบเทียบ หรือ Thermocouple ที่ใช้วัดอุณหภูมิภายในตู้อบ ต้องได้รับการสอบเทียบก่อนนำมาใช้ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี เป็นต้น</p> <p>3.2 สารเคมี ต้องใช้สารเคมีที่ยังไม่หมดอายุ ซึ่งสามารถดูได้จากใบ Certificate ของสารเคมี หรือข้างขวดสารเคมี เกรดของสารเคมีต้องใช้เกรดสำหรับการวิเคราะห์ (Analytical reagent grade, AR) สารมาตรฐานบางตัวต้องใช้ CRM / RM ที่สามารถสอบกลับไป SI unit ได้ เช่น การวิเคราะห์อาร์เซนิก (As) ในอาหารโดยใช้เครื่อง ICP ในการสร้างกราฟมาตรฐาน สารมาตรฐานอาร์เซนิก (As) ต้องใช้เกรด CRM / RM ที่สามารถสอบกลับไป SI unit ได้ เป็นต้น</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 4. ขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) | <p>4.1 การหาค่า LOD ผู้ปฏิบัติงานมักสับสนกับการเลือกสูตรที่ใช้ในการคำนวณระหว่าง <math>LOD = \bar{x} + 3SD</math> กับ <math>LOD = 3SD</math> ผู้ปฏิบัติงานต้องรู้ว่าเลือกใช้ Sample blank หรือ Spiked sample blank ถ้าเลือกใช้ Sample blank ให้ใช้สูตร <math>LOD = \bar{x} + 3SD</math> ซึ่งหมายถึง Sample blank มีค่า ต้องนำค่าเฉลี่ยของ Sample blank มารวมกับค่า 3SD แต่ถ้าเลือกใช้ Spiked sample blank ให้ใช้สูตร <math>LOD = 3SD</math> ซึ่งหมายถึง Sample blank ไม่มีค่า ให้คิดเฉพาะค่า 3SD</p> <p>4.2 การหาค่า LOD ในกรณีเลือกใช้วิธี Spiked sample blank อาจทำการวิเคราะห์โดยเติมสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของกราฟมาตรฐาน เพื่อให้ตรวจพบสัญญาณที่ชัดเจนขึ้น</p> <p>4.3 การหาค่า LOD ในกรณีเลือกใช้วิธีคำนวณจากจุดตัดกราฟเส้นตรง <math>s_0</math> ที่ Plot ระหว่างค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของ Spiked sample blank กับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ผู้ปฏิบัติงานมักสับสนกับการเลือกใช้ค่าในการ Plot กราฟเพื่อหาค่า <math>s_0</math> ซึ่งในการ Plot ให้ Plot ระหว่างค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของ Spiked sample blank แต่ละระดับคู่กับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ที่ระดับนั้น เช่น Plot ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเข้มข้น 1 mg/kg บนแกน x คู่กับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของระดับความเข้มข้น 1 mg/kg บนแกน y เป็นต้น ทำเช่นนี้ที่ระดับความเข้มข้นถัดไป แล้วลากกราฟเส้นตรงเพื่อหาจุดตัดแกน y จะได้ค่า <math>s_0</math></p> |

| เรื่อง                                                     | รายละเอียด                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5. ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ) | 5.1 การประมาณค่า LOQ ผู้ปฏิบัติงานมักสับสนกับการเลือกสูตรที่ใช้ในการคำนวณระหว่าง $LOQ = \bar{x} + 10SD$ กับ $LOQ = 10SD$ และการ Plot กราฟเพื่อหาค่า $s_b$ , เช่นเดียวกับการหาค่า LOD                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|                                                            | 5.2 การประมาณค่า LOQ ในกรณีเลือกใช้วิธี Spiked sample blank อาจทำการวิเคราะห์โดยเติมสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของกราฟมาตรฐาน เพื่อให้ตรวจพบสัญญาณที่ชัดเจนขึ้น                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|                                                            | 5.3 การยืนยัน LOQ ถ้าค่าที่ได้ไม่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ให้เตรียม Spiked sample blank ใหม่ให้มีความเข้มข้นสูงขึ้น หรือถ้าค่า LOQ มีค่าสูงไป ก็อาจเตรียม Spiked sample blank ใหม่ให้มีความเข้มข้นน้อยลง                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                                                            | 5.4 ถ้ายืนยัน LOQ ที่จุดต่ำสุดของช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) สามารถใช้ข้อมูลนี้เป็นข้อมูลในการตรวจสอบความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ที่ความเข้มข้นระดับต่ำได้                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 6. ความแม่นยำ (Accuracy)                                   | 6.1 ในการเลือกใช้ CRM / RM มักจะหาประเภทตัวอย่างชนิดเดียวกันที่มีความเข้มข้นหลายระดับได้ยาก จึงใช้วิธีการเติมสารมาตรฐานลงใน Sample blank แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ค่ากลับคืน (%Recovery) ซึ่งสามารถทำได้ตลอดช่วงของความเป็นเส้นตรง                                                                                                                                                                                                                                                   |
|                                                            | 6.2 ในการเติมสารมาตรฐานลงใน Sample blank แล้วคำนวณ %Recovery มักพบปัญหาคือสารที่เติมลงไปอาจไม่จับกับเนื้อตัวอย่าง แม้จะเป็นสารเดียวกันแต่การจับตัวกับเนื้อตัวอย่าง อาจจะไม่เหมือนกัน หรือสถานะที่เติมอาจแตกต่างจากสถานะที่มีในอยู่ในตัวอย่าง เมื่อคำนวณ %Recovery อาจจะได้ค่าที่สูงกว่าความเป็นจริง %Recovery จะเป็นการบอกประสิทธิภาพของวิธีที่มีต่อสารที่สนใจ ดังนั้นถ้า %Recovery ดี ไม่ได้ประกันว่า Trueness ของวิธีดี แต่ถ้า %Recovery ต่ำ แสดงว่า Trueness ของวิธีไม่เหมาะสม |
|                                                            | 6.3 การตรวจสอบความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) สามารถทำไปพร้อมกันและใช้ข้อมูลร่วมกันได้ โดยความแม่นยำ (Accuracy) จะใช้ค่า %Recovery ในขณะที่ความเที่ยง (Precision) จะใช้ค่า %RSD, HORRAT                                                                                                                                                                                                                                                                           |

| เรื่อง                    | รายละเอียด                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 7. ความเที่ยง (Precision) | 7.1 ความเที่ยง (Precision) จะเป็นการบอกถึงค่าความคลาดเคลื่อนแบบสุ่ม (Random error) ที่เกิดขึ้น จะแสดงในรูปของ %RSD ความเที่ยง (Precision) จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร ดังนั้นจึงควรหาค่า %RSD ที่ความเข้มข้นหลายระดับ โดยระบุความเข้มข้นด้วย ถ้าค่า %RSD ที่ระดับความเข้มข้นต่ำๆ ไม่แตกต่างจากที่ระดับความเข้มข้นสูงๆ อาจใช้ค่า %RSD ที่ใหญ่ที่สุดเพียงค่าเดียวได้ |
|                           | 7.2 สามารถใช้ข้อมูลในการตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ร่วมกับความแม่นยำ (Accuracy) ได้                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|                           | 7.3 การใช้สมการ Horwitz's equation ที่ระดับความเข้มข้นสูงมากๆ หรือต่ำมากๆ ค่าที่ได้จาก Horwitz's equation อาจไม่เหมาะสมเนื่องจากค่าที่ได้ต่ำหรือสูงเกินไป                                                                                                                                                                                                             |
| 8. Matrix effect          | 8.1 ในการศึกษา Matrix effect สามารถใช้ข้อมูลร่วมกับการตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) ได้                                                                                                                                                                                                                                                                      |

### แนวทางการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่เกี่ยวข้อง

URACHEM Guide (1998, p. 3) การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ คือ กระบวนการที่พิสูจน์ว่าวิธีทดสอบมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ทดสอบตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการใช้ โดยมีหลักฐานยืนยันหลักฐานที่ต้องทำการตรวจสอบยืนยันนั้นขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการทดสอบ วัตถุประสงค์ที่แตกต่างกัน การตรวจสอบยืนยันจะแตกต่างกัน ด้วย เช่น การทดสอบเชิงคุณภาพกับการทดสอบเชิงปริมาณ จะมีปัจจัยที่ต้องตรวจสอบต่างกัน ดังนั้นการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบจึงต้องคำนึงถึงปัจจัยหลายประการ เช่น ประเภทของการทดสอบ

ทิพวรรณ นิงน้อย (2549, น. 9) การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นภายหลังการพัฒนาวิธี ปรับปรุง หรือดัดแปลงวิธีให้เหมาะสมแล้ว และมีจุดมุ่งหมายหลักเพื่อแสดงให้เห็นว่าวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้น หรือเลือกมานั้นเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในงานวิเคราะห์เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ เช่น เพื่อหาปริมาณส่วนประกอบอย่างใดอย่างหนึ่งในผลิตภัณฑ์ เพื่อตรวจสอบว่าผลิตภัณฑ์มีคุณภาพตามที่กำหนดหรือไม่ เพื่อตรวจสอบว่าผลิตภัณฑ์มีคุณภาพเข้ามาตรฐานหรือไม่ เพื่อหาสารในสิ่งแวดล้อม เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ผลิตภัณฑ์หรือส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์

คณะกรรมการด้านวิชาการของกรมวิทยาศาสตร์บริการ (2554, น. 10) การตรวจสอบความสมเหตุสมผล (Validation) หมายถึง การพิสูจน์ว่าสิ่งที่กำหนดนั้นเป็นไปตามข้อกำหนดที่ระบุ และเพียงพอกับการนำไปใช้งานตามที่ตั้งใจไว้ การตรวจสอบความสมเหตุสมผลของวิธี (Method Validation) เป็นการจัดหาหลักฐานโดยการทดสอบทางห้องปฏิบัติการเพื่อแสดงว่าระเบียบวิธีการวัด (Method of measurement) มีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้งานตามที่ตั้งใจไว้ โดยพิจารณาจากค่าปริมาณที่แสดงคุณลักษณะเฉพาะของวิธี (Performance characteristics) อาทิ ค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Measurement uncertainty) ค่าความลำเอียง (Bias) ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation) วิธีที่ผ่านการตรวจสอบความสมเหตุสมผลแล้วจะให้ผลการวัดที่น่าเชื่อถือ มีการสอบกลับได้ทางมาตรวิทยา และมีค่าความไม่แน่นอนของการวัด

จากแนวทางการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตามเอกสารทางวิชาการต่างๆ จะเห็นได้ว่ามีหลักการ คือ เป็นกระบวนการพิสูจน์ว่าวิธีวิเคราะห์นั้นมีเหมาะสม โดยมีหลักฐานยืนยัน สามารถสอบกลับทางมาตรวิทยาได้ ถูกต้องตามวัตถุประสงค์ที่จะนำไปใช้งาน นอกจากนี้การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีเป็นข้อกำหนดด้าน วิชาการของระบบคุณภาพตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ซึ่งเป็นกระบวนการหนึ่งในการประกันคุณภาพของ ห้องปฏิบัติการ ดังนั้นการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีจึงมีความสำคัญ การวิเคราะห์ทางเคมีจึงมีความจำเป็น จะต้องทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ก่อนนำมาใช้ปฏิบัติงาน เพื่อให้แน่ใจว่าวิธีวิเคราะห์นั้น มี ความเหมาะสม ซึ่งจะช่วยให้ผลการวิเคราะห์มีความน่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับในระดับสากล ผู้ปฏิบัติงานจึง ต้องมีความรู้ความเข้าใจในขั้นตอนการการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี เพื่อให้ปฏิบัติงานได้อย่างถูกต้อง บรรลุ ตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

บทที่ 4

กระบวนการและขั้นตอนการปฏิบัติงานการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

ตารางที่ 4.1 แผนผังการปฏิบัติงาน (Work Flow)

| ที่ | ผังกระบวนการ | รายละเอียดงาน                                                                                                                                                                                                                                               | ผู้รับผิดชอบ/ผู้ปฏิบัติงาน                        | เอกสารที่เกี่ยวข้อง               | ระยะเวลา  | หมายเหตุ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-----|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |              | -                                                                                                                                                                                                                                                           | -                                                 | -                                 | -         | -                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 1   |              | <p>ขั้นตอนที่ 1 กำหนดวัตถุประสงค์</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. เพื่อหาคุณลักษณะของวิธี (LOD, LOQ เป็นต้น)</li> <li>2. เพื่อยืนยันความเหมาะสมต่อการใช้งานตามวัตถุประสงค์</li> <li>3. เพื่อใช้ในการศึกษาความสามารถของนักวิเคราะห์</li> </ol> | หัวหน้าห้องปฏิบัติการเคมี                         | เอกสารการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี | 1 สัปดาห์ | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. ถ้าสารที่เราสนใจมีปริมาณน้อย จำเป็นต้องตรวจสอบ LOD, LOQ เพื่อยืนยันความสามารถของวิธีในห้องปฏิบัติการทดสอบได้</li> <li>2. ถ้ายืนยันตามวัตถุประสงค์ จำเป็นต้องทราบว่าวิธีวิเคราะห์รายการอะไรในตัวอย่างประเภทไหน</li> <li>3. ถ้าต้องการพิสูจน์ความสามารถของนักวิเคราะห์ จำเป็นต้องตรวจสอบ Accuracy และ Precision</li> </ol> |
| 2   |              | <p>ขั้นตอนที่ 2 เลือกวิธีวิเคราะห์</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. เลือกวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสมกับประเภทของตัวอย่าง และปริมาณสารที่ต้องการวิเคราะห์</li> </ol>                                                                                | หัวหน้าห้องปฏิบัติการเคมี หรือผู้ที่ได้รับมอบหมาย | เอกสารอ้างอิงวิธีวิเคราะห์        | 2 สัปดาห์ | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. เลือกวิธีวิเคราะห์ที่ได้รับการยอมรับในระดับสากลก่อนเสมอ</li> <li>2. เลือกวิธีวิเคราะห์ที่ได้รับการยอมรับในระดับชาติเป็นลำดับรองลงมา</li> <li>3. เลือกวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาเองเป็นอันดับสุดท้าย</li> <li>4. ต้องทราบว่าวิธีวิเคราะห์ที่เลือกเป็น Empirical method หรือ Rational method</li> </ol>                   |

| ที่ | ผังกระบวนการ | รายละเอียดงาน                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | ผู้รับผิดชอบ/ผู้ปฏิบัติงาน                                                                                                                                                                                                    | เอกสารที่เกี่ยวข้อง                                                                                                                                                                                                                          | ระยะเวลา    | หมายเหตุ                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-----|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3   |              | <p>ขั้นตอนที่ 3 กำหนดขอบเขตคุณลักษณะวิธี</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. กำหนดขอบเขตคุณลักษณะวิธีที่ต้องการศึกษา</li> <li>2. กำหนดเกณฑ์การยอมรับและสถิติที่ใช้ในการตรวจสอบคุณลักษณะเฉพาะแต่ละตัว</li> </ol>                                                                                                | หัวหน้าห้องปฏิบัติการเคมี                                                                                                                                                                                                     | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. เอกสารการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี</li> <li>2. เอกสารอ้างอิงวิธีวิเคราะห์</li> </ol>                                                                                                                | 1 สัปดาห์   | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. กำหนดขอบเขต เช่น ต้องการศึกษา Accuracy, Precision, Range &amp; Linearity, LOD, LOQ เป็นต้น</li> <li>2. ต้องกำหนดเกณฑ์การยอมรับให้เหมาะสมกับคุณลักษณะเฉพาะที่กำลังจะศึกษา และต้องเลือกใช้สถิติในการประเมินให้เหมาะสม</li> </ol> |
| 4   |              | <p>ขั้นตอนที่ 4 กำหนดความต้องการทางด้านเทคนิค</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. จัดหารายละเอียดข้อมูลเฉพาะของเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี</li> <li>2. ดำเนินการสั่งซื้อ</li> <li>3. ตรวจสอบเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ได้รับตรงตามที่ต้องการ</li> <li>4. สอบเทียบเครื่องมือที่มีผลต่อการวัด</li> </ol> | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. ผู้ที่ได้รับมอบหมาย</li> <li>2. หัวหน้าห้องปฏิบัติการเคมี / ผู้จัดการด้านวิชาการ</li> <li>3. ผู้จัดการด้านคุณภาพ / ผู้จัดการทั่วไป</li> <li>4. ผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการ</li> </ol> | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. รายละเอียดของเครื่องมือวัดและคู่มือการใช้งานเครื่อง</li> <li>2. ใบรับรองสารเคมี</li> <li>3. ใบเสนอราคา</li> <li>4. แบบบันทึกการขออนุมัติซื้อวัสดุวิทยาศาสตร์ / วัสดุสำนักงาน (F-QM-007)</li> </ol> | 2 - 4 เดือน | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. เครื่องมือวัดต้องมีความสามารถในการวัดได้ตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้</li> <li>2. เกณฑ์ของสารเคมีต้องเหมาะสมกับการวิเคราะห์</li> </ol>                                                                                             |
| 5   |              | <p>ขั้นตอนที่ 5 จัดทำเอกสารวิธีวิเคราะห์</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. จัดทำเอกสารวิธีวิเคราะห์เป็นคู่มือการปฏิบัติงาน</li> </ol>                                                                                                                                                                        | หัวหน้าห้องปฏิบัติการเคมี หรือผู้ที่ได้รับมอบหมาย                                                                                                                                                                             | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. เอกสารวิธีการวิเคราะห์</li> <li>2. เอกสารอ้างอิงวิธีวิเคราะห์</li> </ol>                                                                                                                           | 1 เดือน     | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. เอกสารวิธีการวิเคราะห์ต้องมีรายละเอียดครบถ้วน</li> </ol>                                                                                                                                                                       |



| ที่ | ผังกระบวนการ | รายละเอียดงาน                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | ผู้รับผิดชอบ/ผู้ปฏิบัติงาน                                                                                                                                                                                                    | เอกสารที่เกี่ยวข้อง                                                                                                                                                                             | ระยะเวลา    | หมายเหตุ                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-----|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 6   |              | <p>ขั้นตอนที่ 6 เตรียมวัสดุอ้างอิง</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. รวบรวมรายละเอียดข้อมูลของ CRM, RM ที่ต้องการใช้</li> <li>2. ดำเนินการสั่งซื้อ CRM, RM, Spiked sample</li> <li>3. ตรวจสอบ CRM, RM, Spiked sample ที่ได้รับตรงตามที่ต้องการ</li> </ol>                                                                                                                                                                                         | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. ผู้ที่ได้รับมอบหมาย</li> <li>2. หัวหน้าห้องปฏิบัติการเคมี / ผู้จัดการด้านวิชาการ</li> <li>3. ผู้จัดการด้านคุณภาพ / ผู้จัดการทั่วไป</li> <li>4. ผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการ</li> </ol> | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. ใบรับรอง CRM, RM</li> <li>2. ใบเสนอราคา</li> <li>3. แบบบันทึกการขออนุมัติซื้อวัสดุวิทยาศาสตร์ / วัสดุสำนักงาน (F-QM-007)</li> </ol>                   | 1 – 2 เดือน | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. ต้องเตรียมให้มีปริมาณเพียงพอกับการวิเคราะห์</li> <li>2. ค่าของ CRM, RM ต้องอยู่ในช่วงที่สนใจศึกษา</li> </ol>                                                                                                                                            |
| 7   |              | <p>ขั้นตอนที่ 7 ตรวจสอบคุณลักษณะเฉพาะ</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. ความจำเพาะเจาะจง (Specificity /Selectivity)</li> <li>2. ขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)</li> <li>3. ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)</li> <li>4. ช่วงการใช้งาน (Working range)</li> <li>5. ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity)</li> <li>6. ความแม่นยำ (Accuracy)</li> <li>7. ความเที่ยง (Precision)</li> <li>8. Matrix effect</li> </ol> | ผู้ที่ได้รับมอบหมาย                                                                                                                                                                                                           | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. เอกสารการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี</li> <li>2. เอกสารวิธีการวิเคราะห์</li> <li>3. ใบรับรอง CRM, RM</li> <li>4. แบบฟอร์มบันทึกผลการวิเคราะห์</li> </ol> | 2 – 4 เดือน | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. วิเคราะห์ตามขั้นตอนที่ระบุไว้ในเอกสารวิธีวิเคราะห์</li> <li>2. LOD, LOQ สามารถตรวจสอบไปพร้อมกันได้</li> <li>3. Working range, Linearity สามารถตรวจสอบไปพร้อมกันได้</li> <li>4. Accuracy, Precision, Matrix effect สามารถตรวจสอบไปพร้อมกันได้</li> </ol> |
| 8   |              | <p>ขั้นตอนที่ 8 คำนวณผล และประเมินผล</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. คำนวณผล</li> <li>2. ประเมินผล</li> </ol>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | หัวหน้าห้องปฏิบัติการเคมี หรือผู้ที่ได้รับมอบหมาย                                                                                                                                                                             | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. แบบฟอร์มบันทึกผลการวิเคราะห์</li> <li>2. ใบรับรอง CRM, RM</li> </ol>                                                                                  | 1 เดือน     | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. ต้องเลือกใช้สถิติที่เหมาะสมในการคำนวณผล</li> <li>2. ผลการประเมินไม่ผ่านเกณฑ์ต้องหาสาเหตุ</li> </ol>                                                                                                                                                     |

| ที่ | ผังกระบวนการ | รายละเอียดงาน                                                                             | ผู้รับผิดชอบ/ผู้ปฏิบัติงาน                        | เอกสารที่เกี่ยวข้อง                                    | ระยะเวลา  | หมายเหตุ                                                                                                                                                                               |
|-----|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 9   |              | ขั้นตอนที่ 9 ตรวจสอบผลการประเมิน<br>1. ตรวจสอบผลการประเมินว่าผ่านเกณฑ์ที่กำหนดไว้หรือไม่  | หัวหน้าห้องปฏิบัติการเคมี หรือผู้ที่ได้รับมอบหมาย | 1. แบบฟอร์มบันทึกผลการวิเคราะห์<br>2. ใบรับรอง CRM, RM | 1 สัปดาห์ | 1. เมื่อผลการประเมินไม่ผ่านเกณฑ์ อาจต้องทำการตรวจสอบความใช้ได้ใหม่ หรือปรับเปลี่ยนวิธีวิเคราะห์ หรือปรับเกณฑ์ให้เหมาะสม                                                                |
| 10  |              | ขั้นตอนที่ 10 สรุปผล และจัดทำรายงาน<br>1. สรุปผลการวิเคราะห์ทั้งหมด<br>2. จัดทำเป็นรายงาน | หัวหน้าห้องปฏิบัติการเคมี หรือผู้ที่ได้รับมอบหมาย | 1. แบบฟอร์มบันทึกผลการวิเคราะห์<br>2. ใบรับรอง CRM, RM | 1 เดือน   | 1. รายงานต้องมีรายละเอียดวิธีที่ใช้ค่าที่ได้ ผ่านหรือไม่ผ่านเกณฑ์ ยอมรับ รายชื่อผู้วิเคราะห์ และผู้ทบทวน<br>2. รายงานต้องมีข้อความที่สรุปว่าวิธีเหมาะสมต่อการนำไปใช้งานตามวัตถุประสงค์ |
|     |              | -                                                                                         | -                                                 | -                                                      | -         | -                                                                                                                                                                                      |

จากตารางที่ 4.1 ผู้จัดทำขออธิบายรายละเอียดของกระบวนการและขั้นตอนการปฏิบัติงานเพื่อให้ผู้อ่านเข้าใจกระบวนการมากขึ้นโดยแบ่งเป็นขั้นตอนต่างๆ 10 ขั้นตอน ตั้งแต่เริ่มต้นกระบวนการ ดังนี้

**ขั้นตอนที่ 1** กำหนดวัตถุประสงค์ หัวหน้าห้องปฏิบัติการเคมี กำหนดวัตถุประสงค์ของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีว่าต้องการตรวจสอบวิธีไปเพื่ออะไร เช่น เพื่อหาคุณลักษณะของวิธี เช่น LOD, LOQ เพื่อยืนยันความเหมาะสมต่อการใช้งานตามวัตถุประสงค์ เพื่อใช้ในการศึกษาความสามารถของนักวิเคราะห์ เป็นต้น

ในขั้นตอนการกำหนดวัตถุประสงค์ ถ้าวัตถุประสงค์คือต้องการหาคุณลักษณะของวิธี เช่น LOD, LOQ แสดงว่าสารที่เราสนใจมีค่าปริมาณน้อย เช่น พวกสารปนเปื้อนและสารตกค้าง จึงจำเป็นต้องตรวจสอบ LOD, LOQ ของวิธีวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการสามารถทดสอบได้ แต่ถ้าสารที่เราสนใจมีค่าปริมาณมาก เช่น พวกสารประกอบหลักในผลิตภัณฑ์ จำเป็นต้องตรวจสอบ Accuracy และ Precision ของวิธีวิเคราะห์ ถ้าวัตถุประสงค์คือเพื่อยืนยันความเหมาะสมต่อการใช้ จำเป็นต้องทราบว่าจะวิเคราะห์อะไรในตัวอย่างประเภทไหน ตัวอย่างมีค่าอยู่เท่าไร เพื่อใช้เป็นส่วนประกอบในการตัดสินใจในขั้นตอนถัดไปว่าจำเป็นต้องตรวจสอบคุณลักษณะใดบ้าง ถ้าวัตถุประสงค์คือเพื่อใช้ในการศึกษาความสามารถของนักวิเคราะห์ เช่น เปรียบเทียบความสามารถของนักวิเคราะห์ตั้งแต่ 2 คนขึ้นไป หรือพิสูจน์ความสามารถของนักวิเคราะห์ที่เข้ามาใหม่ จำเป็นต้องตรวจสอบ Accuracy และ Precision เพื่อยืนยันความสามารถของนักวิเคราะห์ว่ามีความสามารถในการปฏิบัติงานได้

การกำหนดวัตถุประสงค์ ต้องกำหนดให้ชัดเจน เพื่อที่จะได้วางแผนการทำงานในขั้นตอนถัดไปได้ถูกต้อง รวดเร็ว การกำหนดวัตถุประสงค์ที่ไม่ชัดเจน อาจทำให้ต้องเสียเวลาในการวางแผนการทำงานใหม่ ซึ่งในแต่ละขั้นตอนต้องใช้ระยะเวลาในการดำเนินงานค่อนข้างนาน โดยเฉพาะในการจัดหาเครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมี CRM / RM ในบางครั้งใช้ระยะเวลาได้ถึง 4 เดือน

**ขั้นตอนที่ 2** เลือกวิธีวิเคราะห์ เมื่อกำหนดวัตถุประสงค์ได้แล้ว หัวหน้าห้องปฏิบัติการเคมีหรือผู้ที่ได้รับมอบหมาย ทำการเลือกวิธีวิเคราะห์โดยเลือกวิธีที่เหมาะสมกับประเภทของตัวอย่าง และปริมาณสารที่ต้องการวิเคราะห์ ตรงตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

ในการเลือกวิธีวิเคราะห์ ต้องทราบว่าวิธีวิเคราะห์ที่เลือกเป็นวิธีประเภทใด เช่น เป็น Empirical method หรือ Rational method มีข้อมูลการตรวจสอบคุณลักษณะเฉพาะของวิธีแล้วหรือไม่ วิธีนั้นใช้วิเคราะห์เชิงปริมาณหรือเชิงคุณภาพ ถ้าวิเคราะห์เชิงปริมาณ สามารถวิเคราะห์ได้ในระดับเท่าใด ความเข้มข้นต่ำหรือความเข้มข้นสูง เป็นต้น ควรเลือกวิธีวิเคราะห์มาตรฐานที่ได้รับการยอมรับในระดับนานาชาติเป็นลำดับแรก ถ้าไม่มีวิธีวิเคราะห์ในระดับนานาชาติ หรือวิธีวิเคราะห์ไม่เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ ให้เลือกวิธีวิเคราะห์มาตรฐานที่ได้รับการยอมรับในระดับชาติเป็นลำดับรองลงมา ถ้าไม่มีวิธีวิเคราะห์มาตรฐานที่ได้รับการยอมรับในระดับนานาชาติหรือระดับชาติ ให้เลือกวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาเอง ซึ่งในการเลือกวิธีวิเคราะห์นอกจากการเลือกวิธีให้ตรงตามวัตถุประสงค์แล้ว การเลือกวิธีวิเคราะห์ยังมีความสำคัญคือช่วยในการพิจารณาตัดสินใจในการกำหนดขอบเขตการตรวจสอบคุณลักษณะของวิธีที่ต้องการตรวจสอบรายการใดบ้าง ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 การเลือกวิธีวิเคราะห์และขอบเขตการตรวจสอบคุณลักษณะของวิธี

| วิธีวิเคราะห์                                         | การดัดแปลงวิธี ไม่มี / มี | ขอบเขตการตรวจสอบคุณลักษณะของวิธี                                                       |
|-------------------------------------------------------|---------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| วิธีวิเคราะห์มาตรฐานที่ได้รับการยอมรับในระดับนานาชาติ | ไม่มี                     | Accuracy และ Precision                                                                 |
|                                                       | มี                        | Selectivity, Working range, Linearity, LOD, LOQ, Accuracy, Precision และ Matrix effect |
| วิธีวิเคราะห์มาตรฐานที่ได้รับการยอมรับในระดับชาติ     | ไม่มี                     | Accuracy และ Precision                                                                 |
|                                                       | มี                        | Selectivity, Working range, Linearity, LOD, LOQ, Accuracy, Precision และ Matrix effect |
| วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาเอง                        | -                         | Selectivity, Working range, Linearity, LOD, LOQ, Accuracy, Precision และ Matrix effect |

นอกจากนี้วิธีวิเคราะห์ที่เลือกต้องเป็นวิธีที่ทันสมัยและเป็นปัจจุบัน ไม่ควรเลือกใช้วิธีวิเคราะห์ที่ล้าหลัง

วิธีมาตรฐานที่ได้รับการยอมรับระดับนานาชาติ เช่น Official Methods of Analysis of AOAC International (AOAC), International Organization for Standardization (ISO), The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater APHA, AWWA & WEF, American Society for Testing and Materials (ASTM) เป็นต้น

วิธีมาตรฐานที่ได้รับการยอมรับระดับชาติ เช่น วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (Bull. Dept. Med. Sci.) เป็นต้น

วิธีวิเคราะห์ที่จะนำมาใช้นั้น โดยทั่วไป วิธีวิเคราะห์ที่ต้องตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (EURACHEM guide, 1998) ได้แก่

1. วิธีวิเคราะห์ที่ไม่ใช่วิธีมาตรฐาน (Non-standard method) เป็นวิธีที่ยังไม่ได้รับการยอมรับทั่วไป เช่น วิธีที่ห้องปฏิบัติการพัฒนาเอง (Laboratory-developed method) วิธีที่ห้องปฏิบัติการปรับเปลี่ยนหรือดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน (In-house method) เป็นต้น เมื่อห้องปฏิบัติการจะนำมาใช้ ต้องตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี โดยต้องตรวจสอบคุณลักษณะเฉพาะของวิธีทุกด้านที่มีผลกระทบต่อผลการทดสอบ เพื่อให้สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ของการทำงาน

2. วิธีวิเคราะห์ที่ใช้นอกขอบเขตวิธีมาตรฐาน เช่น วิธีมาตรฐานกำหนดขอบเขตความสามารถทดสอบปริมาณสารได้ระหว่าง 10 – 100 mg/kg ถ้าห้องปฏิบัติการใช้นอกขอบเขตดังกล่าว ก็ต้องตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีก่อนนำมาใช้ทดสอบ

3. เมื่อตัวชี้บ่งการควบคุมคุณภาพของห้องปฏิบัติการ แสดงค่าให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวมีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม

4. การนำไปใช้ต่างห้องปฏิบัติการ หรือต่างเครื่องมือกัน

5. เมื่อต้องการแสดงให้เห็นว่าวิธีสองวิธีไม่แตกต่างกัน เช่น วิธีใหม่กับวิธีมาตรฐาน

**ขั้นตอนที่ 3** กำหนดขอบเขตคุณลักษณะวิธี หัวหน้าห้องปฏิบัติการเคมีกำหนดขอบเขตคุณลักษณะวิธีที่ต้องการศึกษา กำหนดเกณฑ์การยอมรับและสถิติที่ใช้ในการตรวจสอบคุณลักษณะเฉพาะแต่ละตัว

ในการกำหนดขอบเขตคุณลักษณะวิธีให้พิจารณาจากวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ วิธีวิเคราะห์ที่เลือกใช้ ปริมาณสารที่ต้องการวิเคราะห์ ตัวอย่างดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ตัวอย่างการกำหนดขอบเขตคุณลักษณะวิธี

| วัตถุประสงค์                   | วิธีวิเคราะห์                       | การดัดแปลงวิธี |    | ขอบเขตการศึกษา                                                                         |
|--------------------------------|-------------------------------------|----------------|----|----------------------------------------------------------------------------------------|
|                                |                                     | ไม่มี          | มี |                                                                                        |
| วิเคราะห์สารที่มีปริมาณน้อย    | วิธีมาตรฐาน, วิธีที่พัฒนาโดยผู้อื่น | √              | -  | LOD, LOQ, Accuracy และ Precision                                                       |
|                                | วิธีมาตรฐาน, วิธีที่พัฒนาโดยผู้อื่น | -              | √  | Selectivity, Working range, Linearity, LOD, LOQ, Accuracy, Precision และ Matrix effect |
|                                | วิธีที่พัฒนาขึ้นมาเอง               | -              | -  | Selectivity, Working range, Linearity, LOD, LOQ, Accuracy, Precision และ Matrix effect |
| วิเคราะห์สารที่มีปริมาณมาก     | วิธีมาตรฐาน, วิธีที่พัฒนาโดยผู้อื่น | √              | -  | Accuracy และ Precision                                                                 |
|                                | วิธีมาตรฐาน, วิธีที่พัฒนาโดยผู้อื่น | -              | √  | Selectivity, Working range, Linearity, Accuracy, Precision และ Matrix effect           |
|                                | วิธีที่พัฒนาขึ้นมาเอง               | -              | -  | Selectivity, Working range, Linearity, Accuracy, Precision และ Matrix effect           |
| ศึกษาความสามารถของนักวิเคราะห์ | วิธีมาตรฐาน, วิธีที่พัฒนาโดยผู้อื่น | √              | -  | Accuracy และ Precision                                                                 |
|                                | วิธีมาตรฐาน, วิธีที่พัฒนาโดยผู้อื่น | -              | √  | Accuracy และ Precision                                                                 |
|                                | วิธีที่พัฒนาขึ้นมาเอง               | -              | -  | Accuracy และ Precision                                                                 |

#### ขั้นตอนที่ 4 กำหนดความต้องการทางด้านเทคนิค

หัวหน้าห้องปฏิบัติการเคมีหรือผู้ที่ได้รับมอบหมาย ทำการจัดหาเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี ที่ต้องใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีให้พร้อม เครื่องมือที่มีผลต่อการวัดต้องได้รับการสอบเทียบโดยหน่วยงานที่ได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ก่อนนำมาใช้งาน

ในการจัดหาเครื่องมือวัด ต้องเลือกเครื่องมือวัดที่มีความสามารถในการวัดได้ตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ ซึ่งในการเลือกเครื่องมือวัดให้เหมาะสมสามารถแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. กำหนดช่วงของการวัด (Range) เลือกเครื่องมือวัดที่มีช่วงการวัดครอบคลุมช่วงที่ต้องการวัด โดยสามารถหารายละเอียดข้อมูลเฉพาะของเครื่องมือได้จากผู้ผลิตหรือตัวแทนจำหน่ายเครื่องมือวัด
2. พิจารณาความละเอียด (Resolution) ของเครื่องมือวัด ควรแสดงผลการวัดได้ละเอียดกว่าความละเอียดของค่าที่ต้องการวัด
3. พิจารณาเลือกเครื่องมือที่มีค่าความถูกต้อง และ(หรือ) ความไม่แน่นอนของการวัด (Uncertainty of Measurement) ที่เป็นไปตามเกณฑ์ยอมรับ หรือความถูกต้องที่กำหนดไว้ ตามมาตรฐาน ISO 10012 ระบุว่าเกณฑ์ค่าความคลาดเคลื่อนของเครื่องมือวัดควรมีน้อยที่สุด โดยทั่วไปไม่ควรน้อยกว่า 1 ใน 3 และที่ดีควรเป็น 1 ใน 10 ของเกณฑ์ค่าความคลาดเคลื่อนของช่วงการวัด คือไม่น้อยกว่า 3 เท่าหรือที่ดีคือ 10 เท่า

เช่น ต้องการวัดค่าความเป็นกรดต่างของสารที่  $9.5 \pm 0.5$  โดยมีเครื่อง pH meter ให้เลือก 3 เครื่อง ซึ่งแต่ละเครื่องมีช่วงการวัดและความละเอียดแตกต่างกันในการอ่านค่าดังนี้ เครื่อง (1) 0 – 14 เครื่อง (2) 0.0 – 14.0 เครื่อง (3) 0.00 – 14.00 จะเห็นว่าทั้ง 3 เครื่อง มีช่วงการวัดที่ครอบคลุมค่าที่ต้องการวัด แต่เครื่อง (1) ไม่สามารถนำมาวัดค่าความเป็นกรดต่างของสารได้ เนื่องจากความละเอียดของเครื่องไม่เพียงพอ และเมื่อพิจารณาค่าความถูกต้องของเครื่องมือ ซึ่งได้มาจากใบรับรองการสอบเทียบเครื่องมือ แล้วนำมาเปรียบเทียบกับเกณฑ์ยอมรับ ต้องไม่มากกว่า 1 ใน 3 ของเกณฑ์การยอมรับ ค่าที่ดีคือ 1 ใน 10 ของเกณฑ์การยอมรับ (ตาม ISO 10012) เช่น จากตัวอย่างข้างต้น ต้องการวัดค่าความเป็นกรดต่างของสารที่ 9.5 โดยกำหนดเกณฑ์ยอมรับไว้  $\pm 0.5$  ถ้าเครื่อง pH meter เครื่อง (2) ที่มีช่วงการวัด 0.0 – 14.0 มีความละเอียด 0.1 จากใบรับรองสอบเทียบได้ค่า Error  $\pm$  Uncertainty = 0.3 และเครื่อง pH meter เครื่อง (3) ที่มีช่วงการวัด 0.00 – 14.00 มีความละเอียด 0.01 จากใบรับรองสอบเทียบได้ค่า Error  $\pm$  Uncertainty = 0.15 จะเห็นได้ว่าเครื่อง (2) มีค่าความถูกต้องของเครื่องเกิน 1 ใน 3 ของเกณฑ์การยอมรับ (1 ใน 3 ของ 0.5 จะเท่ากับ 0.17 เครื่อง (2) มีค่า Error  $\pm$  Uncertainty = 0.3 ซึ่งเกิน 0.17) ในขณะที่เครื่อง (3) มีค่าความถูกต้องของเครื่องไม่เกิน 1 ใน 3 ของเกณฑ์การยอมรับ (1 ใน 3 ของ 0.5 จะเท่ากับ 0.17 เครื่อง (3) มีค่า Error  $\pm$  Uncertainty = 0.15 ซึ่งไม่เกิน 0.17) ดังนั้นจึงควรเลือกใช้เครื่อง (3) ในการวัดค่าความเป็นกรดต่างของสาร

ในการจัดหาสารเคมี เกรดของสารเคมีต้องมีความเหมาะสมกับวิเคราะห์ เมื่อต้องใช้เครื่องมือวิเคราะห์ขั้นสูง เช่น HPLC GC ICP เป็นต้น สารมาตรฐานหรือสารเคมีที่ใช้ ต้องเป็นสารที่มีความบริสุทธิ์สูง เพื่อป้องกันการปนเปื้อนเข้าไปในระบบการวิเคราะห์ซึ่งจะทำให้ค่าที่วิเคราะห์ผิดพลาดได้ และป้องกันการอุดตันของเครื่องมือวิเคราะห์ทำให้เครื่องมือเสียหายได้ สารเคมีที่ใช้ในการสกัด ต้องใช้สารที่เป็นเกรดในการวิเคราะห์ (AR, analytical grade) เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากสารเคมี ส่วนสารที่ใช้ล้างเครื่องมือ อุปกรณ์ เครื่องแก้ว สามารถใช้เกรดทางการค้าได้ (Commercial grade)

ในการจัดหาเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี อาจต้องใช้ระยะเวลาานประมาณ 2 – 4 เดือน เนื่องจากส่วนใหญ่เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี จะนำเข้าจากต่างประเทศ จึงต้องวางแผนในการตรวจสอบความใช้ได้ให้ดี เพราะอาจเกิดความล่าช้าจากการรอเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

ขั้นตอนการดำเนินการจัดซื้อเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี มีดังนี้

1. หัวหน้าห้องปฏิบัติการเคมีหรือผู้ที่ได้รับมอบหมาย ดำเนินการหาข้อมูลจำเพาะของเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ต้องการ โดยขอจากบริษัทตัวแทนจำหน่าย
2. ผู้ที่ได้รับมอบหมาย ขออนุมัติซื้อเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี ในแบบบันทึกการขออนุมัติซื้อ วัสดุวิทยาศาสตร์ / วัสดุสำนักงาน (F-QM-007) โดยระบุรายละเอียดข้อมูลจำเพาะของเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ต้องการให้ชัดเจน พร้อมแนบเอกสารรายละเอียดข้อมูลจำเพาะของเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี
2. หัวหน้าห้องปฏิบัติการ / ผู้จัดการด้านวิชาการตรวจสอบและพิจารณาอนุมัติแบบบันทึกการขออนุมัติซื้อวัสดุวิทยาศาสตร์ / วัสดุสำนักงาน (F-QM-007)
3. ผู้จัดการด้านคุณภาพ / ผู้จัดการทั่วไปตรวจสอบและพิจารณาอนุมัติแบบบันทึกการขออนุมัติซื้อ วัสดุวิทยาศาสตร์ / วัสดุสำนักงาน (F-QM-007)
4. ผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการตรวจสอบและพิจารณาอนุมัติแบบบันทึกการขออนุมัติซื้อวัสดุวิทยาศาสตร์ / วัสดุสำนักงาน (F-QM-007)
5. ผู้จัดการด้านคุณภาพ / ผู้จัดการทั่วไปดำเนินการสั่งซื้อ
6. หัวหน้าห้องปฏิบัติการเคมีหรือผู้ที่ได้รับมอบหมายตรวจสอบเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี ที่ได้รับว่าถูกต้องตรงตามที่ต้องการ ถ้าไม่ถูกต้องให้ดำเนินการแจ้งผู้จัดการด้านคุณภาพ / ผู้จัดการทั่วไป
7. ผู้จัดการด้านคุณภาพ / ผู้จัดการทั่วไปติดต่อตัวแทนจำหน่ายเพื่อเปลี่ยนเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีให้ถูกต้องตามที่ต้องการ
8. หัวหน้าห้องปฏิบัติการเคมีหรือผู้ที่ได้รับมอบหมายตรวจสอบเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี ที่ได้รับอีกครั้งว่าถูกต้องตรงตามที่ต้องการ
9. เครื่องมือที่มีผลต่อการวัดให้หัวหน้าห้องปฏิบัติการเคมีหรือผู้ที่ได้รับมอบหมาย ดำเนินการส่งเครื่องมือสอบเทียบก่อนนำมาใช้งาน

**ขั้นตอนที่ 5** จัดทำเอกสารวิธีวิเคราะห์ เมื่อเลือกวิธีวิเคราะห์ได้แล้ว หัวหน้าห้องปฏิบัติการเคมีหรือผู้ที่ได้รับมอบหมาย จัดทำเอกสารวิธีวิเคราะห์เป็นคู่มือการปฏิบัติงาน ซึ่งจะต้องมีรายละเอียดครบถ้วนประกอบไปด้วย

1. วัตถุประสงค์ จะเป็นการบอกว่าการทดสอบรายการวิเคราะห์รายการใด ใช้เครื่องมือชนิดไหน ในการวิเคราะห์ เช่น ทดสอบรายการวิตามินเอ โดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector (HPLC-DAD) เป็นต้น
2. ขอบข่าย จะเป็นการบอกขอบข่ายประเภทของตัวอย่างที่วิธีทดสอบนี้สามารถวิเคราะห์ได้ เช่น ใช้ทดสอบในตัวอย่างนมและผลิตภัณฑ์ เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ ผลิตภัณฑ์ขนมอบ เป็นต้น และบอกช่วงที่วิธีนี้สามารถทำการทดสอบได้
3. เอกสารอ้างอิงและเอกสารที่เกี่ยวข้อง จะเป็นการบอกที่มาของเอกสารอ้างอิงวิธีวิเคราะห์ และเอกสารต่างๆ ที่เกี่ยวข้องที่จำเป็นต้องใช้ในการวิเคราะห์ รวมทั้งแบบฟอร์มที่ต้องใช้ในการบันทึกผลการวิเคราะห์

4. สถานที่ทดสอบและสภาวะทดสอบ จะเป็นการบอกว่าสามารถทำการทดสอบที่ไหนได้บ้าง ซึ่งในการขอการรับรองระบบคุณภาพตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 เนื่องจากจะมีทั้งห้องปฏิบัติการเคลื่อนที่ และห้องปฏิบัติการถาวร จึงต้องมีการระบุสถานที่ทดสอบ นอกจากนี้ต้องมีการระบุสภาวะที่ใช้ในการทดสอบ เนื่องจากบางรายการทดสอบ สภาวะที่ใช้ทดสอบจะมีผลต่อผลการวิเคราะห์ที่ได้ จึงต้องมีการระบุสภาวะที่ใช้ในการทดสอบ และต้องควบคุมให้ได้ตามที่ระบุไว้
5. นิยาม จะเป็นการบอกความหมายของสารที่ต้องการวิเคราะห์ หรือบอกความหมายของสิ่งที่เกี่ยวข้อง
6. หลักการ จะเป็นการบอกหลักการวิธีวิเคราะห์ ใช้เทคนิควิเคราะห์แบบไหน เครื่องมืออะไร
7. เครื่องมือและอุปกรณ์ จะเป็นการบอกว่าในวิธีวิเคราะห์ต้องใช้เครื่องมือและอุปกรณ์อะไรบ้าง
8. สารเคมี สารมาตรฐาน และการเตรียมสารเคมี จะเป็นการบอกว่าในวิธีวิเคราะห์ต้องใช้สารเคมี สารมาตรฐานอะไรบ้าง เกรดของสารเคมี วิธีการเตรียมสารซึ่งระบุรายละเอียดให้ครบถ้วน เพื่อป้องกันความผิดพลาดในการวิเคราะห์ที่เกิดจากการเตรียมสารเคมีผิด
9. วิธีทดสอบ จะเป็นการบอกรายละเอียดขั้นตอนของวิธีวิเคราะห์ ซึ่งต้องระบุให้ละเอียดครบถ้วน เพื่อป้องกันความผิดพลาดในการวิเคราะห์ที่เกิดจากรายละเอียดขั้นตอนของวิธีวิเคราะห์ที่ไม่ครบถ้วน ทำให้ผู้ปฏิบัติงานไม่เข้าใจและปฏิบัติงานได้ไม่ถูกต้อง
10. การคำนวณ จะเป็นการบอกวิธีการคำนวณผลการวิเคราะห์ สูตรที่ใช้ในการคำนวณต้องถูกต้อง เพื่อป้องกันความผิดพลาดจากการใช้สูตรคำนวณผิด รวมถึงต้องระบุสูตรที่ใช้ในการคำนวณอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องให้ครบถ้วน เช่น %RPD, %Recovery เป็นต้น
11. การรายงานผล จะเป็นการบอกวิธีการรายงานผล เมื่อผลการทดสอบมีค่าน้อยกว่า LOD, ผลการทดสอบมีค่ามากกว่า LOD แต่น้อยกว่า LOQ, เมื่อผลการทดสอบมีค่ามากกว่า LOQ และการรายงานค่าความไม่แน่นอน รวมถึงการบอกว่าต้องการรายการผลแบบไหน จำนวนเต็ม หรือมีทศนิยมกี่ตำแหน่ง รายงานผลในหน่วยใด เพื่อให้เป็นแนวทางในการรายงานผลแบบเดียวกัน
12. การควบคุมคุณภาพการทดสอบ จะเป็นการบอกถึงการประกันคุณภาพในการวิเคราะห์ เพื่อให้ได้ผลการทดสอบที่มีความถูกต้องน่าเชื่อถือ เช่น มีการทดสอบ Blank, การทดสอบซ้ำ, การทดสอบ %Recovery, การตรวจสอบกราฟมาตรฐาน เป็นต้น พร้อมทั้งระบุเกณฑ์ยอมรับในการทดสอบแต่ละหัวข้อ
13. คุณสมบัติผู้ทดสอบ จะเป็นการบอกว่าผู้ที่จะทำการทดสอบวิธีนี้ได้ จะต้องมีความสมบัติอะไรบ้าง ต้องผ่านการฝึกอบรมในหัวข้อไหนมาบ้าง
14. ข้อควรระวัง จะเป็นการบอกถึงสิ่งที่ต้องพึงระวังในการทดสอบโดยใช้วิธีวิเคราะห์นี้
15. การกำจัดของเสีย จะเป็นการบอกวิธีการกำจัดของเสียที่เกิดจากการวิเคราะห์
16. ภาคผนวก จะเป็นการบอกรายละเอียดอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น รูปขั้นตอนการวิเคราะห์ อธิบายสูตรการคำนวณ เป็นต้น

ควรเขียนเอกสารวิธีวิเคราะห์ให้ละเอียด เพื่อให้ผู้ปฏิบัติงานจะได้ปฏิบัติตามได้อย่างถูกต้อง โดยเฉพาะขั้นตอนการเตรียมสารเคมี วิธีทดสอบ การคำนวณ การควบคุมคุณภาพการทดสอบ ข้อควรระวัง และการกำจัดของเสีย



**ขั้นตอนที่ 6** เตรียมวัสดุอ้างอิง หัวหน้าห้องปฏิบัติการเคมีหรือผู้ที่ได้รับมอบหมาย จัดเตรียมวัสดุอ้างอิง เช่น CRM, RM, Spiked sample เป็นต้น โดยถ้าเลือกใช้ CRM / RM Matrix ต้องเป็นชนิดเดียวกับตัวอย่างที่เราสนใจหรือใกล้เคียงกับตัวอย่างที่เราสนใจ ค่าของ CRM / RM ต้องอยู่ในช่วงที่สนใจศึกษา และมีปริมาณเพียงพอกับการวิเคราะห์ แต่ถ้าใช้ Spiked sample ต้องเตรียมตัวอย่างให้มีปริมาณเพียงพอกับการวิเคราะห์

ในการเลือก Matrix และช่วงค่าของ CRM / RM สามารถหาข้อมูลได้จากตัวแทนจำหน่าย ผู้ผลิต CRM / RM ต้องได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO 17034 ส่วนใหญ่ CRM / RM ต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ ซึ่งใช้ระยะเวลาในการสั่งซื้ออยู่ที่ประมาณ 1 – 2 เดือน จึงต้องคำนวณปริมาณที่ต้องใช้และวางแผนในการจัดซื้อให้ดี เนื่องจากถ้า CRM / RM ไม่พอ อาจต้องเสียเวลาในการสั่งซื้อใหม่

ในการเตรียม Spiked sample ต้องเลือก Sample blank ที่มีสารที่สนใจศึกษาอยู่ในปริมาณน้อยๆ หรือไม่มีเลย และมีความคงตัว ต้องมั่นใจว่าตัวอย่างจะไม่สลายตัวไปในระหว่างการวิเคราะห์ ไม่ควรเลือกตัวอย่างที่เน่าเสียง่าย หรือถ้าจำเป็นต้องใช้ตัวอย่างอาหารสด ก็ต้องมีวิธีการเก็บรักษาตัวอย่างที่เหมาะสม เช่น การแช่เย็น การแช่แข็ง การเก็บในถุงสุญญากาศ เป็นต้น และในการเก็บรักษานี้จะต้องไม่ทำลายสารที่เรากำลังสนใจศึกษาอยู่ด้วย ถ้าสารที่เราสนใจศึกษาสลายตัวได้ง่าย เช่น วิตามิน ซีลเฟอร์ไดออกไซด์ ก็ต้องพิจารณาว่าการสลายตัวนั้นเกิดจากสาเหตุใดแล้วป้องกันให้เกิดการสลายตัวให้น้อยที่สุด เช่น วิตามินกลุ่มที่ละลายน้ำ จะสลายตัวเมื่อโดนความร้อน แสง ให้เก็บรักษาในภาชนะที่บดแสงและแช่เย็น ในการเตรียมตัวอย่างต้องเตรียมให้มีปริมาณเพียงพอกับการวิเคราะห์ เนื่องจากถ้าตัวอย่างไม่เพียงพอ จะต้องเสียเวลาในการเตรียมตัวอย่างใหม่ และตัวอย่างใหม่ที่นำมาเตรียมอาจมีค่าไม่เหมือนกับตัวอย่างครั้งแรก

ผู้ผลิต CRM / RM เช่น LGC Setting Standards in Analytical Science (LGC), Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS) เป็นต้น

ในการเลือกใช้ CRM / RM มีวิธีการพิจารณาดังนี้

1. สารที่ต้องการวิเคราะห์ : พิจารณาเลือก CRM / RM ที่มีสารที่เราสนใจอยู่ในตัวอย่าง CRM / RM
2. ช่วงของการวิเคราะห์ทดสอบ : ความเข้มข้นของ CRM / RM ควรอยู่ในช่วงใกล้เคียงกับความเข้มข้นของตัวอย่างที่วิเคราะห์
3. Matrix ของ CRM / RM ใกล้เคียงกับตัวอย่าง
4. ความเป็นเนื้อเดียวกัน : มีข้อมูลหรือผ่านการตรวจสอบความเป็นเนื้อเดียวกันแล้วอย่างถูกต้องตามหลักวิชาการ
5. เสถียรภาพ : มีข้อมูลหรือผ่านการตรวจสอบเสถียรภาพแล้วอย่างถูกต้องตามหลักวิชาการ
6. ปริมาณ : ควรจะมีปริมาณเพียงพอกับการวิเคราะห์
7. ค่าความไม่แน่นอน : ต้องระบุค่าความไม่แน่นอนและมีการแสดงหรืออ้างอิงวิธีการคำนวณ
8. วันหมดอายุ (expired date) : บอกวันหมดอายุชัดเจน และต้องเลือกใช้ CRM / RM ที่ยังไม่หมดอายุ

ขั้นตอนการดำเนินการจัดซื้อ CRM / RM หรือ Sample blank มีดังนี้

1. หัวหน้าห้องปฏิบัติการเคมีหรือผู้ที่ได้รับมอบหมาย ดำเนินการหาข้อมูลจำเพาะของ CRM / RM ที่ต้องการ โดยขอจากบริษัทตัวแทนจำหน่าย
2. ผู้ที่ได้รับมอบหมาย ขออนุมัติซื้อ CRM / RM หรือ Sample blank ในแบบบันทึกการขออนุมัติซื้อ วัสดุวิทยาศาสตร์ / วัสดุสำนักงาน (F-QM-007) โดยระบุรายละเอียดข้อมูลจำเพาะของ CRM / RM หรือ Sample blank ที่ต้องการให้ชัดเจน พร้อมแนบเอกสารรายละเอียดข้อมูลจำเพาะของ CRM / RM

2. หัวหน้าห้องปฏิบัติการ / ผู้จัดการด้านวิชาการตรวจสอบและพิจารณาอนุมัติแบบบันทึกการขออนุมัติซื้อวัสดุวิทยาศาสตร์ / วัสดุสำนักงาน (F-QM-007)
3. ผู้จัดการด้านคุณภาพ / ผู้จัดการทั่วไปตรวจสอบและพิจารณาอนุมัติแบบบันทึกการขออนุมัติซื้อวัสดุวิทยาศาสตร์ / วัสดุสำนักงาน (F-QM-007)
4. ผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการตรวจสอบและพิจารณาอนุมัติแบบบันทึกการขออนุมัติซื้อวัสดุวิทยาศาสตร์ / วัสดุสำนักงาน (F-QM-007)
5. ผู้จัดการด้านคุณภาพ / ผู้จัดการทั่วไปดำเนินการสั่งซื้อ
6. หัวหน้าห้องปฏิบัติการเคมีหรือผู้ที่ได้รับมอบหมายตรวจสอบ CRM / RM หรือ Sample blank ที่ได้รับว่าถูกต้องตรงตามที่ต้องการ ถ้าไม่ถูกต้องให้ดำเนินการแจ้งผู้จัดการด้านคุณภาพ / ผู้จัดการทั่วไป
7. ผู้จัดการด้านคุณภาพ / ผู้จัดการทั่วไปติดต่อด่วนหน่วยงานจำหน่ายเพื่อเปลี่ยน CRM / RM หรือซื้อ Sample blank ใหม่ให้ถูกต้องตามที่ต้องการ
8. หัวหน้าห้องปฏิบัติการเคมีหรือผู้ที่ได้รับมอบหมายตรวจสอบ CRM / RM หรือ Sample blank ที่ได้รับอีกครั้งว่าถูกต้องตรงตามที่ต้องการ

**ขั้นตอนที่ 7** ตรวจสอบคุณลักษณะเฉพาะ ผู้ที่ได้รับมอบหมายทำการตรวจสอบคุณลักษณะเฉพาะโดยวิเคราะห์ตามขั้นตอนที่ระบุไว้ในเอกสารวิธีวิเคราะห์

**ขั้นตอนที่ 8** คำนวณผล และประเมินผล หัวหน้าห้องปฏิบัติการเคมี หรือผู้ที่ได้รับมอบหมายทำการคำนวณผล และประเมินผล โดยเลือกใช้สถิติที่เหมาะสมในการคำนวณผล

ขั้นตอนการตรวจสอบคุณลักษณะเฉพาะ และขั้นตอนการคำนวณผล ประเมินผล ผู้เขียนคู่มือขออธิบายขั้นตอนการดำเนินการไปด้วยกัน พร้อมทั้งยกตัวอย่างประกอบเพื่อให้ผู้อ่านคู่มือเข้าใจได้ดียิ่งขึ้น

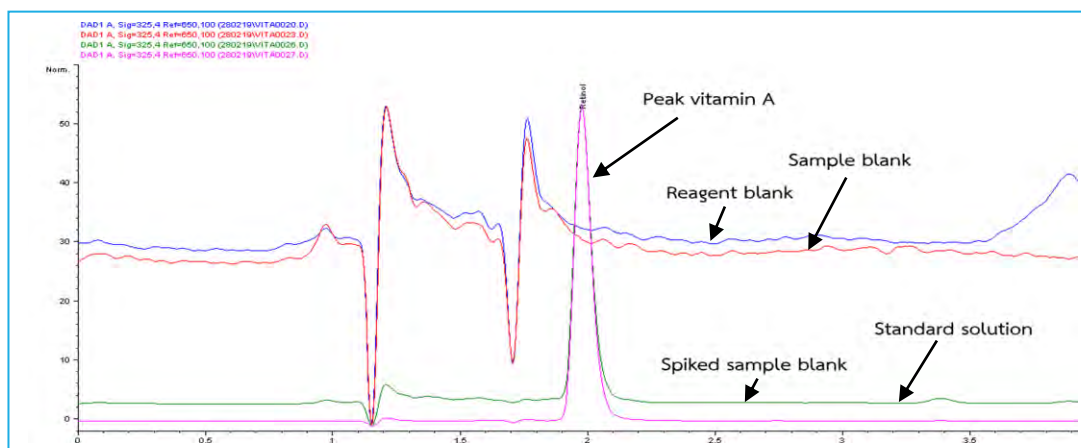
ตรวจสอบคุณลักษณะเฉพาะ คำนวณผล และประเมินผล ทำได้ดังนี้

#### 1. Selectivity

- วิธีทดสอบ : ทำการทดสอบ Reagent blank, Sample blank, Standard solution, Spiked sample blank อย่างละ 1 ซ้ำ
- เกณฑ์ยอมรับ : ไม่มีสัญญาณรบกวนตรงตำแหน่งสารที่ต้องการวิเคราะห์

### ตัวอย่างที่ 4.1 การตรวจสอบ Selectivity

การตรวจสอบ Selectivity รายการวิตามินเอในตัวอย่างนม ทำได้โดยวิเคราะห์ Reagent blank, Sample blank, Standard solution, Spiked sample blank อย่างละ 1 ซ้ำ ตามขั้นตอนการวิเคราะห์ แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC จากนั้นเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของ Solvent blank, Sample blank, Standard solution, Spiked sample blank โครมาโทแกรมของ Solvent blank และ Sample blank จะต้องไม่มี Peak รบกวนตรงตำแหน่ง Peak ของวิตามินเอ ได้ผลการวิเคราะห์ตามโครมาโทแกรมด้านล่าง



ก

การคำนวณผล / ประเมินผล

จากการวิเคราะห์ Reagent blank, Sample blank, Standard solution, และ Spiked sample blank พบว่า Chromatogram ของ Solvent blank และ Sample blank ที่ได้ไม่มี peak รบกวนตรงตำแหน่ง Peak ของวิตามินเอที่ต้องการวิเคราะห์ แสดงว่าวิธีนี้มี Selectivity

### 2. Range และ Linearity

วิธีทดสอบ

Range : ทำการทดสอบ Spiked sample blank ที่ความเข้มข้นต่างๆ 6 ความเข้มข้น ทำการทดสอบตามวิธีวิเคราะห์ แล้ว plot กราฟระหว่างความเข้มข้น (x) กับสัญญาณจากเครื่องมือวัด (y)

เกณฑ์ยอมรับ : ช่วงกราฟเป็นเส้นตรง

Linearity : ทำการทดสอบ Spiked sample blank ที่ความเข้มข้นต่างๆ 6 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ทำการทดสอบตามวิธีวิเคราะห์ แล้ว plot กราฟระหว่างความเข้มข้น (x) กับ สัญญาณจากเครื่องมือวัด (y) หาค่า r และทำ Residuals plot

เกณฑ์ยอมรับ :  $r > 0.995$

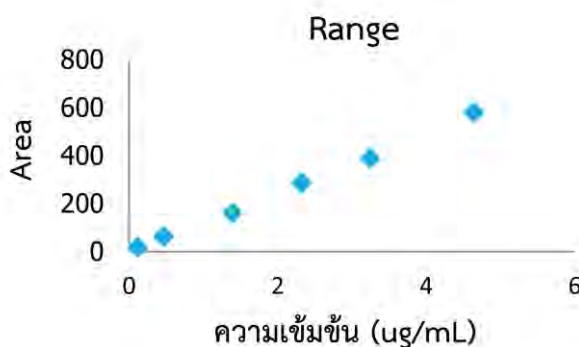
#### ตัวอย่างที่ 4.2 การตรวจสอบ Range และ Linearity

การตรวจสอบ Range รายการวิตามินเอในตัวอย่างนม ทำได้โดยเติมสารมาตรฐานลงใน Sample blank ที่ความเข้มข้นต่างๆ 6 ความเข้มข้น เช่น 0.12, 0.46, 1.39, 2.32, 3.25 และ 4.64  $\mu\text{g/mL}$  วิเคราะห์ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ ทำการทดสอบตามวิธีวิเคราะห์ แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC จากนั้น plot กราฟระหว่างความเข้มข้น (x) กับ Area (y) ได้ผลการวิเคราะห์ดังนี้

เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ได้ผลวิเคราะห์ดังนี้

| ความเข้มข้น ( $\mu\text{g/mL}$ ) | Area   |
|----------------------------------|--------|
| 0.11                             | 16.89  |
| 0.46                             | 61.48  |
| 1.39                             | 162.08 |
| 2.32                             | 286.44 |
| 3.25                             | 387.89 |
| 4.64                             | 579.86 |

จากนั้น Plot กราฟระหว่างความเข้มข้น (x) กับ Area (y)

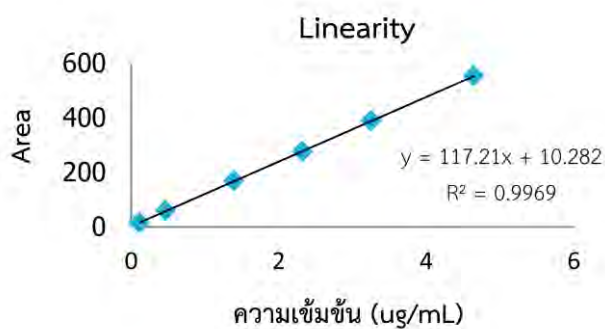


การตรวจสอบ Linearity รายการวิตามินเอในตัวอย่างนม ทำได้โดยเติมสารมาตรฐานลงใน Sample blank ที่ความเข้มข้นต่างๆ 6 ความเข้มข้น เช่น 0.12, 0.46, 1.39, 2.32, 3.25 และ 4.64  $\mu\text{g/mL}$  วิเคราะห์ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ทำการทดสอบตามวิธีวิเคราะห์ แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC จากนั้น plot กราฟระหว่างความเข้มข้น (x) กับ Area (y) หาค่า r และทำ Residuals plot ได้ผลการวิเคราะห์ดังนี้

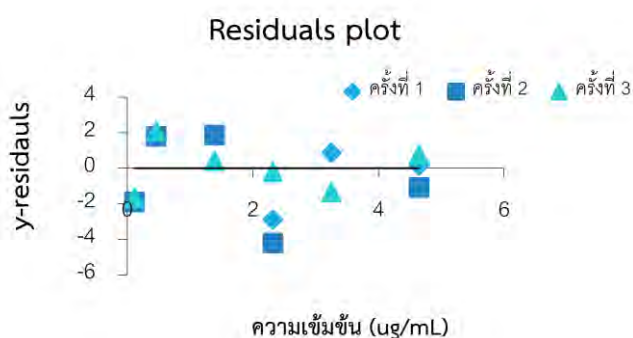
เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ได้ผลวิเคราะห์ดังนี้

| ความเข้มข้น<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | Area       |            |            |         |
|-------------------------------------|------------|------------|------------|---------|
|                                     | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | Average |
| 0.11                                | 14.86      | 14.80      | 14.69      | 14.78   |
| 0.46                                | 62.10      | 61.68      | 61.74      | 61.84   |
| 1.39                                | 196.09     | 194.27     | 196.67     | 195.68  |
| 2.32                                | 276.03     | 273.32     | 277.61     | 275.65  |
| 3.25                                | 390.18     | 390.95     | 386.56     | 389.23  |
| 4.64                                | 555.05     | 551.02     | 553.78     | 553.29  |

จากนั้น Plot กราฟระหว่างความเข้มข้น (x) กับ Area (y) แล้วหาค่า r ได้  $R^2 = 0.9969$ ,  
 $r = 0.9984$



และทำ Residuals plot ซึ่งจะแสดงการกระจายตัวของ y- residuals รอบๆ ค่า 0 ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ยืนยันความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรง



การคำนวณผล / ประเมินผล

Range

จากการทดสอบ Spiked sample blank ที่ความเข้มข้น 0.12, 0.46, 1.39, 2.32, 3.25 และ 4.64  $\mu\text{g/mL}$  แล้วนำไปสร้างกราฟมาตรฐาน พบว่ากราฟที่ได้มีความสัมพันธ์เชิงเส้นเป็นเส้นตรง

Linearity

จากการทดสอบ Spiked sample blank ที่ความเข้มข้น 0.12, 0.46, 1.39, 2.32, 3.25 และ 4.64  $\mu\text{g/mL}$  แล้วนำไปสร้างกราฟมาตรฐาน พบว่ากราฟที่ได้มีความสัมพันธ์เชิงเส้นเป็นเส้นตรง และได้ค่า  $r \geq 0.995$  จึงยืนยันว่ากราฟมีความสัมพันธ์เชิงเส้นเป็นเส้นตรง ดังนั้นจึงเลือกช่วงความเข้มข้นในการเตรียมกราฟมาตรฐานข้างต้นเป็นช่วงการทดสอบ

หมายเหตุ : การตรวจสอบ Range และ Linearity สามารถทำการตรวจสอบไปพร้อมกันได้

### 3. LOD และ LOQ โดยประมาณ

วิธีทดสอบ ทำได้ดังนี้

#### 3.1 กรณีมี Sample blank (Sample blank อ่านค่าสัญญาณได้)

วิเคราะห์ Sample blank ตามวิธีวิเคราะห์ 7-10 ซ้ำ แล้วคำนวณหาค่าความเข้มข้นเฉลี่ย ( $\bar{x}$ ) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของ Sample blank จากนั้นคำนวณค่า LOD จากสูตร  $LOD = \bar{x} + 3SD$  และ LOQ จากสูตร  $LOQ = \bar{x} + 10SD$

### ตัวอย่างที่ 4.3 LOD และ LOQ โดยประมาณ กรณีมี Sample blank

การตรวจสอบ LOD และ LOQ โดยประมาณ รายการวิตามินเอในตัวอย่างนม ทำได้โดยวิเคราะห์ Sample blank ตามวิธีวิเคราะห์ 7-10 ซ้ำ แล้วคำนวณหาค่าความเข้มข้นเฉลี่ย ( $\bar{x}$ ) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของ Sample blank จากนั้นคำนวณค่า LOD จากสูตร  $LOD = \bar{x} + 3SD$  และ LOQ จากสูตร  $LOQ = \bar{x} + 10SD$  ได้ผลการวิเคราะห์ดังนี้

| ครั้งที่               | ความเข้มข้นจากกราฟ ( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|------------------------|-----------------------------------------|
| 1                      | 0.0821                                  |
| 2                      | 0.0832                                  |
| 3                      | 0.0794                                  |
| 4                      | 0.0820                                  |
| 5                      | 0.0835                                  |
| 6                      | 0.0837                                  |
| 7                      | 0.0861                                  |
| 8                      | 0.0814                                  |
| 9                      | 0.0796                                  |
| 10                     | 0.0817                                  |
| $\bar{x}$              | 0.0823                                  |
| SD                     | 0.0020                                  |
| $LOD = \bar{x} + 3SD$  | 0.0882 ~ 0.09                           |
| $LOQ = \bar{x} + 10SD$ | 0.1021                                  |
| LOQ โดยประมาณ          | 0.10                                    |

การคำนวณผล / ประเมินผล

จากการทดสอบ Sample blank ได้ค่า  $\bar{x} = 0.0823$  (ใช้สูตรที่ 1),  $SD = 0.0020$  (ใช้สูตรที่ 3)  
คำนวณหา LOD และ LOQ ได้ดังนี้

$$LOD = \bar{x} + 3SD = 0.0823 + (3 \times 0.0020) = 0.0882 \sim 0.09$$

$$LOQ = \bar{x} + 10SD = 0.0823 + (10 \times 0.0020) = 0.1021 \sim 0.10$$

ดังนั้นได้ค่า LOD เท่ากับ  $0.09 \mu\text{g/mL}$  และ LOQ โดยประมาณ เท่ากับ  $0.10 \mu\text{g/mL}$

หมายเหตุ : การตรวจสอบ LOD และ LOQ สามารถทำการตรวจสอบไปพร้อมกันได้

### 3.2 กรณีวิเคราะห์ Spiked sample blank (Sample blank ไม่สามารถอ่านค่าสัญญาณได้)

เติมสารมาตรฐานวิตามินเอลงใน Sample blank โดยเติมที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ยอมรับได้ เช่น ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ทำการวิเคราะห์ Spiked sample blank ตามวิธีวิเคราะห์ 7-10 ซ้ำ แล้วคำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) จากนั้นคำนวณค่า LOD จากสูตร  $LOD = 3SD$  และ LOQ จากสูตร  $LOQ = 10SD$

#### ตัวอย่างที่ 4.4 LOD และ LOQ โดยประมาณ กรณีวิเคราะห์ Spiked sample blank

การตรวจสอบ LOD และ LOQ โดยประมาณ รายการวิตามินเอในตัวอย่างนม ทำได้โดยเติมสารมาตรฐานวิตามินเอลงใน Sample blank ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด คือ 0.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ทำการวิเคราะห์ Spiked sample blank ตามวิธีวิเคราะห์ 7-10 ซ้ำ แล้วคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) จากนั้นคำนวณค่า LOD จากสูตร  $LOD = 3SD$  และ LOQ จากสูตร  $LOQ = 10SD$  ได้ผลการวิเคราะห์ดังนี้

| ครั้งที่      | ความเข้มข้นจากกราฟ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) |
|---------------|------------------------------------------------|
| 1             | 0.1439                                         |
| 2             | 0.1455                                         |
| 3             | 0.1440                                         |
| 4             | 0.1433                                         |
| 5             | 0.1430                                         |
| 6             | 0.1424                                         |
| 7             | 0.1439                                         |
| 8             | 0.1452                                         |
| 9             | 0.1461                                         |
| 10            | 0.1540                                         |
| $\bar{x}$     | 0.1451                                         |
| SD            | 0.0033                                         |
| $LOD = 3SD$   | 0.0099 ~ 0.01                                  |
| $LOQ = 10SD$  | 0.0330                                         |
| LOQ โดยประมาณ | 0.04                                           |

การคำนวณผล / ประเมินผล

จากการทดสอบ Spiked sample blank ได้ค่า SD = 0.0033 (ใช้สูตรที่ 3) คำนวณหา LOD และ LOQ ได้ดังนี้

$$LOD = 3SD = 3 \times 0.0033 = 0.0099 \sim 0.01$$

$$LOQ = 10SD = 10 \times 0.0033 = 0.0330 \sim 0.04$$

ดังนั้นได้ค่า LOD เท่ากับ 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$  และ LOQ โดยประมาณ เท่ากับ 0.04  $\mu\text{g}/\text{mL}$

หมายเหตุ : - การตรวจสอบ LOD และ LOQ สามารถทำการตรวจสอบไปพร้อมกันได้

- สามารถใช้ค่า LOQ โดยประมาณที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของกราฟมาตรฐานได้

คือเท่ากับ 0.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ได้ (จากตัวอย่างที่ 4.2)



### 3.3 กรณีคำนวณจากจุดตัดกราฟเส้นตรง (มีหรือไม่มี Sample blank)

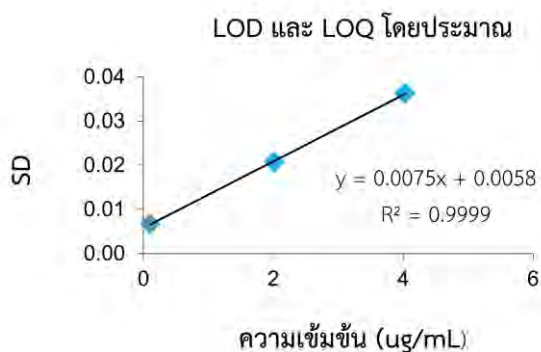
เติมสารมาตรฐานลงใน Sample blank หรือ Sample ให้มีความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง แล้ววิเคราะห์ Spiked sample ตามวิธีวิเคราะห์ระดับละ 7-10 ซ้ำ แล้วคำนวณหาค่าความเข้มข้นเฉลี่ย ( $\bar{x}$ ) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของแต่ละระดับความเข้มข้น Plot กราฟระหว่างความเข้มข้นเฉลี่ย ( $\bar{x}$ ) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) โดยให้  $\bar{x}$  อยู่บนแกน x และ SD อยู่บนแกน y หาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์  $r$  ระหว่าง  $\bar{x}$  และ SD จากนั้นลากเส้นกราฟตัดแกน y จุดตัดแกน y คือค่า  $s_b$  (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นศูนย์) คำนวณค่า LOD จากสูตร  $LOD = 3S_b$  และ LOQ จากสูตร  $LOQ = 10S_b$

#### ตัวอย่างที่ 4.5 LOD และ LOQ โดยประมาณ กรณีคำนวณจากจุดตัดกราฟเส้นตรง

การตรวจสอบ LOD และ LOQ โดยประมาณ รายการวิตามินเอในตัวอย่างนม ทำได้โดยเติมสารมาตรฐานวิตามินเอลงใน Sample blank หรือ Sample ให้มีความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง เช่น 0.1, 2.0 และ 4.0  $\mu\text{g/mL}$  วิเคราะห์ Spiked sample ตามวิธีวิเคราะห์ระดับละ 7-10 ซ้ำ แล้วคำนวณหาค่าความเข้มข้นเฉลี่ย ( $\bar{x}$ ) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของแต่ละระดับความเข้มข้น Plot กราฟระหว่างความเข้มข้นเฉลี่ย ( $\bar{x}$ ) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) จากนั้นลากเส้นกราฟตัดแกน y จุดตัดแกน y คือค่า  $s_b$  คำนวณค่า LOD จากสูตร  $LOD = 3S_b$  และ LOQ จากสูตร  $LOQ = 10S_b$  ได้ผลการวิเคราะห์ดังนี้

| ครั้งที่      | ความเข้มข้นจากกราฟ ( $\mu\text{g/mL}$ ) |               |        |
|---------------|-----------------------------------------|---------------|--------|
|               | 0.1                                     | 2.0           | 4.0    |
| 1             | 0.1055                                  | 2.0254        | 4.0057 |
| 2             | 0.1067                                  | 2.0163        | 4.0123 |
| 3             | 0.1098                                  | 2.0276        | 3.9987 |
| 4             | 0.1122                                  | 1.9941        | 4.0252 |
| 5             | 0.0989                                  | 2.0013        | 4.0931 |
| 6             | 0.0907                                  | 1.9889        | 3.9922 |
| 7             | 0.1036                                  | 2.0344        | 4.0819 |
| 8             | 0.1069                                  | 2.0173        | 3.9859 |
| 9             | 0.0957                                  | 1.9752        | 4.0355 |
| 10            | 0.1078                                  | 2.0366        | 4.0294 |
| $\bar{x}$     | 0.1038                                  | 2.0117        | 4.0260 |
| SD            | 0.0067                                  | 0.0208        | 0.0362 |
| $S_b$         |                                         | 0.0058        |        |
| $LOD = 3S_b$  |                                         | 0.0174 ~ 0.02 |        |
| $LOQ = 10S_b$ |                                         | 0.0580        |        |
| LOQ โดยประมาณ |                                         | 0.06          |        |

นำไป Plot กราฟระหว่างความเข้มข้นเฉลี่ย ( $\bar{x}$ ) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) แล้วลากเส้นกราฟตัดแกน y ได้จุดตัดแกน y (ค่า  $s_b$ ) เท่ากับ 0.0058



การคำนวณผล / ประเมินผล

จากการทดสอบ Spiked sample ได้ค่า  $S_b = 0.0058$  คำนวณหา LOD และ LOQ ได้ดังนี้

$$LOD = 3S_b = 3 \times 0.0058 = 0.0174 \sim 0.02$$

$$LOQ = 10S_b = 10 \times 0.0058 = 0.0580 \sim 0.06$$

ดังนั้นได้ค่า LOD เท่ากับ 0.02  $\mu\text{g/mL}$  และ LOQ โดยประมาณ เท่ากับ 0.06  $\mu\text{g/mL}$

หมายเหตุ : - การตรวจสอบ LOD และ LOQ สามารถทำการตรวจสอบไปพร้อมกันได้

- สามารถใช้ค่า LOQ โดยประมาณที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของกราฟมาตรฐานได้

คือเท่ากับ 0.12  $\mu\text{g/mL}$  ได้ (จากตัวอย่างที่ 4.2)

### 3.4 การยืนยันค่า LOQ

วิธีทดสอบ

: เตรียม Spiked sample ให้มีความเข้มข้นเท่ากับค่า LOQ ที่ประมาณได้ หรือค่าที่ใกล้เคียง ทำการวิเคราะห์ 7-10 ซ้ำ แล้วคำนวณค่าความเข้มข้นเฉลี่ย ( $\bar{x}$ ) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) คำนวณหา % Recovery, %RSD และ HORRAT จากนั้นประเมินการยอมรับความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision)

เกณฑ์ยอมรับ

: ความเข้มข้นต่ำสุดมี Accuracy (% Recovery อยู่ในช่วงเกณฑ์ยอมรับ) Precision (%RSD < %RSD<sub>r</sub> และ HORRAT < 2)

#### ตัวอย่างที่ 4.6 การยืนยันค่า LOQ

การยืนยันค่า LOQ รายการวิตามินเอในตัวอย่างนม ทำได้โดยเติมสารมาตรฐานวิตามินเอลงใน Sample blank หรือ Sample ให้มีความเข้มข้นเท่ากับค่า LOQ ที่ประมาณได้ หรือค่าที่ใกล้เคียง เช่นที่ 0.12 µg/mL (จากตัวอย่างที่ 4.2) วิเคราะห์ Spiked sample ตามวิธีวิเคราะห์ระดับละ 7-10 ซ้ำ แล้วคำนวณหาค่าความเข้มข้นเฉลี่ย ( $\bar{x}$ ) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) คำนวณหา % Recovery, %RSD และ HORRAT ได้ผลการวิเคราะห์ดังนี้

| ครั้งที่          | Sample<br>(µg/100g) | Spiked sample<br>(µg/100g) | Conc. std. added<br>(µg/100g) | %Recovery |
|-------------------|---------------------|----------------------------|-------------------------------|-----------|
| 1                 | 0.00                | 23.19                      | 23.50                         | 98.70     |
| 2                 | 0.00                | 23.38                      | 23.55                         | 99.29     |
| 3                 | 0.00                | 23.55                      | 23.45                         | 100.44    |
| 4                 | 0.00                | 23.52                      | 23.49                         | 100.15    |
| 5                 | 0.00                | 24.28                      | 23.06                         | 105.29    |
| 6                 | 0.00                | 24.27                      | 23.27                         | 104.26    |
| 7                 | 0.00                | 22.86                      | 23.30                         | 98.10     |
| 8                 | 0.00                | 22.44                      | 23.23                         | 96.58     |
| 9                 | 0.00                | 22.38                      | 23.30                         | 96.03     |
| 10                | 0.00                | 22.63                      | 23.27                         | 97.21     |
| $\bar{x}$         |                     | 23.25                      |                               |           |
| SD                |                     | 0.69                       |                               |           |
| %RSD              |                     | 2.96                       |                               |           |
| %RSD <sub>r</sub> |                     | 11                         |                               |           |
| C                 |                     | 0.0000002                  |                               |           |
| 1-0.5log C        |                     | 4.32                       |                               |           |
| %PRSD             |                     | 13.15                      |                               |           |
| HORRAT            |                     | 0.22                       |                               |           |

การคำนวณผล / ประเมินผล

จากการทดสอบ Spiked sample เพื่อยืนยันค่า LOQ ซึ่งต้องมี Accuracy และ Precision โดย Accuracy ให้คำนวณหา % Recovery (สูตรที่ 15)

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

และจากตารางที่ 3.5 กำหนดเกณฑ์ยอมรับ % Recovery เท่ากับ 80 – 110 %

ตารางที่ 3.5

| ความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง         | %Recovery |
|-------------------------------------|-----------|
| 100%                                | 98 – 102  |
| 10%                                 | 98 – 102  |
| 1%                                  | 97 – 103  |
| 0.1%                                | 95 – 105  |
| 100 ppm (mg/kg)                     | 90 – 107  |
| 10 ppm (mg/kg)                      | 80 – 110  |
| 1 ppm (mg/kg)                       | 80 – 110  |
| 100 ppb ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) | 80 – 110  |
| 10 ppb ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )  | 60 – 115  |
| 1 ppb ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )   | 40 – 120  |

ซึ่งจากผลการทดสอบทั้ง 10 ซ้ำ จะเห็นได้ว่า % Recovery อยู่ในช่วง 80 – 110 %

ในการกำหนดเกณฑ์ยอมรับ %Recovery ตามตัวอย่าง จะเห็นได้ว่าตัวอย่างที่ยกมาแสดงมีหน่วยทดสอบเป็น  $\mu\text{g}/100\text{g}$  ซึ่งไม่ตรงกับหน่วยใดของความเข้มข้นของสารในตัวอย่างตามตารางที่ 3.5 ผู้เขียนคู่มือจึงทำการเปลี่ยนหน่วยให้ตรงกับหน่วยในตารางก่อนจะพิจารณาเกณฑ์ยอมรับ ดังนี้ ที่ระดับความเข้มข้นประมาณ 24  $\mu\text{g}/100\text{g}$  เปลี่ยนให้อยู่ในหน่วย mg/kg จะเท่ากับ 0.24 mg/kg และเมื่อพิจารณาเกณฑ์ยอมรับตามตารางที่ 3.5 ได้เกณฑ์ %Recovery อยู่ในช่วง 80 – 110%

Precision ให้คำนวณหา %RSD, %PRSD (%RSD<sub>r</sub>) และ HORRAT จากสูตรดังนี้

$$\begin{aligned} \text{HORRAT} &= \% \text{RSD} / \% \text{PRSD} \\ \text{โดย } \% \text{RSD} &= \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \\ \text{เมื่อ } SD &= \text{ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน} \\ \bar{x} &= \text{ค่าเฉลี่ยของข้อมูล} \\ \% \text{PRSD} (\% \text{RSD}_r) &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \end{aligned}$$

เกณฑ์ยอมรับ %RSD < %RSD<sub>r</sub> และ HORRAT < 2

%PRSD คือ %Predicted RSD ได้แก่ %RSD<sub>R</sub> และ %RSD<sub>r</sub> ซึ่งในการทดสอบโดยห้องปฏิบัติการเดียวกันจะเลือกใช้ %RSD<sub>r</sub>

การกำหนดเกณฑ์ยอมรับ โดยเกณฑ์การยอมรับ HORRAT ตาม AOAC จากตารางที่ 3.8 คือ HORRAT < 2 และจากตารางที่ 3.7 %RSD<sub>r</sub> < 11

ตารางที่ 3.7

| ความเข้มข้นของสาร | Conc. Ratio : C                | Predicted Horwitz |                   |
|-------------------|--------------------------------|-------------------|-------------------|
|                   |                                | %RSD <sub>R</sub> | %RSD <sub>r</sub> |
| 100%              | 1                              | 2                 | 1.3               |
| 10%               | 10 <sup>-1</sup> = 0.1         | 3                 | 1.9               |
| 1%                | 10 <sup>-2</sup> = 0.01        | 4                 | 2.7               |
| 0.1%              | 10 <sup>-3</sup> = 0.001       | 6                 | 3.7               |
| 100 ppm (mg/kg)   | 10 <sup>-4</sup> = 0.0001      | 8                 | 5.3               |
| 10 ppm (mg/kg)    | 10 <sup>-5</sup> = 0.00001     | 11                | 7.3               |
| 1 ppm (mg/kg)     | 10 <sup>-6</sup> = 0.000001    | 16                | 11                |
| 100 ppb (µg/kg)   | 10 <sup>-7</sup> = 0.0000001   | 22                | 15                |
| 10 ppb (µg/kg)    | 10 <sup>-8</sup> = 0.00000001  | 32                | 21                |
| 1 ppb (µg/kg)     | 10 <sup>-9</sup> = 0.000000001 | 45                | 30                |

คำนวณหา

$$\% \text{RSD} = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 = \frac{0.69}{23.25} \times 100 = 2.96$$

$$\% \text{PRSD} = RSD_r = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)}$$

โดยค่า C คือ Concentration ratio ในการคำนวณ %PRSD ต้องทำให้ค่า C ไม่มีหน่วย ซึ่งสามารถคำนวณหาได้โดยคูณหรือหารด้วยหน่วยของค่าตัวอย่าง (ตามตารางที่ 3.7)

จากตัวอย่างค่าได้เท่ากับ 23.25 µg/100g คำนวณหาค่า C ดังนี้

$$C = \frac{23.25 \mu\text{g}}{100 \text{ g}} \times \frac{1 \text{ mg}}{1000 \mu\text{g}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} = \frac{23.25}{100000000} = 0.0000002$$

$$\text{และคำนวณหา } 1-0.5 \log C = 1-0.5 \log(0.0000002) = 4.32$$

$$\% \text{PRSD} = 0.66 \times 2^{(4.32)} = 13.15$$

$$\text{HORRAT} = \frac{\% \text{RSD}}{\% \text{PRSD}} = \frac{2.96}{13.15} = 0.22$$

จากผลการทดสอบพบว่า ได้ค่า %RSD เท่ากับ 2.96 ซึ่งน้อยกว่า %RSD<sub>r</sub> (จากตารางที่ 3.7 ความเข้มข้นของสาร 1 mg/kg %RSD<sub>r</sub> ได้เท่ากับ 11) และเมื่อคำนวณ HORRAT ได้ค่าเท่ากับ 0.22 ซึ่งน้อยกว่า 2

ในการกำหนดเกณฑ์ยอมรับ %RSD<sub>r</sub> ตามตัวอย่าง จะเห็นได้ว่าตัวอย่างที่ยกมาแสดงมีหน่วยทดสอบเป็น µg/100g ซึ่งไม่ตรงกับหน่วยใดของความเข้มข้นของสารในตัวอย่างตามตารางที่ 3.7 ผู้เขียนคู่มือจึงทำการเปลี่ยนหน่วยให้ตรงกับหน่วยในตารางก่อนจะพิจารณาเกณฑ์ยอมรับ ดังนี้ ที่ระดับความระมัดระวังความเข้มข้นประมาณ 24 µg/100g เปลี่ยนให้อยู่ในหน่วย mg/kg จะเท่ากับ 0.24 mg/kg และเมื่อพิจารณาเกณฑ์ยอมรับตามตารางที่ 3.7 ที่ความเข้มข้นของสาร 1 mg/kg %RSD<sub>r</sub> ได้เท่ากับ 11

ดังนั้นจากการทดสอบ Spiked sample ที่ระดับความเข้มข้น 24  $\mu\text{g}/100\text{g}$  (0.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) พบว่า %Recovery อยู่ในช่วง 80 – 110 %, %RSD < %RSD<sub>r</sub> และ HORRAT < 2 แสดงว่า LOQ ที่ระดับความเข้มข้น 24  $\mu\text{g}/100\text{g}$  (0.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) มี Accuracy และ Precision

ตามเกณฑ์การยอมรับการประเมินของ Horwitz equation ถ้าค่า %RSD > %RSD<sub>r</sub> จึงจะคำนวณค่า HORRAT แต่จากตัวอย่างนี้ กำหนดเกณฑ์ยอมรับไว้ %RSD < %RSD<sub>r</sub> และ HORRAT < 2 ซึ่งแคบกว่า เพื่อแสดงให้เห็นว่าวิธีมี Precision ที่ดี ดังนั้นเราสามารถปรับเกณฑ์ยอมรับให้เหมาะสมกับการปฏิบัติงานได้

ในการวิเคราะห์วิตามินเอมีการเปลี่ยนหน่วยจาก  $\mu\text{g}/\text{mL}$  เป็น  $\mu\text{g}/100\text{g}$  โดยใช้สูตรการคำนวณดังนี้

$$\text{Vitamin A } (\mu\text{g}/100\text{g}) = \frac{C \times V \times 100}{W}$$

เมื่อ C คือ ความเข้มข้นของวิตามินเอ ที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )  
 V คือ ปริมาตรสุดท้ายของสารละลายตัวอย่าง (mL)  
 W คือ น้ำหนักตัวอย่าง (g)

ตามวิธีวิเคราะห์ จะชั่งตัวอย่าง 10 g และปริมาตรสุดท้ายของสารละลายตัวอย่างเท่ากับ 10 mL ตัวอย่างเช่น

$$\text{Vitamin A} = \frac{C \times V \times 100}{W} = \frac{0.12 \times 10 \times 100}{5} = 24 \mu\text{g}/100\text{g}$$

ดังนั้นการยืนยันค่า LOQ ที่ 0.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  จะเท่ากับ 24  $\mu\text{g}/100\text{g}$

ในการคำนวณค่า %PRSD ผู้ปฏิบัติงานมักจะลืมการคำนวณให้ค่า C ไม่มีหน่วย หรือคำนวณได้ไม่ถูกต้อง ซึ่งจะทำให้ค่า HORRAT ที่คำนวณได้ผิดพลาด ดังนั้นในการคำนวณค่า %PRSD จะต้องไม่ลืมคำนวณให้ค่า C ไม่มีหน่วยก่อนนำมาคำนวณตามสมการ %PRSD ทุกครั้ง

#### 4. Accuracy และ Precision

##### 4.1 Accuracy วิธีทดสอบ ทำได้ดังนี้

##### 4.1.1 กรณีที่มี CRM / RM ทำได้ดังนี้

1. วิเคราะห์ Reagent blank และ CRM / RM อย่างละ 7-10 ซ้ำ
2. คำนวณค่าเฉลี่ยของ Blank และลบออกจากค่าของ CRM / RM ที่ได้จากการวิเคราะห์แต่ละค่า
3. เกณฑ์การยอมรับ ให้เลือกวิธีใดวิธีหนึ่ง ดังนี้  
วิธีที่ 1 พิจารณาค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวิเคราะห์ ว่ามีค่าอยู่ในช่วงของค่ารับรอง เช่น ค่ารับรองมีค่า  $55.00 \pm 0.20 \text{ g}/100\text{g}$  ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวิเคราะห์ต้องมีค่าอยู่ในช่วง  $54.80 - 55.20 \text{ g}/100\text{g}$

วิธีที่ 2 เปรียบเทียบค่าจริงของ CRM / RM โดยใช้สถิติ t-test (สูตรที่ 7) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%,  $df = n - 1$

$$t = \frac{(\bar{x} - \mu)}{(s / \sqrt{n})}$$

t คือ ค่าที่ได้จากการคำนวณ ซึ่งเป็นอัตราส่วนระหว่าง Bias ( $\bar{x} - \mu$ )

$\bar{x}$  คือ ค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์

$\mu$  คือ ค่าจริง หรือค่าอ้างอิง

s คือ Standard deviation

n คือ จำนวนครั้งที่วิเคราะห์

เปรียบเทียบค่า t ที่ได้จากการคำนวณ กับค่า Critical  $t_c$  จากตาราง ถ้าค่า t น้อยกว่าค่า  $t_c$  แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่าง ค่าจากการวิเคราะห์กับค่าจริงหรือค่าอ้างอิง

วิธีที่ 3 คำนวณ %Recovery (สูตรที่ 15) ค่าที่คำนวณได้ต้องอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

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

เมื่อ  $C_1$  คือ ความเข้มข้นของสารใน CRM / RM ที่วิเคราะห์ได้

$C_2$  คือ ความเข้มข้นของ Blank

$C_3$  คือ Certified value ของ CRM / RM

#### ตัวอย่างที่ 4.7 การตรวจสอบ Accuracy กรณีที่มี CRM / RM

การตรวจสอบ Accuracy รายการวิตามินเอในตัวอย่างนม ทำได้โดยวิเคราะห์ Reagent blank และตัวอย่าง CRM / RM ตามวิธีวิเคราะห์ 7-10 ซ้ำ แล้วคำนวณหาค่าความเข้มข้นเฉลี่ย ( $\bar{x}$ ) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และสมมุติว่าจากใบรับรองตัวอย่าง CRM / RM ได้ค่าวิตามินเอเท่ากับ  $412.20 \pm 2.20 \mu\text{g}/100\text{g}$  ได้ผลการวิเคราะห์ดังนี้

| ครั้งที่ | วิตามินเอ ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) | วิธีการ                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|----------|-----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1        | 412.60                                  | วิธีที่ 1 พิจารณาค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวิเคราะห์ ว่ามีค่าอยู่ในช่วงของค่ารับรอง<br>- Average = $412.03 \mu\text{g}/100\text{g}$<br>- ค่าจากใบรับรอง = $412.20 \pm 2.20 \mu\text{g}/100\text{g}$<br>สรุป ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวิเคราะห์มีค่าอยู่ในช่วง $410.00 - 414.40 \mu\text{g}/100\text{g}$ จากใบรับรอง |
| 2        | 410.50                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 3        | 413.89                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 4        | 412.22                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 5        | 410.77                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 6        | 411.69                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 7        | 412.56                                  | วิธีที่ 2 เปรียบเทียบค่าจริงของ CRM / RM โดยใช้สถิติ t-test<br>$t = \frac{(\bar{x} - \mu)}{(s/\sqrt{n})} = \frac{(412.03 - 412.20)}{(1.24/\sqrt{10})} = -0.43$<br>ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% df = 9 ได้ $t_c = 2.26$                                                                                        |
| 8        | 413.96                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 9        | 410.78                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 10       | 411.34                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Average  | 412.03                                  | สรุป $t < t_c$ แสดงว่าค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ไม่มีความแตกต่างจากใบรับรอง                                                                                                                                                                                                                                  |
| SD       | 1.24                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| n        | 10                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|          |                                         | วิธีที่ 3 %Recovery อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ<br>$\% \text{ Recovery} = \left( \frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100$<br>$\% \text{ Recovery} = \left( \frac{412.03 - 0}{412.20} \right) \times 100 = 99.48\%$<br>สรุป %Recovery อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ 80 - 110%                                                    |

การคำนวณผล / ประเมินผล

วิธีที่ 1 พิจารณาค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวิเคราะห์ ว่ามีค่าอยู่ในช่วงของค่ารับรอง

จากผลการทดสอบพบว่า ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวิเคราะห์ เท่ากับ  $412.03 \mu\text{g}/100\text{g}$  และค่าจากใบรับรอง เท่ากับ  $412.20 \pm 2.20 \mu\text{g}/100\text{g}$  ซึ่งจะเห็นว่า ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวิเคราะห์มีค่าอยู่ในช่วง  $410.00 - 414.40 \mu\text{g}/100\text{g}$  แสดงว่าวิธีนี้มี Accuracy

วิธีที่ 2 เปรียบเทียบค่าจริงของ CRM / RM โดยใช้สถิติ t-test (สูตรที่ 7) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, df = n - 1

จากผลการทดสอบพบว่า ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวิเคราะห์ เท่ากับ  $412.03 \mu\text{g}/100\text{g}$ , ค่า SD เท่ากับ  $1.24 \mu\text{g}/100\text{g}$ , n เท่ากับ 10 และค่าจากใบรับรอง เท่ากับ  $412.20 \pm 2.20 \mu\text{g}/100\text{g}$  คำนวณหาค่า t ได้ดังนี้

$$t = \frac{(\bar{x} - \mu)}{(s/\sqrt{n})} = \frac{(412.03 - 412.20)}{(1.24/\sqrt{10})} = -0.43$$



จากตารางที่ 3.3 ค่า  $t_c$  ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% df = 9 ได้เท่ากับ 2.26 ตารางที่ 3.3

| Degree of freedom | Confidence level |       |       |       |
|-------------------|------------------|-------|-------|-------|
|                   | 90%              | 95%   | 98%   | 99%   |
| 1                 | 6.31             | 12.71 | 31.82 | 63.66 |
| 2                 | 2.92             | 4.30  | 6.96  | 9.92  |
| 3                 | 2.35             | 3.18  | 4.54  | 5.84  |
| 4                 | 2.13             | 2.78  | 3.75  | 4.60  |
| 5                 | 2.02             | 2.57  | 3.36  | 4.03  |
| 6                 | 1.94             | 2.45  | 3.14  | 3.71  |
| 7                 | 1.89             | 2.36  | 3.00  | 3.50  |
| 8                 | 1.86             | 2.31  | 2.90  | 3.36  |
| 9                 | 1.83             | 2.26  | 2.8   | 3.25  |
| 10                | 1.81             | 2.23  | 2.76  | 3.17  |
| 12                | 1.78             | 2.18  | 2.68  | 3.05  |
| 14                | 1.76             | 2.14  | 2.62  | 2.98  |
| 16                | 1.75             | 2.12  | 2.58  | 2.92  |
| 18                | 1.73             | 2.10  | 2.55  | 2.88  |
| 20                | 1.72             | 2.09  | 2.53  | 2.85  |
| 30                | 1.70             | 2.04  | 2.46  | 2.75  |
| 50                | 1.68             | 2.01  | 2.40  | 2.68  |
| ∞                 | 1.64             | 1.96  | 2.33  | 2.58  |

ดังนั้นจะเห็นได้ว่า ค่า  $t$  ที่คำนวณได้ น้อยกว่าค่า  $t_c$  แสดงว่าค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ไม่มีความแตกต่างจากใบรับรองอย่างมีนัยสำคัญ วิธีนี้มี Accuracy

วิธีที่ 3 คำนวณ %Recovery (สูตรที่ 14) ค่าที่คำนวณได้ต้องอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

จากผลการทดสอบพบว่า ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวิเคราะห์ เท่ากับ 412.03  $\mu\text{g}/100\text{g}$  และค่าจากใบรับรอง เท่ากับ  $412.20 \pm 2.20 \mu\text{g}/100\text{g}$  และจากตารางที่ 3.5 กำหนดเกณฑ์ %Recovery เท่ากับ 80 – 110% คำนวณหา %Recovery ได้ดังนี้

ตารางที่ 3.5

| ความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง         | %Recovery |
|-------------------------------------|-----------|
| 100%                                | 98 – 102  |
| 10%                                 | 98 – 102  |
| 1%                                  | 97 – 103  |
| 0.1%                                | 95 – 105  |
| 100 ppm (mg/kg)                     | 90 – 107  |
| 10 ppm (mg/kg)                      | 80 – 110  |
| 1 ppm (mg/kg)                       | 80 – 110  |
| 100 ppb ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) | 80 – 110  |
| 10 ppb ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )  | 60 – 115  |
| 1 ppb ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )   | 40 – 120  |

$$\% \text{Recovery} = \left( \frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 = \left( \frac{412.03 - 0}{412.20} \right) \times 100 = 99.48\%$$

ดังนั้นจะเห็นได้ว่า %Recovery อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ 80 – 110% แสดงว่าวิธีนี้มี Accuracy  
ดูวิธีการเปลี่ยนหน่วยเพื่อพิจารณาเกณฑ์ยอมรับ %Recovery ได้จากตัวอย่างที่ 4.6

#### 4.1.2 กรณีที่ไม่มี CRM / RM ทำได้ดังนี้

1. เตรียม Sample blank ให้มีปริมาณมากพอสำหรับการวิเคราะห์
2. เตรียม Spiked sample blank โดยการเติมสารมาตรฐานให้มีความเข้มข้นระดับต่างๆ ให้อยู่ในช่วงการใช้งาน (Working range) อย่างน้อย 3 ระดับ (ต่ำ กลาง สูง) และเตรียม ให้มีปริมาณมากพอสำหรับการวิเคราะห์
3. วิเคราะห์ Sample blank 7-10 ซ้ำ
4. วิเคราะห์ Spiked sample blank ระดับละ 7-10 ซ้ำ
5. คำนวณ %Recovery (สูตรที่ 14)

$$\% \text{Recovery} = \left( \frac{C_{Sp} - C_S}{C_A} \right) \times 100$$

เมื่อ  $C_{Sp}$  คือ ความเข้มข้นของสารใน Spiked sample blank

$C_S$  คือ ความเข้มข้นของสารใน Sample blank

$C_A$  คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไป

6. พิจารณาเกณฑ์การยอมรับ %Recovery มีดังนี้
  1. ตาม AOAC Peer-Verified methods Program, Manual on Policies and Procedures (1998) AOAC INTERNATIONAL ได้กำหนดแนวทางการพิจารณาเกณฑ์การยอมรับ %Recovery โดยทั่วไป ตามตารางที่ 3.5
  2. ตาม Codex ได้กำหนดแนวทางการพิจารณาเกณฑ์การยอมรับ %Recovery สำหรับงานด้านสารพิษตกค้าง ยาฆ่าแมลง และยาสัตว์ตกค้างในอาหาร ตามตารางที่ 3.6

#### ตัวอย่างที่ 4.8 การตรวจสอบ Accuracy กรณีที่ไม่มี CRM / RM

การตรวจสอบ Accuracy รายการวิตามินเอในตัวอย่างนม ทำได้โดยวิเคราะห์ Sample blank 7-10 ซ้ำ และ Spiked sample blank อย่างน้อย 3 ระดับ (0.12  $\mu\text{g/mL}$ , 2.39  $\mu\text{g/mL}$  และ 4.77  $\mu\text{g/mL}$ ) ระดับละ 7-10 ซ้ำ ตามวิธีวิเคราะห์ แล้วคำนวณหา %Recovery โดยใช้สูตร

$$\% \text{ Recovery} = \left( \frac{C_{Sp} - C_S}{C_A} \right) \times 100$$

ตารางที่ 3.5

| ความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง  | %Recovery |
|------------------------------|-----------|
| 100%                         | 98 – 102  |
| 10%                          | 98 – 102  |
| 1%                           | 97 – 103  |
| 0.1%                         | 95 – 105  |
| 100 ppm (mg/kg)              | 90 – 107  |
| 10 ppm (mg/kg)               | 80 – 110  |
| 1 ppm (mg/kg)                | 80 – 110  |
| 100 ppb ( $\mu\text{g/kg}$ ) | 80 – 110  |
| 10 ppb ( $\mu\text{g/kg}$ )  | 60 – 115  |
| 1 ppb ( $\mu\text{g/kg}$ )   | 40 – 120  |

และจากตารางที่ 3.5 กำหนดเกณฑ์ %Recovery เท่ากับ 80 – 110% ได้ผลการวิเคราะห์และ %Recovery ดังนี้

ผลการทดสอบ Accuracy ที่ความเข้มข้นต่ำ (0.12  $\mu\text{g/mL}$  ประมาณ 24  $\mu\text{g}/100\text{g}$  การเปลี่ยนหน่วยดูตัวอย่างที่ 4.6)

| ครั้งที่ | Sample<br>( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) | Spiked sample<br>( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) | Conc. std. added<br>( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) | %Recovery |
|----------|-----------------------------------------|------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------|
| 1        | 0.00                                    | 22.34                                          | 23.61                                             | 94.62     |
| 2        | 0.00                                    | 22.68                                          | 23.74                                             | 95.52     |
| 3        | 0.00                                    | 23.38                                          | 23.74                                             | 98.49     |
| 4        | 0.00                                    | 23.31                                          | 23.67                                             | 98.48     |
| 5        | 0.00                                    | 23.38                                          | 23.70                                             | 98.63     |
| 6        | 0.00                                    | 23.47                                          | 23.68                                             | 99.11     |
| 7        | 0.00                                    | 22.97                                          | 23.75                                             | 96.72     |
| 8        | 0.00                                    | 21.99                                          | 23.71                                             | 92.73     |
| 9        | 0.00                                    | 23.31                                          | 23.65                                             | 98.55     |
| 10       | 0.00                                    | 23.38                                          | 23.70                                             | 98.68     |

ผลการทดสอบ Accuracy ที่ความเข้มข้นกลาง (2.39  $\mu\text{g/mL}$  เท่ากับ 480  $\mu\text{g}/100\text{g}$  การเปลี่ยนหน่วยดูตัวอย่างที่ 4.6)

| ครั้งที่ | Sample<br>( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) | Spiked sample<br>( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) | Conc. std. added<br>( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) | %Recovery |
|----------|-----------------------------------------|------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------|
| 1        | 0.00                                    | 458.42                                         | 474.85                                            | 96.54     |
| 2        | 0.00                                    | 459.56                                         | 472.99                                            | 97.16     |
| 3        | 0.00                                    | 454.92                                         | 474.93                                            | 95.79     |
| 4        | 0.00                                    | 486.41                                         | 476.24                                            | 102.13    |
| 5        | 0.00                                    | 465.40                                         | 475.89                                            | 97.80     |
| 6        | 0.00                                    | 448.34                                         | 473.28                                            | 94.73     |
| 7        | 0.00                                    | 458.60                                         | 475.70                                            | 96.41     |
| 8        | 0.00                                    | 462.84                                         | 475.14                                            | 97.41     |
| 9        | 0.00                                    | 453.24                                         | 473.92                                            | 95.64     |
| 10       | 0.00                                    | 474.53                                         | 475.86                                            | 99.72     |

ผลการทดสอบ Accuracy ที่ความเข้มข้นสูง (4.77  $\mu\text{g/mL}$  เท่ากับ 950  $\mu\text{g}/100\text{g}$  การเปลี่ยนหน่วยดูตัวอย่างที่ 4.6)

| ครั้งที่ | Sample<br>( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) | Spiked sample<br>( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) | Conc. std. added<br>( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) | %Recovery |
|----------|-----------------------------------------|------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------|
| 1        | 0.00                                    | 940.22                                         | 942.25                                            | 99.78     |
| 2        | 0.00                                    | 963.95                                         | 944.36                                            | 102.07    |
| 3        | 0.00                                    | 969.24                                         | 947.36                                            | 102.31    |
| 4        | 0.00                                    | 950.85                                         | 946.50                                            | 100.46    |
| 5        | 0.00                                    | 901.18                                         | 948.66                                            | 94.99     |
| 6        | 0.00                                    | 905.48                                         | 945.26                                            | 95.79     |
| 7        | 0.00                                    | 965.33                                         | 950.40                                            | 101.57    |
| 8        | 0.00                                    | 957.08                                         | 947.57                                            | 101.00    |
| 9        | 0.00                                    | 953.06                                         | 945.45                                            | 100.81    |
| 10       | 0.00                                    | 946.37                                         | 948.45                                            | 99.78     |

จากผลการทดสอบพบว่า %Recovery ที่คำนวณได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง มีค่าอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ 80 – 110% แสดงว่าวิธีนี้มี Accuracy

ในการกำหนดเกณฑ์ยอมรับ %Recovery ตามตัวอย่าง จะเห็นได้ว่าตัวอย่างที่ยกมาแสดงมีหน่วยทดสอบเป็น  $\mu\text{g}/100\text{g}$  ซึ่งไม่ตรงกับหน่วยใดของความเข้มข้นของสารในตัวอย่างตามตารางที่ 3.5 ผู้เขียนคู่มือจึงทำการเปลี่ยนหน่วยให้ตรงกับหน่วยในตารางก่อนจะพิจารณาเกณฑ์ยอมรับ ดังนี้ ที่ระดับความเข้มข้น 24  $\mu\text{g}/100\text{g}$  เปลี่ยนให้อยู่ในหน่วย  $\text{mg}/\text{kg}$  จะเท่ากับ 0.24  $\text{mg}/\text{kg}$  ระดับความเข้มข้น 480  $\mu\text{g}/100\text{g}$  เปลี่ยนให้อยู่ในหน่วย  $\text{mg}/\text{kg}$  จะเท่ากับ 4.80  $\text{mg}/\text{kg}$  ระดับความเข้มข้น 950  $\mu\text{g}/100\text{g}$  เปลี่ยนให้อยู่ในหน่วย  $\text{mg}/\text{kg}$

จะเท่ากับ 9.50 mg/kg และเมื่อพิจารณาเกณฑ์ยอมรับตามตารางที่ 3.5 ได้เกณฑ์ %Recovery อยู่ในช่วง 80 – 110%

#### 4.2 Precision วิธีทดสอบ ทำได้ดังนี้

1. วิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำ ในช่วงความเข้มข้นที่ครอบคลุมช่วงการใช้งาน (Working range) วิเคราะห์ความเข้มข้นละ 7-10 ซ้ำ สามารถใช้ข้อมูลชุดเดียวกับการหา Accuracy ได้ โดยใช้ผลการทดสอบ CRM / RM หรือ Spiked sample blank
2. วิเคราะห์อย่างน้อย 3 ความเข้มข้น คือ ความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง
3. คำนวณค่า Standard deviation (SD) ของแต่ละความเข้มข้น
4. คำนวณค่า %Relative standard deviation (%RSD)
5. นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับเกณฑ์ที่กำหนด โดยให้เลือกวิธีใดวิธีหนึ่ง ดังนี้

วิธีที่ 1 เปรียบเทียบกับเกณฑ์ยอมรับที่กำหนดไว้แล้ว เช่น ข้อกำหนดตามกฎหมาย ข้อกำหนดของลูกค้า ตามวิธีมาตรฐานกำหนด เช่น ค่า Repeatability ของห้องปฏิบัติการในแต่ละความเข้มข้น ควรมีค่าน้อยกว่าหรือใกล้เคียงกับค่า Reproducibility ที่วิธีมาตรฐานกำหนด

วิธีที่ 2 ประเมินผลด้วย Horwitz equation

เกณฑ์การยอมรับการประเมินตาม Horwitz equation มีดังนี้

- ค่า %RSD จากการวิเคราะห์ < %RSD<sub>r</sub> ตามตารางที่ 3.7
- ถ้าค่า %RSD จากการวิเคราะห์ > %RSD<sub>r</sub> ให้คำนวณหาค่า HORRAT (สูตรที่ 26)

$$HORRAT = \frac{\%RSD}{\%PRSD}$$

และคำนวณ %RSD ตามสมการ Horwitz equation (สูตรที่ 25)

$$RSD_r = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)}$$

เมื่อ C = Concentration ratio

โดยเกณฑ์การยอมรับ HORRAT ตาม AOAC จากตารางที่ 3.8 คือ HORRAT < 2

ตารางที่ 3.7

| ความเข้มข้นของสาร | Conc. Ratio : C                | Predicted Horwitz |                   |
|-------------------|--------------------------------|-------------------|-------------------|
|                   |                                | %RSD <sub>R</sub> | %RSD <sub>r</sub> |
| 100%              | 1                              | 2                 | 1.3               |
| 10%               | 10 <sup>-1</sup> = 0.1         | 3                 | 1.9               |
| 1%                | 10 <sup>-2</sup> = 0.01        | 4                 | 2.7               |
| 0.1%              | 10 <sup>-3</sup> = 0.001       | 6                 | 3.7               |
| 100 ppm (mg/kg)   | 10 <sup>-4</sup> = 0.0001      | 8                 | 5.3               |
| 10 ppm (mg/kg)    | 10 <sup>-5</sup> = 0.00001     | 11                | 7.3               |
| 1 ppm (mg/kg)     | 10 <sup>-6</sup> = 0.000001    | 16                | 11                |
| 100 ppb (µg/kg)   | 10 <sup>-7</sup> = 0.0000001   | 22                | 15                |
| 10 ppb (µg/kg)    | 10 <sup>-8</sup> = 0.00000001  | 32                | 21                |
| 1 ppb (µg/kg)     | 10 <sup>-9</sup> = 0.000000001 | 45                | 30                |

#### ตัวอย่างที่ 4.9 การตรวจสอบ Precision กรณีใช้ CRM / RM

การตรวจสอบ Precision รายการวิตามินเอในตัวอย่างนม ทำได้โดยวิเคราะห์ตัวอย่าง CRM / RM ตามวิธีวิเคราะห์ 7-10 ซ้ำ แล้วคำนวณหาค่าความเข้มข้นเฉลี่ย ( $\bar{x}$ ), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) %Relative standard deviation (%RSD) และ %Predicted RSD ได้ผลการวิเคราะห์ดังนี้

| ครั้งที่ | วิตามินเอ ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) | วิธีคำนวณ                                                  |
|----------|-----------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| 1        | 412.60                                  | คำนวณ %RSD, %PRSD และ HORRAT                               |
| 2        | 410.50                                  | $\%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$                    |
| 3        | 413.89                                  | $\%RSD = \frac{1.24}{412.03} \times 100 = 0.30$            |
| 4        | 412.22                                  |                                                            |
| 5        | 410.77                                  | $\%PRSD = RSD_r = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)}$          |
| 6        | 411.69                                  |                                                            |
| 7        | 412.56                                  | $\%PRSD = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log 0.0000041)}$          |
| 8        | 413.96                                  | $= 8.53$                                                   |
| 9        | 410.78                                  |                                                            |
| 10       | 411.34                                  | $HORRAT = \frac{\%RSD}{\%PRSD} = \frac{0.30}{8.53} = 0.04$ |
| Average  | 412.03                                  |                                                            |
| SD       | 1.24                                    |                                                            |

การคำนวณผล / ประเมินผล

จากผลการทดสอบ CRM / RM คำนวณ %RSD, %PRSD และ HORRAT ได้ดังนี้

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 = \frac{1.24}{412.03} \times 100 = 0.30$$

$$\%PRSD = RSD_r = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)}$$

โดยค่า C คือ Concentration ratio ในการคำนวณ %PRSD ต้องทำให้ค่า C ไม่มีหน่วย ซึ่งสามารถคำนวณหาได้โดยคูณหรือหารด้วยหน่วยของค่าตัวอย่าง (ตามตารางที่ 3.7)

จากตัวอย่างได้ค่าเท่ากับ  $412.03 \mu\text{g}/100\text{g}$  คำนวณหาค่า C ดังนี้

$$C = \frac{412.03 \mu\text{g}}{100 \text{g}} \times \frac{1 \text{mg}}{1000 \mu\text{g}} \times \frac{1 \text{g}}{1000 \text{mg}} = \frac{412.03}{100000000} = 0.0000041$$

$$\text{และคำนวณหา } 1-0.5 \log C = 1-0.5 \log(0.0000041) = 3.69$$

$$\%PRSD = 0.66 \times 2^{(3.69)} = 8.53$$

$$HORRAT = \frac{\%RSD}{\%PRSD} = \frac{0.30}{8.53} = 0.04$$

จากผลการทดสอบพบว่า ได้ค่า %RSD เท่ากับ 0.30 ซึ่งน้อยกว่า %RSD<sub>r</sub> (จากตารางที่ 3.7 ที่ความเข้มข้นของสาร 10 mg/kg %RSD<sub>r</sub> ได้เท่ากับ 7.3) และเมื่อคำนวณ HORRAT ได้ค่าเท่ากับ 0.04 ซึ่งน้อยกว่า 2 แสดงว่าวิธีนี้มี Precision

ดูวิธีการเปลี่ยนหน่วยเพื่อพิจารณาเกณฑ์ยอมรับ %RSD<sub>r</sub> ได้จากตัวอย่างที่ 4.6

#### ตัวอย่างที่ 4.10 การตรวจสอบ Precision กรณีไม่มี CRM / RM

การตรวจสอบ Precision รายการวิตามินเอในตัวอย่างนม ทำได้โดยวิเคราะห์ Sample blank 7-10 ซ้ำ และ Spiked sample blank อย่างน้อย 3 ระดับ (0.12 µg/mL, 2.39 µg/mL และ 4.77 µg/mL) ระดับละ 7-10 ซ้ำ ตามวิธีวิเคราะห์ แล้วคำนวณหาค่าความเข้มข้นเฉลี่ย ( $\bar{x}$ ), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) %Relative standard deviation (%RSD) และ %Predicted RSD ได้ผลการวิเคราะห์ดังนี้ ผลการทดสอบ Precision ที่ความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง

| ครั้งที่ | Sample (µg/100g)  | Spiked sample (µg/100g) |                 |                | วิธีการคำนวณ                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|----------|-------------------|-------------------------|-----------------|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|          |                   | ความเข้มข้นต่ำ          | ความเข้มข้นกลาง | ความเข้มข้นสูง |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 1        | 0.00              | 22.34                   | 458.42          | 940.22         | คำนวณ %RSD, %PRSD และ HORRAT<br><b>ความเข้มข้นต่ำ</b><br>$\%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$ $= \frac{0.52}{23.02} \times 100 = 2.25$ $\%PRSD = RSD_r = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)}$ $\%PRSD = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log 0.0000002)}$ $= 13.17$ $HORRAT = \frac{\%RSD}{\%PRSD} = \frac{2.25}{4.32} = 0.17$ |
| 2        | 0.00              | 22.68                   | 459.56          | 963.95         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 3        | 0.00              | 23.38                   | 454.91          | 969.24         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 4        | 0.00              | 23.31                   | 486.41          | 950.85         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 5        | 0.00              | 23.38                   | 465.40          | 901.18         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 6        | 0.00              | 23.47                   | 448.34          | 905.48         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 7        | 0.00              | 22.97                   | 458.60          | 965.34         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 8        | 0.00              | 21.99                   | 462.84          | 957.08         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 9        | 0.00              | 23.31                   | 453.24          | 953.06         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 10       | 0.00              | 23.38                   | 474.53          | 946.37         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|          | Avg.              | 23.02                   | 462.23          | 945.28         | <b>ความเข้มข้นกลาง</b><br>$\%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$ $= \frac{11.10}{462.23} \times 100 = 2.40$ $\%PRSD = RSD_r = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)}$ $\%PRSD = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log 0.0000046)}$ $= 8.39$ $HORRAT = \frac{\%RSD}{\%PRSD} = \frac{2.40}{8.39} = 0.29$                               |
|          | SD                | 0.52                    | 11.10           | 23.83          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|          | %RSD              | 2.25                    | 2.40            | 2.52           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|          | %RSD <sub>r</sub> | 11                      | 7.3             | 7.3            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|          |                   |                         |                 |                | <b>ความเข้มข้นสูง</b><br>$\%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$ $= \frac{23.83}{945.28} \times 100 = 2.52$ $\%PRSD = RSD_r = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)}$ $\%PRSD = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log 0.0000095)}$ $= 7.53$ $HORRAT = \frac{\%RSD}{\%PRSD} = \frac{2.52}{7.53} = 0.33$                                |

การคำนวณผล / ประเมินผล

จากผลการทดสอบ Sample blank และ Spiked sample blank คำนวณ %RSD, %PRSD และ HORRAT ได้ดังนี้  
ที่ความเข้มข้นต่ำ

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 = \frac{0.52}{23.02} \times 100 = 2.25$$

$$\%PRSD = RSD_r = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)}$$

โดยค่า C คือ Concentration ratio ในการคำนวณ %PRSD ต้องทำให้ค่า C ไม่มีหน่วย ซึ่งสามารถคำนวณหาได้โดยคูณหรือหารด้วยหน่วยของค่าตัวอย่าง (ตามตารางที่ 3.7)

ค่าตัวอย่างได้เท่ากับ 23.02  $\mu\text{g}/100\text{g}$  คำนวณหาค่า C ดังนี้

$$C = \frac{23.02\text{ug}}{100\text{g}} \times \frac{1\text{mg}}{1000\text{ug}} \times \frac{1\text{g}}{1000\text{mg}} = \frac{23.02}{100000000} = 0.0000002$$

$$\text{และคำนวณหา } 1-0.5 \log C = 1-0.5 \log(0.0000002) = 4.32$$

$$\%PRSD = 0.66 \times 2^{(4.32)} = 13.17$$

$$HORRAT = \frac{\%RSD}{\%PRSD} = \frac{2.25}{13.17} = 0.17$$

ที่ความเข้มข้นกลาง

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 = \frac{11.10}{462.23} \times 100 = 2.40$$

$$\%PRSD = RSD_r = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)}$$

โดยค่า C คือ Concentration ratio ในการคำนวณ %PRSD ต้องทำให้ค่า C ไม่มีหน่วย ซึ่งสามารถคำนวณหาได้โดยคูณหรือหารด้วยหน่วยของค่าตัวอย่าง (ตามตารางที่ 3.7)

ค่าตัวอย่างได้เท่ากับ 462.23  $\mu\text{g}/100\text{g}$  คำนวณหาค่า C ดังนี้

$$C = \frac{462.23\text{ug}}{100\text{g}} \times \frac{1\text{mg}}{1000\text{ug}} \times \frac{1\text{g}}{1000\text{mg}} = \frac{462.23}{100000000} = 0.0000046$$

$$\text{และคำนวณหา } 1-0.5 \log C = 1-0.5 \log(0.0000046) = 3.67$$

$$\%PRSD = 0.66 \times 2^{(3.67)} = 8.39$$

$$HORRAT = \frac{\%RSD}{\%PRSD} = \frac{2.40}{8.39} = 0.29$$



ที่ความเข้มข้นสูง

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 = \frac{23.83}{945.28} \times 100 = 2.52$$

$$\%PRSD = RSD_r = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)}$$

โดยค่า C คือ Concentration ratio ในการคำนวณ %PRSD ต้องทำให้ค่า C ไม่มีหน่วย ซึ่งสามารถคำนวณหาได้โดยคูณหรือหารด้วยหน่วยของค่าตัวอย่าง (ตามตารางที่ 3.7)

ค่าตัวอย่างได้เท่ากับ 945.28  $\mu\text{g}/100\text{g}$  คำนวณหาค่า C ดังนี้

$$C = \frac{945.28\text{ug}}{100\text{g}} \times \frac{1\text{mg}}{1000\text{ug}} \times \frac{1\text{g}}{1000\text{mg}} = \frac{945.28}{10000000} = 0.0000095$$

$$\text{และคำนวณหา } 1-0.5 \log C = 1-0.5 \log(0.0000095) = 3.51$$

$$\%PRSD = 0.66 \times 2^{(3.51)} = 7.53$$

$$HORRAT = \frac{\%RSD}{\%PRSD} = \frac{2.52}{7.53} = 0.33$$

จากผลการทดสอบสรุปได้ดังนี้

- ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ได้ค่า %RSD เท่ากับ 2.25 ซึ่งน้อยกว่า %RSD<sub>r</sub> (จากตารางที่ 3.7 ที่ความเข้มข้นของสาร 1 mg/kg %RSD<sub>r</sub> ได้เท่ากับ 11) และเมื่อคำนวณ HORRAT ได้ค่าเท่ากับ 0.17 ซึ่งน้อยกว่า 2
- ที่ระดับความเข้มข้นกลาง ได้ค่า %RSD เท่ากับ 2.40 ซึ่งน้อยกว่า %RSD<sub>r</sub> (จากตารางที่ 3.7 ที่ความเข้มข้นของสาร 10 mg/kg %RSD<sub>r</sub> ได้เท่ากับ 7.3) และเมื่อคำนวณ HORRAT ได้ค่าเท่ากับ 0.29 ซึ่งน้อยกว่า 2
- ที่ระดับความเข้มข้นสูง ได้ค่า %RSD เท่ากับ 2.52 ซึ่งน้อยกว่า %RSD<sub>r</sub> (จากตารางที่ 3.7 ที่ความเข้มข้นของสาร 10 mg/kg %RSD<sub>r</sub> ได้เท่ากับ 7.3) และเมื่อคำนวณ HORRAT ได้ค่าเท่ากับ 0.33 ซึ่งน้อยกว่า 2

จะเห็นได้ว่า %RSD และค่า HORRAT ที่คำนวณได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง มีค่า %RSD < %RSD<sub>r</sub> และค่า HORRAT < 2 แสดงว่าวิธีนี้มี Precision

ดูวิธีการเปลี่ยนหน่วยเพื่อพิจารณาเกณฑ์ยอมรับ %RSD<sub>r</sub> ได้จากตัวอย่างที่ 4.6

การตรวจสอบ Accuracy และ Precision สามารถทำการตรวจสอบไปพร้อมกันได้ และสามารถใช้อุณหภูมิการทดสอบชุดเดียวกันได้ แตกต่างกันที่เกณฑ์การประเมินผล

นอกจากนี้ผู้จัดทำคู่มือขอยกตัวอย่างการเปรียบเทียบผลระหว่างผู้นักวิเคราะห์ 2 คน เพื่อยืนยันความสามารถของนักวิเคราะห์ทั้งสองคนว่ามีความสามารถในการปฏิบัติงานแทนกันได้ หรือการเปรียบเทียบผลระหว่างวิธีวิเคราะห์ 2 วิธี เพื่อยืนยันว่าวิธีวิเคราะห์ทั้งสองวิธีให้ผลไม่แตกต่างกัน สามารถเลือกใช้ได้ทั้งสองวิธี

#### ตัวอย่างที่ 4.11 การเปรียบเทียบผลระหว่างผู้วิเคราะห์ 2 คน

การเปรียบเทียบผลระหว่างผู้วิเคราะห์ 2 คน ทำได้โดยให้ผู้วิเคราะห์ทั้งสองคนทำการทดสอบตัวอย่างตามวิธีวิเคราะห์ ในระยะเวลาใกล้เคียงกัน แล้วเปรียบเทียบผลโดยใช้สถิติ F-test และ t-test และทดสอบค่าสุดต่าง (Outlier) ด้วย Grubb's test ตัวอย่างดังนี้

ผลการวิเคราะห์รายการวิตามินเอของผู้วิเคราะห์ A และ B ได้ผลวิเคราะห์ดังนี้

| ครั้งที่ | วิตามินเอ ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) |                |
|----------|-----------------------------------------|----------------|
|          | ผู้วิเคราะห์ A                          | ผู้วิเคราะห์ B |
| 1        | 100.50                                  | 98.77          |
| 2        | 95.69                                   | 94.53          |
| 3        | 101.21                                  | 100.66         |
| 4        | 102.69                                  | 101.23         |
| 5        | 99.85                                   | 100.97         |
| 6        | 100.42                                  | 97.54          |
| 7        | 101.36                                  | 96.22          |
| 8        | 105.79                                  | 103.55         |
| 9        | 102.78                                  | 102.43         |
| 10       | 101.55                                  | 100.89         |
| Avg.     | 101.18                                  | 99.68          |
| SD       | 2.56                                    | 2.85           |

จากผลการทดสอบให้ทดสอบค่าสุดต่าง (Outlier) ด้วย Grubb's test ของผู้วิเคราะห์ A และ B โดยเรียงข้อมูลจากน้อยไปมาก แล้วคำนวณ Outlier (สูตรที่ 6) ดังนี้

$$G = \frac{|suspectvalue - \bar{x}|}{s}$$

ตาราง 3.1

| Sample size | Critical value |
|-------------|----------------|
| 3           | 1.155          |
| 4           | 1.481          |
| 5           | 1.715          |
| 6           | 1.887          |
| 7           | 2.020          |
| 8           | 2.126          |
| 9           | 2.215          |
| 10          | 2.290          |

จากตาราง Grubbs 'Test  $n = 10$   $G_{crit.} = 2.29$

เรียงข้อมูลจากน้อยไปมาก

| ครั้งที่ | วิตามินเอ ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) |                | การทดสอบ Outlier                                                                                   |
|----------|-----------------------------------------|----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
|          | ผู้วิเคราะห์ A                          | ผู้วิเคราะห์ B |                                                                                                    |
| 1        | 95.69                                   | 94.53          | จากตาราง Grubbs 'Test $n = 10$ $G_{crit.} = 2.29$                                                  |
| 2        | 99.85                                   | 96.22          | <b>ผู้วิเคราะห์ A</b>                                                                              |
| 3        | 100.42                                  | 97.54          | ค่าน้อยที่สุดที่สงสัย = 95.69 ค่ามากที่สุดที่สงสัย = 105.79                                        |
| 4        | 100.50                                  | 98.77          | $G_{Min} = \frac{ 95.69 - 101.18 }{2.56} = 1.80$ , $G_{Min} < G_{crit.}$ ข้อมูลนี้ไม่เป็น Outlier  |
| 5        | 101.21                                  | 100.66         | $G_{Max} = \frac{ 105.79 - 101.18 }{2.56} = 2.14$ , $G_{Max} < G_{crit.}$ ข้อมูลนี้ไม่เป็น Outlier |
| 6        | 101.36                                  | 100.89         | <b>ผู้วิเคราะห์ B</b>                                                                              |
| 7        | 101.55                                  | 100.97         | ค่าน้อยที่สุดที่สงสัย = 94.53 ค่ามากที่สุดที่สงสัย = 103.55                                        |
| 8        | 102.69                                  | 101.23         | $G_{Min} = \frac{ 94.53 - 99.68 }{2.85} = 1.36$ , $G_{Min} < G_{crit.}$ ข้อมูลนี้ไม่เป็น Outlier   |
| 9        | 102.78                                  | 102.43         | $G_{Max} = \frac{ 103.55 - 99.68 }{2.85} = 1.81$ , $G_{Max} < G_{crit.}$ ข้อมูลนี้ไม่เป็น Outlier  |
| 10       | 105.79                                  | 103.55         |                                                                                                    |

ประเมินผลโดยใช้ F-test และ t-test ดังนี้

| ครั้งที่ | วิตามินเอ ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) |                | การประเมินผล                                                                                     |
|----------|-----------------------------------------|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
|          | ผู้วิเคราะห์ A                          | ผู้วิเคราะห์ B |                                                                                                  |
| 1        | 100.50                                  | 98.77          | พิสูจน์ค่าความแปรปรวนของทั้ง 2 ค่า โดยใช้ F-test                                                 |
| 2        | 95.69                                   | 94.53          | $F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$ โดย $s_1^2 > s_2^2$                                                    |
| 3        | 101.21                                  | 100.66         |                                                                                                  |
| 4        | 102.69                                  | 101.23         | $F = \frac{2.85^2}{2.56^2} = 1.23$                                                               |
| 5        | 99.85                                   | 100.97         | ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $df_1 = 9$ , $df_2 = 9$ ค่า $F_C = 4.03$                              |
| 6        | 100.42                                  | 97.54          | สรุป $F < F_C$ แสดงว่า Variance ของทั้ง 2 ค่า ไม่แตกต่างกัน                                      |
| 7        | 101.36                                  | 96.22          | ทดสอบ t-test                                                                                     |
| 8        | 105.79                                  | 103.55         | $t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$                     |
| 9        | 102.78                                  | 102.43         |                                                                                                  |
| 10       | 101.55                                  | 100.89         | โดย $s^2 = \frac{[(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2]}{(n_1 + n_2 - 2)}$ และ $df = (n_1 + n_2 - 2)$ |
| Avg.     | 101.18                                  | 99.68          | หาค่า s, $s^2 = \frac{[(10 - 1)2.56^2 + (10 - 1)2.85^2]}{(10 + 10 - 2)} = 63.26$                 |
| SD       | 2.56                                    | 2.85           |                                                                                                  |
| n        | 10                                      | 10             | $S = 7.95$                                                                                       |
|          |                                         |                | หาค่า t, $t = \frac{(101.18 - 99.68)}{7.95 \sqrt{\frac{1}{10} + \frac{1}{10}}} = -1.24$          |
|          |                                         |                | ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% $df = 18$ ค่า $t_C = 2.10$                                             |
|          |                                         |                | สรุป ค่า $t < t_C$ แสดงว่าค่าที่ได้จากการผู้วิเคราะห์ A และ ผู้วิเคราะห์ B ไม่แตกต่างกัน         |

ตารางที่ 3.2 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%,  $df_1 = 9$ ,  $df_2 = 9$  ค่า  $F_c$  ได้เท่ากับ 4.03

| $df_2$ | $df_1$ |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |  |  |  |
|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|--|--|
|        | 1      | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 12    | 15    |  |  |  |
| 1      | 161.4  | 199.5 | 215.7 | 224.6 | 230.2 | 234.0 | 236.8 | 238.9 | 240.5 | 241.9 | 243.9 | 245.9 |  |  |  |
| 1      | 647.8  | 799.5 | 864.2 | 899.6 | 921.8 | 937.1 | 948.2 | 956.7 | 963.3 | 968.6 | 976.7 | 984.9 |  |  |  |
| 2      | 38.51  | 39.00 | 39.17 | 39.25 | 39.30 | 39.33 | 39.36 | 39.37 | 39.39 | 39.40 | 39.41 | 39.43 |  |  |  |
| 3      | 17.44  | 16.04 | 15.44 | 15.10 | 14.88 | 14.73 | 14.62 | 14.54 | 14.47 | 14.42 | 14.34 | 14.25 |  |  |  |
| 4      | 12.22  | 10.65 | 9.979 | 9.605 | 9.364 | 9.197 | 9.074 | 8.983 | 8.905 | 8.844 | 8.751 | 8.657 |  |  |  |
| 5      | 10.01  | 8.434 | 7.764 | 7.388 | 7.146 | 6.978 | 6.853 | 6.757 | 6.681 | 6.619 | 6.525 | 6.428 |  |  |  |
| 6      | 8.813  | 7.260 | 6.599 | 6.227 | 5.988 | 5.820 | 5.695 | 5.600 | 5.523 | 5.461 | 5.366 | 5.269 |  |  |  |
| 7      | 8.073  | 6.542 | 5.890 | 5.523 | 5.285 | 5.119 | 4.995 | 4.899 | 4.823 | 4.761 | 4.666 | 4.568 |  |  |  |
| 8      | 7.571  | 6.059 | 5.416 | 5.053 | 4.817 | 4.652 | 4.529 | 4.433 | 4.357 | 4.295 | 4.200 | 4.101 |  |  |  |
| 9      | 7.209  | 5.715 | 5.078 | 4.718 | 4.484 | 4.320 | 4.197 | 4.102 | 4.026 | 3.954 | 3.868 | 3.769 |  |  |  |
| 10     | 6.937  | 5.456 | 4.826 | 4.468 | 4.236 | 4.072 | 3.950 | 3.855 | 3.779 | 3.717 | 3.621 | 3.522 |  |  |  |
| 11     | 6.724  | 5.256 | 4.630 | 4.275 | 4.044 | 3.881 | 3.759 | 3.664 | 3.588 | 3.526 | 3.430 | 3.330 |  |  |  |
| 12     | 6.554  | 5.096 | 4.474 | 4.121 | 3.891 | 3.728 | 3.607 | 3.512 | 3.436 | 3.374 | 3.277 | 3.177 |  |  |  |
| 13     | 6.414  | 4.965 | 4.347 | 3.996 | 3.767 | 3.604 | 3.483 | 3.388 | 3.312 | 3.250 | 3.153 | 3.053 |  |  |  |
| 14     | 6.298  | 4.857 | 4.242 | 3.892 | 3.663 | 3.501 | 3.380 | 3.285 | 3.209 | 3.147 | 3.050 | 2.949 |  |  |  |
| 15     | 6.200  | 4.765 | 4.153 | 3.804 | 3.576 | 3.415 | 3.293 | 3.199 | 3.123 | 3.060 | 2.963 | 2.862 |  |  |  |

$df_1$  = number of degrees of freedom of the numerator and

$df_2$  = number of degrees of freedom of the denominator

พิสูจน์ค่าความแปรปรวนของทั้ง 2 ค่า โดยใช้ F-test ซึ่งได้ F เท่ากับ 1.23

ดังนั้น F จากการคำนวณมีค่าน้อยกว่า  $F_c$  แสดงว่า Variance ของทั้ง 2 ค่า ไม่แตกต่างกัน

ทดสอบ t-test โดยใช้สูตร (สูตรที่ 9 – 11) ซึ่งได้ t เท่ากับ -1.24

ตารางที่ 3.3 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%  $df = 18$  ค่า  $t_c$  ได้เท่ากับ 2.10

| Degree of freedom | Confidence level |       |       |       |
|-------------------|------------------|-------|-------|-------|
|                   | 90%              | 95%   | 98%   | 99%   |
| 1                 | 6.31             | 12.71 | 31.82 | 63.66 |
| 2                 | 2.92             | 4.30  | 6.96  | 9.92  |
| 3                 | 2.35             | 3.18  | 4.54  | 5.84  |
| 4                 | 2.13             | 2.78  | 3.75  | 4.60  |
| 5                 | 2.02             | 2.57  | 3.36  | 4.03  |
| 6                 | 1.94             | 2.45  | 3.14  | 3.71  |
| 7                 | 1.89             | 2.36  | 3.00  | 3.50  |
| 8                 | 1.86             | 2.31  | 2.90  | 3.36  |
| 9                 | 1.83             | 2.26  | 2.8   | 3.25  |
| 10                | 1.81             | 2.23  | 2.76  | 3.17  |
| 12                | 1.78             | 2.18  | 2.68  | 3.05  |
| 14                | 1.76             | 2.14  | 2.62  | 2.98  |
| 16                | 1.75             | 2.12  | 2.58  | 2.92  |
| 18                | 1.73             | 2.10  | 2.55  | 2.88  |
| 20                | 1.72             | 2.09  | 2.53  | 2.85  |
| 30                | 1.70             | 2.04  | 2.46  | 2.75  |
| 50                | 1.68             | 2.01  | 2.40  | 2.68  |
| $\infty$          | 1.64             | 1.96  | 2.33  | 2.58  |

สรุป ค่า t จากการคำนวณน้อยกว่า  $t_c$  แสดงว่าค่าที่ได้จากการผู้วิเคราะห์ A และ ผู้วิเคราะห์ B ไม่แตกต่างกัน

และจากการประเมินโดยใช้ HORRAT พบว่า ผู้วิเคราะห์ A และ ผู้วิเคราะห์ B มีค่า HORRAT  
 ดังนี้  
 ผู้วิเคราะห์ A

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 = \frac{2.56}{101.18} \times 100 = 2.53$$

$$\%PRSD = RSD_r = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)}$$

โดยค่า C คือ Concentration ratio ในการคำนวณ %PRSD ต้องทำให้ค่า C ไม่มีหน่วย ซึ่ง  
 สามารถคำนวณหาได้โดยคูณหรือหารด้วยหน่วยของค่าตัวอย่าง (ตามตารางที่ 3.7)

ค่าตัวอย่างได้เท่ากับ 101.18  $\mu\text{g}/100\text{g}$  คำนวณหาค่า C ดังนี้

$$C = \frac{101.18 \mu\text{g}}{100 \text{g}} \times \frac{1 \text{mg}}{1000 \mu\text{g}} \times \frac{1 \text{g}}{1000 \text{mg}} = \frac{101.18}{100000000} = 0.000001$$

$$\text{และคำนวณหา } 1-0.5 \log C = 1-0.5 \log(0.000001) = 4.00$$

$$\%PRSD = 0.66 \times 2^{(4.00)} = 10.54$$

$$HORRAT = \frac{\%RSD}{\%PRSD} = \frac{2.53}{10.54} = 0.24$$

ผู้วิเคราะห์ B

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 = \frac{2.85}{99.68} \times 100 = 2.86$$

$$\%PRSD = RSD_r = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)}$$

โดยค่า C คือ Concentration ratio ในการคำนวณ %PRSD ต้องทำให้ค่า C ไม่มีหน่วย ซึ่ง  
 สามารถคำนวณหาได้โดยคูณหรือหารด้วยหน่วยของค่าตัวอย่าง (ตามตารางที่ 3.7)

ค่าตัวอย่างได้เท่ากับ 99.68  $\mu\text{g}/100\text{g}$  คำนวณหาค่า C ดังนี้

$$C = \frac{99.68 \mu\text{g}}{100 \text{g}} \times \frac{1 \text{mg}}{1000 \mu\text{g}} \times \frac{1 \text{g}}{1000 \text{mg}} = \frac{99.68}{100000000} = 0.000001$$

$$\text{และคำนวณหา } 1-0.5 \log C = 1-0.5 \log(0.000001) = 4.00$$

$$\%PRSD = 0.66 \times 2^{(4.00)} = 10.57$$

$$HORRAT = \frac{\%RSD}{\%PRSD} = \frac{2.86}{10.57} = 0.27$$

จากผลการประเมิน Accuracy และ Precision ของผู้วิเคราะห์ทั้ง 2 คน สรุปได้ว่า ผู้วิเคราะห์ทั้ง  
 2 คน สามารถปฏิบัติงานแทนกันได้

### ตัวอย่างที่ 4.12 การเปรียบเทียบผลระหว่างวิธีวิเคราะห์ 2 วิธี โดยใช้ F-test, t-test

การเปรียบเทียบผลระหว่างวิธีวิเคราะห์ 2 วิธี เช่น เปรียบเทียบวิธีที่พัฒนากับวิธีมาตรฐาน ทำได้ โดยให้นักวิเคราะห์ทำการทดสอบทั้ง 2 วิธี แล้วเปรียบเทียบผลโดยใช้สถิติ F-test และ t-test ตัวอย่างดังนี้

ผลการทดสอบวิธีที่พัฒนาและวิธีมาตรฐาน

| ครั้งที่ | วิตามินเอ ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) |             | การประเมินผล                                                                                                                                                                                                       |
|----------|-----------------------------------------|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|          | วิธีที่พัฒนา                            | วิธีมาตรฐาน |                                                                                                                                                                                                                    |
| 1        | 45.11                                   | 53.69       | พิสูจน์ค่าความแปรปรวนของทั้ง 2 ค่า โดยใช้ F-test                                                                                                                                                                   |
| 2        | 48.72                                   | 52.88       | $F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$ โดย $s_1^2 > s_2^2$                                                                                                                                                                      |
| 3        | 50.45                                   | 53.21       |                                                                                                                                                                                                                    |
| 4        | 46.63                                   | 51.24       | $F = \frac{s_1^2}{s_2^2} = \frac{2.60^2}{1.25^2} = 4.34$                                                                                                                                                           |
| 5        | 51.89                                   | 54.78       |                                                                                                                                                                                                                    |
| 6        | 50.53                                   | 53.69       | ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $df_1 = 9$ , $df_2 = 9$ ค่า $F_C = 4.03$                                                                                                                                                |
| 7        | 45.36                                   | 55.84       | สรุป $F < F_C$ แสดงว่า Variance ของทั้ง 2 ค่า ไม่แตกต่างกัน                                                                                                                                                        |
| 8        | 51.96                                   | 53.02       | ทดสอบ t-test                                                                                                                                                                                                       |
| 9        | 46.65                                   | 52.61       | $t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$ โดย $df = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{s_1^4}{n_1^2(n_1-1)} + \frac{s_2^4}{n_2^2(n_2-1)}}$ |
| 10       | 49.78                                   | 52.88       |                                                                                                                                                                                                                    |
| Avg.     | 48.71                                   | 53.38       | หาค่า df, $df = \frac{\left(\frac{2.60^2}{10} + \frac{1.25^2}{10}\right)^2}{\frac{2.60^4}{10^2(10-1)} + \frac{1.25^4}{10^2(10-1)}} = 12.95 = \sim 13$                                                              |
| SD       | 2.60                                    | 1.25        | หาค่า t, $t = \frac{(48.71 - 53.38)}{\sqrt{\frac{2.60}{10} + \frac{1.25}{10}}} = -5.12$                                                                                                                            |
| n        | 10                                      | 10          | ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% $df = 13$ ค่า $t_C = 2.16$                                                                                                                                                               |
|          |                                         |             | สรุป ค่า $t < t_C$ แสดงว่าวิธีที่พัฒนาแตกต่างจากวิธีมาตรฐาน                                                                                                                                                        |

ตารางที่ 3.2 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%,  $df_1 = 9$ ,  $df_2 = 9$  ค่า  $F_C$  ได้เท่ากับ 4.03

| $df_2$ | $df_1$ |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |  |  |  |
|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|--|--|
|        | 1      | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 12    | 15    |  |  |  |
| 1      | 161.4  | 199.5 | 215.7 | 224.6 | 230.2 | 234.0 | 236.8 | 238.9 | 240.5 | 241.9 | 243.9 | 245.9 |  |  |  |
| 1      | 647.8  | 799.5 | 864.2 | 899.6 | 921.8 | 937.1 | 948.2 | 956.7 | 963.3 | 968.6 | 976.7 | 984.9 |  |  |  |
| 2      | 38.51  | 39.00 | 39.17 | 39.25 | 39.30 | 39.33 | 39.36 | 39.37 | 39.39 | 39.40 | 39.41 | 39.43 |  |  |  |
| 3      | 17.44  | 16.04 | 15.44 | 15.10 | 14.88 | 14.73 | 14.62 | 14.54 | 14.47 | 14.42 | 14.34 | 14.25 |  |  |  |
| 4      | 12.22  | 10.65 | 9.979 | 9.605 | 9.364 | 9.197 | 9.074 | 8.983 | 8.905 | 8.844 | 8.751 | 8.657 |  |  |  |
| 5      | 10.01  | 8.434 | 7.764 | 7.388 | 7.146 | 6.978 | 6.853 | 6.757 | 6.681 | 6.619 | 6.525 | 6.428 |  |  |  |
| 6      | 8.813  | 7.260 | 6.599 | 6.227 | 5.988 | 5.820 | 5.695 | 5.600 | 5.523 | 5.461 | 5.366 | 5.269 |  |  |  |
| 7      | 8.073  | 6.542 | 5.890 | 5.523 | 5.285 | 5.119 | 4.995 | 4.899 | 4.823 | 4.761 | 4.666 | 4.568 |  |  |  |
| 8      | 7.571  | 6.059 | 5.416 | 5.053 | 4.817 | 4.652 | 4.529 | 4.433 | 4.357 | 4.295 | 4.200 | 4.101 |  |  |  |
| 9      | 7.209  | 5.715 | 5.078 | 4.718 | 4.484 | 4.320 | 4.197 | 4.102 | 4.026 | 3.954 | 3.868 | 3.769 |  |  |  |
| 10     | 6.937  | 5.456 | 4.826 | 4.468 | 4.236 | 4.072 | 3.950 | 3.855 | 3.779 | 3.717 | 3.621 | 3.522 |  |  |  |
| 11     | 6.724  | 5.256 | 4.630 | 4.275 | 4.044 | 3.881 | 3.759 | 3.664 | 3.588 | 3.526 | 3.430 | 3.330 |  |  |  |
| 12     | 6.554  | 5.096 | 4.474 | 4.121 | 3.891 | 3.728 | 3.607 | 3.512 | 3.436 | 3.374 | 3.277 | 3.177 |  |  |  |
| 13     | 6.414  | 4.965 | 4.347 | 3.996 | 3.767 | 3.604 | 3.483 | 3.388 | 3.312 | 3.250 | 3.153 | 3.053 |  |  |  |
| 14     | 6.298  | 4.857 | 4.242 | 3.892 | 3.663 | 3.501 | 3.380 | 3.285 | 3.209 | 3.147 | 3.050 | 2.949 |  |  |  |
| 15     | 6.200  | 4.765 | 4.153 | 3.804 | 3.576 | 3.415 | 3.293 | 3.199 | 3.123 | 3.060 | 2.963 | 2.862 |  |  |  |

$df_1$  = number of degrees of freedom of the numerator and

$df_2$  = number of degrees of freedom of the denominator

พิสูจน์ค่าความแปรปรวนของทั้ง 2 ค่า โดยใช้ F-test ซึ่งได้ F เท่ากับ 4.34  
 ดังนั้น F จากการคำนวณมีค่ามากกว่า  $F_c$  แสดงว่า Variance ของทั้ง 2 ค่า แตกต่างกัน ทดสอบ  
 t-test โดยใช้สูตร (สูตรที่ 12 – 13) ซึ่งได้ t เท่ากับ -5.12

ตารางที่ 3.3 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% df = 13 ค่า  $t_c$  ได้เท่ากับ 2.16

| Degree of freedom | Confidence level |       |       |       |
|-------------------|------------------|-------|-------|-------|
|                   | 80%              | 95%   | 98%   | 99%   |
| 1                 | 6.31             | 12.71 | 31.82 | 63.66 |
| 2                 | 2.92             | 4.30  | 6.96  | 9.92  |
| 3                 | 2.35             | 3.18  | 4.54  | 5.84  |
| 4                 | 2.13             | 2.78  | 3.75  | 4.60  |
| 5                 | 2.02             | 2.57  | 3.36  | 4.03  |
| 6                 | 1.94             | 2.45  | 3.14  | 3.71  |
| 7                 | 1.89             | 2.36  | 3.00  | 3.50  |
| 8                 | 1.86             | 2.31  | 2.90  | 3.36  |
| 9                 | 1.83             | 2.26  | 2.8   | 3.25  |
| 10                | 1.81             | 2.23  | 2.76  | 3.17  |
| 12                | 1.78             | 2.18  | 2.68  | 3.05  |
| 14                | 1.76             | 2.14  | 2.62  | 2.98  |
| 16                | 1.75             | 2.12  | 2.58  | 2.92  |
| 18                | 1.73             | 2.10  | 2.55  | 2.88  |
| 20                | 1.72             | 2.09  | 2.53  | 2.85  |
| 30                | 1.70             | 2.04  | 2.46  | 2.75  |
| 50                | 1.68             | 2.01  | 2.40  | 2.68  |
| $\infty$          | 1.64             | 1.96  | 2.33  | 2.58  |

ค่า t จากการคำนวณมากกว่า  $t_c$  แสดงว่าวิธีที่พัฒนาแตกต่างจากวิธีมาตรฐาน

#### ตัวอย่างที่ 4.13 การเปรียบเทียบผลระหว่างวิธีวิเคราะห์ 2 วิธี

การเปรียบเทียบผลระหว่างวิธีวิเคราะห์ 2 วิธี เช่น เปรียบเทียบวิธีที่ปรับปรุงกับวิธีมาตรฐาน ทำได้  
 โดยให้นักวิเคราะห์ทำการทดสอบทั้ง 2 วิธี แล้วเปรียบเทียบผลโดยใช้สถิติ t-test ตัวอย่างดังนี้

ผลการทดสอบวิธีที่ปรับปรุงและวิธีมาตรฐาน

| ครั้งที่ | วิตามินเอ ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) |             | Difference = d |
|----------|-----------------------------------------|-------------|----------------|
|          | วิธีที่ปรับปรุง                         | วิธีมาตรฐาน |                |
| 1        | 21.69                                   | 23.22       | 1.53           |
| 2        | 82.35                                   | 84.54       | 2.19           |
| 3        | 245.21                                  | 243.69      | -1.52          |
| 4        | 404.79                                  | 399.85      | -4.94          |
| 5        | 568.51                                  | 571.32      | 2.81           |
| 6        | 803.56                                  | 800.48      | -3.08          |
|          |                                         | $\bar{d}$   | -0.50          |
|          |                                         | $S_d$       | 3.15           |

เปรียบเทียบผลโดยใช้ Paired t-test (สูตรที่ 14)

$$t = \frac{\bar{d}}{\left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)} = \frac{-0.50}{\left(\frac{3.15}{\sqrt{6}}\right)} = -0.39$$

จากตารางที่ 3.3 ค่า  $t_c$  ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%  $df = 5$  ( $df = n-1$ ) ได้เท่ากับ 2.57  
ค่า  $t$  จากการคำนวณมีค่าน้อยกว่า  $t_c$  แสดงว่า วิธีที่ปรับปรุงไม่แตกต่างจากวิธีมาตรฐาน

## 5. Matrix Effects

วิธีทดสอบ

: ทำการวิเคราะห์ Spiked sample blank และสารมาตรฐาน 3 ระดับ ความเข้มข้น (อยู่ในช่วง Linear range : ต่ำ กลาง สูง) วิเคราะห์ตามวิธี วิเคราะห์วิตามินเอระดับละ 7-10 ซ้ำ พิสูจน์ Matrix Effects โดย Plot กราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (บนแกน x) กับ ความเข้มข้นของ Spiked sample blank (บนแกน y) ทดสอบความเป็น เส้นตรงและทดสอบว่าช่วงความเชื่อมั่น (confidential interval : CI) ของ slope คลุม 1 หรือไม่ ถ้าคลุมแสดงว่าไม่มี Matrix Effects โดยใช้ สูตรคำนวณดังนี้

- สำหรับ Intercept :  $CI_{intercept} = a \pm t_{(n-2)}s_a$

$$\text{เมื่อ } s_a = s_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n(x_i - \bar{x})^2}}$$

$s_a$  = standard deviation ของ intercept

- สำหรับ Slope :  $CI_{slope} = b \pm t_{(n-2)}s_b$

$$\text{เมื่อ } s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{และ}$$

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{(n-2)}}$$

$s_b$  = standard deviation ของ slope

เกณฑ์ยอมรับ : ถ้า Intercept ไม่แตกต่างจากศูนย์ (0) และ slope ไม่แตกต่างจาก 1 แสดงว่าไม่มี Matrix Effects



#### ตัวอย่างที่ 4.14 Matrix Effects

การตรวจสอบ Matrix Effects รายการวิตามินเอในตัวอย่างนม ทำได้โดยวิเคราะห์ Spiked sample blank และสารมาตรฐาน 3 ระดับความเข้มข้น (0.12  $\mu\text{g/mL}$ , 2.39  $\mu\text{g/mL}$  และ 4.77  $\mu\text{g/mL}$ ) ระดับละ 7-10 ซ้ำ ตามวิธีวิเคราะห์ Plot กราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (บนแกน x) กับความเข้มข้นของ Spiked sample blank (บนแกน y) ทดสอบความเป็นเส้นตรงและทดสอบว่าช่วงความเชื่อมั่น (confidence interval : CI) ของ slope กลุ่ม 1 หรือไม่ ซึ่งได้ผลการวิเคราะห์ดังนี้

ผลการวิเคราะห์สารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง

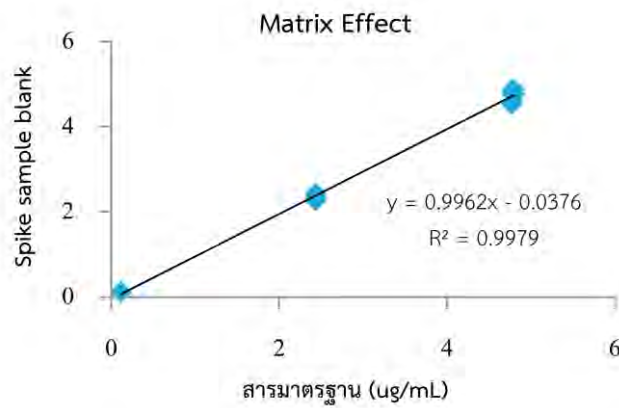
| ครั้งที่ | สารมาตรฐาน ( $\mu\text{g/mL}$ ) |                 |                |
|----------|---------------------------------|-----------------|----------------|
|          | ความเข้มข้นต่ำ                  | ความเข้มข้นกลาง | ความเข้มข้นสูง |
| 1        | 0.1190                          | 2.4505          | 4.8056         |
| 2        | 0.1184                          | 2.4394          | 4.7866         |
| 3        | 0.1189                          | 2.4354          | 4.8022         |
| 4        | 0.1173                          | 2.4380          | 4.7845         |
| 5        | 0.1186                          | 2.4383          | 4.7734         |
| 6        | 0.1174                          | 2.4400          | 4.7848         |
| 7        | 0.1176                          | 2.4398          | 4.7861         |
| 8        | 0.1186                          | 2.4396          | 4.7824         |
| 9        | 0.1176                          | 2.4453          | 4.7732         |
| 10       | 0.1171                          | 2.4434          | 4.7838         |

ผลการวิเคราะห์ Spiked sample blank ที่ความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง

| ครั้งที่ | Spiked sample blank ( $\mu\text{g/mL}$ ) |                 |                |
|----------|------------------------------------------|-----------------|----------------|
|          | ความเข้มข้นต่ำ                           | ความเข้มข้นกลาง | ความเข้มข้นสูง |
| 1        | 0.1129                                   | 2.3038          | 4.7625         |
| 2        | 0.1140                                   | 2.3187          | 4.8718         |
| 3        | 0.1175                                   | 2.2858          | 4.8830         |
| 4        | 0.1175                                   | 2.4373          | 4.7948         |
| 5        | 0.1177                                   | 2.3338          | 4.5339         |
| 6        | 0.1183                                   | 2.2607          | 4.5720         |
| 7        | 0.1154                                   | 2.3006          | 4.8478         |
| 8        | 0.1106                                   | 2.3246          | 4.8207         |
| 9        | 0.1176                                   | 2.2823          | 4.8113         |
| 10       | 0.1177                                   | 2.3797          | 4.7623         |

การคำนวณผล / ประเมินผล

จากผลการทดสอบนำมา Plot กราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (บนแกน x) กับความเข้มข้นของ Spiked sample blank (บนแกน y) ได้ดังนี้



คำนวณหาค่า Intercept (a) = -0.0376 และ Slope (b) = 0.9962

จากนั้นคำนวณหาค่า  $Cl_{intercept}$ ,  $Cl_{slope}$  ดังนี้

| Std (x) | Sample (y) | $(x_i - \bar{x})^2$ | $\hat{y}$  | $(y - \hat{y})^2$ | $x^2$    |
|---------|------------|---------------------|------------|-------------------|----------|
| 0.1190  | 0.1129     | 5.4265              | 0.0809     | 0.0010            | 0.0141   |
| 0.1184  | 0.1140     | 5.4291              | 0.0803     | 0.0011            | 0.0140   |
| 0.1189  | 0.1175     | 5.4266              | 0.0809     | 0.0013            | 0.0141   |
| 0.1173  | 0.1175     | 5.4340              | 0.0793     | 0.0015            | 0.0138   |
| 0.1186  | 0.1177     | 5.4282              | 0.0805     | 0.0014            | 0.0141   |
| 0.1174  | 0.1183     | 5.4338              | 0.0793     | 0.0015            | 0.0138   |
| 0.1176  | 0.1154     | 5.4327              | 0.0796     | 0.0013            | 0.0138   |
| 0.1186  | 0.1106     | 5.4280              | 0.0806     | 0.0009            | 0.0141   |
| 0.1176  | 0.1176     | 5.4328              | 0.0795     | 0.0014            | 0.0138   |
| 0.1171  | 0.1177     | 5.4351              | 0.0790     | 0.0015            | 0.0137   |
| 2.4505  | 2.3038     | 0.0000              | 2.4036     | 0.0100            | 6.0050   |
| 2.4394  | 2.3187     | 0.0001              | 2.3926     | 0.0055            | 5.9509   |
| 2.4354  | 2.2858     | 0.0002              | 2.3886     | 0.0106            | 5.9311   |
| 2.4380  | 2.4373     | 0.0001              | 2.3912     | 0.0021            | 5.9440   |
| 2.4383  | 2.3338     | 0.0001              | 2.3914     | 0.0033            | 5.9452   |
| 2.4400  | 2.2607     | 0.0001              | 2.3931     | 0.0175            | 5.9534   |
| 2.4398  | 2.3006     | 0.0001              | 2.3930     | 0.0085            | 5.9528   |
| 2.4396  | 2.3246     | 0.0001              | 2.3928     | 0.0046            | 5.9517   |
| 2.4453  | 2.2823     | 0.0000              | 2.3985     | 0.0135            | 5.9796   |
| 2.4434  | 2.3797     | 0.0000              | 2.3965     | 0.0003            | 5.9702   |
| 4.8056  | 4.7625     | 5.5560              | 4.7497     | 0.0002            | 23.0933  |
| 4.7866  | 4.8718     | 5.4670              | 4.7309     | 0.0199            | 22.9114  |
| 4.8022  | 4.8830     | 5.5403              | 4.7464     | 0.0187            | 23.0612  |
| 4.7845  | 4.7948     | 5.4572              | 4.7288     | 0.0044            | 22.8914  |
| 4.7734  | 4.5339     | 5.4056              | 4.7177     | 0.0338            | 22.7855  |
| 4.7848  | 4.5720     | 5.4587              | 4.7291     | 0.0247            | 22.8945  |
| 4.7861  | 4.8478     | 5.4645              | 4.7303     | 0.0138            | 22.9064  |
| 4.7824  | 4.8207     | 5.4476              | 4.7267     | 0.0088            | 22.8716  |
| 4.7732  | 4.8113     | 5.4046              | 4.7175     | 0.0088            | 22.7835  |
| 4.7838  | 4.7623     | 5.4541              | 4.7281     | 0.0012            | 22.8851  |
| Avg. =  | 2.4484     | $\Sigma =$ 108.9632 | $\Sigma =$ | 0.2230            | 288.8074 |

การคำนวณค่า  $CI_{\text{intercept}}$  ทำได้ดังนี้

$$CI_{\text{intercept}} = a \pm t_{(n-2)} S_a \quad \text{เมื่อ} \quad S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n(x_i - \bar{x})^2}}$$

$S_a$  = standard deviation ของ intercept

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{(n-2)}} = \sqrt{\frac{0.2230}{(30-2)}} = 0.0892$$

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2}} = 0.0892 \sqrt{\frac{288.8074}{30 \times 108.9632}} = 0.0265$$

$$\begin{aligned} CI \text{ of intercept} &= a \pm (t_{(n-2)} \times S_a), & a &= -0.0376 & S_a &= 0.0265 \\ &= -0.0376 \pm (2.10 \times 0.0265) \\ &= -0.0376 \pm 0.0557 \\ &= -0.0933 \pm 0.0181 \end{aligned}$$

การคำนวณค่า  $CI_{\text{slope}}$  ทำได้ดังนี้

$$CI_{\text{slope}} = b \pm t_{(n-2)} S_b \quad \text{เมื่อ} \quad S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{และ} \quad S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{(n-2)}}$$

$S_b$  = standard deviation ของ slope

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{(n-2)}} = \sqrt{\frac{0.2230}{(30-2)}} = 0.0892$$

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}} = \frac{0.0892}{\sqrt{108.9632}} = 0.0085$$

$$\begin{aligned} CI \text{ of Slope} &= b \pm (t_{(n-2)} \times S_b), & b &= 0.9962 & S_b &= 0.0085 \\ &= 0.9962 \pm (2.10 \times 0.0085) \\ &= 0.9962 \pm 0.0180 \\ &= 0.9783 \pm 0.0142 \end{aligned}$$

จากการคำนวณค่า  $CI_{\text{intercept}}$  และ  $CI_{\text{slope}}$  พบว่า ค่า  $CI_{\text{intercept}}$  ผ่าน 0 และ  $CI_{\text{slope}}$  ครอบคลุม 1 ดังนั้นจากการ Plot กราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (บนแกน x) กับความเข้มข้นของ Spiked sample blank พบว่า intercept ไม่แตกต่างจากศูนย์ (0) และ slope ไม่แตกต่างจาก 1 แสดงว่าไม่มี Matrix Effects

การตรวจสอบ Matrix Effects สามารถทำการตรวจสอบไปพร้อมกับ Accuracy และ Precision ได้

**ขั้นตอนที่ 9** ตรวจสอบผลการประเมิน หัวหน้าห้องปฏิบัติการเคมี หรือผู้ที่ได้รับมอบหมายทำการ ตรวจสอบผลการประเมินว่าผ่านเกณฑ์ที่กำหนดไว้หรือไม่ หากพบว่ามีคุณลักษณะอย่างใดอย่างหนึ่งไม่ผ่าน เกณฑ์การยอมรับ ควรพิจารณาหาสาเหตุที่ทำให้เกิดความผิดพลาด และอาจจำเป็นต้องตรวจสอบความใช้ได้ ของวิธีใหม่ หรือปรับเปลี่ยนวิธีวิเคราะห์ หรือปรับเกณฑ์การยอมรับใหม่

เมื่อผลการประเมินคุณลักษณะของวิธีหวัข้อใดไม่ผ่านเกณฑ์ ยังไม่ควรสรุปว่าวิธีที่เลือกนี้ไม่เหมาะสม ผู้ปฏิบัติงานควรทบทวนในประเด็นต่างๆ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ผลการประเมินไม่ผ่านเกณฑ์ เช่น เกิด การสูญหายในระหว่างการวิเคราะห์ การใช้สารมาตรฐานที่ไม่ได้คุณภาพหรือสารหมดอายุ การเตรียมกราฟ มาตรฐานไม่ดี เกิดความผิดพลาดในขั้นตอนการวิเคราะห์ เตรียมสารผิด เติมสารผิด ทำตัวอย่างระหว่างการ สกัด เป็นต้น รวมทั้งสาเหตุที่เกิดจากเครื่องมือ และอุปกรณ์ต่างๆ เช่น ใช้เครื่องมือที่มีค่าความละเอียดของ เครื่องมือไม่เหมาะสมกับสารที่ต้องการวัด เครื่องมือมีค่าความผิดพลาดเกินเกณฑ์ยอมรับที่กำหนดไว้ เป็นต้น เมื่อพบว่าไม่ใช่จากสาเหตุดังกล่าว จึงจะสรุปว่าวิธีวิเคราะห์นี้ไม่เหมาะสม

**ขั้นตอนที่ 10** สรุปผล และจัดทำรายงาน หัวหน้าห้องปฏิบัติการเคมี หรือผู้ที่ได้รับมอบหมายทำการ สรุปผลการวิเคราะห์ โดยสรุปผลการวิเคราะห์ทั้งหมด วิธีที่ใช้ ชนิดตัวอย่างที่ใช้ คุณลักษณะวิธีที่ตรวจสอบ เช่น ค่าที่ได้ ผลการคำนวณ และผลการประเมิน ผ่านหรือไม่ผ่านเกณฑ์ยอมรับ ช่วงที่ทดสอบได้ จัดทำเป็น รายงานฉบับสมบูรณ์ และมีข้อความที่สรุปว่าวิธีเหมาะสมต่อการนำไปใช้งานตามวัตถุประสงค์หรือไม่ รวมทั้ง ชี้ดจำกัดอื่นๆ ของวิธีที่อาจมี และควรระบุรายชื่อผู้วิเคราะห์ ผู้ทบทวน และช่วงระยะเวลาที่ดำเนินการ ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

## บทที่ 5

### ปัญหาอุปสรรคและแนวทางแก้ปัญหาและการพัฒนา

จากประสบการณ์การปฏิบัติงานของผู้จัดทำคู่มือตลอดระยะเวลากว่า 6 ปีที่ผ่านมา ผู้จัดทำคู่มือได้ใช้ผังก้างปลาในวิเคราะห์ปัญหาอุปสรรคในการปฏิบัติงาน พร้อมแนวทางการแก้ปัญหา ข้อเสนอแนะ และแนวทางการพัฒนางาน ซึ่งอธิบายได้ดังต่อไปนี้

#### 5.1 ปัญหาอุปสรรคในการปฏิบัติงาน และแนวทางการแก้ปัญหา

ตารางที่ 5.1 ปัญหาอุปสรรคในการปฏิบัติงาน และแนวทางการแก้ปัญหา

| ที่ | ขั้นตอนการปฏิบัติงาน | ผู้ที่เกี่ยวข้อง                                  | ปัญหาอุปสรรค                                                                                                                                                                                                                          | แนวทางการแก้ปัญหา                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-----|----------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1   | กำหนดวัตถุประสงค์    | หัวหน้าห้องปฏิบัติการเคมี                         | กำหนดวัตถุประสงค์ไม่ชัดเจน หรือกำหนดวัตถุประสงค์ได้ไม่ครอบคลุมเป้าหมายไม่ชัดเจน ทำให้เกิดความล่าช้า ต้องกลับมาวางแผนการดำเนินงานในขั้นตอนถัดไปใหม่                                                                                    | - กำหนดวัตถุประสงค์ให้ชัดเจน ครอบคลุมเป้าหมายที่ต้องการ โดยต้องทราบเป้าหมายที่แน่ชัดว่าต้องการทำไปเพื่ออะไร อาจใช้ข้อมูลรายการวิเคราะห์ ผลการวิเคราะห์ ประเภทตัวอย่างที่ส่งวิเคราะห์ย้อนหลังของผู้รับบริการ ข้อมูลการปฏิบัติงานของเจ้าหน้าที่ผู้วิเคราะห์ มาประกอบในการกำหนดเป้าหมายและวัตถุประสงค์                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 2   | เลือกวิธีวิเคราะห์   | หัวหน้าห้องปฏิบัติการเคมี หรือผู้ที่ได้รับมอบหมาย | - ไม่ทราบว่าวิธีวิเคราะห์ที่เลือกเป็นวิธีประเภทใด<br>- เลือกวิธีไม่เหมาะสมกับประเภทตัวอย่างและปริมาณที่ต้องการวิเคราะห์<br><br>- ไม่สามารถหาวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสมกับประเภทตัวอย่างที่ต้องการได้<br>- เลือกใช้วิธีที่ไม่เป็นปัจจุบัน | - ศึกษาประเภทของวิธีวิเคราะห์ว่ามีอะไรบ้าง<br><br>- เลือกวิธีให้เหมาะสมกับประเภทตัวอย่างและปริมาณที่ต้องการวิเคราะห์ โดยสามารถศึกษาได้จากเอกสารวิธีวิเคราะห์ซึ่งจะมีการระบุประเภทของตัวอย่างและช่วงปริมาณที่วิเคราะห์ได้<br>- ศึกษาหาความรู้เพิ่มเติมเกี่ยวกับวิธีวิเคราะห์ต่างๆ หลักการวิเคราะห์แต่ละรายการ เพื่อที่จะเลือกใช้วิธีได้ถูกต้อง ลดความผิดพลาดจากการเลือกใช้วิธีไม่เหมาะสมกับประเภทตัวอย่างและปริมาณที่ต้องการวิเคราะห์<br>- ศึกษาวิธีวิเคราะห์หลายๆ วิธี เลือกวิธีที่ใกล้เคียง นำมาตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี หรือพัฒนาวิธีขึ้นเองแล้วตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีก่อนนำมาใช้<br>- เลือกใช้วิธีที่เป็นปัจจุบัน โดยต้องติดตามข่าวสารเกี่ยวกับวิธีวิเคราะห์ อยู่เสมอว่ามี การปรับปรุงแก้ไขวิธีหรือไม่ |

| ที่ | ขั้นตอนการปฏิบัติงาน          | ผู้ที่เกี่ยวข้อง                                  | ปัญหาอุปสรรค                                                                                                                                                                                                                                                                             | แนวทางการแก้ปัญหา                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-----|-------------------------------|---------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3   | กำหนดขอบเขตคุณลักษณะวิธี      | หัวหน้าห้องปฏิบัติการเคมี                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>- กำหนดขอบเขตคุณลักษณะวิธีที่ต้องตรวจสอบความใช้ได้ไม่ครบถ้วน หรือ กำหนดขอบเขตคุณลักษณะวิธีเกินจำเป็น เช่น ตรวจสอบ LOD LOQ ของการวิเคราะห์สารที่มีปริมาณมาก</li> <li>- กำหนดเกณฑ์การยอมรับและสถิติที่ใช้ในการตรวจสอบคุณลักษณะไม่เหมาะสม</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- ต้องทราบวัตถุประสงค์ วิธีวิเคราะห์ที่เลือกใช้ ปริมาณสารที่ต้องการวิเคราะห์ เพื่อที่จะได้กำหนดขอบเขตคุณลักษณะวิธีที่ต้องตรวจสอบความใช้ได้ ได้ถูกต้อง</li> <li>- เลือกใช้สถิติและกำหนดเกณฑ์ยอมรับให้เหมาะสม โดยสามารถศึกษาได้จากเอกสารอ้างอิงต่างๆ ผู้ปฏิบัติงานควรมีความรู้ด้านสถิติและสามารถนำมาประยุกต์ใช้งานได้ เมื่อเกณฑ์การยอมรับไม่เหมาะสมให้ตรวจสอบข้อมูลผลการวิเคราะห์ย้อนหลังเพื่อกำหนดเกณฑ์การยอมรับใหม่ให้เหมาะสมได้</li> <li>- ตรวจสอบข้อมูลผลการวิเคราะห์ย้อนหลังเพื่อกำหนดเกณฑ์การยอมรับให้เหมาะสมกับการวิเคราะห์รายการอื่นๆ ได้</li> </ul> |
| 4   | กำหนดความต้องการทางด้านเทคนิค | หัวหน้าห้องปฏิบัติการเคมี หรือผู้ที่ได้รับมอบหมาย | ความล่าช้าในการจัดหาเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี เนื่องจากส่วนใหญ่ต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ และในการจัดซื้อเครื่องมือวิเคราะห์ขั้นสูงซึ่งจัดเป็นครุภัณฑ์ต้องมีการตั้งงบประมาณล่วงหน้าอย่างน้อย 1 ปี                                                                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>- เมื่อทราบว่าต้องใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีอะไรบ้างให้วางแผนการดำเนินการไว้ล่วงหน้า</li> <li>- ตรวจสอบข้อมูลรายการวิเคราะห์ย้อนหลัง เพื่อใช้ประกอบในการวางแผนว่าต้องการตรวจสอบความใช้ได้ของรายการวิเคราะห์ใดในครั้งถัดไป ต้องใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีอะไรบ้าง เพื่อวางแผนจัดซื้อและตั้งงบประมาณล่วงหน้า</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                          |
| 5   | จัดทำเอกสารวิธีวิเคราะห์      | หัวหน้าห้องปฏิบัติการเคมี หรือผู้ที่ได้รับมอบหมาย | รายละเอียดของเอกสารไม่ครบถ้วน เช่น ระบุขอบข่ายไม่ครอบคลุมประเภทตัวอย่าง การเตรียมสารเคมีและขั้นตอนการทดสอบไม่ละเอียด สูตรการคำนวณไม่ถูกต้อง เป็นต้น                                                                                                                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>- ต้องระบุรายละเอียดของเอกสารให้ครบถ้วน โดยเฉพาะขั้นตอนการเตรียมสารเคมี และขั้นตอนการทดสอบ ต้องเขียนให้ละเอียดที่สุด เพื่อป้องกันความผิดพลาดที่เกิดจากการเตรียมสารเคมีผิด และขั้นตอนการทดสอบไม่ถูกต้อง และตรวจสอบสูตรที่ใช้ในการคำนวณว่าถูกต้อง</li> <li>- ให้เจ้าหน้าที่ในหน่วยงานอ่านทบทวนเอกสารที่จัดทำเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของเอกสารอีกครั้ง</li> <li>- ทบทวนเอกสารประจำปี เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของเอกสารและแก้ไขปรับปรุงให้เป็นปัจจุบันอยู่เสมอ</li> </ul>                                                                                        |

| ที่ | ขั้นตอนการปฏิบัติงาน  | ผู้ที่เกี่ยวข้อง                                 | ปัญหาอุปสรรค                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | แนวทางการแก้ปัญหา                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|-----|-----------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 6   | เตรียมวัสดุอ้างอิง    | หัวหน้าห้องปฏิบัติการเคมีหรือผู้ที่ได้รับมอบหมาย | <ul style="list-style-type: none"> <li>- CRM / RM ที่มี Matrix ชนิดเดียวหรือใกล้เคียงกับตัวอย่างที่เราสนใจและมีค่าอยู่ในช่วงที่ต้องการ หาได้ค่อนข้างยาก มีราคาแพง และใช้ระยะเวลาในการสั่งซื้อค่อนข้างนาน เนื่องจากต้องสั่งจากต่างประเทศ</li> <li>- Sample blank ที่มีสารที่สนใจศึกษาอยู่ในปริมาณน้อยๆ หรือไม่มีเลย หาได้ค่อนข้างยาก</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- ถ้าหา CRM / RM ที่มี Matrix ชนิดเดียวกับตัวอย่างและมีค่าอยู่ในช่วงที่ต้องการไม่ได้ ให้เลือกใช้ CRM / RM ที่มี Matrix และช่วงค่าใกล้เคียงที่สุด และวางแผนจัดซื้อให้มีปริมาณเพียงพอกับที่ต้องการใช้</li> <li>- ถ้าหา Sample blank ที่ไม่มีสารที่เรานำมาศึกษาไม่ได้ ให้เลือกใช้ Sample blank ที่มีค่าปริมาณน้อยที่สุดที่หาได้ ในการเลือก Sample blank สามารถศึกษาข้อมูลปริมาณสารที่มีในตัวอย่างจากเอกสารทางวิชาการต่างๆ ได้</li> <li>- รวบรวมปริมาณสารที่มีใน Sample blank เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการเลือกใช้ Sample blank ในครั้งถัดไป</li> </ul> |
| 7   | ตรวจสอบคุณลักษณะเฉพาะ | ผู้ที่ได้รับมอบหมาย                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>- ผู้ปฏิบัติงานขาดความรู้ความเข้าใจในขั้นตอนการตรวจสอบคุณลักษณะเฉพาะ ไม่ทราบว่าต้องทำอะไร</li> <li>- ขาดความชำนาญและประสบการณ์ในการวิเคราะห์</li> <li>- ขาดความชำนาญและประสบการณ์ในการใช้เครื่องมือวัดและการแปลผลจากเครื่องมือวัด</li> </ul>                                                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>- อบรมผู้ปฏิบัติงานให้มีความรู้ความเข้าใจเรื่องการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีและให้ปฏิบัติงานจริง</li> <li>- อบรมเรื่องวิธีการวิเคราะห์ให้กับผู้ปฏิบัติงาน และให้ฝึกปฏิบัติจริงจนมีความเชี่ยวชาญสามารถปฏิบัติงานได้อย่างถูกต้อง</li> <li>- อบรมเรื่องวิธีการใช้เครื่องมือวัดเครื่องนั้นๆ รวมถึงวิธีการแปลผลจากเครื่องมือวัด และให้ฝึกการใช้งานเครื่องจริงจนสามารถใช้งานได้คล่อง</li> </ul>                                                                                                                                                        |
| 8   | คำนวณผล และประเมินผล  | หัวหน้าห้องปฏิบัติการเคมีหรือผู้ที่ได้รับมอบหมาย | <ul style="list-style-type: none"> <li>- ขาดความรู้ทางด้านสถิติ</li> <li>- เลือกใช้สถิติในการคำนวณผลไม่ถูกต้อง</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>- อบรมผู้ปฏิบัติงานให้มีความรู้เข้าใจเรื่องสถิติ และสามารถนำมาประยุกต์การใช้งานได้</li> <li>- ศึกษาให้เข้าใจถึงสถิติแต่ละตัวและการใช้งาน เพื่อจะได้เลือกใช้ได้อย่างถูกต้อง</li> <li>- ตรวจสอบสูตรที่ใช้ในการคำนวณเป็นระยะๆ เช่น ทุก 3 เดือน โดยเฉพาะสูตรคำนวณที่ต้องใช้โปรแกรม Excel เพื่อตรวจสอบว่าสูตรที่ใช้ยังมีความถูกต้อง</li> </ul>                                                                                                                                                                                                      |



| ที่ | ขั้นตอนการปฏิบัติงาน  | ผู้ที่เกี่ยวข้อง                                  | ปัญหาอุปสรรค                                                                                                   | แนวทางการแก้ปัญหา                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-----|-----------------------|---------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                       |                                                   | - คำนวณผลผลิต                                                                                                  | - ตรวจสอบสูตรการคำนวณ โดยเฉพาะเมื่อใช้โปรแกรม Excel ในการคำนวณ ตรวจสอบดูว่ามีการเลือกใช้ cell ได้อย่างถูกต้อง และให้เจ้าหน้าที่ในหน่วยงาน ตรวจสอบผลการคำนวณอีกครั้ง                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 9   | ตรวจสอบผลการประเมิน   | หัวหน้าห้องปฏิบัติการเคมี หรือผู้ที่ได้รับมอบหมาย | ผลการประเมินไม่ผ่านเกณฑ์ เนื่องจาก วิธีวิเคราะห์ ผู้ปฏิบัติงาน สารเคมี เครื่องมือ หรือเกณฑ์การยอมรับไม่เหมาะสม | - ตรวจสอบสาเหตุว่าการที่ผลการประเมินไม่ผ่านเกณฑ์เกิดจากวิธีวิเคราะห์ไม่เหมาะสมจริงๆ หรือเกิดจากผู้วิเคราะห์ เช่น ทำสารทระหว่างขั้นตอนสกัด เติร์ยม สารผิด สารหมดอายุ เครื่องมือ อุปกรณ์ไม่ดี เป็นต้น หรือเกิดจากเกณฑ์การยอมรับไม่เหมาะสม ถ้าเกิดจากวิธีวิเคราะห์ไม่เหมาะสมให้เปลี่ยนวิธีวิเคราะห์ ถ้าเกิดจากผู้ปฏิบัติงานให้ฝึกจนให้มีความเชี่ยวชาญก่อนปฏิบัติงานจริง หรือใช้สารเคมีที่ยังไม่หมดอายุ หรือใช้เครื่องมือที่อยู่ในสภาพพร้อมใช้งาน ถ้าเกิดจากเกณฑ์การยอมรับไม่เหมาะสมให้กำหนดเกณฑ์ยอมรับใหม่<br>- ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีใหม่ในหัวข้อที่ไม่ผ่านเกณฑ์<br>- ปรับเปลี่ยนวิธีวิเคราะห์ แล้วดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีใหม่<br>- ปรับเกณฑ์การยอมรับใหม่ แล้วตรวจสอบผลการประเมินอีกครั้ง |
| 10  | สรุปผล และจัดทำรายงาน | หัวหน้าห้องปฏิบัติการเคมี หรือผู้ที่ได้รับมอบหมาย | - รายละเอียดของรายงานไม่ครบถ้วน<br>- มักขาดข้อความที่สรุปว่าวิธีเหมาะสม ต่อการนำไปใช้งานตามวัตถุประสงค์        | - ระบุรายละเอียดของรายงานให้ครบถ้วน ให้เจ้าหน้าที่ในหน่วยงานอ่านทบทวน รายงานที่จัดทำเพื่อตรวจสอบความถูกต้องอีกครั้ง<br>- ระบุข้อความสรุปว่า วิธีเหมาะสมต่อการนำไปใช้งานตามวัตถุประสงค์                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |

## 5.2 ข้อเสนอแนะและแนวทางการพัฒนา

5.2.1 ควรจัดให้ผู้ปฏิบัติงานได้รับการอบรมสัมมนาทั้งจากภายในและภายนอกองค์กร ในหัวข้อที่เกี่ยวข้องกับการปฏิบัติงานเป็นระยะๆ เช่น ทุก 4 เดือน เพื่อเป็นการเพื่อทบทวนความรู้ของผู้ปฏิบัติงานให้เป็นปัจจุบันและทันสมัยอยู่ตลอดเวลาตามความก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และเพื่อที่จะสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับงานได้

5.2.2 ควรจัดให้มีทดสอบความรู้ความสามารถของผู้ปฏิบัติงานอย่างน้อยปีละ 1 ครั้ง เพื่อเป็นการประเมินผู้ปฏิบัติงาน ว่ายังมีความรู้ ความเข้าใจ และความสามารถในการทำงานที่ได้รับมอบหมายหรือไม่

5.2.3 อาจจัดทำคู่มือขั้นตอนการปฏิบัติงานในรูปแบบที่ง่ายต่อการทำความเข้าใจภายในระยะเวลาสั้นๆ เนื่องจากปัจจุบันขั้นตอนการปฏิบัติงานมีรายละเอียดค่อนข้างมาก มีเนื้อหาที่เป็นที่ยากต่อการเข้าใจ จึงอาจไม่เหมาะสมต่อการศึกษาทำความเข้าใจของผู้ที่มีพื้นฐานความรู้ไม่มากและมีเวลาน้อย โดยอาจจัดทำเป็นลักษณะของรูปภาพเล่าเรื่อง หรือสรุปเป็นประเด็นสั้นๆ ที่มีตัวอย่างประกอบ เป็นต้น

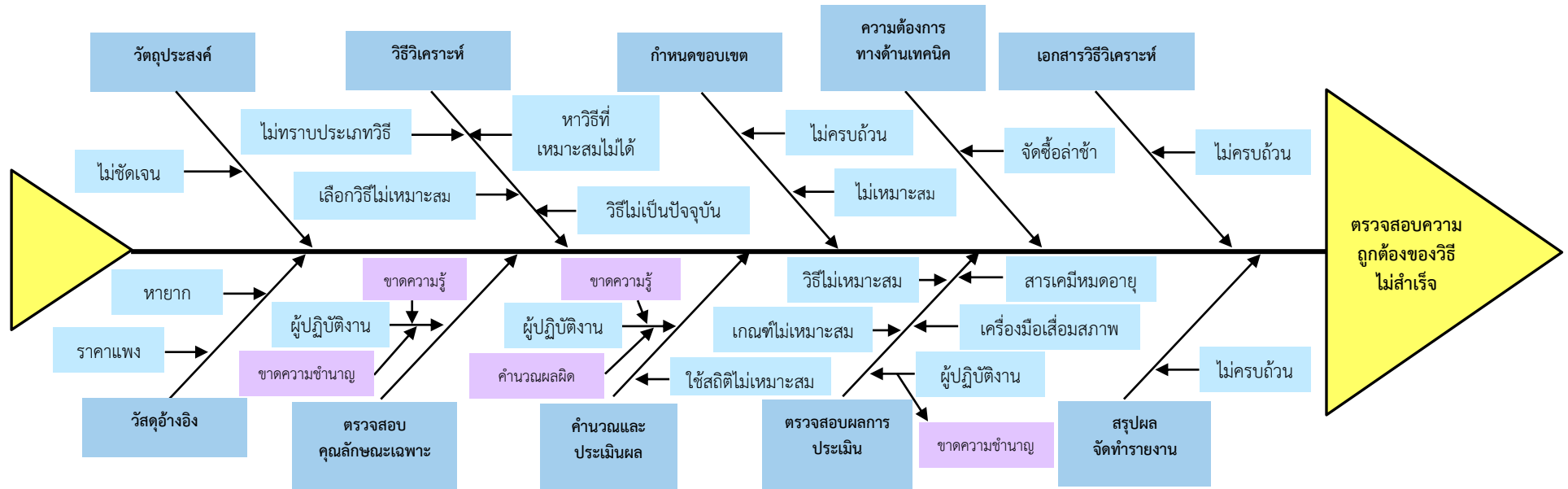
5.2.4 รวบรวมข้อมูลปัญหาอุปสรรคในการปฏิบัติงาน และแนวทางการแก้ปัญหาในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทางเคมีที่เกิดขึ้นจากการปฏิบัติงาน จัดทำเป็นเอกสาร เพื่อใช้เป็นแนวทางในการแก้ไขปัญหาเมื่อมีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทางเคมีในรายการอื่นๆ ต่อไป

## บรรณานุกรม

- จิตรา วรรณวิจิตร. (2554). *เอกสารประกอบการฝึกอบรม เรื่อง การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (ทางเคมี) ระหว่างวันที่ 1 - 2 สิงหาคม 2554*. กรุงเทพฯ: สำนักพัฒนาศีกยภาพนักวิทยาศาสตร์ห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์บริการ.
- ดุขฎิ มั่นความดี, นิระนารถ แจ้งทอง และวรรณภา ตันยีนยงค์. (2546). *เอกสารประกอบการฝึกอบรม เรื่อง Method validation for chemical laboratories ระหว่างวันที่ 6 - 7 กุมภาพันธ์ 2546*. กรุงเทพฯ: สำนักพัฒนาศีกยภาพนักวิทยาศาสตร์ห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์บริการ.
- ทิพวรรณ นิ่งน้อย. (2549). *แนวทางปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว (A Practical Guide for Single Laboratory Method Validation of Chemical Methods)*. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.
- ทิพวรรณ นิ่งน้อย. (2558). *เอกสารประกอบการฝึกอบรม เรื่อง การตรวจสอบความสมเหตุสมผลของวิธีทางเคมี ระหว่างวันที่ 29 - 30 มกราคม 2558*. กรุงเทพฯ: สำนักพัฒนาศีกยภาพนักวิทยาศาสตร์ห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์บริการ.
- นันทนา กันยานุวัฒน์ และนุชนาท นาคำ. (2555). *แนวทางการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี*. สืบค้น 4 สิงหาคม 2564, จาก <http://www.dpim.go.th/service/download?articleid=4110&F=7132>
- นิระนารถ แจ้งทอง, วรรณภา ตันยีนยงค์ และศิริวรรณ ศิลป์สกุลสุข. (2554). *เอกสารประกอบการฝึกอบรม เรื่อง การประกันคุณภาพผลการวิเคราะห์ทดสอบ ระหว่างวันที่ 4 - 5 สิงหาคม 2554*. กรุงเทพฯ: สำนักพัฒนาศีกยภาพนักวิทยาศาสตร์ห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์บริการ.
- แนวทางการจัดทำความสมเหตุสมผลของการวัด (Guidelines on Validity of Measurement)*. (2553). กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ.
- สถิติสำหรับงานวิเคราะห์ทดสอบและวิจัย (อบรมผ่านเครือข่ายอินเทอร์เน็ต) ระหว่างวันที่ 21 พฤษภาคม ถึง 19 สิงหาคม 2562*. กรุงเทพฯ: สำนักพัฒนาศีกยภาพนักวิทยาศาสตร์ห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์บริการ.
- อภิชาติ อิมยิ้ม. (2559). *การจัดทำระบบคุณภาพ ISO 17025 & GLP สำหรับห้องปฏิบัติการเคมี*. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- EURACHEM Guide. (1998). *The Fitness for Purpose of Analytical Methods ; A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics (1st ed)*. Retrieved 4 August 2021, from <http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/valid.pdf>, cited Jan. 2012.
- International Organization for Standardization. (2017). *General requirement for the competence of testing and calibration laboratories ISO/IEC 17025*.
- ISO 10012. (2003). *Measurement management systems - Requirements for measurement processes and measuring equipment*.
- Official Methods of Analysis of AOAC International. (2019). *Appendix F : Guidelines for Standard Method Performance Requirements*.

ภาคผนวก

การวิเคราะห์ปัญหาในการปฏิบัติงานโดยใช้ฝักก้างปลา



## ประวัติผู้เขียน

|                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ชื่อ นามสกุล           | นางวิไล ประยูรหงษ์                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| ที่อยู่ปัจจุบัน        | 25 ซอยอัสสัมชัญ 23 แขวงบางไผ่ เขตบางแค กรุงเทพมหานคร                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| ประวัติการศึกษา        | ปริญญาดุษฎี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีทางอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| พ.ศ. 2544              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| พ.ศ. 2540              | ศูนย์การศึกษานอกโรงเรียนจังหวัดประดิษฐารามวิทยาคม สายวิทย์-คณิต                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| สถานที่ทำงาน           | ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาคารมหามกุฏ ชั้น 16 ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| ตำแหน่งหน้าที่ปัจจุบัน | เจ้าหน้าที่บริการวิทยาศาสตร์ (P7)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| ผลงาน                  | <ol style="list-style-type: none"> <li>งานวิจัยเรื่อง “การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบปริมาณไขมันในตัวอย่างเนื้อและผลิตภัณฑ์” ทุนวิจัยสำหรับบุคลากรสายสนับสนุน กองทุนเพื่อการวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ระยะเวลาดำเนินการ 1 มิถุนายน 2559 ถึง 31 พฤษภาคม 2560</li> <li>งานวิจัยเรื่อง “การพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างสารพิษตกค้างทางการเกษตร กลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตโดยใช้วิธีการสกัดแบบ TLC (Thin Layer Chromatography)” ทุนวิจัยสำหรับบุคลากรสายสนับสนุน กองทุนเพื่อการวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ระยะเวลาดำเนินการ 1 มิถุนายน 2562 ถึง 31 พฤษภาคม 2563</li> <li>งานวิจัยเรื่อง “การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารปนเปื้อน Mineral oil ที่เกิดจากกระบวนการผลิตในตัวอย่างน้ำมันรำข้าว)” ทุนวิจัยสำหรับบุคลากรสายสนับสนุน กองทุนเพื่อการวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ระยะเวลาดำเนินการ 1 กันยายน 2563 ถึง 31 สิงหาคม 2564</li> </ol> |