

เราจะตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (ทางเคมี) ได้อย่างไร

โดย นางสาวยุพิน รัตนะแพร

เจ้าหน้าที่บริหารงานทั่วไป

สำนักงานสิ่งแวดล้อมภาคที่ 13 (ชลบุรี)

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (method validation) คือเป็นกระบวนการยืนยันความใช้ได้วิธีทดสอบที่ห้องปฏิบัติการอาจกำหนดขึ้นมา โดยการตรวจสอบและจัดทำหลักฐานที่เป็นรูปธรรมเพื่อแสดงว่าข้อกำหนดพิเศษต่างๆสำหรับการใช้ตามที่ตั้งใจไว้โดยเฉพาะสามารถบรรลุผลได้ครบถ้วนและเป็นไปตามข้อกำหนด การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบจึงมีความสำคัญสำหรับผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ โดยมีองค์ประกอบดังนี้

1. หลักการและความจำเป็นของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

1.1 ความจำเป็นต้องมีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี เมื่อวิธีทดสอบเป็นดังนี้

- วิธีทดสอบที่ใช้ไม่เป็นวิธีมาตรฐาน ไม่มีการยอมรับในระดับนานาชาติ ห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี เพื่อให้แน่ใจว่าวิธีทดสอบสามารถให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำตรงตามวัตถุประสงค์การใช้งาน

- เป็นวิธีทดสอบที่ห้องปฏิบัติการพัฒนาหรือออกแบบขึ้นเอง โดยห้องปฏิบัติการไม่อ้างอิงตามวิธีที่เป็นวิธีมาตรฐานซึ่งเป็นที่ยอมรับในระดับนานาชาติ

- เป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้นอกขอบข่ายที่กำหนด

- มีการขยายและดัดแปลงวิธีมาตรฐาน (Amplification and modification) เช่น ห้องปฏิบัติการอาจอ้างอิงตามวิธีมาตรฐานแต่อาจมีบางขั้นตอนในวิธีทดสอบที่ไม่ปฏิบัติตามวิธีมาตรฐานทุกประการ ซึ่งวิธีทดสอบนี้จะต้องมีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีก่อนนำมาใช้งานเพื่อให้แน่ใจว่าหากมีการเปลี่ยนแปลงวิธีทดสอบจากวิธีมาตรฐานไปบางส่วนผลการทดสอบที่ได้จะยังคงความน่าเชื่อถือ

1.2 หลักการสำหรับการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

- ครอบคลุมการประยุกต์ใช้ เช่น ห้องปฏิบัติการต้องการวิเคราะห์ Cu ในน้ำผิวดินอยู่ในช่วง 0.1 – 3.0 mg/l การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบจะต้องครอบคลุมอยู่ในช่วงดังกล่าวนี้ด้วย

- มีบันทึกวิธีการและผลที่ได้จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

- มีข้อสรุปบ่งชี้ว่าวิธีนั้นเหมาะสมกับวัตถุประสงค์การใช้งาน

2. ประเภทของวิธีทดสอบ

2.1 แบ่งตามความสมบูรณ์ของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

2.1.1 วิธีที่ผ่านการตรวจสอบโดยการศึกษาจากหลายๆห้องปฏิบัติการ (collaboratory study) ซึ่งอาจเป็นวิธีการทดสอบที่เป็นไปตามกระบวนการที่แต่ละหน่วยงานกำหนด แต่การทดสอบนั้นๆเป็นวิธีที่นานาชาติยอมรับ

2.1.2 วิธีที่ผ่านการตรวจสอบโดยห้องปฏิบัติการตั้งแต่ 2 แห่งขึ้นไป อาจทำโดยให้ห้องปฏิบัติการ ตั้งแต่ 2 ห้องปฏิบัติการทำการทดสอบโดยใช้วิธีการทดสอบเดียวกัน แต่วิธีดังกล่าวนี้ยังไม่สมบูรณ์เหมือนกับวิธีการทำ collaboratory study เนื่องจากยังไม่เป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับในระดับนานาชาติ

2.1.3 วิธีที่ผ่านการตรวจสอบโดยห้องปฏิบัติการเดียว เช่น การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบในแต่ละห้องปฏิบัติการว่าวิธีทดสอบที่ใช้มีความน่าเชื่อถือ แต่ไม่สามารถยอมรับได้ในระดับนานาชาติ

2.1.4 วิธีที่ผ่านคุณลักษณะบางรายการ เช่น มีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีแต่ไม่ได้ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีในทุกตัวแปรที่จำเป็นต้องตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

2.1.5 วิธีที่ไม่มีข้อมูลการตรวจสอบ เป็นวิธีที่ไม่ได้ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

2.2 แบ่งตามลักษณะของวิธี

2.2.1 Empirical method หมายถึงวิธีทดสอบขึ้นกับวิธีที่กำหนดไว้ มักเป็นวิธีที่กำหนดขึ้นเพื่อให้ผู้ที่เกี่ยวข้องใช้ตาม การใช้วิธีนี้จะต้องสอบกลับไปถึง method นั้นได้

2.2.2 Non Empirical method หมายถึง วิธีที่ผลการทดสอบไม่ขึ้นอยู่กับวิธี (Method-independent result) การใช้วิธีที่แตกต่างกัน (แต่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีแล้ว) จะให้ผลที่ไม่แตกต่างกันผลการทดสอบของวิธีเหล่านี้จะสอบกลับไปสู่ SI unit หรือโดยผ่าน CRM

2.3 แบ่งตามระดับความเข้มข้นของสารที่ต้องการศึกษา

2.3.1 วิธีทดสอบสำหรับสารที่มีความเข้มข้นระดับต่ำๆ เช่น การทดสอบสารปนเปื้อน สารตกค้าง เป็นต้น

2.3.2 วิธีทดสอบสำหรับสารที่มีความเข้มข้นสูงๆ เช่น การทดสอบสารประกอบหลักในผลิตภัณฑ์ เป็นต้น

3. การศึกษาค่าตัวแปรที่สำคัญ (Key Parameter) ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

3.1 Specificity/Selectivity

- Specificity หมายถึง ความจำเพาะเจาะจงในการวัดของสิ่งที่ต้องการศึกษาเพียงอย่างเดียว ถึงแม้ว่าสิ่งที่ต้องการศึกษาจะมี matrix อยู่ด้วยก็ตาม แม่นยำ เช่น ในการวัดสารละลายตัวอย่างตัวหนึ่ง ซึ่งในสารละลายตัวอย่างนั้น อาจมีสาร a สาร b และสาร c อยู่ แต่สิ่งที่เราต้องการหาคือสาร c เครื่องมือของเราจะอ่านค่าเพียงแค่สาร c เท่านั้น จะไม่อ่านค่าสารตัวอื่นที่นอกเหนือจากสารที่เราต้องการ

- Selectivity หมายถึง ความจำเพาะเจาะจงที่สามารถวัดค่าสิ่งที่ต้องการวัดและ matrix ได้แต่สามารถอ่านค่าสิ่งที่ต้องการวัดได้ถูกต้องและแม่นยำ เช่น ในการวัดสารละลายตัวอย่างตัวหนึ่ง ซึ่งในสารละลายตัวอย่างนั้นอาจมีสาร a สาร b และสาร c อยู่ สิ่งที่เราต้องการหาคือสาร c แต่เครื่องมือของเรา

ไม่ได้อ่านเพียงค่า c อย่างเดียวเครื่องมือจะอ่านค่าของสารทุกตัวที่สามารถอ่านได้ แต่จะรับรองเฉพาะค่า c เท่านั้นที่ให้ผลถูกต้องและแม่นยำ

3.2 Range หมายถึง ช่วงการใช้งานที่ครอบคลุมระดับความเข้มข้นของสารที่ต้องการศึกษา (lower และ upper levels) โดยสามารถแสดงระดับของความเที่ยง (Precision) ความแม่นยำ (Accuracy) และ ความสัมพันธ์เชิงเส้น (linearity) ตามที่กำหนดในวิธีทดสอบ

3.3 ความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) หมายถึง ความสามารถของวิธีทดสอบที่ให้ค่าสัญญาณของเครื่องมือวัดที่แปรสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารที่ต้องการศึกษา แบ่งออกเป็น 2 ลักษณะ ดังนี้

3.3.1 System linearity หมายถึง การทดสอบโดยใช้สารมาตรฐานวัดหาค่าโดยจะแสดงผลทดสอบเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

3.3.2 Method linearity หมายถึง การทดสอบโดยใช้ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (Spike sample) โดยจะแสดงความสามารถของวิธีทดสอบที่ให้ผลเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารที่มีอยู่จริงในตัวอย่าง

3.4 LOD (Limit of Detection) หมายถึง ความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่องสามารถตรวจพบได้ โดยทั่วไปจะเป็นระดับความเข้มข้นของสารที่ให้สัญญาณเป็น 3 เท่า ของ SD ของ blank เหนือค่าเฉลี่ยสัญญาณของ blank

3.5 LOQ (Limit of Quantitation) หมายถึง ความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่องสามารถตรวจพบและอ่านค่าได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ สามารถรายงานค่าได้ โดยทั่วไปจะเป็นระดับความเข้มข้นของสารที่ให้สัญญาณเป็น 10 เท่า ของ SD ของ blank เหนือค่าเฉลี่ยสัญญาณของ blank

3.6 Accuracy หรือ Trueness หมายถึง ค่าที่ได้จากการวัดมีค่าใกล้เคียงกับค่าจริงมากน้อยเพียงใด โดยทั่วไปจะมีความสัมพันธ์กับค่าความเบี่ยงเบน (Bias) คือจะแปรผกผันกับค่าความเบี่ยงเบน (Bias)

3.6.1 Recovery คือการเติมความเข้มข้นน้อยๆ ของสารมาตรฐานที่รู้ค่าที่แน่นอน ลงไปในตัวอย่างเพื่อดูค่าคืนกลับของสารมาตรฐานนั้นๆ โดยคำนวณจากสูตร

$$\% \text{Recovery} = [(C1 - C2) / C3] \times 100$$

เมื่อ C1 = ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน
C2 = ความเข้มข้นของตัวอย่าง
C3 = ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงไป

3.7 Precision หมายถึง การวัดซ้ำหลายๆ ครั้งแล้วดูว่าค่าที่ได้ใกล้เคียงกันหรือไม่ ซึ่งการวัดที่ได้ค่าใกล้เคียงกันไม่ได้หมายความว่าค่าที่วัดได้จะเป็นค่าที่ถูกต้องเสมอไป

3.7.1 Repeatability หมายถึง การทดสอบซ้ำๆ ภายใต้สภาวะคงที่ ซึ่งการทดสอบจะต้อง

ทำโดยห้องปฏิบัติการเดียวกัน ตัวอย่างเดียวกัน ภาวะแวดล้อมเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน และภายใต้เวลาใกล้เคียงกัน

3.7.2 Reproducibility หมายถึง การทดสอบซ้ำซึ่งอาจมีความแตกต่างกัน ดังนี้

3.7.2.1 Intra-lab Reproducibility หมายถึง การทดสอบซ้ำโดยอาจจะขยายเวลาในการทดสอบมากขึ้น มีการเปลี่ยนแปลงเจ้าหน้าที่ทดสอบ เปลี่ยนเครื่องมือ วันที่ทำการทดสอบต่างกัน แต่ห้องปฏิบัติการที่ใช้ทดสอบเป็นห้องปฏิบัติการเดียวกัน

3.7.2.2 Inter-lab Reproducibility หมายถึง การทดสอบซ้ำโดยดูค่าความแปรปรวนที่มีผลต่อความแม่นยำของวิธีเมื่อ มีการเปลี่ยนผู้ทดสอบ เปลี่ยนเครื่องมือ แต่ไม่ได้ทำการทดสอบโดยห้องปฏิบัติการเดียวกัน

3.8 Ruggedness/Robustness หมายถึง ความคงทนของวิธี โดยปกติการทำ Robustness จะทำเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงวิธีทดสอบ หรือมีการทำวิธีทดสอบขึ้นมาใหม่เท่านั้น

4 แนวทางการวางแผนการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

4.1 ทบทวนวิธีทดสอบที่เลือกใช้ ความพร้อมด้านเครื่องมือ อุปกรณ์ สารมาตรฐาน สารเคมี บุคลากร

4.2 ศึกษาข้อมูลการทำ Validation ของวิธีและ Parameter ที่ต้องตรวจสอบ

4.3 การดัดแปลงวิธีที่เลือกใช้ ควรศึกษาความเป็นไปได้เบื้องต้นว่าเป็นไปได้หรือไม่ และทำการดัดแปลงวิธีให้เหมาะสม

4.4 ดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่กำหนด โดยกำหนด Parameter ที่ต้องตรวจสอบเกณฑ์การยอมรับและประเภทของ sample matrix

4.5 รายงานสรุปผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี โดยต้องมีข้อมูลจากการตรวจสอบ Parameter ที่กำหนด สรุปความเหมาะสมต่อวัตถุประสงค์การใช้งานและขอข่ายการนำไปใช้ และกำหนดเกณฑ์การทำ Revalidation โดยทั่วไปจะไม่กำหนดเป็นระยะเวลาแต่จะกระทำก็ต่อเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงวิธีที่แตกต่างไปจากวิธีมาตรฐาน

5 Validation Tools โดยจะใช้สารมาตรฐานและสารเคมี ดังต่อไปนี้

5.1 Reagent blank หมายถึง blank ที่เตรียมตามขั้นตอนการวิเคราะห์ทั้งหมดโดยไม่เติมตัวอย่าง เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของสารเคมี

5.2 Sample blank หมายถึง blank ที่เตรียมตามขั้นตอนการวิเคราะห์ทั้งหมดโดยมี matrix ของตัวอย่างที่มีปริมาณสิ่งที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาณน้อยๆ ในระดับ LOD เพื่อตรวจสอบผลการรบกวนโดยสารอื่น

5.3 Fortified materials/solution หมายถึง materials หรือ solution ที่เติมสารที่ต้องการวัดเพื่อเป็นการเพิ่มสัญญาณของสารที่ต้องการวัด หรือเพื่อศึกษาค่า recovery ของวิธีวิเคราะห์

5.4 Sample of known analyte content หมายถึงตัวอย่างที่ทราบค่าแน่นอนของสิ่งที่ต้องการวัด สามารถนำมาใช้เป็น reference material ได้

5.5 Reference standard หมายถึง สารมาตรฐานที่ใช้เพื่อสอบเทียบ หรือการชี้เฉพาะ

5.6 Incurred materials หมายถึง material ที่มีสารที่ต้องการวัดเป็นองค์ประกอบ อาจโดยธรรมชาติหรือจงใจทำให้เกิดขึ้นเหมือนธรรมชาติ

5.7 Reference materials (RM_s) หมายถึง วัสดุใดๆที่มีการเตรียมอย่างดี มีความเป็นเนื้อเดียวกัน ไม่เปลี่ยนแปลงหรือสลายได้ง่าย และทราบค่าความเข้มข้นที่แน่นอน

5.8 Certified Reference materials (CRM_s) หมายถึง RM ที่มีค่าหรือความเข้มข้นของสารสามารถสอบกลับได้และได้รับการรับรอง สามารถสอบกลับไป SI unit ได้และมีใบรับรองค่า (Certificate)

สรุป การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (ทางเคมี) เป็นข้อกำหนดด้านวิชาการตามระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการ ISO/IEC 17025 ในข้อ 5.4.2 เป็นกระบวนการหนึ่งในการจัดทำประกันคุณภาพห้องปฏิบัติการ การทดสอบทางเคมีจึงมีความจำเป็นจะต้องทำการตรวจสอบความใช้ได้เพื่อให้แน่ใจว่าวิธีที่นำมาทดสอบมีความเหมาะสมทำให้ผลการทดสอบมีความน่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับในระดับสากล

เอกสารอ้างอิง

เอกสารประกอบการฝึกอบรม-สัมมนาวิชาการ “เรื่อง การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (ทางเคมี)”

สำนักพัฒนาศักยภาพนักวิทยาศาสตร์ห้องปฏิบัติการ