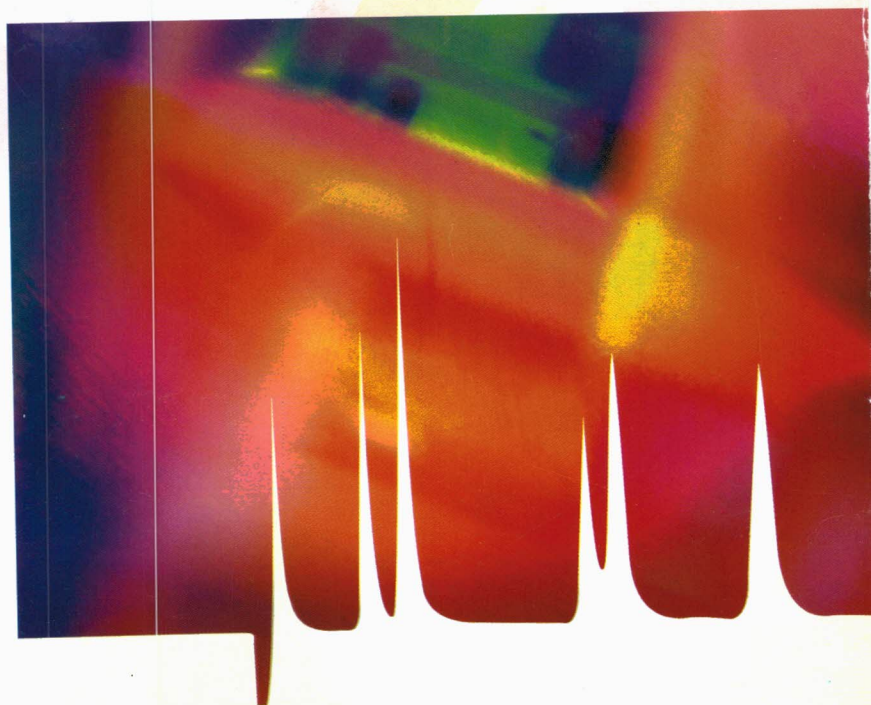


แนวปฏิบัติการทดสอบ ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว

A PRACTICAL GUIDE FOR SINGLE LABORATORY
METHOD VALIDATION OF CHEMICAL METHODS



ISBN: 974-7549-97-2



9 78974 75499 73

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว

A PRACTICAL GUIDE FOR SINGLE LABORATORY METHOD VALIDATION OF CHEMICAL METHODS

แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว
(A Practical Guide for Single Laboratory Method Validation of Chemical Methods)
ทิพวรรณ นิ่งน้อย

ที่ปรึกษา

เภสัชกรหญิงอมรา วงศ์พุทธพิทักษ์
ที่ปรึกษากรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะกรรมการ

เภสัชกรหญิงยุพดี พยัคฆพันธ์
हरररर รयरรर
นवरร อนันตลินิกุล

กรกฎาคม 2549 จำนวน 1,000 เล่ม

จัดพิมพ์เผยแพร่โดย

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี
โทร. 0-2951-0000

ISBN : 974-7549-97-2

หนังสือเล่มนี้สงวนลิขสิทธิ์ การคัดลอกส่วนใดไปเผยแพร่ทุกในรูปแบบ ต้องได้รับการอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษร

แนวปฏิบัติการทดสอบ ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว

A PRACTICAL GUIDE FOR SINGLE LABORATORY
METHOD VALIDATION OF CHEMICAL METHODS

ISBN : 974-7549-97-2

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

คำปรารภ (Forword)



การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เป็นงานหลักที่สำคัญของห้องปฏิบัติการทดสอบทุกระดับ และเป็นเงื่อนไขหนึ่งในการรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการทดสอบตามมาตรฐาน ISO17025: 2005 และการรับรองความสามารถของผู้ผลิตวัสดุอ้างอิงตาม ISO Guide 34: 2000 และ ILAC G12: 2000 เพื่อแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการใช้นั้น สามารถให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องแม่นยำและเหมาะสมกับวัตถุประสงค์ที่จะนำไปใช้ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้จัดทำแนวทางการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ขึ้นในปี พ.ศ. 2547 เพื่อให้ นักวิชาการมีความเข้าใจที่ตรงกันในพารามิเตอร์ ตัวชี้วัด คำนิยามและมีรูปแบบของกระบวนการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ไปในแนวทางเดียวกัน อย่างไรก็ตามการปฏิบัติตามแนวทางดังกล่าวจำเป็นต้องมีความรู้ความเข้าใจทางวิชาการเพิ่มเติมโดยเฉพาะผู้เริ่มต้น

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จึงได้มีดำริให้จัดทำแบบปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมี โดยห้องปฏิบัติการเดียวขึ้น เพื่อให้ นักวิชาการสามารถปฏิบัติได้อย่างเป็นรูปธรรม และได้มอบให้ นางสาวทิพวรรณ นิ่งน้อย อนุกรรมการในคณะอนุกรรมการดำเนินการเกี่ยวกับมาตรฐานทางเคมี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ผู้มีความรู้ ความสามารถและประสบการณ์สูง เป็นผู้นิพนธ์แนวปฏิบัติดังกล่าวซึ่งต้องขอชมเชยในความอุตสาหะวิริยะของผู้นิพนธ์ และหวังอย่างยิ่งว่าแนวปฏิบัตินี้จะจักเป็นประโยชน์ต่อห้องปฏิบัติการที่ทำการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์รวมทั้งเป็นเอกสารอ้างอิงทางวิชาการได้ต่อไป

นายแพทย์ไพจิตร วราจิต
อธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

25 กรกฎาคม 2549

คำนำ (Preface)

แนว

ปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว (A Practical Guide for Single Laboratory Method Validation of Chemical Methods) เล่มนี้ มีเนื้อหาเกี่ยวข้องกับองค์ประกอบที่จำเป็นต่อการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีเชิงปริมาณ ได้แก่ วิธีวิเคราะห์ วัสดุอ้างอิง วิธีการทางสถิติที่ใช้แนวทางการกำหนดขอบเขตของการทดสอบวิธี ลำดับขั้นตอนที่ควรปฏิบัติเมื่อจะทดสอบวิธี และคุณลักษณะเฉพาะต่างๆ ของวิธีวิเคราะห์ รวมทั้งค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบซึ่งเป็นพารามิเตอร์ที่สำคัญที่จะตัดสินว่าวิธีวิเคราะห์ที่กำลังทดสอบนั้นมีความถูกต้องเหมาะสมต่อการใช้งานหรือไม่ หนังสือเล่มนี้ได้กล่าวถึงความหมาย วิธีการหาและวิธีการประเมินความใช้ได้หรือการยอมรับคุณลักษณะเฉพาะเหล่านี้ไว้อย่างละเอียดเพื่อให้ปฏิบัติตามได้ นอกจากนี้ในภาคผนวกยังมีการให้คำนิยามของศัพท์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องโดยตรง และวิธีทางสถิติที่มีรายละเอียดมากกว่าในเนื้อหาหลักเพื่อให้ผู้อ่านศึกษาเพิ่มเติม

องค์ความรู้ในหนังสือเล่มนี้เป็นการรวบรวมและเรียบเรียงจากความรู้ที่ได้จากการศึกษาค้นคว้าจากตำราและเอกสารวิชาการต่างๆ ที่ตีพิมพ์เผยแพร่และยอมรับกันในระดับนานาชาติ ประมวลเข้ากับความรู้และประสบการณ์จากการทำงานด้านการตรวจวิเคราะห์อาหารทางเคมีของผู้เขียน และคำแนะนำจากผู้ทรงคุณวุฒิหลายๆท่าน จึงคาดว่าจะประโยชน์ต่อผู้ที่นำไปศึกษาและลงมือปฏิบัติต่อไป

เนื่องจากหนังสือเล่มนี้เป็นเอกสารทางวิชาการ ภาษาที่ใช้จึงมีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษปนกันเพราะศัพท์ต่างๆทางวิชาการบางคำเมื่อใช้ทับศัพท์เป็นภาษาอังกฤษจะเป็นที่คุ้นเคยและเข้าใจได้ชัดเจนกว่า

ความสำเร็จของหนังสือเล่มนี้มาจากความร่วมมือและความช่วยเหลือจากหลายๆ ฝ่าย ผู้เขียนขอขอบคุณนางกนกพร อธิสุข และนางวันทนีย์ ขำเลิศ ซึ่งได้ให้ข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ นางสาวสตีโฟลรัฐ เอกะจัมปะกะ ซึ่งได้ประสานการจัดพิมพ์ อย่างไรก็ตามความผิดพลาดในหนังสือเล่มนี้เป็นความผิดพลาดของผู้เขียนแต่ผู้เดียว

ทิพวรรณ นิ่งน้อย
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
20 กรกฎาคม 2549

สารบัญ (Content)

หน้า

คำปรารภ (Forward)

คำนำ (Preface)

1. บทนำ (Introduction)	9
2. วิธีวิเคราะห์ (Analytical Methods)	13
2.1 ประเภทของวิธีวิเคราะห์ (Types of Analytical Method)	13
2.2 คุณลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์ (Method Performance Characteristics)	15
3. เครื่องมือในการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Tools of Validation Study)	17
3.1 วัสดุ (Materials)	17
3.2 วิธีการทางสถิติ (Statistical Techniques)	19
4. ขอบเขตของการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Extent of a Validation Study)	27
4.1 วิธีที่พัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการ (Laboratory-developed Methods)	27
4.2 วิธีที่พัฒนาโดยผู้อื่นและต้องการนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการ (Existing Methods)	28
4.3 วิธีที่ห้องปฏิบัติการดัดแปลงจากวิธีที่ยอมรับกันว่าเป็นวิธีมาตรฐาน (Standard Methods with Modification)	29
5. ขั้นตอนการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Protocol for Method Validation Study)	33
5.1 ขั้นตอนการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Protocol for Method Validation Study)	33

5.2 ตัวอย่างการเตรียม spiked materials สำหรับการทดสอบวิธีวิเคราะห์ (Example of Material Preparation for Method Validation Study)	35
6. คุณลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์ : การหาค่าและการประเมินการยอมรับ (Method Performance Characteristics : Determination and Assessment of Acceptance)	39
6.1 ความจำเพาะเจาะจง (Specificity/selectivity)	39
6.2 ช่วงของการวัด (Working Ranges) และความเป็นเส้นตรง (Linearity)	41
6.3 ความแม่นยำ (Accuracy)	46
6.3.1 Trueness	47
6.3.2 การกลับคืน (Recovery)	60
6.4 ความเที่ยง (Precision)	64
6.5 ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation)	70
6.6 ความทน (Ruggedness/robustness)	76
6.7 ความไม่แน่นอนของการวัด (Measurement Uncertainty)	77
7. การรายงานการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (A Validation Report)	87
8. การนำข้อมูลจากการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ไปใช้กำหนดวิธีควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์ (Use of Validation Data for Designing Internal Quality Control)	89
เอกสารอ้างอิง (References)	91
ภาคผนวก 1 : นิยามของเทอมต่างๆ (Definitions)	95
ภาคผนวก 2 : วิธีการทางสถิติ (Statistical Techniques)	101

1

บทนำ (Introduction)

การตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการที่จะให้ผลถูกต้อง และเป็นที่น่าเชื่อถือ นั้นวิธีวิเคราะห์เป็นองค์ประกอบที่สำคัญยิ่ง ดังนั้นเมื่อจะเลือกวิธีวิเคราะห์มาใช้ ไม่ว่าจะ เป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับกันทั่วไป วิธีที่ผู้อื่นพัฒนาขึ้น หรือเป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ จะต้องทดสอบก่อนว่าสามารถใช้วิเคราะห์ตัวอย่างได้ถูกต้องตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นภายหลังการพัฒนาวิธี ปรับปรุง หรือดัดแปลงวิธีให้เหมาะสมแล้ว และมีจุดมุ่งหมายหลักเพื่อแสดงให้เห็นว่าวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้น หรือเลือกมานั้นเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในงานวิเคราะห์เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์เฉพาะที่ตั้งไว้ เช่น เพื่อหาปริมาณส่วนประกอบอย่างใดอย่างหนึ่งในผลิตภัณฑ์ เพื่อตรวจสอบว่าผลิตภัณฑ์มีคุณภาพตามเกณฑ์ที่กำหนด (specification) หรือไม่ เพื่อตรวจสอบว่าผลิตภัณฑ์มีคุณภาพเข้ามาตรฐาน (regulatory requirements) หรือไม่ เพื่อหาปริมาณสารในสิ่งแวดล้อม เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ผลิตภัณฑ์ หรือส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์ (ซึ่งจะไม่กล่าวถึงรายละเอียดในคู่มือนี้) เป็นต้น

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ จำเป็นอย่างยิ่งในกรณีต่อไปนี้

- เมื่อจะนำวิธีมาตรฐานมาใช้กับ matrix ที่นอกเหนือจากที่กำหนดไว้ในวิธีนั้น

- เมื่อมีการปรับเปลี่ยนเงื่อนไขที่กำหนดไว้ในวิธีมาตรฐานหรือวิธีที่มีอยู่เดิม
- เมื่อวิธีที่จะนำมาใช้ไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับคุณลักษณะเฉพาะของวิธี หรือมีไม่สมบูรณ์ ตามความจำเป็นของการใช้งาน
- เมื่อวิธีนั้นเป็นวิธีใหม่ที่ห้องปฏิบัติการพัฒนาขึ้น

ส่วนในกรณีที่น่าวิธีมาตรฐาน หรือวิธีที่พัฒนาอย่างดีแล้วมาใช้โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลง ก็ต้องมีการทวนสอบ (verify) ทางห้องปฏิบัติการ เพื่อยืนยันสมรรถนะของห้องปฏิบัติการว่าสามารถทำได้ตามที่ระบุในวิธี

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ เป็นกระบวนการศึกษาทางห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาหรือยืนยันคุณลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์ (method performance characteristics) และประเมินด้วยวิธีการทางสถิติว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความถูกต้องและเหมาะสมตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน คุณลักษณะเฉพาะของวิธีเหล่านี้ ได้แก่ ความจำเพาะเจาะจง (specificity/selectivity) ความแม่นยำ (accuracy) ความเที่ยง (precision) พิสัย หรือช่วงของการใช้งาน (working range) และความเป็นเส้นตรง (linearity) ขีดจำกัดของวิธีเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ (limit of detection และ limit of quantitation) และความทนของวิธี (ruggedness/robustness) เป็นต้น การศึกษาคุณลักษณะเฉพาะเหล่านี้อาจไม่จำเป็นต้องทำทั้งหมด ทั้งนี้ขึ้นกับวิธีวิเคราะห์และวัตถุประสงค์ของการใช้งาน

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่สมบูรณ์และน่าเชื่อถือที่สุดคือการทำ collaborative study ซึ่ง เป็น multi-laboratory method validation ที่ศึกษาและทดสอบวิธีวิเคราะห์โดยมีการดำเนินการตามขั้นตอน (protocol) ที่นานาชาติยอมรับ เช่น AOAC INTERNATIONAL กำหนดว่าต้องมีห้องปฏิบัติการผู้เชี่ยวชาญหลายแห่งเข้าร่วมโครงการ (อย่างน้อย 8 แห่ง) มีการศึกษาวิธีใน matrix อย่างน้อย 5 ชนิด รวมทั้งมีการวิเคราะห์ blind duplicate และ split level เพื่อดู repeatability ของห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งด้วย

การทำ collaborative study ทำให้วิธีวิเคราะห์มีความน่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับในระดับนานาชาติได้ อย่างไรก็ตามวิธีวิเคราะห์สารปนเปื้อนบางชนิด หรือสารตกค้างที่มี

ความเข้มข้นต่ำๆ ในอาหาร เช่น drug and pesticide residues อาจทำ collaborative study ไม่ได้เนื่องจากห้องปฏิบัติการผู้เชี่ยวชาญสาขานี้มีไม่มากและค่าใช้จ่ายสูง กรณีเช่นนี้ การทดสอบวิธีวิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการเดียว (single laboratory method validation) เป็นที่ยอมรับว่าเพียงพอ และหากห้องปฏิบัติการนั้นมีการควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์ (internal quality control) ได้เข้าร่วมการทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการกับหน่วยงานภายนอก (proficiency testing) อย่างสม่ำเสมอ รวมทั้งได้รับการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการ (accredited laboratory) ก็จะได้รับการยอมรับมากขึ้น

การทดสอบวิธีวิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการเดียว เป็นการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการที่จะนำวิธีนั้นมาใช้ เพื่อยืนยันความเหมาะสมสำหรับวัตถุประสงค์ของงานวิเคราะห์เฉพาะ หรือเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้น ก่อนที่จะตัดสินใจทำ collaborative study ซึ่งมีค่าใช้จ่ายสูง หรือเพื่อทดแทน collaborative study ในกรณีที่ไม้อาจทำ collaborative study ได้

วิธีวิเคราะห์ที่จะทดสอบความถูกต้อง ควรมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้

- เป็นวิธีที่ได้พัฒนา และปรับสภาวะให้เหมาะสม (optimized) แล้ว
- มีการจัดทำเอกสารบรรยายลักษณะของวิธี และวิธีทำไว้อย่างชัดเจน เช่น ในรูปของ SOP (standard operating procedure) เป็นต้น

การทดสอบวิธีวิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการเดียวนั้น วัสดุอ้างอิง (reference materials: RM) เป็นสิ่งจำเป็น โดยเฉพาะอย่างยิ่งคือ matrix CRM (certified reference materials) ที่มีสภาพ คุณสมบัติของเนื้อสาร (matrix) และความเข้มข้นของสารที่จะศึกษา (analyte) ใกล้เคียงกับตัวอย่างในการใช้งานจริง กรณีที่ไม่สามารถหา matrix CRM ที่เหมาะสมได้ ก็อาจใช้ RM อื่นๆ ที่จัดเตรียมอย่างเหมาะสมแทนได้ เช่น การเติม (spiking) วัสดุอ้างอิงที่เป็นสารบริสุทธิ์หรือที่เรียกกันทั่วไปว่าสารมาตรฐาน ลงในตัวอย่างที่ปราศจากสารนั้นในขั้นตอนต่างๆตามความเหมาะสม เช่น เติวก่อนขั้นตอนสุ่มตัวอย่าง หรือ เติมนใน test portion ก่อนทำการวิเคราะห์ เป็นต้น

นอกจากวัสดุอ้างอิง แล้วองค์ประกอบสำคัญอื่นๆก็ต้องมีความเหมาะสมเช่นกัน เช่น

เครื่องมือ (โดยเฉพาะเครื่องมือที่ใช้สำหรับวัดค่าของ analyte) จะต้องมีความสมบัติตามที่กำหนดไว้ในวิธีวิเคราะห์ ผ่านการสอบเทียบว่าถูกต้อง มีการปรับสภาวะให้เหมาะสม และมีการตรวจสอบความพร้อมของระบบ (system suitability) เช่น AAS (atomic absorption spectrometer) GC (gas chromatograph) และ HPLC (high performance liquid chromatograph) เป็นต้น นอกจากนี้ผู้ที่ทดสอบวิธีก็ควรเป็นผู้ที่มีความรู้ความชำนาญเกี่ยวกับเทคนิคที่เกี่ยวข้อง และวิธีการทางสถิติที่ต้องใช้พอสมควร

2

วิธีวิเคราะห์ (Analytical Methods)

วิธีวิเคราะห์หรือวิธีทดสอบ หมายถึงกระบวนการที่เกิดจากการนำหลักการทางวิทยาศาสตร์ (scientific principles or techniques) มาพัฒนาเพื่อตอบปัญหาทางด้านการตรวจวิเคราะห์ เช่น การนำเทคนิคเกี่ยวกับ atomic absorption spectrometry มาพัฒนาเป็นวิธีหาปริมาณโลหะในอาหาร เป็นต้น

2.1 ประเภทของวิธีวิเคราะห์ (Types of analytical method)

การแบ่งประเภทของวิธีวิเคราะห์อาจทำได้หลายแบบ ในที่นี่เพื่อวัตถุประสงค์ในการกำหนดขอบเขตของการทดสอบความถูกต้องและเหมาะสม แบ่งได้ดังนี้

2.1.1 แบ่งตามความสมบูรณ์ของการทดสอบความถูกต้อง

- 2.1.1.1 วิธีที่ผ่านการทดสอบโดยการศึกษา collaborative study ซึ่งเป็นไปตาม protocol ที่ นานาชาติดอมรับ
- 2.1.1.2 วิธีที่ผ่านการทดสอบโดยห้องปฏิบัติการตั้งแต่ 2 แห่งขึ้นไป (multi-laboratory validation) แต่ไม่สมบูรณ์เหมือน 2.1.1.1
- 2.1.1.3 วิธีที่ผ่านการทดสอบโดยห้องปฏิบัติการเดียว (single laboratory method validation)
- 2.1.1.4 วิธีที่ผ่านการทดสอบคุณลักษณะเฉพาะบางรายการ (partially validated)
- 2.1.1.5 วิธีที่ไม่มีข้อมูลการทดสอบ (validation not known)

2.1.2 แบ่งตามลักษณะของวิธีวิเคราะห์

2.1.2.1 Empirical method

Empirical method หมายถึงวิธีวิเคราะห์ที่ผลการวิเคราะห์ขึ้นกับวิธีการที่กำหนดไว้ในวิธีนั้น (method-dependent result) วิธี empirical มักจะเป็นวิธีที่มีการกำหนดขึ้นมาให้ผู้เกี่ยวข้องใช้ตามเพื่อใช้ในการตัดสินใจ โดยไม่เน้นที่จะหาค่าจริง วิธีเหล่านี้จึงไม่จำเป็นต้องหาประสิทธิภาพของวิธี ผลวิเคราะห์โดยวิธีเหล่านี้จะสอบกลับได้ไปที่วิธีวิเคราะห์ (traceable to the method or the procedure) ตัวอย่างวิธีวิเคราะห์ที่เป็น empirical เช่น การหา “extractable fat” ผลวิเคราะห์ที่ได้ขึ้นอยู่กับเงื่อนไขของการสกัดที่กำหนดไว้ในวิธี เป็นต้น

2.1.1.2 Non-empirical method หรือ rational method

Rational method หมายถึงวิธีวิเคราะห์ที่ผลการวิเคราะห์ไม่ขึ้นกับวิธี (method-independent result) หมายความว่า การใช้วิธีที่แตกต่างกัน (แต่ผ่านการยืนยันความเหมาะสมแล้ว) จะให้ผลวิเคราะห์ที่ไม่ต่างกัน เช่น การหาปริมาณคาเฟอีนในอาหาร อาจใช้วิธี spectrometry หรือ HPLC ก็ให้ผลที่ไม่ต่างกัน เป็นต้น ผลวิเคราะห์โดยวิธีเหล่านี้จะสอบกลับไปที่ SI unit ได้โดยตรง หรือโดยผ่าน CRM (certified reference material)

2.1.3 แบ่งตามระดับความเข้มข้นของสารที่ต้องการศึกษา

เป็นการแบ่งวิธีที่ใช้วิเคราะห์เชิงปริมาณโดยพิจารณาจากระดับความเข้มข้นของสารที่สนใจ (analyte of interest)

2.1.3.1 วิธีวิเคราะห์สำหรับสารที่มีความเข้มข้นต่ำๆ เช่น วิธีวิเคราะห์สารปนเปื้อนต่างๆ และ สารตกค้าง เป็นต้น

2.1.3.2 วิธีวิเคราะห์สำหรับสารที่มีความเข้มข้นสูงๆ เช่นวิธีวิเคราะห์สารประกอบหลักในผลิตภัณฑ์ หรือ formulation วิธีวิเคราะห์สารที่เติมในอาหาร เป็นต้น

วิธีต่าง ๆ เหล่านี้อาจเป็นวิธีมาตรฐาน (standard method) หรือ วิธีที่ไม่ใช่วิธีมาตรฐาน (non-standard method) ก็ได้ โดยวิธีมาตรฐานหมายถึงวิธีที่ยอมรับกันทั่วไปในสาขานั้นๆ และมักจะเป็นวิธีที่ผ่านการศึกษา collaborative trial มาแล้วแต่อาจมีบางวิธีที่ไม่ผ่านการศึกษา collaborative trial แต่เป็นวิธีที่ใช้กันมานานและได้รับการยอมรับกันทั่วไปในสาขานั้นแล้ว อาจเป็นวิธีที่ตีพิมพ์ในมาตรฐานระหว่างประเทศ มาตรฐานภูมิภาค หรือมาตรฐานของประเทศ หรือมาตรฐานขององค์กรที่มีชื่อเสียงในสาขานั้นๆ เช่น ในสาขาการวิเคราะห์อาหาร คือ วิธีที่ Codex รับรอง, วิธีที่ตีพิมพ์ใน Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, AOAC Bacteriological Analysis Manual (BAM), U.S. Pesticide Analytical Manual (PAM), APHA/AWWA/WEF Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Thailand Compendium of Methods for Food Analysis เป็นต้น

สำหรับวิธีที่ไม่ใช่วิธีมาตรฐาน หมายถึงวิธีที่ยังไม่ได้รับการรับรองจากองค์กรที่มีชื่อเสียง ในสาขาที่เกี่ยวข้อง วิธีเหล่านี้อาจจะเป็นวิธีที่มีการทำ collaborative study หรือไม่ได้ เช่น วิธีที่ตีพิมพ์ในวารสารทางวิทยาศาสตร์ต่าง ๆ วิธีที่ห้องปฏิบัติการ พัฒนาขึ้น (in-house method) เป็นต้น วิธีที่เป็น non-standard ภายหลังอาจได้รับการยอมรับเป็น standard method ได้

2.2 คุณลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์ (Method performance characteristics)

คุณลักษณะที่สำคัญที่สุดของวิธีวิเคราะห์ที่ดี คือ สามารถใช้ตรวจวิเคราะห์ได้ตลอดไป โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางสถิติ (statistical control) ซึ่งหมายความว่าแม้จะใช้ตรวจวิเคราะห์ ซ้ำๆ และมีความแปรปรวนเกิดขึ้น คุณสมบัติทางสถิติของความแปรปรวนนั้นไม่เปลี่ยนแปลงไปตามกาลเวลาไม่ว่าจะยาวนานเพียงใด

คุณลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์ ได้แก่

- ความจำเพาะเจาะจง (specificity/selectivity) คือคุณสมบัติที่บอกว่าวิธีนั้นจะไม่ตอบสนองต่อสารอื่นที่ไม่ใช่สาร (analyte) ที่กำลังศึกษา specificity มักใช้ในกรณีวิธีนั้นตอบสนองต่อสารชนิดเดียว (single analyte) เท่านั้น

ส่วน selectivity มักใช้ในกรณีที่วิธีนั้นตอบสนองต่อสารหลายชนิดที่อาจแยกแยะความแตกต่างกันได้หรือไม่ได้

- พิสัย หรือช่วงของการใช้งาน (working range) คือช่วงของความเข้มข้นที่วิธีนั้นตรวจวัดสารที่กำลังศึกษาได้
- ความเป็นเส้นตรง (linearity) คือคุณสมบัติที่บอกว่าสัญญาณของเครื่องมือวัดแปรเปลี่ยนเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารที่กำลังศึกษา
- ความแม่นยำ (accuracy) คือคุณสมบัติที่บอกความใกล้เคียงของค่าที่วิเคราะห์ได้ด้วยวิธีนั้นกับค่าอ้างอิง
- ความเที่ยง (precision) คือคุณสมบัติที่บอกการกระจายของค่าแต่ละค่าที่วิเคราะห์ได้รอบๆค่าเฉลี่ย อาจเป็น repeatability, intra-laboratory (within laboratory) reproducibility, inter-laboratory reproducibility
- ขีดจำกัดของการตรวจพบเชิงคุณภาพ (limit of detection: LOD) คือระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่วิธีนี้จะตรวจพบได้
- ขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (limit of quantitation: LOQ) คือระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่วิธีนี้จะวัดปริมาณได้โดยมีความแม่นยำและความเที่ยงที่ยอมรับได้
- ความทนของวิธี (ruggedness/robustness) คือคุณสมบัติที่บอกความทนของวิธีเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงหรือเบี่ยงเบนสถานะบางประการไปจากที่กำหนดไว้ หรือหมายถึงคุณสมบัติที่บอกระดับความเที่ยงของผลวิเคราะห์ที่ได้จากการทำซ้ำภายใต้ผู้วิเคราะห์หรือสถานะที่เปลี่ยนไป

นิยามเฉพาะของคำเหล่านี้ รวมทั้งคำต่าง ๆ สามารถดูได้จากภาคผนวก 1

3

เครื่องมือในการ ทดสอบความ ถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Tools of Validation Study)

ในการทดสอบวิธีวิเคราะห์ นอกจากจะมียุทธศาสตร์ประกอบที่เกี่ยวข้องโดยตรง เช่น ผู้ทำการทดสอบ เครื่องมือวิเคราะห์ วิธีวิเคราะห์ แล้ว ยังจำเป็นต้องใช้เครื่องมืออื่น ๆ ด้วย ได้แก่ วัสดุอ้างอิง และวิธีการทางสถิติที่จะใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลผลการวิเคราะห์และประเมินความใช้ได้ของข้อมูลและวิธีนั้น

3.1 วัสดุ (Materials)

วัสดุที่ใช้ในการทดสอบวิธีวิเคราะห์ ต้องมีความเป็นเนื้อเดียวกัน มีความคงตัว ไม่สลายหรือเปลี่ยนแปลงง่ายตลอดระยะเวลาที่ดำเนินการทดสอบวิธี มีเนื้อสาร (matrix) ใกล้เคียงกับตัวอย่างที่วิเคราะห์เป็นประจำ มีความเข้มข้นของสารที่จะวิเคราะห์ใกล้เคียงกับความเข้มข้นของสารในตัวอย่างจริง มีความคงตัว และมีปริมาณเพียงพอ

ชนิดของวัสดุที่ควรเลือกใช้ตามความเหมาะสมและจำเป็น ได้แก่

3.1.1 Blanks มี หลาย ชนิด ได้แก่

- **Reagent blank** คือ reagents ที่ใช้ในกระบวนการวิเคราะห์ รวมทั้งสารทำละลายที่ใช้ในการสกัดหรือละลาย reagent blank ใช้ในการศึกษาการรบกวนของสารอื่นในขั้นตอนการวัด
- **Matrix blank** หรือ sample blank คือ ตัวอย่างหรือ matrix ที่ไม่มีสารที่สนใจ (analyte) matrix blank หรือ sample blank ถึงแม้จะหายากแต่ก็จำเป็นโดยเฉพาะในกรณีที่จะศึกษาเรื่องสารรบกวนที่อาจมีใน matrix

3.1.2 Samples/test materials ในการทดสอบวิธีวิเคราะห์ ถ้าสามารถใช้ตัวอย่างจริงได้ก็จะมีประโยชน์มาก เพราะจะทำให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับสารรบกวนซึ่งอาจเกิดขึ้นได้ในการวิเคราะห์จริง และถ้าทราบค่าความเข้มข้นที่มีความถูกต้องสูง ก็สามารถใช้ประเมินความแม่นยำของวิธีได้ด้วย อย่างไรก็ตาม ค่าความเข้มข้นจริงมักจะหาได้ยากยกเว้นแต่จะหาด้วยวิธีที่มี bias น้อยมาก

3.1.3 Fortified or spiked materials/solutions หมายถึงวัสดุที่มีการเติมสารที่กำลังศึกษาโดยเติมใน test portion ก่อนการวิเคราะห์ การเติมด้วยวิธีนี้สารที่เติมอาจจะไม่อยู่ในสภาพเดียวกับที่มีอยู่แล้วในตัวอย่าง ดังนั้นเมื่อศึกษาประสิทธิภาพของวิธีด้วย spiked material มักจะได้ค่าที่สูงกว่าความเป็นจริง เนื่องจากสารที่เติมไม่จับกับเนื้อตัวอย่าง จึงถูกสกัดได้ง่ายกว่า

คำว่า fortifying และ spiking โดยทั่วไป มีความหมายอย่างเดียวกันคือ การเติม (สาร) อย่างไรก็ตาม คำว่า spiking ไม่จำกัดเฉพาะสารที่สนใจศึกษาเท่านั้น แต่อาจหมายถึงการเติมสารอื่นๆ ก็ได้ เช่น การเติมสารใดๆ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อศึกษาว่า ณ ระดับความเข้มข้นใดที่สารนั้นมีการรบกวนปริมาณสารที่สนใจ แต่ fortifying จะเน้นถึงการเติมสารที่สนใจโดยเฉพาะ

บางครั้งอาจพบว่า spiking หมายถึงการเติมสารในขั้นตอนก่อนการวิเคราะห์ และ fortifying หมายถึงการเติมสารในขั้นตอนก่อนวัดด้วยเครื่องมือวัด

3.1.4 Incurred materials คือ วัสดุที่มีสารที่จะวิเคราะห์อยู่ในเนื้อตัวอย่าง อาจโดยธรรมชาติหรือจงใจทำให้เกิดขึ้นเหมือนธรรมชาติ ซึ่งจะทำให้สารนั้นจับกับเนื้อตัวอย่างได้ดีกว่าการ fortify หรือ spike ความเข้มข้นของสารจะขึ้นอยู่กับปริมาณสารที่สัมผัสกับเนื้อตัวอย่าง อัตราการดูดซับ (take-up) และการสูญเสียของ matrix รวมทั้งการสูญเสียที่เกิดจาก metabolism ตัวอย่าง incurred materials เช่น แป้งที่ทำจากธัญพืชที่พ่นด้วยสารกำจัดวัชพืชระหว่างปลูก เนื้อสัตว์ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมสารเร่งการเจริญเติบโต ยาซึ่งเติม active ingredients ในช่วง formulation stage เป็นต้น

3.1.5 Independently characterised materials เป็นวัสดุที่เตรียมขึ้นมา โดยเฉพาะ กรณีนี้ความเข้มข้นของสารควรได้จากวิธีซึ่งมี bias น้อยมาก เช่น จากวิธีปฐมภูมิ (primary method)

3.1.6 Reference materials (RM) หมายถึงวัสดุใดๆ ที่มีการเตรียมอย่างดี มีความเป็นเนื้อเดียวกัน จะต้องไม่เปลี่ยนแปลงหรือสลายง่าย และทราบค่าความเข้มข้นหรือคุณสมบัติที่กำลังศึกษา RM อาจเป็น matrix RM หรือ pure RM ซึ่งได้แก่ สารมาตรฐานที่ใช้เตรียม กราฟมาตรฐานหรือ สารเคมีอื่นที่ทราบค่าความบริสุทธิ์

3.1.7 Certified reference materials (CRM) : คือ RM ที่ค่าหรือความเข้มข้นของสารสามารถสอบกลับได้และได้รับการรับรอง การเลือก CRMs ควรเลือกจากผู้ผลิตที่น่าเชื่อถือ เป็นที่ยอมรับ และวิธีการให้ค่า (assign) สอบกลับไปที่ SI unit ได้ ผลิตตาม ISO Guide 34 (general requirements for the competence of reference material producers) และมีใบรับรองค่า (certificate) ที่มีสาระสำคัญตาม ISO Guide 31 (reference materials-contents of certificates and labels) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม CRMs ที่มี matrix และความเข้มข้นของสารเหมาะสม เป็นสิ่งที่หาได้ยาก นอกจากนี้ ยังมีราคาแพงมาก

3.2 วิธีการทางสถิติ (Statistical Techniques)

วิธีการหรือเทคนิคทางสถิติเป็นเครื่องมือที่สำคัญยิ่งสำหรับการทดสอบและการประเมินวิธีวิเคราะห์ ทั้งนี้เพราะคุณลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์ทำได้โดยการคำนวณผลวิเคราะห์และประเมินด้วยสถิติ ดังนั้นนักวิเคราะห์ควรมีความคุ้นเคยกับสถิติเบื้องต้น และมีความเข้าใจเกี่ยวกับสถิติทดสอบ (statistical tests) ที่ใช้ในการประเมิน ความแม่นยำ (accuracy), ความเที่ยง (precision), ความเป็นเส้นตรง (linearity), ช่วงของการวัด (range), ขีดจำกัดของการตรวจพบเชิงคุณภาพ (limit of detection), ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantification) และ ความไม่แน่นอนของการวัด (measurement uncertainty) รวมทั้งสถิติที่ใช้ในการทดสอบค่าสุดต่าง (outlier)

สถิติที่เกี่ยวข้องกับการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่จะกล่าวถึงในบทนี้ได้แก่ ค่าเฉลี่ยเลขคณิต (arithmetic mean) ค่าแปรปรวน (variance) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) สัมประสิทธิ์ความแปรผัน (coefficient of variation), ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (standard error หรือ standard deviation of the mean), สถิติสำหรับการทดสอบ เช่น Grubb's test, Cochran test, F-test, t-test, สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) (สถิติเหล่านี้ใช้กับข้อมูลที่มีการแจกแจงแบบโค้งปกติ (normal or Guassian curve))

รายละเอียดและตัวอย่างการใช้สถิติเหล่านี้รวมทั้งสถิติอื่นๆ ได้แก่ สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination), ความถดถอยเชิงเส้น (linear regression) และการยืนยันความสัมพันธ์เชิงเส้นด้วย residual plot มีอยู่ในภาคผนวก 2

3.2.1 ค่าเฉลี่ยเลขคณิต (Arithmetic mean)

ค่าเฉลี่ยเลขคณิตหรือค่าเฉลี่ย เป็นค่าบอกจุดตรงกลางของกลุ่มข้อมูล ถ้าเป็นค่าเฉลี่ยของข้อมูลทั้งหมด (ประชากร) ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยจริงใช้สัญลักษณ์ “ μ ” ถ้าเป็นค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างที่สุ่มมา (sample) ใช้สัญลักษณ์ “ $\bar{x}$ ” โดยปกติการทดสอบหรือการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ จะไม่ทราบค่า μ แต่จะทราบค่า $\bar{x}$ ดังนั้น $\bar{x}$ จึงเป็นตัวแทนหรือค่าโดยประมาณของ μ ค่า $\bar{x}$ จะใกล้เคียงกับค่า μ มากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับจำนวนข้อมูล เช่น จำนวนการทดสอบหรือวิเคราะห์ซ้ำ

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

โดย x_i เป็น ค่าของข้อมูลหรือผลวิเคราะห์แต่ละค่า และ n เป็นจำนวนข้อมูล

3.2.2 ค่าแปรปรวน (Variance)

จะเห็นว่าผลวิเคราะห์ที่ทำซ้ำๆ แต่ละค่าไม่เท่ากัน และมีความแตกต่างจากค่าเฉลี่ยต่างกัน แสดงว่าข้อมูลมีความแปรปรวนซึ่งจะมีผลต่อความน่าเชื่อถือของข้อมูล ถ้ามีความแปรปรวนมากความน่าเชื่อถือก็ลดลง ดังนั้นจึงต้องหาค่าแปรปรวนโดยแสดงในรูปของค่าแปรปรวนเฉลี่ยสำหรับกลุ่มประชากรแทนด้วยสัญลักษณ์ “ σ^2 ” สำหรับของกลุ่มตัวอย่าง (เช่นผลวิเคราะห์ซ้ำๆ) ใช้ “ s^2 ”

$$\sigma^2 = \frac{\sum (x_i - \mu)^2}{n} \dots\dots\dots(2)$$

ในความเป็นจริงไม่อาจหาค่า σ^2 ถ้าไม่ทราบค่า μ ดังนั้นจึงต้องหาค่า estimator ของ σ^2 แทน คือ s^2 ซึ่งหาได้จากสูตร

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

โดย $n-1$ คือ degree of freedom

การใช้ $n-1$ จะทำให้ ค่า s^2 ใกล้เคียงกับ σ^2 (และไม่น้อยกว่า σ^2) มากกว่าการใช้ n

สำหรับค่าแปรปรวนของค่าเฉลี่ย แทนได้ด้วย $s^2(\bar{x})$ และหาได้จาก

$$s^2(\bar{x}) = \frac{s^2}{n} \dots\dots\dots(4)$$

3.2.3 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation)

เป็นค่าบอกความมากน้อยของการกระจายข้อมูล แสดงความคลาดเคลื่อนของผลวิเคราะห์ที่เกิดขึ้นเป็นครั้งคราว (random error) standard deviation มีค่าเท่ากับรากที่ 2 ของค่าแปรปรวน ถ้าเป็นค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของประชากรใช้ “ σ ” ถ้าเป็นกลุ่มตัวอย่างใช้สัญลักษณ์ “ s ”

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \mu)^2}{n}} \dots\dots\dots(5)$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}} \dots\dots\dots(6)$$

3.2.4 ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Standard error หรือ standard deviation of the mean)

ใช้สัญลักษณ์ “ $s(\bar{x})$ ” เป็นค่าที่แสดงถึงการกระจายตัวของ $\bar{x}$ ที่แตกต่างจาก μ

$$s(\bar{x}) = \frac{s}{\sqrt{n}} \dots\dots\dots(7)$$

Standard error มีประโยชน์มากในการประเมินผลทางสถิติ โดยเฉพาะการวัดความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้นเป็นประจำในวิธีวิเคราะห์ (systematic error) เช่นในการทำ recovery study การทราบค่า $\bar{x}$ เพียงอย่างเดียวไม่อาจบอกถึงค่า μ ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยที่แท้จริงได้โดยตรง แต่เราสามารถคาดคะเนค่า μ ได้ดีขึ้นโดยการหาช่วงของความเชื่อมั่น (confidence interval) ของ $\bar{x}$ โดยใช้ $\bar{x}$ และ standard error (ซึ่งจะกล่าวถึงอย่างละเอียดในหัวข้อ t-test)

3.2.5 สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of variation: CV)

คือค่าที่แสดงความคลาดเคลื่อนของวิธีที่เกิดขึ้นเป็นครั้งคราว เช่นเดียวกับ standard deviation แต่ CV เป็นค่าสัมพัทธ์ นิยมแสดงเป็นค่าร้อยละจึงใช้เปรียบเทียบความคลาดเคลื่อนที่ความเข้มข้นต่างระดับ และบอก precision ของวิธีได้

$$\%CV = \%RSD = \frac{s \times 100}{\bar{x}} \dots\dots\dots(8)$$

3.2.6 การทดสอบค่าสุดต่าง (outlier) ด้วย Grubb's test

ค่าสุดต่าง (outlier) หมายถึงค่าที่แตกต่างจากค่าอื่นๆในกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ เป็นค่าที่ควรกำจัดออกเพื่อไม่ให้มีผลกระทบกับค่าเฉลี่ย การทดสอบค่าสุดต่างของข้อมูลในนี้จะกล่าวถึงเฉพาะ Grubb's test ซึ่งทำได้โดยการหาอัตราส่วน (G หรือบางครั้งใช้ T) ระหว่างความเบี่ยงเบนของค่าที่สงสัยจากค่าเฉลี่ย กับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$$G = \frac{|\text{suspect value} - \bar{x}|}{s} \dots\dots\dots(9)$$

ค่า s คือ standard deviation ที่คำนวณโดยมีค่าที่สงสัยรวมอยู่ด้วย จากนั้นจึงเปรียบเทียบค่า G ที่คำนวณได้กับค่า G จากตารางโดยเลือกใช้ตารางที่ระดับนัยสำคัญที่ต้องการ (เช่น 0.05) ถ้า G จากการคำนวณน้อยกว่า แสดงว่าไม่มีค่าสุดต่างในกลุ่มข้อมูลนี้ (ตาราง G แสดงในภาคผนวก 2)

สามารถใช้ Grubb's test ทดสอบค่าสุดต่างของผลการวิเคราะห์ที่เกิดจาก
ทำหลายๆ ซ้ำได้

3.2.7 การทดสอบค่าแปรปรวนสุดต่างด้วย Cochran's test

Cochran's test เป็นสถิติที่ใช้ในการทดสอบค่าสุดต่างของค่าแปรปรวน หรือ
ความแตกต่างของค่า duplicate ซึ่งทำได้โดยการหาอัตราส่วน (R หรือบางครั้งใช้ C)
ระหว่างค่าแปรปรวนที่มีค่าสูงที่สุดกับผลรวมของค่าแปรปรวนทั้งหมด

$$R = \frac{\max s_i^2}{\sum s_i^2} \dots\dots\dots(10)$$

โดย $\max s_i^2$ หมายถึงค่าแปรปรวนของข้อมูลชุดที่ i ซึ่งมีค่ามากที่สุด
ข้อมูลอาจมีหลายชุด แต่ทุกชุดจะต้องมี ค่า n เท่ากัน

เปรียบเทียบค่า R ที่คำนวณได้กับค่า R จากตาราง (ภาคผนวก 2) ถ้า R จากการ
คำนวณน้อยกว่า แสดงว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างค่าแปรปรวนเหล่านั้น

สามารถใช้ Cochran's test ทดสอบค่าสุดต่างของความแตกต่างของผลการวิเคราะห์
2 ค่าจากการทำ duplicate analysis ในการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างหรือ
RM (reference material) ที่เตรียมขึ้นเพื่อใช้ในการทดสอบวิธีก่อนทดสอบด้วย one-way
ANOVA ได้

3.2.8 การทดสอบค่าแปรปรวนด้วย F-test

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \dots\dots\dots(11)$$

s_1^2 = ค่าแปรปรวนของ ข้อมูลกลุ่มที่ 1 (หรือวิธีที่ 1)

s_2^2 = ค่าแปรปรวนของ ข้อมูลกลุ่มที่ 2 (หรือวิธีที่ 2)

โดย $s_1^2 > s_2^2$

เปรียบเทียบ ค่า F จากการคำนวณกับค่า F_c จากตาราง F (ภาคผนวก 1) ค่า F_c ขึ้นกับขนาดของกลุ่มข้อมูล (n) และระดับนัยสำคัญ

ถ้า F จากการคำนวณน้อยกว่า F_c แสดงว่าค่าแปรปรวนทั้งสองไม่แตกต่างกัน

สามารถใช้ F-test ในการทดสอบความแตกต่างของ precision ได้

3.2.9 การทดสอบค่าเฉลี่ยด้วย t-test

t-test ใช้ในการทดสอบค่าเฉลี่ยของข้อมูล 1 กลุ่มตัวอย่าง และ 2 กลุ่มตัวอย่าง และใช้ในการหาช่วงของความเชื่อมั่นของค่าเฉลี่ย (confidence interval of the mean) สามารถใช้ t-test ในการทดสอบ accuracy ของวิธีวิเคราะห์ได้

การทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย t-test ทำได้โดยการคำนวณค่า t ด้วยสูตรที่เหมาะสม และเปรียบเทียบค่า t กับค่า t_c จากตาราง t (ภาคผนวก 1) ค่า t_c ขึ้นกับขนาดของกลุ่มข้อมูล (n) และระดับนัยสำคัญ

ถ้า t จากการคำนวณน้อยกว่า t_c แสดงว่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยไม่มีนัยสำคัญ

3.2.9.1 สำหรับข้อมูล 1 กลุ่มตัวอย่าง

$$t = \frac{(\bar{x} - \mu)}{(s/\sqrt{n})} \dots\dots\dots(12)$$

t เป็นอัตราส่วนระหว่างความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์กับค่าอ้างอิง (ซึ่งแสดงถึงความคลาดเคลื่อนแบบ systematic error) กับ standard error

3.2.9.2 สำหรับข้อมูล 2 กลุ่มตัวอย่างที่เป็นอิสระต่อกัน และมีค่าแปรปรวนไม่แตกต่างกัน ($\sigma_1^2 = \sigma_2^2$)

การทดสอบว่า ค่าแปรปรวนของข้อมูล 2 กลุ่มแตกต่างกันหรือไม่ ใช้ F-test (สูตร ที่ 11)

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \dots\dots\dots(14)$$

โดย s ได้จาก

$$s^2 = \frac{[(n_1-1) s_1^2 + (n_2-1) s_2^2]}{(n_1+n_2-2)} \dots\dots\dots(15)$$

ค่า degree of freedom $df = (n_1 + n_2 - 2) \dots\dots\dots(16)$

3.2.9.3 สำหรับข้อมูล 2 กลุ่มตัวอย่างที่เป็นอิสระต่อกัน และมีค่าแปรปรวนแตกต่างกัน ($\sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$)

$$t = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{\sqrt{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)}} \dots\dots\dots(17)$$

$$df = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\left(\frac{s_1^4}{n_1^2(n_1-1)} + \frac{s_2^4}{n_2^2(n_2-1)}\right)} \dots\dots\dots(18)$$

3.2.9.4 สำหรับข้อมูล 2 กลุ่มตัวอย่างที่มีความสัมพันธ์กัน เช่น ผลวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกันจาก 2 วิธีที่ระดับความเข้มข้นหลายระดับในช่วงที่ไม่กว้างนัก (paired t-test)

$$t = \frac{\bar{d}}{\left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)} \dots\dots\dots(19)$$

d คือ ค่าเฉลี่ยของความแตกต่างระหว่างผลที่ได้จาก 2 วิธีที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

s คือ standard deviation ของความแตกต่าง เหล่านั้น

สามารถใช้ t-test เหล่านี้ในการทดสอบ ความแม่นยำของวิธีได้

3.2.10 การทดสอบหาความสัมพันธ์ระหว่าง 2 ตัวแปร กรณีที่ข้อมูลทั้ง 2 ตัวแปร นำมาคำนวณได้ (Correlation analysis)

ลักษณะของความสัมพันธ์นี้อาจมีได้หลายรูปแบบ ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง และวิธีการทางสถิติที่เรียกว่า สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (Pearson Correlation Coefficient : r)

$$r = \frac{\sum[(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{[\sum(x_i - \bar{x})^2][\sum(y_i - \bar{y})^2]}} \dots\dots\dots(20)$$

สามารถใช้ r ในการทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานและของวิธีวิเคราะห์ได้ระดับหนึ่ง

(ควรอ่านภาคผนวก 2 เพิ่มเติม)

4

ขอบเขต

ของการทดสอบวิธี

(Extent of a Validation Study)

การนำวิธีวิเคราะห์ไปใช้นอกจากจะต้องทราบวัตถุประสงค์ เช่น ใช้หาสารอะไร ใช้ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพหรือเชิงปริมาณ ครอบคลุม matrix ประเภทใด ช่วงความเข้มข้นเท่าไรแล้ว จะต้องทราบคุณลักษณะเฉพาะของวิธีที่เกี่ยวข้องกับการใช้งานด้วย เช่น ความแม่นยำ ความเที่ยง ความจำเพาะเจาะจง ความเป็นเส้นตรง ความทน ซีดจำกัดของการตรวจพบ ซีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณ รวมทั้งคุณสมบัติอื่นๆที่จำเป็น คุณลักษณะเฉพาะของวิธีเหล่านี้จะทราบได้จากข้อมูลการทดสอบวิธี ดังนั้นในการทดสอบวิธี จึงควรมีการกำหนดขอบเขตของการทดสอบ ซึ่งครอบคลุมคุณลักษณะทุกอย่าง หรือเพียงบางอย่าง โดยมีแนวทางในการพิจารณาดังต่อไปนี้

4.1 วิธีที่พัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการ (Laboratory-developed methods)

(เช่นจากวิธีเดิมใช้เทคนิค spectrophotometry ห้องปฏิบัติการปรับมาใช้เทคนิค HPLC เป็นต้น) ควรศึกษา

4.1.1 พิสัยหรือช่วงของการใช้งาน และความเป็นเส้นตรงของวิธี โดยศึกษาจากกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจาก สารละลายมาตรฐานที่เตรียมด้วยน้ำหรือตัวทำละลายที่ระบุในวิธีวิเคราะห์ เพื่อกำหนดช่วงที่เหมาะสม และตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของวิธี (ศึกษาใน matrix) รวมทั้งศึกษา matrix effect (บางเทคนิคไม่จำเป็นต้องศึกษาความเป็นเส้นตรงเช่น immunoassay)

4.1.2 ความจำเพาะเจาะจง โดยศึกษาการรบกวนจากสารหรือสิ่งต่างๆที่อาจมีใน

ตัวอย่างจริง เช่น สารปนเปื้อนที่เป็นชนิดเดียวกับสารที่สนใจ (contaminants) และคนละชนิดกัน (impurities) การรบกวนจาก matrix หรือสารอื่นๆ สำหรับวิธีที่ใช้ในการหา stability ควรศึกษาการรบกวนของ transformation products ด้วย

4.1.3 ความแม่นยำ โดยการวิเคราะห์ CRM และ ศึกษา recovery ที่ระดับต่างๆ ในช่วงของการใช้งาน

4.1.4 ความเที่ยง โดยศึกษาที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ด้วยการซ้ำ (repeatability) และ within laboratory reproducibility)

4.1.5 เปรียบเทียบผลวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีนี้กับวิธีอื่น (ถ้าสามารถทำได้)

4.1.6 ถ้าเป็นวิธีที่ใช้หาสารในระดับต่ำ อาจต้องหาค่า LOD, LOQ ด้วย

ถ้าผลของทดสอบวิธีไม่ผ่านเกณฑ์ที่กำหนดไว้ ควรทบทวนขั้นตอนต่างๆ ของวิธี ปรับปรุงและทดสอบใหม่ นอกจากนี้ควรให้นักวิเคราะห์หลายคน ทดลองใช้วิธีนี้ด้วย

4.2 วิธีที่พัฒนาโดยผู้อื่นและต้องการนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการ (Existing methods)

อย่างน้อยต้องศึกษาคุณลักษณะดังต่อไปนี้

4.2.1 วิธีที่ผ่านการทดสอบความถูกต้องอย่างสมบูรณ์ (fully validated) และนำมาใช้กับ matrix ที่แตกต่างจากที่กำหนดในขอบข่ายของวิธี ต้องแสดงให้เห็นว่า matrix ใหม่ นั้นไม่ทำให้เกิดคลาดเคลื่อน โดยการทดสอบ ความแม่นยำ ความเที่ยง ความเป็นเส้นตรงและ matrix effect

4.2.2 วิธีที่พัฒนามาอย่างดีและผ่านการศึกษา single laboratory method validation แล้วแต่ไม่มีการทำ collaborative study (well established

without collaborative study) ควรทดสอบ ความแม่นยำ ความเที่ยง
ความเป็นเส้นตรง และ matrix effect

4.2.3 วิธีที่เผยแพร่ในวารสารวิทยาศาสตร์ ควรทดสอบ ความแม่นยำ ความเที่ยง ความ
เป็นเส้นตรงและ matrix effect รวมทั้งความทน

4.2.4 วิธีที่เป็น empirical method (ดูคำอธิบายในบทที่ 2) ถ้าเป็นวิธีที่ไม่มีข้อมูล
การทำ collaborative study ควรศึกษาความเที่ยงโดยเปรียบเทียบกับ
ค่าที่คำนวณจาก Horwitz equation

4.2.5 วิธีที่ใช้สำหรับ Ad hoc analysis (การตรวจวิเคราะห์ที่มีขึ้นเป็นกรณีพิเศษที่
เฉพาะเจาะจง และอาจไม่ได้ทำอีกเลย และไม่ใช้วิธีที่ใช้ในการตรวจ
วิเคราะห์ที่ทำเป็นประจำ) ควรทดสอบความแม่นยำ โดยการทำ recovery หรือ
standard addition และหาค่าความเที่ยง

4.2.6 วิธีที่ใช้อยู่เดิมมีการเปลี่ยนแปลงในระบบการวิเคราะห์ เช่น เครื่องมือวัด,
reagent batch, นักวิเคราะห์ เป็นต้น อย่างน้อยควรศึกษาความแม่นยำ โดย
ใช้วัตถุตัวอย่างที่วิเคราะห์เป็นประจำ หรือ ตัวอย่างควบคุม (control sample)

4.3 วิธีที่ห้องปฏิบัติการดัดแปลงจากวิธีที่ยอมรับกันว่าเป็นวิธีมาตรฐาน (Standard methods with modification)

ขอบเขตการศึกษาค้นคุณลักษณะเฉพาะของวิธีขึ้นอยู่กับว่ามีการดัดแปลงหรือ
เปลี่ยนแปลงไปจากวิธีเดิมในขั้นตอนใด อย่างไรก็ตามควรศึกษาเช่นเดียวกับวิธีใน 4.1

สำหรับการนำวิธีมาตรฐาน ที่ผ่านการทดสอบความถูกต้องอย่างสมบูรณ์ (fully
validated) คือผ่านการทำ collaborative study และในการใช้งานไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ
ไม่จำเป็นที่ห้องปฏิบัติการจะต้องทำการทดสอบวิธี (method validation) อย่างไรก็ตามห้อง
ปฏิบัติการต้องทวนสอบ (verify) เพื่อเป็นการยืนยันสมรรถนะของห้องปฏิบัติการว่าสามารถ
ทำได้ตามคุณลักษณะที่กำหนดไว้ของวิธี และเหมาะสมตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน
โดยการหาค่าความแม่นยำ ความเที่ยง ความเป็นเส้นตรง

ถ้าวิธีต่างๆ ดังกล่าวถูกนำมาใช้ในการหาสารที่มีในปริมาณต่ำ ก็ต้องพิจารณาเรื่องของขีดจำกัดของการตรวจพบ และขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณด้วย

ขอบเขตของการทดสอบวิธี สรุปได้ตามตารางที่ 1

สำหรับลำดับของการทดสอบวิธีวิเคราะห์นั้น ขึ้นอยู่กับวิธีวิเคราะห์ที่กำลังทดสอบ ถ้าเป็นวิธีที่ใช้เทคนิคทางด้าน liquid chromatography ควรเริ่มต้นด้วยการศึกษา selectivity ของสารมาตรฐาน และ precision ของ retention times และ peak area เพื่อดูความพร้อมของ system จากนั้นจึง ทดสอบ linearity และ range LOD LOQ selectivity (ใน matrix) trueness รวมทั้ง recovery ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ และ ruggedness ซึ่งบางพารามิเตอร์เหล่านี้สามารถศึกษาพร้อมกันได้

ตารางที่ 1 สรุปข้อบ่งชี้การทดสอบวิธีวิเคราะห์ สำหรับวิธีวิเคราะห์

วิธีวิเคราะห์	คุณลักษณะของวิธีวิเคราะห์					
	① ความเป็นเส้นตรง (linearity) และ matrix effect	② ความแม่นยำ (accuracy)	③ ความเที่ยง (precision)	④ ความทนทาน (ruggedness)	⑤ LOD	⑥ LOQ
1. Fully validated ทำตามวิธีทุกประการ (verify)	Y	Y	Y	?	?	?
2. Fully validated ใช้กับ matrix ใหม่	Y	Y	Y	N		?
3. Well-established without collaborative trial ทำตามวิธีทุกประการ	Y	Y	Y	N	?	?
4. Published with some characteristics ทำตามวิธีทุกประการ	Y	Y	Y	Y	?	?
5. Published without characteristics	Y	Y	Y	Y	?	?
6. Empirical without collaborative trial	Y	N	N	?	?	?
7. Ad hoc analysis	Y	Y	N	N	?	?
8. Change in system	Y	Y	N	N	?	?

Y = ทดสอบ, N = ไม่ต้องทดสอบ, ? = ขึ้นกับปริมาณของสารที่ต้องการหา และ วัตถุประสงค์ของการใช้งาน

5

ขั้นตอนการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Protocol for Method Validation Study)

ในการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ควรพิจารณาแหล่งต่างๆที่อาจจะทำให้เกิดความแปรปรวน (variations) เมื่อมีการนำวิธีวิเคราะห์นั้นไปใช้ในงานประจำ ซึ่งรวมทั้งความแปรปรวนที่เกิดจากความเปลี่ยนแปลงระหว่างวัน (between days) ระหว่างการวิเคราะห์แต่ละครั้ง (between runs), และเมื่อมีการเปลี่ยนกราฟมาตรฐาน

5.1 ขั้นตอนการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Protocol for method validation study)

- 5.1.1 กำหนดวัตถุประสงค์ (objectives) เช่น เพื่อหาคุณลักษณะของวิธี (เช่น ความแม่นยำ ความเที่ยง ชัดจำกัดของการตรวจพบ เป็นต้น) เพื่อยืนยันความเหมาะสมต่อการใช้งานตามวัตถุประสงค์เฉพาะ หรือเพื่อใช้ในการศึกษาความสามารถ (proficiency) ของนักวิเคราะห์ เป็นต้น
- 5.1.2 กำหนดประเภทของวิธี และการนำวิธีไปใช้งาน (Type of method and application) นั่นคือต้องทราบว่า วิธีนั้นเป็นวิธีประเภทใด เช่น เป็น empirical method, rational method (ดูคำอธิบายในบทที่ 2) เป็นต้น มีข้อมูลเกี่ยวกับคุณลักษณะเฉพาะของวิธีหรือไม่ วิธีนั้นใช้สำหรับการวิเคราะห์เชิงปริมาณหรือคุณภาพ ถ้าเป็นเชิงปริมาณ ปริมาณหรือความเข้มข้นของสารที่สนใจอยู่ในระดับใด เช่น ความเข้มข้นต่ำ (สารปนเปื้อน, และสารตกค้าง เป็นต้น) หรือ ความเข้มข้นสูง (ส่วนประกอบสำคัญของ

ผลิตภัณฑ์ หรือวัตถุตัวอย่าง เป็นต้น) ผลของการวิเคราะห์จะนำไปใช้งานประเภทใด เช่น ทางด้านกฎหมาย สํารวจวิจัย ตรวจสอบติดตาม, ตรวจสอบข้อกำหนด, หรือควบคุมคุณภาพ เป็นต้น

5.1.3 กำหนดขอบเขตหรือคุณลักษณะของวิธีที่จะต้องศึกษา (extent of validation) เช่น ความแม่นยำ ความเที่ยง ช่วงของการใช้งานและความเป็นเส้นตรง ขีดจำกัดของการตรวจพบ เป็นต้น

5.1.4 กำหนดความต้องการทางเทคนิค (technical requirements) เช่น เครื่องมือ สารเคมี เป็นต้น

5.1.5 จัดทำคำบรรยายลักษณะของวิธี (description) โดยเขียนวิธีการตามรูปแบบที่กำหนดไว้ (เช่น SOP) ให้ชัดเจนทุกขั้นตอน ระบุความต้องการต่างๆ เช่น chromatographic materials, enzymes, antibodies, reagents ระบุ performance specification และ system suitability รวมทั้งจุดวิกฤติต่างๆ ของ สารมาตรฐานที่ใช้ เช่น absorptivities, half-scale deflections, recoveries เป็นต้น และสิ่งอื่นๆ ที่จะทำให้การดำเนินการวิเคราะห์เป็นไปอย่างถูกต้อง

5.1.6 เตรียมวัสดุอ้างอิง (reference materials) เช่น CRM, spike materials, ให้มีปริมาณมากพอ โดยพิจารณาจากคุณลักษณะที่ต้องศึกษาว่า จะทำที่ระดับความเข้มข้นใดบ้าง ระดับละกี่ซ้ำ คุณลักษณะเฉพาะใดที่สามารถศึกษาไปพร้อมกันได้ ปริมาณที่เตรียมจะต้องมากกว่าที่จะใช้จริง เพื่อเผื่อไว้สำหรับกรณีที่ต้องมีการทดสอบเพิ่มเติมด้วย

5.1.7 วิเคราะห์ตามขั้นตอนที่กำหนดไว้ในวิธีวิเคราะห์ (procedure) รวมทั้งจำนวน การทำซ้ำตามที่ระบุไว้

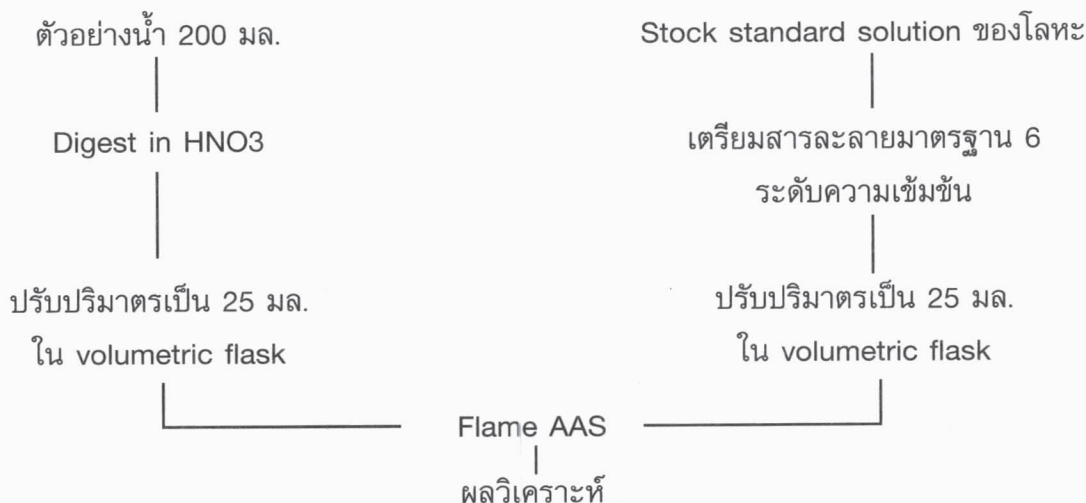
5.1.8 คำนวณผล และประเมินผล (calculation and assessment) โดยเลือกใช้ สถิติที่เหมาะสม (พิจารณาค่าสุดต่างที่อาจมี)

5.1.9 ทบทวนผล (review the results) และหากพบว่ามีคุณลักษณะเฉพาะ
อย่างใด อย่างหนึ่งไม่ผ่านเกณฑ์การยอมรับ ควรพิจารณาหาสาเหตุที่ทำให้
เกิดการผิดพลาดเพื่อจะได้ปรับปรุงวิธีให้ดีขึ้น

5.1.10 สรุปผลการทดสอบ (conclusion) และจัดทำรายงาน (reporting) โดยสรุป
ผลของการทดสอบทั้งหมด วิธีที่ใช้ ค่าที่ได้ การผ่านหรือไม่ผ่านเกณฑ์การ
ยอมรับ ข้อความที่สรุปว่าวิธีนี้มีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้งานตาม
วัตถุประสงค์เฉพาะหรือไม่ รวมทั้งขีดจำกัดอื่นๆของวิธีที่อาจมี และควรระบุ
รายชื่อผู้ทดสอบวิธี และผู้ทบทวน

5.2 ตัวอย่างการเตรียม spiked materials สำหรับการทดสอบวิธีวิเคราะห์ (Example of material preparation for method validation study)

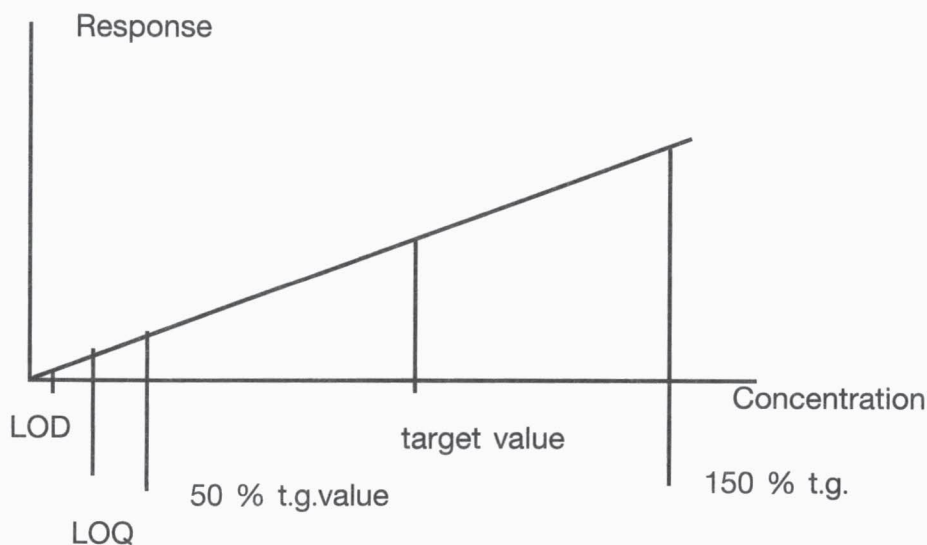
การทดสอบวิธีวิเคราะห์โลหะในน้ำด้วย Flame atomic absorption spectrometry
ขั้นตอนในการวิเคราะห์



ค่าเป้าหมาย (target value) สำหรับวิธีนี้ คือ ค่ากำหนดตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข
สำหรับปริมาณโลหะในน้ำดื่ม = 0.05 มก. ต่อลิตร

5.2.1 คุณลักษณะของวิธีและระดับความเข้มข้นที่จะศึกษา

คุณลักษณะของวิธีที่จะศึกษา	ระดับความเข้มข้นที่จะศึกษา
1. Linearity	ความเข้มข้น 6 ระดับ ครอบคลุมค่าเป้าหมาย คือ 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.10 มก ต่อ ลิตร ความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ
2. Accuracy	ความเข้มข้นที่ ระดับ 50%, 100% และ 150% หรือ 200% ของค่าเป้าหมาย คือ 0.025, 0.05, 0.075, มก ต่อ ลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ
3. Precision	ความเข้มข้นที่ ระดับ 50%, 100% และ 150% หรือ 200% ของค่า (repeatability) เป้าหมาย หมายถึง คือ 0.025, 0.05, 0.075, มก ต่อ ลิตร ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ
4. LOD	ทดสอบด้วยการวัด method blank 10 ซ้ำ
5. LOQ	ทดสอบด้วยการวัด method blank 10 ซ้ำ และยืนยันด้วยค่า precision และ accuracy



ค่า target ใน calibration curve เป็นค่าใน final solution ซึ่ง dilute จาก original 8 เท่า

5.2.2 การเตรียม material ที่จะใช้

ระดับความเข้มข้น ที่ต้องการ (มก/กก)	จำนวนซ้ำ	ปริมาณ ตัวอย่างที่ใช้	น้ำกลั่น ที่ใช้เตรียม	ผลการวิเคราะห์ที่ได้ (xbar, sd) ใช้สำหรับ
0	10	2000	2500	LOD, estimated LOQ
0.005	6	1200	2000	linearity, recovery, precision
0.01	6	1200	2000	linearity, recovery, precision
0.025	6	1200	2000	linearity, recovery, precision
0.05	6	1200	2000	linearity, recovery, precision
0.075	6	1200	2000	linearity, recovery, precision
0.1	6	1200	2000	linearity, recovery, precision
LOQ	7	1400	2000	LOQ

รวมปริมาณน้ำกลั่นที่ต้องเตรียมไว้ใช้ในการทดสอบวิธีนี้คือ ประมาณ 21000 มิลลิลิตร (21 ลิตร) ซึ่งรวมที่เผื่อไว้สำหรับการทำซ้ำเมื่อมีข้อผิดพลาด แต่ยังไม่รวมปริมาณที่ต้องใช้สำหรับ intermediate precision

6

คุณลักษณะเฉพาะของ วิธีวิเคราะห์ : การหาค่า และการประเมิน การยอมรับ

(Method Performance Characteristics : Determination and Assessment of Acceptance)

เนื้อหาในบทนี้จะเกี่ยวกับคุณลักษณะเฉพาะต่างๆของวิธีตามทีระบุไว้ในบทที่ 2 ซึ่งได้แก่ ความจำเพาะเจาะจง ช่วงของการวัดและความเป็นเส้นตรง ความแม่นยำ ความเที่ยง ชัดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ ความทนของวิธี และความไม่แน่นอนของการวัด โดยจะพูดถึงวิธีการหาค่า และการประเมินการยอมรับอย่างละเอียด อย่างไรก็ตามลำดับของหัวข้อในบทนี้ไม่ได้หมายความว่า เป็นลำดับที่จะต้องปฏิบัติตาม ทั้งนี้ ในการทดสอบวิธีนั้น ผู้ทดสอบจะต้องพิจารณาตัดสินใจเอง

6.1 ความจำเพาะเจาะจง (Specificity/selectivity)

การศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธี คือ การศึกษาว่าวิธีนั้น มีการตอบสนองต่อสารที่กำลังศึกษาเพียงอย่างเดียวหรือตอบสนองต่อสารอื่นที่มีในตัวอย่าง หรือต่อ species อื่นๆของสารที่กำลังศึกษาด้วย (เช่นกรณีสารประกอบของธาตุที่มี oxidation state หลายค่า) ถ้ามีการตอบสนองต่อสารอื่นที่ไม่ใช่สารที่ศึกษาเพียงอย่างเดียวแสดงว่าวิธีนั้นไม่มีความจำเพาะเจาะจง และสารอื่นๆเหล่านั้นจะทำให้เกิด systematic error

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงเชิงปริมาณเป็นสิ่งที่ยุ่งยาก เพราะจะต้องมีการศึกษาที่ความเข้มข้นของสารที่สนใจ และสารที่อาจรบกวนเหล่านั้นหลายระดับ ดังนั้น

การทดสอบเชิงคุณภาพจึงเป็นที่ยอมรับ ซึ่งทำได้โดยการใช้ สารมาตรฐาน, matrix blanks, spiked matrix blanks, กรณีที่ไม่สามารถหา matrix blank ได้ ก็อาจใช้ blanks อื่นๆ ที่เหมาะสมได้

การทดสอบความจำเพาะเจาะจง

6.1.1 กรณีที่มี matrix blank

วิเคราะห์ matrix blank กับ spiked matrix blank ถ้าสัญญาณของ matrix blank น้อยมากเมื่อเทียบกับสัญญาณของ spiked matrix blank แสดงว่าไม่มีการรบกวนจากสารอื่นในตัวอย่าง (ยกเว้นการวิเคราะห์สารตกค้าง ซึ่งค่าของ blank มักจะใกล้เคียงกับ analyte ที่ระดับ detection limit)

ควรแสดงผลการเปรียบเทียบให้เห็นชัดเจน เช่น chromatogram, spectra, data table เป็นต้น

6.1.2 กรณีที่ไม่มี matrix blank

วิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้วิธีที่กำลังศึกษา และยืนยันด้วยเทคนิคอื่น โดยเฉพาะเทคนิคที่ให้ spectral data เช่น mass spectrometry (MS), atomic emission spectrometry (AES), NMR, IR, UV, fluorescence เป็นต้น โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ทั้งนี้ต้องทำ method blank ด้วย เพื่อ identify interference อื่นๆที่นอกเหนือจาก sample matrix

6.1.3 กรณีที่มีวิธีมาตรฐานที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อ sample matrix นั้นๆ

วิเคราะห์ตัวอย่างด้วยวิธีที่กำลังศึกษา เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน ถ้าพบว่ามี การรบกวน ต้องหาสาเหตุและแก้ไข หากพบว่ามาจาก matrix จะต้องปรับ (optimize) หรือดัดแปลง (modify) วิธีให้ดีขึ้น

ตัวอย่าง

วิธีที่ใช้ chromatographic technique ซึ่งอาจมีสารอื่นที่ให้ peak ที่เดียวกับสารที่สนใจ สามารถทดสอบความจำเพาะเจาะจงได้โดยการเปลี่ยนคอลัมน์เป็นชนิดที่มี polarity ต่างจากเดิม และเปรียบเทียบผลหรือ อาจใช้ mass spectrometer detector (MSD) เพื่อ แยกสารต่างๆ

สำหรับการทดสอบ matrix effect มีรายละเอียดในข้อ 6.2.3

6.2 ช่วงของการวัด (Working range) และ ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ช่วงของการใช้งานหรือช่วงของการวัด (working range) เป็นช่วงของความเข้มข้นของสารซึ่งวิธีวิเคราะห์จะใช้ได้ ส่วนความเป็นเส้นตรงเป็นคุณลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์ที่แสดงความสัมพันธ์อย่างเป็นสัดส่วนโดยตรงระหว่างสัญญาณจากเครื่องมือตรวจวัดและความเข้มข้นของสารในช่วงของการใช้งาน ช่วงของการใช้งานจะเริ่มต้นจาก LOD (ถ้าทราบค่า LOD) หรือ LOQ ช่วงความเป็นเส้นตรง (linear range) จะเป็นส่วนหนึ่งของช่วงของการใช้งาน และจะเริ่มต้นที่ LOQ ทั้งช่วงการใช้งานและช่วงความเป็นเส้นตรงเป็นช่วงที่วัดได้ในสารละลายที่วัดค่าด้วยเครื่องมือวัด (final solution) ไม่ใช่ในตัวอย่างตั้งต้น (original sample)

การทดสอบความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ ทำได้โดยทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (calibration curve) และทดสอบ matrix effect โดยใช้สถิติที่เหมาะสม

กราฟมาตรฐานสร้างขึ้นจากการ plot ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณจากเครื่องมือวัดกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานของสารที่กำลังศึกษา สำหรับกราฟมาตรฐานที่เป็นเส้นตรง ปริมาณสารในตัวอย่างหาโดยการคำนวณจากค่า slope และ intercept ของสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ดังนั้นการสร้างกราฟมาตรฐานจะต้องให้ความคลาดเคลื่อนสุ่ม (random error) น้อยที่สุด เพื่อลดความคลาดเคลื่อนของ slope และ intercept ซึ่งสามารถทำได้โดยการเพิ่มจำนวนระดับความเข้มข้น (levels of concentration) และการทำซ้ำ (replication) ในแต่ละระดับ

Matrix effect หมายถึงการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของสัญญาณจากเครื่องมือวัดอันเป็นผลมาจากส่วนประกอบอื่นๆที่มีในตัวอย่างแต่ไม่ใช่จากสารที่กำลังศึกษา

6.2.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน

6.2.1.1 กำหนดช่วงของกราฟมาตรฐานให้ครอบคลุมความเข้มข้นใน final

solution ของตัวอย่าง (เช่น ช่วง 0-150% หรือ 50-150% ของความเข้มข้นใน final solution เป็นต้น)

- 6.2.1.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน ให้มีความเข้มข้นอย่างน้อย 6 ระดับ แต่ละระดับให้มีปริมาณเพียงพอสำหรับการทำ 3-4 ซ้ำ และควรเตรียมให้มีความห่างของแต่ละระดับเท่า ๆ กัน (ถ้าน้อยกว่า 6 ระดับจะทำให้มีความคลาดเคลื่อนสูงเกินไป ถ้าเกิน 20 ระดับ การลดลงของความคลาดเคลื่อนไม่มากนัก)
- 6.2.1.3 วัดสัญญาณจากเครื่องมือวัดโดยวัดแบบสุ่ม
- 6.2.1.4 plot ความเข้มข้นของสารมาตรฐานบนแกน x และสัญญาณที่อ่านได้บนแกน y (รวมทั้งค่า blank ด้วย)

6.2.2 การทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

- 6.2.2.1 ประเมินความเป็นเส้นตรง ด้วยสายตา (visual inspection) ถ้าพบว่ามีความเป็นเส้นตรง จึงดำเนินการต่อไป (ภาพที่ 1)
- 6.2.2.2 หาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ค่า r ที่ได้ควรเข้าใกล้ 1 กรณีที่ค่า r บอกความสัมพันธ์ได้ไม่ชัดเจน อาจทดสอบด้วย t-test เพิ่มเติม
- 6.2.2.3 เมื่อพบว่า มีความสัมพันธ์จึงสร้างเส้น regression line โดยใช้ method of least square (ภาพที่ 2)
- 6.2.2.4 ทำ residual plots เพื่อยืนยันความเป็นเส้นตรง (ภาพที่ 3) (ดูรายละเอียดในและภาคผนวก 2)

เมื่อสรุปได้ว่า calibration curve เป็นเส้นตรง อาจต้องทดสอบ matrix effect ด้วย

นอกจากสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) แล้ว การใช้สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ก็สามารถบอกความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรงของความเข้มข้น (x) และสัญญาณจากเครื่องมือวัด (y) ได้ โดย r บอกว่า x กับ y มีความสัมพันธ์กันหรือไม่เท่านั้น แต่ R^2 บอกถึงอิทธิพลของ x ที่มีต่อ y โดยอธิบายความแปรปรวนของ y ที่เกิดจาก x (ดูรายละเอียดในภาคผนวก 2)

การใช้ Method of least square คำนวณเส้น regression line

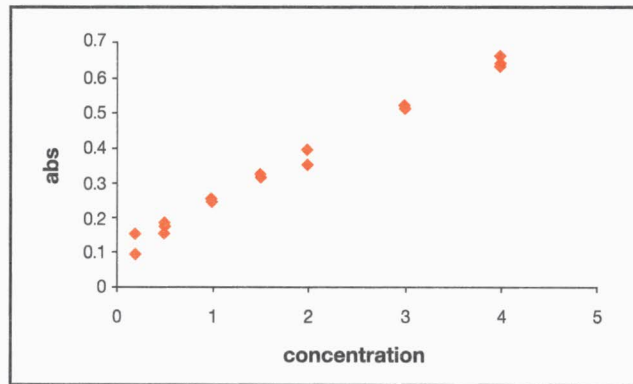
ในการ plot ความสัมพันธ์ระหว่าง x และ y นั้น มีสมมุติฐานว่า error ทั้งหมดเกิดบนแกน y ดังนั้นจะต้องลากเส้นตรงที่ทำให้มี error น้อยที่สุดคือให้ความแตกต่างระหว่างค่าสัญญาณที่อ่านได้จากการวัด (observe y_i) และ ค่าสัญญาณที่ได้จากการคำนวณ ($y_{\text{predicted}}$) ในแกน y มีน้อยที่สุด ค่าแตกต่างนี้เรียกว่า y-residual และเนื่องจากค่า y-residuals มีทั้งค่าบวกและค่าลบ จึงต้องหา ค่า minimum sum of squares of the residuals ซึ่ง Least square straight line หาได้ดังนี้

$$\text{Slope ของ เส้นตรง (b)} = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum (x_i - \bar{x})^2}$$

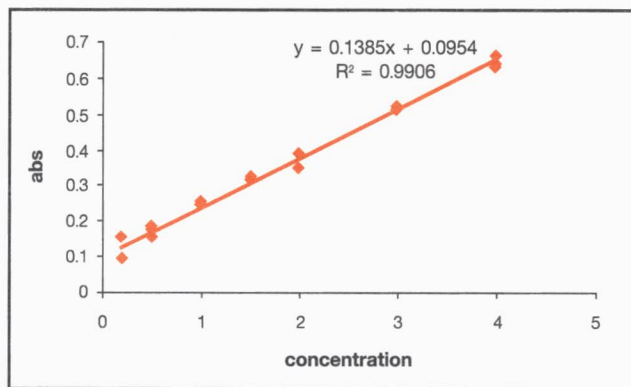
$$\text{Intercept (a)} = \bar{y} - b\bar{x}$$

ตัวอย่างการสร้าง calibration curve และ การทดสอบด้วย residual plot จากข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารกับสัญญาณจากเครื่องมือวัด

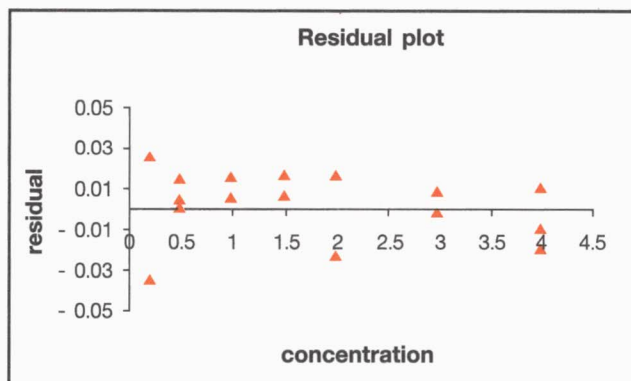
Concentration (ppm)	OD	OD	OD
0.2	0.09	0.09	0.15
0.5	0.18	0.15	0.17
1	0.24	0.24	0.25
1.5	0.31	0.32	0.31
2	0.35	0.39	0.35
3	0.51	0.52	0.52
4	0.63	0.66	0.64



ภาพที่ 1 Plot ของความเข้มข้นและสัญญาณจากเครื่องมือวัด



ภาพที่ 2 Calibration curve (regression line) จากการใช้ method of least square



ภาพที่ 3 Residual plot แสดงการกระจายตัวของ y-residuals รอบๆค่า 0 ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ยืนยันความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรง (สำหรับ residual plot แบบต่างๆ ดูได้ในภาคผนวก 2)

6.2.3 การทดสอบ matrix effect

6.2.3.1 เตรียม spiked matrix blank ให้มีความเข้มข้นที่ระดับต่าง ๆ เหมือนกับสารละลายมาตรฐานที่ทำกราฟมาตรฐาน

6.2.3.2 วัดสัญญาณจากเครื่องมือวัดโดยวัดแบบสุ่มและคำนวณค่าความเข้มข้น

6.2.3.3 ประเมิน matrix effect ซึ่งอาจทำได้หลายวิธี เช่น

- โดยการ plot ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (บนแกน x) กับความเข้มข้นของ spiked matrix blank ที่ได้จากข้อ 6.3.3.2 (บนแกน y) ทดสอบความเป็นเส้นตรง และทดสอบว่าช่วงของความเชื่อมั่น (confidence interval :CI) ของ slope คลุม 1 หรือไม่ ถ้าคลุมแสดงว่าไม่มี matrix effect
- ทดสอบด้วย paired t-test (ดูตัวอย่างเรื่อง trueness)

ถ้าพบว่ามี matrix effect การใช้กราฟมาตรฐาน (ที่สร้างจากสารละลายมาตรฐาน) มาคำนวณปริมาณสารในตัวอย่างจะเกิดความผิดพลาดสูง การใช้วิธีการ standard addition จะถูกต้องมากกว่าถึงแม้จะยุ่งยากกว่า

การทดสอบว่า slope เท่ากับ 1 หรือไม่

ทำได้โดยการหา confidence interval (CI) ของ slope (b) จาก

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

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

s_b คือ standard deviation ของ slope

ถ้า CI_{slope} ผ่าน 1 แสดงว่าไม่มี matrix effect (ดูตัวอย่างเพิ่มเติมในเรื่อง trueness)

ในบางกรณีสำหรับวิธีที่มีความเป็นเส้นตรงสูง อาจใช้ single point (one-point) calibration ในงานประจำได้โดยมีเงื่อนไขดังนี้

- ทดสอบแล้วว่ากราฟมาตรฐานผ่านจุดตั้งต้น ($x=0$, $y=0$) (โดยการหาช่วงของความเชื่อมั่น (CI) ของ y-intercept ถ้า CI ครอบคลุม 0 แสดงว่าผ่าน origin) ;
- ถือว่าการใช้ ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% (สำหรับ regression line) มีเหมาะสม;
- มีค่า response factor ($1/\text{slope}$) ที่ระดับต่างๆไม่แตกต่างกัน

การทดสอบว่า calibration curve ผ่าน origin ($x=0$, $y=0$) หรือไม่

ทำได้โดยการหา confidence interval (CI) ของ a (คือ y-intercept) จาก

$$CI_a = a \pm t_{(n-2)} s_a$$

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

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

s_a คือ standard deviation ของ a

$s_{y/x}$ คือ standard deviation ของ regression line

$y_i - \bar{y}_{\text{predicted}}$ คือ y-residual

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

ถ้า CI ผ่านศูนย์ แสดงว่ากราฟมาตรฐานผ่าน origin (ดูตัวอย่างในเรื่อง trueness)

6.3 ความแม่นยำ (Accuracy)

ความแม่นยำเป็นคุณลักษณะของวิธีที่แสดงความใกล้เคียงของผลการทดสอบต่อค่าจริงหรือค่าอ้างอิง การทดสอบความแม่นยำทำได้โดยการประเมินทั้ง systematic และ random effects ที่มีต่อผลทดสอบ ดังนั้นบางตำราจึงให้ความหมายของความแม่นยำไว้ว่ามี 2 องค์ประกอบ คือ trueness (คุณสมบัติที่บ่งบอกว่าค่าเฉลี่ยของผลวิเคราะห์ใกล้เคียงค่าจริงมากน้อยแค่ไหน) และความเที่ยง (ความเที่ยงเป็นตัววัดว่าผลวิเคราะห์แต่ละค่าอยู่ใกล้กันมากน้อยเพียงใดรอบๆ

ค่าเฉลี่ย) นอกจากนี้ในปัจจุบันการแสดงความถูกต้องของวิธี บางองค์กรแสดงด้วยค่าความไม่แน่นอน (measurement uncertainty) ทั้งนี้เพราะความไม่แน่นอน ได้รวม systematic และ random effects ไว้ด้วยกัน แต่ในที่นี้จะแยก ความแม่นยำ ความเที่ยง และ ความไม่แน่นอน เป็นคุณลักษณะ 3 อย่าง

ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์นอกจากจะแสดงด้วยค่า trueness ดังกล่าวแล้ว อาจแสดงได้ด้วยการหาเปอร์เซ็นต์การกลับคืน (% recovery) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงประสิทธิภาพของวิธีที่มีต่อสารที่สนใจในตัวอย่าง ซึ่งหากทำโดยการเติมสารนั้นที่ทราบปริมาณแน่นอน ลงในตัวอย่างและวิเคราะห์ด้วยวิธีที่ศึกษา เปอร์เซ็นต์การกลับคืนที่ได้อาจสูงกว่าความเป็นจริง เพราะสถานะของสารที่เติมอาจมีความแตกต่างจากสถานะของสารที่มีอยู่ในตัวอย่าง แม้จะเป็นสารเดียวกันเนื่องจากการจับกับเนื้อตัวอย่างอาจไม่เหมือนกันทำให้การสกัดมีความยากง่ายต่างกัน

ในการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ควรทดสอบทั้ง trueness และ เปอร์เซ็นต์การกลับคืน เพราะการทดสอบ trueness มักใช้ CRM ที่แม้ว่าจะมีคุณสมบัติการสอบกลับได้สูง แต่ก็มักจะมีค่าความเข้มข้นระดับเดียว ในขณะที่การหาเปอร์เซ็นต์การกลับคืนสามารถทำได้ตลอดช่วงความเป็นเส้นตรง

6.3.1 Trueness

Trueness คือคุณสมบัติที่บ่งบอกว่า ผลการวิเคราะห์ใกล้เคียงกับค่าจริงมากน้อยแค่ไหน ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวิเคราะห์กับค่าจริงหรือค่าอ้างอิงเรียกว่า bias การประเมิน trueness ของวิธีวิเคราะห์จึงทำได้โดยการเปรียบเทียบผลจากการวิเคราะห์กับค่าจริงหรือค่าอ้างอิงโดยใช้สถิติที่เหมาะสม

Bias มีองค์ประกอบ 2 อย่าง คือ method bias และ laboratory bias

Method bias เกิดจาก systematic error ที่ติดมากับ method ดังนั้นไม่ว่าห้องปฏิบัติการใดนำวิธีนี้ไปใช้ก็จะมี method bias เกิดขึ้นเสมอ

Laboratory bias เป็น bias ที่นอกเหนือจาก method bias เกิดขึ้นจากห้องปฏิบัติการที่ใช้วิธีนี้ ดังนั้น laboratory bias ของแต่ละห้องปฏิบัติการอาจเท่ากันหรือต่างกันได้ bias ที่แต่ละห้องปฏิบัติการทำได้จึงเป็น overall bias คือเป็นผลรวมของ method bias และ laboratory bias

การประเมิน trueness จึงเป็นการเปรียบเทียบค่า overall bias ที่ ห้องปฏิบัติการหาได้กับ bias ที่รายงานไว้ในวิธีนั้น โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เป็น known sample เช่น reference materials (RMs) ซึ่งอาจเป็น certified reference material (CRM) หรือ RM ที่ทราบค่าความเข้มข้นของสารที่กำลังศึกษา ถ้าใช้ CRM ค่า certified value ถือว่า มี traceability การเลือก CRM ขึ้นอยู่กับ การนำผลไปใช้งานด้วย สำหรับงานด้านการควบคุมตามกฎหมาย ควรเลือก CRM ที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับตัวอย่างจริงมากที่สุด

อย่างไรก็ตาม CRM ที่มี matrix ใกล้เคียงกับ matrix ของตัวอย่างมักจะหายาก จึงมีการใช้ RM ชนิดอื่นๆ แทน เช่น fortified/spiked materials ซึ่งเตรียมโดย การเติม pure RM ที่มี purity และ stability ที่เหมาะสม ลงใน matrix blank หรือ sample blank เป็นต้น

นอกจากนี้การประเมิน trueness ของวิธี อาจทำได้โดยการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์จากวิธีที่กำลังศึกษากับวิธีที่ยอมรับเป็นวิธีมาตรฐานซึ่งทราบค่าความไม่แน่นอน

วิธีประเมิน trueness ของวิธีทดสอบ

การประเมิน trueness ของวิธีวิเคราะห์สามารถทำได้ด้วยวิธีการทางสถิติซึ่งมี หลายวิธีการ โดยขึ้นอยู่กับข้อมูล เช่น การใช้ t - test หรือ linear regression เป็นต้น การใช้ t-test ก็มีหลายวิธี เช่น กรณีที่ใช้ CRM ที่ค่าความไม่แน่นอนน้อยมากจนไม่นำมาคิด กรณีที่ใช้ CRM หรือ RM ที่ค่าความไม่แน่นอนมีนัยสำคัญ หรือ กรณีที่เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้จากสองวิธี เป็นต้น ส่วนการประเมินโดยใช้ linear regression จะใช้เมื่อเป็นการเปรียบเทียบผลของ สองวิธีที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นต้น

6.3.1.1 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีที่กำลังศึกษา กับค่าอ้างอิงของ CRM

ใช้ในกรณีที่มี CRM ที่เหมาะสม ทำได้ดังนี้

1. วิเคราะห์ reagent blank และ CRM อย่างละ 10 ซ้ำ
2. คำนวณค่าเฉลี่ยของ blank และลบออกจากค่าของ CRM ที่ได้จากการวิเคราะห์ แต่ละค่า

3. เปรียบเทียบกับค่าจริงของ CRM โดยใช้สถิติ t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยคำนวณค่า t จาก

$$t = \frac{(\bar{x} - \mu)}{(s/\sqrt{n})} \dots\dots\dots(1)$$

t เป็นอัตราส่วนระหว่าง bias ($= \bar{x} - \mu$) ซึ่งแสดงถึงความคลาดเคลื่อนแบบ systematic error กับ standard error $\left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)$

μ คือ ค่าจริง หรือค่าอ้างอิง

$\bar{x}$ คือ ค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์ n ครั้ง และ s คือ standard deviation

เปรียบเทียบ ค่า t ที่ได้จากการคำนวณ กับ ค่า critical (t_c) จากตาราง ค่านี้ขึ้นอยู่กับ confidence level และ ค่า degree of freedom (df) ถ้า ค่า t น้อยกว่า t_c แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่าง ค่าจากการทดลองกับค่าจริง หรือค่าอ้างอิง (ตัวอย่างที่ 1, 2)

ตัวอย่าง ที่ 1

ต้องการศึกษา trueness ของ วิธีทดสอบสาร a ในตัวอย่างอาหาร โดยนำ CRM ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับตัวอย่างจริง มาทดสอบด้วยวิธีที่กำลังศึกษา CRM นี้ มีค่า certified value ของสาร a = 15.02 ± 0.17 มก/กก จากการทดสอบ โดยการทำ 10 ซ้ำ (10 replicate) ได้ค่า ความเข้มข้นของสาร a = 14.25 มก/กก และ standard deviation = 1.25 มก/กก (ค่าความเข้มข้นที่คำนวณได้ หักลบค่า blank ออกแล้ว)

วิธีทำ

การจะประเมิน trueness คือ การพิสูจน์ว่า ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีที่กำลังศึกษา แตกต่างจากค่าที่ certified หรือไม่ (ใช้ t-test)

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

ในที่นี้ $\mu = 15.02$ มก/กก, $\bar{x} = 14.25$ มก/กก, $s = 1.25$ มก/กก, $n = 10$

$$\therefore t = \frac{(14.25 - 15.02)}{(1.25/\sqrt{10})}$$

$$t = - 1.95$$

อ่าน ค่า t_c จากตาราง โดยเลือก $df = n-1 = 9$ และ $p = 0.05$ ได้ค่า $t_c = 2.262$ เปรียบเทียบค่า t (1.95) จากการคำนวณ (โดยไม่ต้องคำนึงถึงเครื่องหมาย) กับค่า t_c (2.262) พบว่า น้อยกว่า t_c แสดงว่าค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีที่กำลัง validate ไม่ แตกต่างจากค่าที่ certified

แสดงว่า trueness ของวิธีนี้ยอมรับได้

ตัวอย่างที่ 2

ต้องการศึกษา trueness ของ วิธีทดสอบ สาร a ในตัวอย่างอาหาร

นำ CRM ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับตัวอย่างจริง มาทดสอบด้วยวิธีที่กำลังศึกษา CRM นี้มีค่า certified value ของสาร a = 15.02 ± 0.17 มก/กก จากการทดสอบ โดยการทำ 10 ซ้ำ (10 replicate) ได้ค่า ความเข้มข้นของสาร a = 14.00 มก/กก และ standard deviation = 1.25 มก/กก (ค่าความเข้มข้นที่คำนวณได้ หักลบค่า blank ออกแล้ว)

วิธีทำ

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

$$t = \frac{(14.00 - 15.02)}{(1.25/\sqrt{10})}$$

$$\therefore t = -2.58$$

อ่าน ค่า t_c จากตาราง โดยเลือก $df = n-1 = 9$ และ $p = 0.05$ ได้ค่า $t_c = 2.262$

เปรียบเทียบค่า t (2.58) โดยไม่ต้องคำนึงถึงเครื่องหมาย กับค่า t_c (2.262) พบว่า t จากการคำนวณ มากกว่า t_c แสดงว่าค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ แตกต่างจากค่าที่ certified อย่างมีนัยสำคัญ

ข้อคิดเห็นและเสนอแนะ :

ยังไม่ควรสรุปว่าวิธีนี้ไม่เหมาะสม ห้องปฏิบัติการควรทบทวนดูในประเด็นต่างๆ ซึ่ง อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ สาร a สูญหายในระหว่างการวิเคราะห์ได้ เช่น คุณภาพ ของสารมาตรฐานที่ใช้ กราฟมาตรฐาน ขั้นตอนของการวิเคราะห์ (การสกัด การ ทำ dry ashing การ digest ตัวอย่าง เป็นต้น) รวมทั้งอุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ เมื่อพบว่าไม่ใช่จากสาเหตุดังกล่าว จึงจะ สรุปว่าวิธีนี้ไม่เหมาะสม เนื่องจากมี bias

ในกรณีที่คิดว่าค่า uncertainty ของ CRM ที่ใช้มีนัยสำคัญ ควรใช้สูตรใดสูตรหนึ่งดังต่อไปนี้

กรณีที่ค่าแปรปรวนทั้ง 2 ค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ยืนยันด้วย F-test)

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}} \dots\dots\dots(2)$$

โดย $\bar{x}_1$ คือ ค่าเฉลี่ยของผลวิเคราะห์ด้วยวิธีที่ศึกษา และมี Standard deviation = s_1 ;
 $\bar{x}_2$ ในที่นี้คือค่า certified ของ CRM และมี Standard deviation = s_2

$$s^2 = \frac{(df_1 s_1^2 + df_2 s_2^2)}{df_1 + df_2}$$

s คือ pooled standard deviation

และ $df = df_1 + df_2$

กรณีที่ค่าแปรปรวนทั้ง 2 ค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ยืนยันด้วย F-test)

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \dots\dots\dots(3)$$

$$df = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\left(\frac{s_1^4}{n_1^2 df_1} + \frac{s_2^4}{n_2^2 df_2}\right)}$$

6.3.1.2 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีที่กำลังศึกษา กับ ค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีมาตรฐาน

6.3.1.2.1 ศึกษาและเปรียบเทียบที่ระดับความเข้มข้นระดับเดียว

ในกรณีที่ไม่สามารถหา CRM ได้ ควรศึกษา trueness โดยการเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน โดยอาจใช้ in-house reference material (inhouse RM) หรือ ตัวอย่างทั่วไปก็ได้

1. วิเคราะห์ reagent blank และ RM หรือตัวอย่าง
อย่างละ 10 ขั้ว (ต่อ 1 วิธี) ด้วยวิธีทั้งสอง
2. คำนวณค่า mean ของ blank และลบออกจาก แต่ละค่า
ของตัวอย่าง (ของแต่ละวิธี)
3. เปรียบเทียบผลที่ได้จาก 2 วิธี โดยใช้ F-test และ t-test
ที่เหมาะสม (สูตรที่ 2 หรือ 3 ใน 6.3.1.1)

(ตัวอย่างที่ 3, 4)

6.3.1.2.2 ศึกษาที่ความเข้มข้นหลายระดับในช่วงใกล้เคียงกัน

กรณีนี้สถิติที่เหมาะสม คือ paired t-test (ตัวอย่างที่ 5)

$$t = \frac{\bar{d}}{(s_d/\sqrt{n})} \dots\dots\dots(4)$$

โดย $\bar{d}$ คือ ค่าเฉลี่ยของความแตกต่างระหว่างผลที่ได้จาก 2 วิธี และ s_d คือ standard deviation ของความแตกต่างเหล่านี้

ตัวอย่างที่ 3

ในการทดสอบวิธีวิเคราะห์สาร a ในตัวอย่างของห้องปฏิบัติการแห่งหนึ่งโดยการวิเคราะห์ตัวอย่าง เทียบกับวิธีมาตรฐาน ทั้ง 2 วิธี ทำ 10 ซ้ำเท่ากัน ได้ผลดังนี้ ด้วยวิธีที่กำลังศึกษาพบสาร a มีค่าเฉลี่ย 1.35 มก/กก ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน = 0.09 มก/กก ด้วยวิธีมาตรฐาน พบสาร a มีค่าเฉลี่ย 1.55 มก/กก ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน = 0.05 (ค่าความเข้มข้นที่ได้หักลบค่า blank ออกแล้ว) ต้องการพิสูจน์ว่า trueness ของวิธีนี้ยอมรับได้หรือไม่

วิธีทำ

ต้อง พิสูจน์ก่อน ว่า variance ของทั้ง 2 ค่าแตกต่างกันหรือไม่ โดยการใช้ F-test

$$F = s_1^2/s_2^2 \quad \text{โดยที่} \quad s_1^2 > s_2^2$$

ในที่นี้ $s_1 = 0.09$ มก/กก. และ $s_2 = 0.05$ มก/กก

$$F = s_1^2/s_2^2 = 0.09^2/0.05^2 = 3.24$$

จากตาราง F ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %, $df_1 = 9$, $df_2 = 9$ ค่า $F_c = 4.03$

ดังนั้น F จากการคำนวณ มีค่าน้อยกว่า F_c แสดงว่า variance ทั้ง 2 ค่า ไม่แตกต่างกัน

ใช้สูตร (2)

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

โดย

$$s^2 = \frac{[df_1 s_1^2 + df_2 s_2^2]}{df_1 + df_2} \quad \text{และ} \quad df = df_1 + df_2$$

หาค่า s ;

$$s^2 = \frac{[9 \times 0.09^2 + 9 \times 0.05^2]}{18}$$

$$s = 0.0728$$

$$t = \frac{(1.35 - 1.55)}{0.0728 \sqrt{\left(\frac{1}{10} + \frac{1}{10}\right)}}$$

จากตาราง t ที่ $df = 18$ และ $p = 0.05$ ได้ค่า $t_c = 2.101$

t มากกว่า t_c แสดงว่าค่าที่ได้จากการทดสอบ แตกต่างจากค่าที่ได้จากวิธีมาตรฐาน

ข้อเสนอแนะ : ยังไม่ควรสรุปว่าวิธีนี้ไม่เหมาะสม เนื่องจากมี bias ห้องปฏิบัติการควรทบทวนดูในประเด็นต่างๆ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ analyte สูญหายในระหว่างการวิเคราะห์ได้ก่อน เมื่อพบว่าไม่ใช่จากสาเหตุดังกล่าว จึงจะสรุปว่าวิธีนี้ไม่เหมาะสมเนื่องจากมี bias

ตัวอย่างที่ 4

ในการทดสอบวิธีวิเคราะห์ สาร a ในตัวอย่าง ของห้องปฏิบัติการแห่งหนึ่ง โดยการวิเคราะห์ ตัวอย่างเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน ทั้ง 2 วิธี ทำ 10 ซ้ำเท่ากัน (ไม่จำเป็นต้องทำจำนวน ซ้ำเท่ากัน) ด้วยวิธีที่กำลังศึกษา พบสาร a มีค่าเฉลี่ย 1.35 มก/กก ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน = 0.09 มก/กก ด้วยวิธีมาตรฐาน พบสาร a มีค่าเฉลี่ย 1.55 มก/กก ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน = 0.04 มก/กก ต้องการพิสูจน์ว่า trueness ของวิธีนี้ยอมรับได้หรือไม่

วิธีทำ

ต้อง พิสูจน์ก่อน ว่าค่าแปรปรวนทั้ง 2 ค่าแตกต่างกันหรือไม่ โดยใช้ F-test

$$F = s_1^2/s_2^2 \quad \text{โดยที่} \quad s_1^2 > s_2^2$$

ในที่นี้ $s_1 = 0.09$ มก/กก. และ $s_2 = 0.04$ มก/กก

$$F = s_1^2/s_2^2 = 0.09^2/0.04^2 = 5.06$$

จากตาราง F ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %, $df_1 = 9$, $df_2 = 9$ ค่า $F_c = 4.03$

ดังนั้น F จากการคำนวณ มากกว่า F_c แสดงว่า variance ทั้ง 2 ค่า แตกต่างกัน ใช้สูตร (3)

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} = \frac{(1.35 - 1.55)}{\sqrt{\frac{0.09^2}{10} + \frac{0.04^2}{10}}} = 6.4$$

$$\text{โดย } df = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\left(\frac{s_1^4}{n_1^2 df_1} + \frac{s_2^4}{n_2^2 df_2}\right)}$$

$$\text{ในที่นี้ } df = \frac{\left(\frac{0.09^2}{10} + \frac{0.04^2}{10}\right)^2}{\left(\frac{0.09^4}{10^2 \times 9} + \frac{0.04^4}{10^2 \times 9}\right)} = 12.4$$

จากตาราง t ที่ $df = 12$ และ $p = 0.05$ ได้ค่า $t_c = 2.179$

พบว่า t จากการคำนวณ มากกว่า t_c แสดงว่าค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีที่กำลัง validate แตกต่างจากค่าที่ได้จากวิธีมาตรฐาน

ตัวอย่างที่ 5

ในการศึกษาวิธีวิเคราะห์ไนเตรทในน้ำด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เทียบกับวิธี ion chromatography (IC) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน โดยทำการวิเคราะห์น้ำจำนวน 6 ตัวอย่าง ซึ่งมีระดับความเข้มข้นในช่วง 1.0-4.0 มก/ลิตร พบปริมาณไนเตรท (มก/ลิตร) ดังนี้

ตัวอย่างที่	IC	สเปกโตรมิเตอร์	Difference = d
1	1.04	1.18	0.14
2	1.23	1.17	-0.06
3	2.04	2.04	0
4	2.48	2.69	0.21
5	3.79	3.89	0.10
6	4.22	4.11	-0.11
			$\bar{d} = 0.0467 \pm 0.1236$

ใช้ Paired t-test

พบว่า $\bar{d} = 0.0467$ และ $s_d = 0.1236$

$$\text{จาก } t = \frac{\bar{d}}{(s_d/\sqrt{n})}$$

$$= \frac{0.0467}{(0.1236/\sqrt{6})} = 0.925$$

$$t_{(0.05,5)} = 2.57$$

t จากการคำนวณ (0.92) น้อยกว่า t_c (2.57) แสดงว่า ทั้งสองวิธีนี้ไม่แตกต่างกัน นั่นคือ trueness ของวิธีสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ยอมรับได้

6.3.1.2.3 ศึกษาที่ความเข้มข้นหลายระดับโดยมีช่วงของความเข้มข้นกว้าง

กรณีนี้สถิติที่เหมาะสม คือ linear regression อย่างไรก็ตามควรมีข้อมูลไม่น้อยกว่า 10 ระดับความเข้มข้น (ตัวอย่างที่ 6)

ตัวอย่างที่ 6

ในการศึกษาวิธีวิเคราะห์ไนเตรทในน้ำด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตมิเตอร์เทียบกับวิธี ion chromatography (IC) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน โดยทำการวิเคราะห์น้ำจำนวน 10 ตัวอย่างซึ่งมีระดับความเข้มข้นในช่วง 1-10 มก/ลิตร พบปริมาณไนเตรท (มก ไนโตรเจน/ลิตร) ดังนี้

ตัวอย่างที่	IC	สเปกโตรมิเตอร์
1	1.04	1.18
2	1.23	1.17
3	2.04	2.04
4	2.48	2.69
5	3.79	3.89
6	4.22	4.11
7	6.0	5.70
8	7.2	7.5
9	9.0	9.0
10	10.5	10.7

วิธีทำ

- 1) plot ความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่ได้จาก 2 วิธี โดยให้ผลของวิธี IC ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานอยู่บนแกน x และวิธีที่กำลังศึกษาอยู่บนแกน y ซึ่งจะได้ความสัมพันธ์ $y = a + bx$ จากนั้น คำนวณค่า standard deviation ของ intercept (a) และของ slope (b) เพื่อหา confidence interval (CI) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %
- 2) พิสูจน์ว่า confidence interval ของ intercept แตกต่างจาก “0” หรือไม่ และของ slope แตกต่างจาก “1” หรือไม่ ถ้าไม่แตกต่าง แสดงว่า 2 วิธีนี้ไม่แตกต่างกัน

$$CI \text{ of intercept } a = a \pm [t(0.05, (n-2)) \times s_a]$$

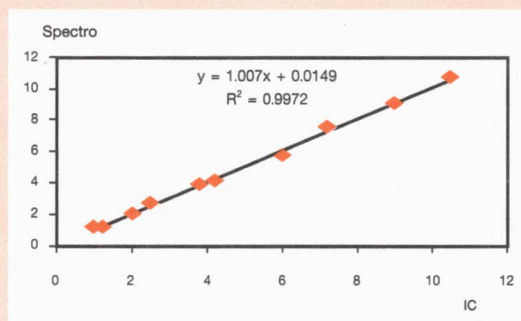
$$CI \text{ of slope } b = b \pm [t(0.05, (n-2)) \times s_b]$$

ตัวอย่างที่ 6 (ต่อ)

$$s_a = \text{standard deviation of intercept } a = s_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n(\sum x_i - \bar{x})^2}} \quad \dots\dots\dots(5)$$

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

$$s_b = \text{standard deviation of slope } b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad \dots\dots\dots(6)$$



a = intercept = 0.0149,

b = slope = 1.007

$\hat{Y} = \text{fitted } y = 1.007x + 0.0149$

(x)	(y)	$(x_i - \bar{x})_2$	$\hat{Y}$	$(y - \hat{y})^2$
1.04	1.18	13.76	1.06	0.014
1.23	1.17	12.39	1.3	0.007
2.04	2.04	7.34	2.07	0.001
2.48	2.69	5.15	2.51	0.032
3.79	3.89	0.92	3.83	0.003
4.22	4.11	0.28	4.26	0.024
6.0	5.70	1.56	6.06	0.127
7.2	7.5	6.00	7.26	0.055
9.0	9.0	18.06	9.08	0.006
10.5	10.7	33.06	10.59	0.0124
$\bar{X} = 4.75$		$\Sigma = 98.5$	$\Sigma =$	0.282

ตัวอย่างที่ 6 (ต่อ)

สำหรับ Intercept

$$s_a = 0.188$$

$$\begin{aligned} \text{CI of intercept} &= a + t_{(\text{two-tailed}, 0.05, 8)} \times s_a \\ &= 0.0149 \pm (2.31 \times 0.188) \\ &= 0.0149 \pm 0.2486 \text{ (ตั้งแต่ } -0.23 \text{ ถึง } 0.26) \end{aligned}$$

นั่นคือ intercept มีช่วงความเชื่อมั่น ตั้งแต่ -0.23 ถึง 0.26

สำหรับ slope

$$s_b = 0.0189$$

$$\begin{aligned} \text{CI of slope} &= b \pm [t_{(0.05, (n-2))}] \times s_b = 1.007 \pm (2.31 \times 0.0189) \\ &= 1.007 \pm 0.0437 \text{ (ตั้งแต่ } 0.96 \text{ ถึง } 1.05) \end{aligned}$$

นั่นคือ slope มีช่วงของความเชื่อมั่น ตั้งแต่ 0.96 ถึง 1.05

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า trueness ของวิธีนี้ยอมรับได้

สำหรับตัวอย่างนี้ พบว่า intercept ไม่แตกต่างจาก ศูนย์ (0) และ slope ไม่แตกต่างจาก 1 แสดงว่า 2 วิธีนี้ ไม่แตกต่างกัน

6.3.2 การกลับคืน (Recovery)

เรามักจะพบว่าวิธีวิเคราะห์ที่ใช้ยังไม่ได้วัดปริมาณสารที่เราสนใจได้ครบถ้วน 100% ทุกวิธี ซึ่งสะท้อนให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์เหล่านั้นไม่สมบูรณ์ อาจมีความคลาดเคลื่อน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทราบประสิทธิภาพ (efficiency) ของวิธีวิเคราะห์ในการวัดปริมาณสารที่มีอยู่ทั้งหมด แต่เนื่องจากในความเป็นจริงเราไม่ทราบว่าสารที่เราสนใจมีอยู่เท่าไรจึงยากที่จะบอกได้ว่าวิธีวิเคราะห์ที่ใช้สามารถสกัดสารนั้นออกมาได้ดีแค่ไหน วิธีการหนึ่งที่จะบอกได้คือการเติมสารที่ความเข้มข้นระดับต่างๆในช่วงการใช้งานลงใน matrix blank หรือ sample blank จากนั้นจึงวิเคราะห์ตามขั้นตอนที่ระบุในวิธีวิเคราะห์ และคำนวณค่า recovery ของสารส่วนที่เติมลงไป

ปัญหาก็คือสารที่เติมลงไปอาจไม่จับกับเนื้อตัวอย่าง หรือไม่ใช้สารประกอบที่เหมือนกับที่มีอยู่ในตัวอย่าง (native analyte) เมื่อคำนวณค่า recovery จะได้ประสิทธิภาพที่อาจสูงกว่าความเป็นจริง เพราะบอกได้เฉพาะประสิทธิภาพของวิธีในการวิเคราะห์สารส่วนที่เติมลงไปเท่านั้น ไม่รวมถึง native analyte ดังนั้นค่า recovery ดี (ประสิทธิภาพสูง) ไม่ได้ประกันว่า trueness ของวิธีดี แต่ ค่า recovery ต่ำ (ประสิทธิภาพต่ำ) บอกได้ว่า trueness ของวิธีนี้ไม่เหมาะสม

อย่างไรก็ตามการหาค่า recovery นับเป็นวิธีที่ยอมรับได้ระดับหนึ่งในการศึกษา trueness เมื่อไม่อาจหา matrix CRM หรือ matrix RM ที่เหมาะสมได้

เราอาจหาค่า recovery โดยใช้ CRM ก็ได้ ถ้า CRM นั้นมี matrix และความเข้มข้นของสารที่สนใจอยู่ในระดับที่เหมาะสมและเป็น CRM ที่ผลิตจาก natural materials (โดย analyte ที่มีใน CRM นั้นไม่ได้มาจากการเติม) ค่า recovery ที่ได้จะบอกถึงประสิทธิภาพของวิธีต่อ native analyte ได้อย่างถูกต้องมากกว่า

การแสดงผลการกลับคืนนิยมแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ (% recovery)

6.3.2.1 วิธีหาเปอร์เซ็นต์การกลับคืน

6.3.2.1.1 กรณีที่มี CRM

1. วิเคราะห์ blank
2. วิเคราะห์ CRM 6 ซ้ำ

3. คำนวณ %Recovery

$$\%R = \frac{(C1-C2) \times 100}{C3} \dots\dots\dots(7)$$

C1 คือ ความเข้มข้นของสารใน CRM ที่วิเคราะห์ได้

C2 คือ ค่าของ blank และ

C3 คือ certified value ของ CRM

6.3.2.1.2 กรณีที่ไม่มี CRM

1. เตรียม matrix blank หรือ sample blank (unspiked) ให้มีปริมาณพอเพียง
2. เตรียม spiked matrix blank หรือ spiked sample โดยการเติมสารมาตรฐาน (analyte) ให้มีความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ใน working range อย่างน้อย 3 ระดับและเตรียมให้มีปริมาณมากพอสำหรับการวิเคราะห์ อย่างน้อย ระดับละ 6 ซ้ำ ทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน
3. วิเคราะห์ matrix blank หรือ sample blank (unspiked) 6 ซ้ำ
4. วิเคราะห์ spiked matrix blank หรือ fortified sample blank ระดับละ 6 ซ้ำ
5. คำนวณ %Recovery

$$\%R = \frac{(C1-C2) \times 100}{C3}$$

C1 คือ ความเข้มข้นของสารใน spiked matrix blank

C2 คือ ความเข้มข้นของ matrix blank และ

C3 คือ ความเข้มข้นของ analyte ที่เติม

ในทางปฏิบัติมักพบปัญหาการไม่สามารถหา matrix blank หรือ sample blank ได้จึงอาจจำเป็นต้องใช้ matrix หรือ sample ที่มีสารที่สนใจในระดับที่ไม่ต่ำมากมาหาค่า recovery กรณีนี้ความเข้มข้นที่เติมควรสูงกว่าความเข้มข้นที่มีอยู่เดิม

ตัวอย่างที่ 7 ในการหา %recovery ของวิธีวิเคราะห์คาเฟอีนในเครื่องดื่มโดยการเติมสารละลายมาตรฐานคาเฟอีนในเครื่องดื่มที่ไม่ผสมคาเฟอีน ที่ระดับ 40.0 มก/ลิตร ทำการวิเคราะห์ 7 ซ้ำ มีผลการวิเคราะห์ดังนี้ 35.1, 37.0, 35.4, 35.9, 37.9, 41.5, 36.5 มก/ลิตร (blank = 0) จงหา %recovery ของคาเฟอีนในเครื่องดื่ม

วิธีทำ

ค่าเฉลี่ยของผลวิเคราะห์ทั้ง 7 ซ้ำ = 37.04 มก/ลิตร

$$\%R = \frac{(C1-C2)}{C3} \times 100$$

C1 คือ ความเข้มข้นเฉลี่ยของคาเฟอีนในเครื่องดื่มที่วัดได้หลังจากเติมคาเฟอีน = 37.04 มก/ลิตร

C2 คือ ความเข้มข้นของคาเฟอีนในเครื่องดื่มที่ไม่เติมคาเฟอีน = 0 และ

C3 คือ ความเข้มข้นของคาเฟอีนที่เติม = 40.0 มก/ลิตร

$$\%R = \frac{(37.04-0)}{40.0} \times 100 = 92.6 \%$$

%recovery ของคาเฟอีนในเครื่องดื่ม = 92.6 %

6.3.2.2 เกณฑ์การยอมรับ Recovery

The AOAC Manual for the Peer Verified Methods Program (1993) ได้กำหนดแนวทางสำหรับพิจารณาการยอมรับ %recovery โดยทั่วไป ตามตารางที่ 1 สำหรับตารางที่ 2 เป็นเกณฑ์ที่ Codex ได้กำหนดไว้สำหรับงานด้านสารตกค้างจากยาฆ่าแมลง และยาสัตว์ตกค้างในอาหาร

ตารางที่ 1 Analyte recovery ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (ตาม AOAC)

ความเข้มข้นของ analyte	% Recovery
100%	98-102
> 10%	98-102
> 1 %	97-103
> 0.1%	95-105
100 ppm	90-107
10 ppm	80-110
1 ppm	80-110
100 ppb	80-110
10 ppb	60-115
1 ppb	40-120

ตารางที่ 2 Analyte recovery ของ สารตกค้างจากยาฆ่าแมลง และยาสัตว์ตกค้างในอาหาร (ตาม codex)

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

6.4 ความเที่ยง (Precision)

ความเที่ยงเป็นคุณลักษณะเฉพาะของวิธีที่แสดงถึงความใกล้เคียงกันของผลการวิเคราะห์ซ้ำภายใต้สภาวะที่กำหนด ความเที่ยงจะบอกถึงความคลาดเคลื่อนสุ่ม (random error) ที่เกิดขึ้น โดยทั่วไปการแสดงความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ แสดงได้หลายแบบ เช่น การทวนซ้ำได้ (repeatability) หรือ การทำซ้ำได้ (reproducibility) ซึ่งทั้ง 2 แบบนี้จัดเป็น extreme measures คือเป็น ความเที่ยงที่มีค่าแคบที่สุด และกว้างที่สุด

การทวนซ้ำได้ เป็นตัวบอกถึงความแปรปรวนที่เกิดขึ้นเมื่อนักวิเคราะห์หนึ่งคนทำการทดลอง ตัวอย่างหนึ่งซ้ำๆกัน หลายครั้งในเวลาเดียวกันหรือใกล้เคียงกัน โดยใช้เครื่องมือชุดเดิม และวิธีเดียวกัน แสดงค่าในรูปของ RSD_r ส่วนการทำซ้ำได้เป็นตัวบอกความแปรปรวนที่จะเกิดขึ้นเมื่อมีการวิเคราะห์ตัวอย่างชุดเดียวกันโดยห้องปฏิบัติการหลายแห่ง โดยใช้วิธีเดียวกัน (นักวิเคราะห์หลายคน เครื่องมือต่างชุดกัน เวลาต่างกัน สิ่งแวดล้อมต่างกัน) แสดงค่าในรูปของ RSD_R

ส่วนในกรณีที่มีการวิเคราะห์ตัวอย่างชุดเดียวกัน โดยวิธีเดียวกัน ในห้องปฏิบัติการเดียวกัน แต่นักวิเคราะห์อาจเป็นคนละคนหรือนักวิเคราะห์คนเดียวกัน แต่ทำการวิเคราะห์ต่างวัน หรือใช้เครื่องมือ ต่างชุดกัน เป็นต้น ความแปรปรวนที่จะเกิดขึ้น อาจแสดงเป็น within laboratory reproducibility หรือ intra-laboratory reproducibility (RSD_r) จัดเป็น intermediate precision

จะเห็นได้ว่า สำหรับ single laboratory validation แล้ว intermediate precision จะบอกความเที่ยงที่มีความเป็นจริงมากกว่า repeatability อย่างไรก็ตามควรต้องระบุนเงื่อนไขของการทำด้วย เช่นนักวิเคราะห์คนเดียวกัน แต่ทำการวิเคราะห์ต่างวัน หรือ นักวิเคราะห์สองคนทำการวิเคราะห์พร้อมกัน เป็นต้น

โดยทั่วไป การระบุ ความเที่ยง จะระบุในรูปของ %RSD แต่เนื่องจากความเที่ยงขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร ดังนั้นจึง ควร หาค่า %RSD ที่ความเข้มข้นหลายระดับโดยระบุระดับความเข้มข้นด้วย ในการ ทดสอบวิธีวิเคราะห์ อาจแสดงความเที่ยงเป็นค่า %RSD ที่ใหญ่ที่สุดเพียงค่าเดียวได้ ถ้าความแปรปรวนที่ระดับความเข้มข้นต่ำๆไม่แตกต่างจากความแปรปรวนที่ระดับความเข้มข้นสูงๆ ในช่วงการใช้งาน

สำหรับงานวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (qualitative analysis) อาจแสดง ความเที่ยง ในรูปของอัตราการเกิด true and false positive (and negative) โดยควรหาที่ ความเข้มข้นหลายๆ ระดับที่สูงกว่า และต่ำกว่า ระดับ threshold

$$\% \text{ false positive} = \text{false positive} \times 100 / \text{total known negatives}$$

$$\% \text{ false negative} = \text{false negative} \times 100 / \text{total known positives}$$

6.4.1 การหาค่าของความเที่ยง

เตรียมตัวอย่าง หรือ RM ที่จะใช้ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ใน working range โดยแต่ละระดับเตรียมให้มีปริมาณมากพอสำหรับการวิเคราะห์เพื่อศึกษา ความเที่ยง อย่างน้อย 10 ซ้ำ (10 replicates) ทั้ง repeatability หรือ within-laboratory reproducibility

6.4.1.1 Repeatability

1.1 วิเคราะห์ตัวอย่างที่เตรียมไว้ทุกระดับความเข้มข้น ระดับ ละ 10 ซ้ำ โดยนักวิเคราะห์คนเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน ในเวลาเดียวกัน หรือใกล้เคียงกัน

1.2 คำนวณค่า sd ของแต่ละความเข้มข้น

1.3 คำนวณ $\%RSD_r$ จะได้ repeatability ที่ความเข้มข้นนั้นๆ

$$\%RSD_r = \frac{sd \times 100}{\bar{x}} \dots\dots\dots(1)$$

6.4.1.2 Within laboratory reproducibility

1.1 วิเคราะห์ตัวอย่างที่เตรียมไว้ทุกระดับความเข้มข้น ระดับละ 10 ซ้ำ โดยนักวิเคราะห์คนเดียวกัน หรือมากกว่า 1 คน ในเวลาต่างวันกันซึ่งอาจเป็นเวลา หลายสัปดาห์

1.2 คำนวณค่า sd ของแต่ละความเข้มข้น

1.3 คำนวณ $\%RSD_i$ ตามสมการที่ (1) จะได้ within laboratory reproducibility ของแต่ละความเข้มข้น

เมื่อหาความเที่ยงในรูปของ $\%RSD$ ได้แล้ว จะต้องประเมินด้วยว่าใช้ได้หรือไม่ ซึ่งอาจประเมินได้หลายวิธีตามความเหมาะสม

หมายเหตุ การหาความเที่ยงของวิธีไม่จำเป็นต้องแยกทำ สามารถศึกษาไปพร้อมกับ trueness, recovery หรือ LOQ ได้ แต่ต้องวางแผนการศึกษาให้ได้ข้อมูลที่สามารถนำมาใช้ได้ครบถ้วน

6.4.2 เกณฑ์การยอมรับ ความเที่ยง

การประเมินการยอมรับสามารถทำได้หลายวิธี เช่น กรณีที่ไม่มีการกำหนดค่าที่ยอมรับได้ไว้อย่างชัดเจน จะประเมินได้โดยการเปรียบเทียบกับค่าที่คำนวณได้จาก Horwitz's equation และ HORRAT (Horwitz ratio) ตามที่ระบุใน The AOAC manual for the Peer Verified Methods program (1993) หรือในกรณีที่มีการเปรียบเทียบความเที่ยงของสองวิธี ก็ใช้ F- test ในการประเมินได้

6.4.2.1 การประเมินด้วย Horwitz's equation และ HORRAT

Horwitz's equation เป็นสมการที่พัฒนาขึ้นโดย Dr. William Horwitz โดยสร้างขึ้นจากความสัมพันธ์ระหว่าง %RSD กับความเข้มข้นโดยไม่คำนึงถึงวิธีวิเคราะห์ที่ใช้และตัวอย่างที่วิเคราะห์ เนื่องจากพบว่าวิธีวิเคราะห์และลักษณะตัวอย่างไม่มีอิทธิพลต่อ %RSD และเมื่อ plot ความสัมพันธ์ดังกล่าว จะได้กราฟที่มีลักษณะ ดังภาพที่ 1 ซึ่งเป็นที่รู้จักกันในชื่อ Horwitz's trumpet ดังนั้น Horwitz's equation จึงใช้คาดคะเน %RSD ที่ควรจะเป็นของความเข้มข้นระดับต่างๆได้

Horwitz equation

สำหรับ reproducibility: $\%RSD_R = 2^{(1-0.5 \log C)} = 2C^{-0.1505}$ (2)

สำหรับ repeatability; $\%RSD_r = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} = 0.66 \times 2C^{-0.1505}$ (3)

โดย C เป็น concentration ratio (ไม่มีหน่วย)

ตัวอย่างการคำนวณ expected $\%RSD_r$ แสดงในตารางที่ 1 และตัวอย่างที่ 1

ตารางที่ 1 แสดง ค่า expected $\% RSD_r$ ที่คำนวณจาก Horwitz's equation ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของ analyte	C	Expected $\%RSD_r$
100% (100 g/100 g)	1	$0.66 \times 2 \times (1^{-0.1505}) = 1.3$
10% (10 g/100 g)	0.1	$0.66 \times 2 \times (0.1^{-0.1505}) = 1.8$
1% (1 g/100 g)	0.01	$0.66 \times 2 \times (0.01^{-0.1505}) = 2.6$
0.1% (0.1 g/100 g)	0.001	$0.66 \times 2 \times (0.001^{-0.1505}) = 3.7$
100 ppm (100 mg/kg)	$1 \times 10^{-4} = 0.0001$	$0.66 \times 2 \times (10^{-4})^{-0.1505} = 5.2$
10 ppm (10 mg/kg)	$1 \times 10^{-5} = 0.00001$	$0.66 \times 2 \times (10^{-5})^{-0.1505} = 7.4$
1 ppm (1 mg/kg)	$1 \times 10^{-6} = 0.000001$	$0.66 \times 2 \times (10^{-6})^{-0.1505} = 10.5$
0.1 ppm หรือ 100 ppb	$1 \times 10^{-7} = 0.0000001$	$0.66 \times 2 \times (10^{-7})^{-0.1505} = 14.9$
0.01 ppm หรือ 10 ppb	$1 \times 10^{-8} = 0.00000001$	$0.66 \times 2 \times (10^{-8})^{-0.1505} = 21.1$
0.001 ppm หรือ 1 ppb	$1 \times 10^{-9} = 0.000000001$	$0.66 \times 2 \times (10^{-9})^{-0.1505} = 29.8$

เกณฑ์การยอมรับ อาจใช้เกณฑ์ที่ AOAC และ Codex กับ EU กำหนดไว้ทุกๆ ไปดังนี้

Reference	ค่า HORRAT ที่ยอมรับ
AOAC	< 2
Codex, EU	≤ 2

โดย HORRAT หรือ Horwitz ratio คือ อัตราส่วนระหว่างค่า RSD ที่คำนวณได้จากผลการทดลอง (RSD_{obs}) กับค่า RSD ที่คำนวณจาก Horwitz's equation ($RSD_{expected}$) ใช้ประเมินการยอมรับความเที่ยงได้

$$\text{สำหรับ repeatability; HORRAT} = \frac{\text{RSD}_{\text{obs}}}{\text{RSD}_{\text{expected}}} \dots\dots\dots(6)$$

ข้อสังเกต การใช้ Horwitz's equation ที่ความเข้มข้นสูงมากๆ และ ต่ำมากๆ ค่าที่ได้จาก Horwitz's equation อาจจะไม่เหมาะสมเนื่องจากจะได้ค่าที่ต่ำเกินไป หรือสูงเกินไป ดังนั้นบางองค์กรจึงมีการกำหนดรายละเอียดการใช้เกณฑ์นี้เพิ่มเติม

การใช้ Horwitz 's equation ในการประเมินค่า precision แสดงในตัวอย่างที่ 1

ตัวอย่างที่ 1

ในการทดสอบวิธีวิเคราะห์ไนเตรทในน้ำด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรีโดยใช้ CRM ซึ่งมีค่าความเข้มข้นของไนเตรท 12.5 มกต่อลิตร มีผลการวิเคราะห์ดังนี้ ค่าความเข้มข้นเฉลี่ยที่วิเคราะห์ 10 ซ้ำคือ 12.9 มก ต่อลิตร และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน คือ 1.15 มก ต่อลิตร ความเที่ยง ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธีนี้ยอมรับได้หรือไม่

วิธีทำ

1. คำนวณ %RSD ของผลการวิเคราะห์ RM

$$\%RSD = \frac{1.15 \times 100}{12.9} = 8.9 \%$$

2. คำนวณ expected %RSD_r จาก Horwitz's Equation

$$\text{Expected \%RSD}_r = 0.66 \times 2 \times C^{-0.1505} \quad (C = 12.9 \times 10^{-6})$$

(หรืออาจใช้ $C = 12.5 \times 10^{-6}$)

$$\text{Expected \%RSD}_r = 0.66 \times 2 \times (12.9 \times 10^{-6})^{-0.1505} = 7.2\%$$

3. คำนวณค่า HORRAT

$$\text{HORRAT} = \frac{\%RSD_{\text{lab}}}{\%RSD_{\text{expected}}}$$

$$= 8.9/7.2$$

$$= 1.2 \quad (\text{น้อยกว่า } 2)$$

สรุปได้ว่า ความเที่ยง ของวิธีนี้ยอมรับได้

6.4.2.2 การประเมินโดยใช้ F-test

ในการประเมินความใช้ได้ของความเที่ยง ของวิธีทดสอบด้วยวิธีนี้ จะเป็นการเปรียบเทียบระหว่างค่าแปรปรวน (s^2) ของวิธีที่กำลังทดสอบกับวิธีมาตรฐาน ดังนั้นจึงต้องมีการวิเคราะห์ตัวอย่างหรือ RM นั้นด้วยวิธีมาตรฐานด้วย

เปรียบเทียบ ค่า F จากการคำนวณกับค่า F_c จากตาราง (F_c) ถ้า F จากการคำนวณ น้อยกว่า F_c แสดงว่า ความเที่ยง ของทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ในกรณีที่พบว่ามีความแตกต่างกันควรทดสอบกับ Horwitz's Equation ด้วย

ตัวอย่างที่ 2

ในการทดสอบวิธีวิเคราะห์ไนเตรทในน้ำโดยใช้วิธีสเปกโตรโฟโตเมตรีโดยการวิเคราะห์ตัวอย่างเทียบกับวิธี IC ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน มีผลการวิเคราะห์ดังนี้ ด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี ได้ไนเตรท 12.9 มก/ลิตร วิธี IC 12.5 มก/ลิตร และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ วิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี = 1.15 มก/ลิตร ของวิธี IC = 0.70 มก/ลิตร โดยทั้ง 2 วิธีทำการวิเคราะห์ 10 ซ้ำเท่ากัน ความเที่ยงที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี แตกต่างจากความเที่ยงโดยวิธี IC หรือไม่

วิธีทำ

คำนวณค่า F จาก $F = s_1^2/s_2^2$ โดย $s_1^2 > s_2^2$

$$s_1^2 = 1.15^2, s_2^2 = 0.70^2$$

$$F = \frac{1.15^2}{0.70^2} = 2.70$$

จากตาราง F : ที่ $p = 0.05$ และ $df_1 = 9, df_2 = 9$ ค่า $F_c = 4.03$

นั่นคือ $F < F_c$

แสดงว่า ความเที่ยงของวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรีไม่แตกต่างจากความเที่ยงของวิธี IC

6.5 ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation)

Limit of detection (LOD) เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สนใจในตัวอย่างที่วิธีทดสอบสามารถตรวจวัดได้ด้วยความเชื่อมั่น 99 % โดยที่ความเข้มข้นระดับนี้ ไม่อาจบอกเป็นปริมาณที่มีความถูกต้อง และเที่ยงตรงในระดับที่ยอมรับได้ เนื่องจากความไม่แน่นอนมีค่าสูง

Limit of quantitation (LOQ) เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สนใจในตัวอย่างที่วิธีทดสอบสามารถตรวจวัดได้ ที่ความเข้มข้นระดับนี้สามารถรายงานเป็นปริมาณที่มีความแม่นยำและเที่ยงตรงในระดับที่ยอมรับได้ (ประมาณ 30%)

บางครั้งจะพบคำที่มีความหมายคล้ายๆกัน เช่น IDL (instrumental detection limit) IDL บอกถึงความสามารถของเครื่องมือวัดที่จะแสดงความแตกต่างระหว่างสัญญาณ (signal) ที่เกิดจากสารที่สนใจ กับ noise ค่า IDL จึงไม่ใช่ LOD ของวิธีทดสอบ

6.5.1 Limit of detection

โดยทั่วไปการกำหนดค่า LOD นั้น กำหนดจากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณจากการวัดค่า blank (s) ที่ระดับความเชื่อมั่นประมาณ 99% (อาจมีข้อกำหนดที่แตกต่างจากนี้บ้าง) โดยถือว่าผลของการทดสอบมีการแจกแจงแบบปกติ (normal distribution) ดังนั้น LOD จึงมีค่าเป็น $3s$ (ที่ 99% z มีค่าประมาณ 3) อย่างไรก็ตามในการทดสอบทางเคมี การทำซ้ำมากๆ เป็นสิ่งที่เป็นไปได้ เนื่องจากต้องใช้ตัวอย่างปริมาณมาก เสียค่าใช้จ่ายในการทดสอบสูง และเสียเวลาโดยไม่จำเป็น จำนวนซ้ำ (n) มักจะมีค่าน้อย การแจกแจงของข้อมูลถือว่าเป็นแบบ t-distribution (ซึ่งคล้ายกับการแจกแจงแบบปกติ) ดังนั้น LOD จึงเท่ากับ $t_{(one-tailed, 0.01, n-1)} \times s$ และเพื่อให้ค่า t มีค่าเท่ากับ 3 โดยประมาณจึงต้องมีการทดสอบ 7- 10 ซ้ำ (ตามตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ค่า t ที่ ระดับความเชื่อมั่น 99% (one-tailed)

n	Degree of freedom (n-1)	t _(0.01, n-1)
5	4	3.75
6	5	3.36
7	6	3.14
8	7	3.00
9	8	2.90
10	9	2.82

วิธีการหาค่า s สามารถทำได้หลายวิธี ในที่นี้จะกล่าวถึงวิธีดังต่อไปนี้

1. การคำนวณจากสัญญาณของ sample blank ที่อ่านได้จากเครื่องมือวัด
2. การคำนวณจากสัญญาณของ spiked sample blank ที่อ่านได้จากเครื่องมือวัด
3. การคำนวณจากจุดตัดของกราฟเส้นตรงที่ plot ระหว่างค่าความเข้มข้นของ spiked sample blank กับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
4. การคำนวณจากจุดตัดของกราฟมาตรฐานที่เตรียมโดยใช้ sample blank

การหาค่า s เพื่อนำมาคำนวณ ค่า LOD มีหลายวิธี โดยทั่วไปสำหรับการทดสอบวิธีวิเคราะห์ LOD ที่ได้จากวิธีที่ 1 ถือว่ามีความเหมาะสมเพียงพอ แต่หากไม่สามารถทำได้ ก็อาจใช้วิธีอื่นๆ แต่ไม่ว่าจะใช้วิธีใดก็ตาม sample blank หรือ spiked sample blank ที่เตรียมต้องมีปริมาณมากพอสำหรับการทดสอบ 7-10 ขั้ว และควรเพื่อไว้บ้าง

- 6.5.1.1 การคำนวณจากสัญญาณของ sample blank ที่อ่านได้จากเครื่องมือวัด**
วิธีนี้ sample blank ต้องสามารถอ่าน สัญญาณได้ (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานไม่เท่ากับศูนย์ และสัญญาณที่ได้ต้องไม่ได้มาจากการมีสารที่สนใจ)

1. วิเคราะห์ sample blank 7-10 ซ้ำ ($n=7-10$) ซ้ำ ละ 1 ครั้ง
2. คำนวณค่าความเข้มข้น และความเข้มข้นเฉลี่ย ($\bar{x}$) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (s) ของ sample blank
3. คำนวณค่า LOD จากสูตร

$$LOD = \bar{x} + 3 s$$

6.5.1.2 การคำนวณจากสัญญาณของ spiked sample blank

ควรใช้วิธีนี้ในกรณีที่ sample blank ไม่สามารถอ่านสัญญาณได้

1. เติมสารมาตรฐานของสารที่สนใจลงใน sample blank โดยเติมที่ระดับต่ำสุดที่ยอมรับได้ เช่น ระดับ LOQ (ถ้าทราบ) หรือระดับต่ำสุดของความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่เหมาะสม
2. วิเคราะห์ spiked sample blank จาก ข้อ 1. จำนวน 7-10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ครั้ง
3. คำนวณค่า s
4. คำนวณค่า LOD จากสูตร

$$LOD = 3 s$$

6.5.1.3 การคำนวณจากจุดตัดของกราฟเส้นตรงที่ plot ระหว่างค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของ spiked sample blank กับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

1. เติมสารมาตรฐานของสารที่สนใจลงใน sample blank ให้มีความเข้มข้นหลายระดับ โดยระดับแรกไม่ควรห่างจากศูนย์มากนัก และระดับอื่นๆ ควรมีระยะห่างเท่าๆ กัน
2. วิเคราะห์ spiked sample blank ระดับละ 7 ซ้ำ
3. คำนวณค่า $\bar{x}$ และ s ของแต่ละระดับความเข้มข้น
4. plot graph ระหว่าง $\bar{x}$ และ s โดยให้ $\bar{x}$ อยู่บนแกน x และ s อยู่บนแกน y หาสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ระหว่าง $\bar{x}$ และ s
5. ถ้ามีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ลากเส้นกราฟตัดแกน y จุดตัดคือ s_b (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นศูนย์)
6. คำนวณค่า LOD จากสูตร

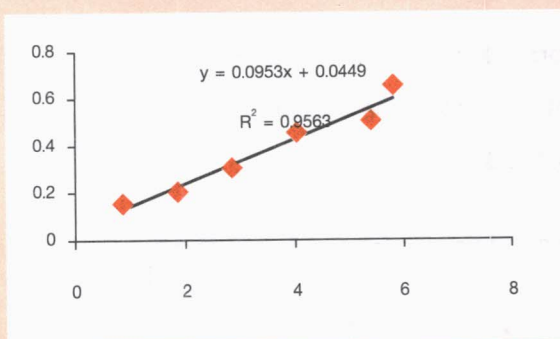
$$LOD = 3 s_b$$

ตัวอย่างที่ 1

เติมสารมาตรฐาน (Analyte) ลงใน sample blank โดยให้ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5, 6 มก/กก วิเคราะห์ ระดับละ 7 ซ้ำ ได้ผลดังนี้

ความเข้มข้นของตัวอย่าง ที่เตรียม, (มก/กก)	ความเข้มข้นเฉลี่ยของตัวอย่างที่ วิเคราะห์ได้, $\bar{x}$ (มก/กก)	Standard deviation, s (มก/กก)
1	0.85	0.15
2	1.85	0.2
3	2.85	0.3
4	4.03	0.45
5	5.54	0.50
6	5.80	0.65

เมื่อ plot graph ระหว่าง $\bar{x}$ และ s ($\bar{x}$ บนแกน X และ s บนแกน Y) ได้ผลดังนี้



ดังนั้น $s_b = 0.0449$ มก/กก

$3 s_b = 0.1347$ มก/กก.

นั่นคือ LOD = 0.14 มก/กก.

6.5.1.4 การคำนวณจากจุดตัดของกราฟมาตรฐานที่เตรียมโดยใช้ sample blank

กรณีนี้พิจารณาว่าจุดตัดของกราฟมาตรฐาน (y-intercept) คือสัญญาณซึ่งเกิดจาก blank ดังนั้น การหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ y - intercept ก็คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ blank สำหรับกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นโดยใช้ simple least squares method ถือว่าความแปรปรวนบนเส้นกราฟตลอดทั้งช่วงไม่แตกต่างกัน (ช่วงไม่ควรกว้างเกินกว่า 10 เท่า) ดังนั้นจึงสามารถใช้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของเส้นกราฟ ($s_{y/x}$) เป็นค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ y - intercept ได้

1. สร้างกราฟมาตรฐาน โดยใช้ spiked sample blank โดยให้ครอบคลุมความเข้มข้นของสารละลายสุดท้ายของตัวอย่างก่อนวัด และมีอย่างน้อย 6 ระดับความเข้มข้นระดับละ 3-4 ซ้ำ มีความห่างของแต่ละระดับเท่า ๆ กัน และระดับแรกควรใกล้ 0

2. คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ y - intercept จากสูตร

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

โดย y_i คือ ค่าสัญญาณที่อ่านจากเครื่องมือวัด,

$\hat{y}$ คือ ค่าสัญญาณที่ควรเป็น คำนวณโดยใช้ method of least square (ค่า y บน regression line ที่สอดคล้องกับค่า x ระดับต่าง ๆ)

$(y_i - \hat{y})$ คือ y - residual

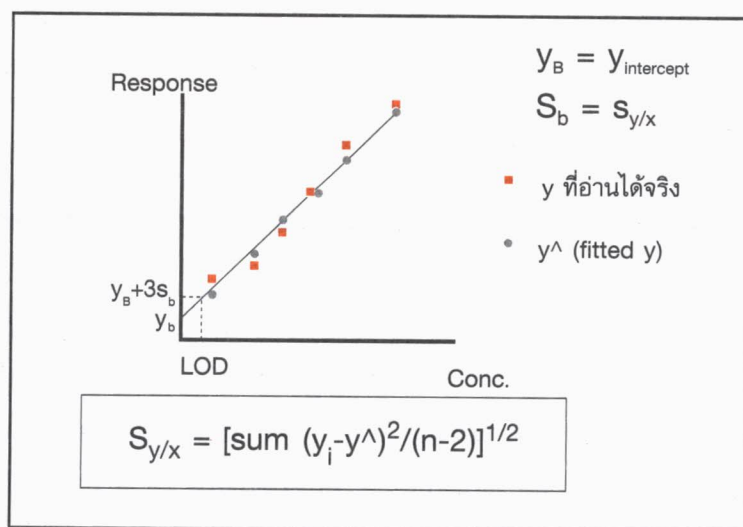
$(n-2)$ คือ degree of freedom ของ linear regression line (เส้นกราฟตามภาพที่ 1)

3. คำนวณค่า LOD จากสูตร

LOD = ความเข้มข้นที่ correspond กับ $(y_{\text{intercept}} + 3 s_{y/x})$

โดยที่ $y_{\text{intercept}}$ = intercept = response บนแกน y ที่ $x = 0$

$s_{y/x}$ = Standard deviation ของ $y_{\text{intercept}}$



ภาพที่ 1 การหาค่า LOD โดยใช้ calibration curve

6.5.2 Limit of quantitation

วิธีการกำหนดค่า LOQ มี 2 ขั้นตอนคือ การหาค่า LOQ โดยประมาณ และการยืนยันค่า LOQ ที่มีความแม่นยำและความเที่ยงในระดับที่ยอมรับได้

1. หาค่า LOQ โดยประมาณ จาก s_b ที่ได้จากการหาค่า LOD

LOQ (ประมาณ) = ความเข้มข้นของ blank ที่อ่านได้ + 10 s_b
(ดู 6.5.1.1) หรือ

LOQ (ประมาณ) = 10 s_b (ดู 6.5.1.2-6.5.1.4)

2. ยืนยันค่า LOQ ที่มีความแม่นยำและความเที่ยงในระดับที่ยอมรับได้

1. เตรียม spiked sample blank ให้มีความเข้มข้นเท่ากับค่า LOQ (ประมาณ) หรือใกล้เคียง
2. วิเคราะห์ 10 ซ้ำ
3. คำนวณค่าความเข้มข้นเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
4. ประเมินการยอมรับความแม่นยำและความเที่ยง

ถ้าความแม่นยำและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (ดูเกณฑ์การยอมรับในบทที่ 6.3 และ 6.4) แสดงว่า ระดับความเข้มข้นนี้คือค่า LOQ แต่ถ้ายังไม่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ ให้เตรียม spiked sample blank ใหม่ให้มีความเข้มข้นสูงขึ้นและทำตามข้อ 2-4 หรือในกรณีที่ ค่าความแม่นยำและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ แต่คิดว่าค่า LOQ นี้อาจจะสูงเกินไปก็อาจเตรียม spiked sample blank ใหม่ให้มีความเข้มข้นน้อยลงและทำตาม ข้อ 2-4

6.5.3 เกณฑ์การยอมรับ LOD และ LOQ

ความเหมาะสมค่าของค่า LOD และ/หรือ LOQ ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการใช้งาน อย่างไรก็ตาม Codex Committee on methods and sampling ได้นำเสนอเกณฑ์เกี่ยวกับ LOD และ LOQ สำหรับ trace elements ในอาหารในการประชุม CCMAS ปี 1998 ซึ่งห้องปฏิบัติการอาจใช้เป็นแนวทางสำหรับการพิจารณาความเหมาะสมของ LOD และ LOQ ที่ทดสอบได้ดังนี้

LOD หรือ LOQ	เกณฑ์การยอมรับ
LOD	< 1/20 ของ target value
LOQ	< 1/10 ของ target value

Target value อาจหมายถึงค่ามาตรฐาน หรือ specification ของ ผลิตภัณฑ์ เป็นต้น

6.6 ความทน (Ruggedness / Robustness)

ความทนของวิธีวิเคราะห์ คือคุณลักษณะที่บ่งว่าวิธีนั้นจะยังให้ผลการวิเคราะห์ที่ยอมรับได้เมื่อตัวแปรหรือเงื่อนไขบางอย่างที่กำหนดไว้ในวิธีมีการเปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อย ผลของการศึกษาความทนนี้จะช่วยให้ทราบจุดวิกฤติของวิธี ซึ่งนักวิเคราะห์จะต้องเอาใจใส่ และควบคุมอย่างใกล้ชิดในขณะที่ใช้วิเคราะห์ตัวอย่างในงานประจำ

การศึกษาเรื่องความทนเป็นขั้นตอนหนึ่งของกระบวนการพัฒนาวิธี เช่น วิธีหาความชื้นโดยการอบร้อน ซึ่งระบุให้ใช้อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส แสดงว่ามีการศึกษามาแล้วว่าการอบที่อุณหภูมิ 103, 104 และ 105 องศาเซลเซียส ให้ผลไม่แตกต่างกัน โดยพิจารณาความใช้ได้ของความแม่นยำและความเที่ยง เป็นต้น

วิธีทำ

1. ศึกษาและกำหนดตัวแปรที่คาดว่าจะมีผลกระทบต่อ performance ของวิธี
2. วิเคราะห์ CRM หรือ RM ที่ทราบค่าความเข้มข้น โดยการปรับเปลี่ยนตัวแปรเหล่านั้นโดยปรับเปลี่ยนครั้งละ 1 ตัวแปร
3. คำนวนและประเมินความใช้ได้ของความแม่นยำและความเที่ยง (6.3 และ 6.4)

ตัวอย่างตัวแปรที่ควรศึกษาได้แก่ เครื่องมือ นักวิเคราะห์ น้ำยาเคมี ความเข้มข้นของน้ำยาเคมีที่ใช้ ความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิ ระยะเวลาในขั้นตอนต่างๆ เป็นต้น

หมายเหตุ การศึกษาความทนอาจทำได้โดยใช้ fractional factorial designs ของ Youden ซึ่งวิธีนี้ จะมีการปรับเปลี่ยนตัวแปร 7 ตัวแปรโดยทำการทดลอง 8 การทดลอง แล้วจึงศึกษาผลกระทบโดยการวิเคราะห์ผลการทดลองทั้ง 8 ค่า การศึกษาแบบนี้นิยมทำในขั้นตอนของการพัฒนาวิธีมากกว่าในขั้นตอนการทดสอบวิธี

6.7 ความไม่แน่นอนของการวัด (Measurement Uncertainty)

ความไม่แน่นอนของการวัด คือพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับผลวิเคราะห์ โดยบอกช่วงของผลการวิเคราะห์ที่เป็นไปได้ ผลวิเคราะห์ที่ระบุค่าความไม่แน่นอนจะมีความน่าเชื่อถือกว่าผลวิเคราะห์ที่ไม่ระบุค่าความไม่แน่นอน เพราะค่าความไม่แน่นอนบอกถึงคุณสมบัติการสอบกลับได้ของผลวิเคราะห์นั้น ดังนั้นในการทดสอบวิธีวิเคราะห์จึงควรมีการประมาณค่าความไม่แน่นอนด้วยเพื่อใช้ในการพิจารณาความเหมาะสมของวิธี

ความไม่แน่นอนของการวัดเป็นค่ารวมของผลกระทบทั้งหมดที่มีต่อผลวิเคราะห์ที่เป็นเชิงปริมาณ (สำหรับการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพไม่ต้องประมาณค่าความไม่แน่นอน) โดยทั่วไปความไม่แน่นอนของการวัดอาจแสดงในรูปของค่าความไม่แน่นอนมาตรฐาน หรือช่วงของความเชื่อมั่น หรือค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานคูณด้วยค่า coverage factor ระดับความเชื่อมั่นที่กำหนด อย่างไรก็ตามความไม่แน่นอนของการวัดที่เหมาะสมกับการใช้งานไม่จำเป็นต้องมีค่าน้อยที่สุด โดยเฉพาะเมื่อการทำให้ความไม่แน่นอนน้อยลงมากเกินไปต้องเกี่ยวข้องกับค่าใช้จ่ายที่สูงขึ้นเกินความจำเป็น

ค่าความไม่แน่นอนมีเครื่องหมายทั้งบวกและลบ ($\pm$) ค่านี้จะนำไปปรับแก้ค่า (correction) ที่วัดได้ให้เท่ากับค่าจริงหรือค่าอ้างอิงไม่ได้ ซึ่งต่างจากค่า error ซึ่งนำไปปรับแก้ค่าให้เท่ากับค่าจริงหรือค่าอ้างอิงได้

6.7.1 แหล่งที่มาของความไม่แน่นอน (Sources of uncertainty)

แหล่งที่มาของความไม่แน่นอนมีหลายแหล่ง โดยทั่วไป ได้แก่

1. ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ ซึ่งอาจไม่ใช่ตัวแทนที่ดี หรือไม่เป็นเนื้อเดียวกัน
2. วิธีวิเคราะห์ที่ใช้ มี bias หรือบางขั้นตอนอาจมีความไม่ชัดเจน (ยกเว้น

วิธีที่เป็น empirical เนื่องจากวิธี empirical ถือว่าเป็นวิธีที่ไม่มี method bias (ดูเพิ่มเติม ในบทที่ 2))

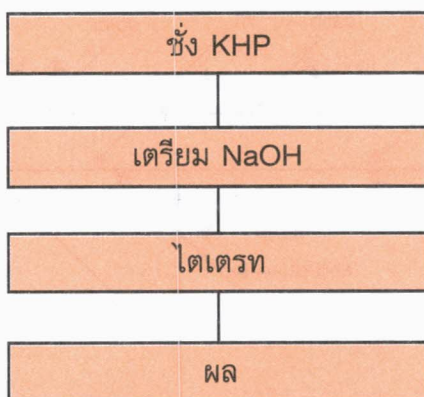
3. สภาวะแวดล้อมของการวิเคราะห์ เช่นการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ความชื้น กระแสไฟฟ้า ฝุ่น เป็นต้น
4. เครื่องมือที่ใช้ต่างๆ เช่น เครื่องแก้วสำหรับวัดปริมาตร เครื่องชั่งที่ใช้ชั่ง สารมาตรฐาน และ ตัวอย่าง มีค่าความไม่แน่นอน เครื่องมือวัดมี sensitivity, resolution ที่ไม่เหมาะสม เป็นต้น
5. สารมาตรฐาน และ วัสดุอ้างอิง ซึ่งค่าความบริสุทธิ์ หรือ ความเข้มข้นที่ระบุ/รับรองมีค่าความไม่แน่นอน
6. ผู้วิเคราะห์มีความคลาดเคลื่อน
7. repeatability

6.7.2 ประเภทของความไม่แน่นอน (Types of uncertainty)

ความไม่แน่นอนของการวัดอาจแบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ ความไม่แน่นอน สุ่ม (random uncertainty) หรือความไม่แน่นอนแบบ A (Type A uncertainty) เป็นความไม่แน่นอนที่สามารถหาค่าได้ด้วยการทำซ้ำๆ และประเมินด้วยวิธีการทางสถิติ และความไม่แน่นอนระบบ (systematic uncertainty) หรือความไม่แน่นอนแบบ B (Type B uncertainty) เป็นความไม่แน่นอนที่ไม่อาจประเมินได้ด้วยวิธีการทางสถิติ

6.7.3 ขั้นตอนในการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Estimation of measurement uncertainty)

ในการประมาณค่าความไม่แน่นอนจะต้องคำนึงถึงกระบวนการวิเคราะห์เพื่อจะได้ทราบแหล่งของความไม่แน่นอนทั้งหมด การเขียน flow diagram แสดงขั้นตอนของการวิเคราะห์ทั้งหมดอย่างย่อจะช่วยให้สามารถหาแหล่งความไม่แน่นอนได้ครบถ้วน เช่น การ standardization สารละลาย มาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ เขียน flow diagram ได้ดังนี้



6.7.3.1 กำหนดสิ่งที่ต้องการวิเคราะห์ (Specify the measurand)

Measurand คือปริมาณของสิ่งที่ต้องการวัด สามารถกำหนดได้จากสูตรที่ใช้ในการคำนวณผลการวิเคราะห์ เช่น ในการ standardization สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ สิ่งที่ต้องการคือความเข้มข้นของ NaOH (C_{NaOH} mol/l) ซึ่งหาได้จาก

$$C_{\text{NaOH}} = \frac{1000 \times m_{\text{KHP}} \times P_{\text{KHP}}}{M_{\text{KHP}} \times V_T} \text{ mol/l}$$

C_{NaOH} = ความเข้มข้นของ NaOH (mol/l)

1000 = conversion factor จาก ml เป็น l

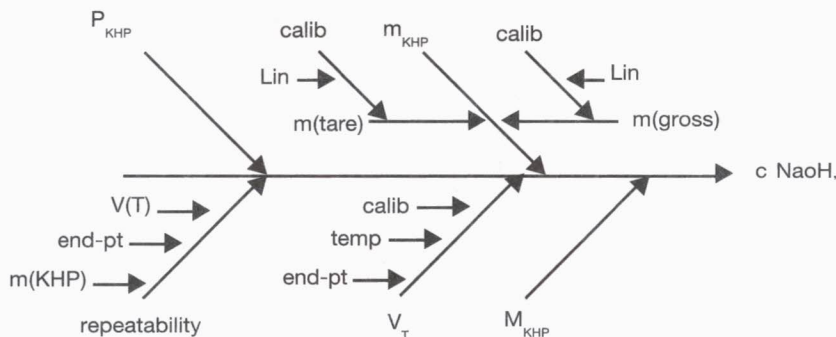
m_{KHP} = น้ำหนักของ KHP (g)

M_{KHP} = น้ำหนักโมเลกุลของ KHP (g)

P_{KHP} = ความบริสุทธิ์ ของ KHP (เป็น mass fraction)

V_T = ปริมาตร NaOH (ml)

6.7.3.2 หาแหล่งและองค์ประกอบต่างๆของความไม่แน่นอน (Identify uncertainty sources) โดยการพิจารณาจาก measurand เมื่อทราบแหล่งที่มาของความไม่แน่นอนแล้ว จึงทำการวิเคราะห์ (การแสดงเป็น fish bone diagram (หรือ cause-effect diagram) จะทำให้เห็นชัดเจน)



ภาพที่ 2 Fish bone diagram แสดงแหล่งของความไม่แน่นอน

6.7.3.3 หาค่าความไม่แน่นอนขององค์ประกอบต่างๆ (Quantify uncertainty components)

6.7.3.3.1 สำหรับองค์ประกอบที่ทำให้เกิดความไม่แน่นอนสุ่ม (u_A)

ความไม่แน่นอนหาได้จากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (s or sd) ของการทำซ้ำจากข้อมูลที่มีอยู่แล้ว เช่น ข้อมูลการทำ method validation ของวิธีนั้น (RSD ที่แสดงความเที่ยงของวิธี) หรือข้อมูลการวิเคราะห์ control sample เป็นเวลานาน

กรณีที่ 1 ถ้าผลของการวัดตัวอย่างมีความแปรปรวนสูง (ผลของการวิเคราะห์ตัวอย่างได้จากการวิเคราะห์ 1 ซ้ำ : $n = 1$)

$$u_A = sd$$

กรณีที่ 2 ถ้าผลของการวัดมีความแปรปรวนไม่สูง (ผลของการวิเคราะห์ตัวอย่าง ได้จากการวิเคราะห์มากกว่า 1 ซ้ำ : $n > 1$)

$$u_A = \frac{sd}{\sqrt{n}}$$

สำหรับความไม่แน่นอนของค่าที่ได้จากการคำนวณจากกราฟมาตรฐาน (u_{co})

$$u_{co} = \frac{s}{B_1} \times \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(c_0 - \bar{c})^2}{s_{xx}}}$$

B_1 = slope ของกราฟมาตรฐาน

p = จำนวนครั้งของการวัดตัวอย่าง

n = จำนวนครั้งของการวัดสารละลายมาตรฐาน (calibrant) ทั้งหมด

$\bar{c}$ = ความเข้มข้นเฉลี่ยของความเข้มข้นทั้งหมดของสารละลายมาตรฐาน โดยคิดจากค่าที่ได้จากสมการ regression

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{j=1..n} (A_j - (B_0 + B_1 \times c_j))^2}{(n-2)}}$$

s = residual standard deviation

$$S_{xx} = \sum (c_j - \bar{c})^2$$

A_j = สัญญาณของสารละลายมาตรฐาน

c_j = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

6.7.3.3.2 สำหรับองค์ประกอบที่ทำให้เกิดความไม่แน่นอนระบบ (u_B)

หาจาก specification ของเครื่องมือ ใบรับรองการสอบเทียบเครื่องมือ ใบรับรองค่าวัสดุอ้างอิง มาตรฐานอ้างอิงต่างๆ หรือตำราต่างๆ เป็นต้น ซึ่งข้อมูลที่บ่งบอกถึงความไม่แน่นอนของการวัดอาจแสดงไว้ในรูปแบบต่างๆ ให้พิจารณาดังนี้

1. ถ้าระบุค่าความไม่แน่นอน ใช้ค่านี้เพียงค่าเดียว
2. ถ้าไม่ระบุค่าความไม่แน่นอนแต่มีค่าที่เกี่ยวข้องกับความไม่แน่นอนในรูปแบบอื่นๆ ให้เลือกใช้ 1-2 ค่าโดยพิจารณาความสำคัญเพื่อให้ครอบคลุมที่สุด เช่น ค่า tolerant ของเครื่องมือ ค่าการทวนซ้ำ ค่าการทวนซ้ำ ค่าความเป็นเส้นตรงของเครื่องชั่ง ความแม่นยำของวิธีที่ใช้กำหนดค่าอ้างอิงของสารมาตรฐาน หรือวัสดุอ้างอิง เป็นต้น
3. ถ้าไม่มีข้อมูลระบุให้ถือว่าความไม่แน่นอนมีค่าน้อยมากจนตัดทิ้งได้ กรณีนี้ต้องพิจารณาถึงคุณภาพ และความน่าเชื่อถือของผู้ผลิตประกอบด้วย

6.7.3.3.3 หาค่าความไม่แน่นอนมาตรฐาน (Standardize the uncertainty)

สำหรับความไม่แน่นอนสุ่มตามข้อ 6.7.3.3.1 ค่าที่ได้คือความไม่แน่นอนมาตรฐาน สำหรับความไม่แน่นอนระบบ ตามข้อ 6.7.3.3.2

เปลี่ยนค่าความไม่แน่นอนเหล่านั้นเป็นความไม่แน่นอนมาตรฐาน (standard uncertainty) ได้โดยหารด้วยค่าที่บอกความเชื่อมั่นของการแจกแจงที่เหมาะสม (divisor: d) ซึ่งความไม่แน่นอนของแต่ละแหล่งอาจมีการแจกแจงข้อมูลต่างกัน เช่น การแจกแจงแบบสามเหลี่ยม (Triangle distribution) การแจกแจงแบบสี่เหลี่ยม (Rectangular distribution) และ การแจกแจงแบบปกติ (Normal distribution) ค่า d สำหรับการแจกแจงต่างๆ แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่า d สำหรับการแจกแจงต่างๆ

ลักษณะการแจกแจงข้อมูล (distribution)	ตัวหารเพื่อทำให้เป็น standard uncertainty: d
การแจกแจงแบบสามเหลี่ยม (Triangle distribution)	$\sqrt{6}$
การแจกแจงแบบสี่เหลี่ยม (Rectangular distribution)	$\sqrt{3}$
การแจกแจงแบบปกติ (Normal distribution)	2 (ที่ 95%) 3 (ที่ ~ 99%)

ข้อมูลเกี่ยวกับ Type B uncertainty มักจะไม่ระบุระดับความเชื่อมั่นหรือรูปแบบการแจกแจงของข้อมูล จึงต้องพิจารณาความสมเหตุสมผลที่จะเลือกใช้ค่า d กรณีเช่นนี้ควรใช้ $d = \sqrt{3}$

เช่น สาร KHP มาตรฐานที่ใช้ มีค่าความไม่แน่นอน = ± 0.0005 (ไม่ระบุข้อมูลใดๆเกี่ยวกับลักษณะของข้อมูล) เปลี่ยนเป็นความไม่แน่นอนมาตรฐาน = $0.0005 / \sqrt{3} = 0.00029$

6.7.3.4 คำนวณค่าความไม่แน่นอนรวม (Calculate the combined standard uncertainty)

การหาค่าความไม่แน่นอนรวมไม่สามารถทำได้โดยการรวมค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานโดยตรง เนื่องจากค่าตั้งต้น และหน่วยแตกต่างกัน จะต้องเปลี่ยนค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานเป็นความไม่แน่นอนสัมพัทธ์ก่อน โดยการหารค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานด้วยค่าของ

องค์ประกอบนั้น เช่น สารมาตรฐานที่ใช้ มีค่าความไม่แน่นอนมาตรฐาน
= 0.00029 จะได้ความไม่แน่นอนสัมพัทธ์ = $0.00029/1 = 0.00029$
ขั้นตอน 1-3 จัดทำเป็นตารางได้ดังตารางที่ 1 ดังนี้

ตารางที่ 2 แสดงขั้นตอนการหาค่าความไม่แน่นอน

แหล่งของความไม่แน่นอน	ค่าขององค์ประกอบ: x (หน่วย)	ค่าความไม่แน่นอน: u (หน่วย)	Divisor: d	ความไม่แน่นอนมาตรฐาน: u(x) (หน่วย)	ความไม่แน่นอนมาตรฐานสัมพัทธ์: u(x)/x
ความบริสุทธิ์ของ KHP มาตรฐาน: P _{KHP}	1	0.0005	$\sqrt{3}$	$0.0005 / \sqrt{3}$ = 0.00029	$0.00029/1$ = 0.00029

ในขั้นตอนนี้จะสามารถบอกได้ว่าความไม่แน่นอนจากแหล่งใดที่มีค่าสูง ซึ่งควรจะมีการทบทวนและหาวิธีลดความไม่แน่นอนลง

6.7.3.4.1 รวมค่าความไม่แน่นอนสัมพัทธ์ ทั้งหมด โดยใช้ law of propagation

$$\frac{u_{(c)}}{c} = \sqrt{\frac{u_{(x1)}^2}{x_1^2} + \frac{u_{(x2)}^2}{x_2^2} + \dots + \frac{u_{(xn)}^2}{x_n^2}}$$

โดย $\frac{u_{(c)}}{c}$ หมายถึง ความไม่แน่นอนมาตรฐานสัมพัทธ์ของผล
การวิเคราะห์

6.7.3.4.2 เปลี่ยนความไม่แน่นอนรวมสัมพัทธ์เป็นความไม่แน่นอน
รวมมาตรฐาน (u_c) โดยการคูณด้วยค่าของ measurand
เช่น ผลวิเคราะห์ตัวอย่าง = c มก/กก

$$u_{(c)} = \frac{u_{(c)}}{c} \times c \text{ มก/กก}$$

ในขั้นตอนนี้ความไม่แน่นอนรวมมาตรฐานถือว่ามีแจกแจงแบบปกติ เนื่องจากข้อมูลมีมากขึ้น (ตาม Central limiting theorem)

6.7.3.5 คำนวณค่าความไม่แน่นอนขยาย (Calculate the expanded uncertainty: U)

การรายงานค่าความไม่แน่นอนอาจรายงานในรูปของความไม่แน่นอนมาตรฐานก็ได้ ซึ่งเป็นค่าความไม่แน่นอนที่ระดับความเชื่อมั่นประมาณ 68% แต่ทั่วไปโดยเฉพาะสำหรับการวิเคราะห์ทางเคมีนิยมรายงานความไม่แน่นอนที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังนั้นจึงขยายความไม่แน่นอนมาตรฐานด้วยการคูณด้วยค่าที่บอกความเชื่อมั่น (coverage หรือ confidence factor: k) ที่ 95% ซึ่งค่า k ที่เหมาะสมมีค่าประมาณ 2

$$U = 2 \times u_{ce}$$

ค่า U นี้ ควรประกอบด้วย ตัวเลขมีนัยสำคัญไม่เกิน 2 ตัว และในการปิดเศษ ควรปัดขึ้น

หมายเหตุ ค่า divisor และค่า coverage factor ของแต่ละการแจกแจงคือค่าเดียวกัน ถ้าเอาไปหารเพื่อเปลี่ยนให้เป็นค่าที่ระดับความเชื่อมั่นประมาณ 68% เรียก divisor ถ้าเอาไปคูณเพื่อขยายระดับความเชื่อมั่น เรียก coverage factor

สำหรับการแจกแจงแบบปกติ มีค่า k หรือ d โดยประมาณดังนี้ การใช้ค่า coverage factor ต้องคำนึงถึง degree of freedom ด้วย

ระดับความเชื่อมั่นโดยประมาณ	ค่า k หรือ d
68%	1
95%	2
99%	3

EURACHEM CITAC Guide CG 4 ระบุว่าถ้า degree of freedom มีค่าตั้งแต่ 6 ขึ้นไป สามารถใช้ ค่า $k = 2$ (95% confidence level) ได้ แต่ถ้าน้อยกว่า 6 ให้ใช้ coverage factor จากตาราง t (ภาคผนวก 1) โดยหาค่า effective degree of freedom (v_{eff}) ได้จากสูตร

$$v_{\text{eff}} = \frac{u_c^4(y)}{\sum \left(\frac{u_i^4}{v_i} \right)} \dots\dots\dots(1)$$

$u_c(y)$ = total uncertainty

u_i = uncertainty ของ component i

v_i = degree of freedom ของ component i

6.7.4 การรายงานค่าความไม่แน่นอน (Reporting uncertainty)

การรายงานความไม่แน่นอนจะต้องมีความชัดเจนเพื่อผู้ใช้ข้อมูลจะได้ใช้ในการตัดสินใจ

เช่น ถ้ารายงานความไม่แน่นอนในรูปของความไม่แน่นอนรวมมาตรฐาน ให้รายงานดังนี้

ปริมาณตะกั่วในน้ำ = 7.75 ไมโครกรัมต่อลิตร

ความไม่แน่นอนมาตรฐาน = 0.38 ไมโครกรัมต่อลิตร

ถ้ารายงานความไม่แน่นอนในรูปของความไม่แน่นอนขยาย ให้รายงานดังนี้

ปริมาณตะกั่วในน้ำ = 7.75 ± 0.76 ไมโครกรัมต่อลิตร

($k = 2$)

รายละเอียดวิธีการประมาณค่าความไม่แน่นอนสามารถศึกษาเพิ่มเติมได้จาก EURACHEM/CITAC Guide CG4 และอื่นๆ)

6.7.5 เกณฑ์การพิจารณาความสมเหตุสมผลของค่าความไม่แน่นอน

ในการพิจารณาว่าค่าความไม่แน่นอนที่ประมาณได้สำหรับผลการวิเคราะห์ใด ๆ นั้นสมเหตุสมผลหรือไม่อาจประเมินได้โดยใช้เกณฑ์ต่อไปนี้

ค่า standard deviation ที่คำนวณจาก	ค่าความไม่แน่นอนที่ควรเป็น
control chart	sd from control chart x 3
predicted Horwitz's RSD _r	predicted Horwitz's RSD _r x 2

หรืออาจใช้เกณฑ์อื่นๆที่เหมาะสม

7

การรายงานผลการทดสอบ วิธีวิเคราะห์ (A Validation Report)

เมื่อทดสอบวิธีวิเคราะห์แล้วควรจัดทำรายงานผลการทดสอบซึ่งควรครอบคลุมรายละเอียดต่อไปนี้

1. วัตถุประสงค์ และขอบข่ายของวิธีวิเคราะห์
2. ชนิดของสารที่ศึกษาและ matrix
3. สารเคมี สารมาตรฐาน และวัสดุอ้างอิง ที่ใช้ และการเตรียม
4. วิธีการตรวจสอบสารมาตรฐานและสารเคมีที่ใช้
5. ความปลอดภัย
6. คุณสมบัติของวิธีวิเคราะห์
7. จุดวิกฤติที่ได้จากการศึกษาความทน
8. เครื่องมือ และพารามิเตอร์ของเครื่องมือ เช่น อุณหภูมิของคอลัมน์
9. วิธีการทดสอบ (validation) อย่างละเอียด
10. วิธีการทางสถิติที่ใช้
11. การควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์ในงานประจำ
12. โครมาโตแกรม กราฟมาตรฐาน เป็นต้น
13. เกณฑ์การยอมรับคุณลักษณะของวิธีวิเคราะห์
14. ค่าความไม่แน่นอนที่คาดว่าจะมีในผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้
15. เกณฑ์การพิจารณาในการทำ revalidation
16. ชื่อผู้พัฒนาวิธี และผู้ทดสอบวิธี
17. บทสรุปผลการทดสอบวิธี และข้อความที่ระบุว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความเหมาะสม (หรือไม่เหมาะสม) ในการใช้งาน

8

การนำข้อมูลจากการทดสอบ ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ไปใช้กำหนดวิธีควบคุมคุณภาพ การวิเคราะห์

(Use of Validation Data for
Designing Internal Quality
Control)

การควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ (internal quality control, IQC) เป็นกระบวนการที่มีขึ้นเพื่อ monitor และควบคุมกระบวนการวิเคราะห์ และจากการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทำให้ทราบคุณลักษณะเฉพาะ ความสามารถและขีดจำกัดของวิธีซึ่ง จะพบในการใช้งานประจำ เมื่อใช้วิธีวิเคราะห์ในงานประจำจะต้อง verify ว่าขณะนั้นวิธีวิเคราะห์และระบบการวิเคราะห์ยังคงใช้งานได้เป็นปกติ (statistical control) การทดสอบวิธีวิเคราะห์เราใช้วัสดุอ้างอิงหรือตัวอย่างที่ทราบค่าของสารแน่นอน (known sample) แต่ในงานประจำตัวอย่างเป็น unknown ดังนั้นการทำ IQC ที่เกณฑ์การยอมรับกำหนดโดยอาศัยข้อมูลที่ได้จากการทดสอบวิธี (validation data) จะสะท้อนไปถึงผลวิเคราะห์ตัวอย่างที่ทำใน batch เดียวกันได้

การทำ IQC แบบใดขึ้นอยู่กับธรรมชาติของวิธี วัตถุประสงค์ของการนำผลวิเคราะห์ไปใช้ และความถี่ของการวิเคราะห์ รวมทั้งจำนวนตัวอย่าง เช่นการใช้ blanks,

สารมาตรฐาน, spiked sample, blind samples, replicate analysis, QC sample และ control charting เป็นต้น ทั้งนี้การทำ IQC แบบต่างๆต้องเพียงพอที่จะแสดงให้เห็นถึงการใช้ได้ของผลวิเคราะห์ การใช้ IQC ในการ monitor ความแปรปรวนต่างๆที่อาจเกิดขึ้นในกระบวนการ เช่น QC sample ที่วิเคราะห์เป็นช่วงๆใน batch จะบอกถึงการเลื่อนไหล (drift) ในระบบ blank ประเภทต่างๆ จะบอกถึงการปนเปื้อนในขั้นตอนต่างๆ ซึ่งทำให้เกิดสัญญาณ ที่นอกเหนือจากสัญญาณของสารที่กำลังวิเคราะห์ การทำซ้ำจะบอกถึง repeatability และการวิเคราะห์ spiked sample บอกถึง recovery เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

(References)

AOAC Peer Verified Methods Program, Manual on Policies and Procedures, Arlington, VA, Nov 1993.

AOAC Short Course Manual, Intralaboratory Analytical Method Validation, AOAC INTERNATIONAL 1996.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, Procedural Manual, Fifteenth Edition, 2005.

CODEX COMMITTEE ON METHODS OF ANALYSIS AND SAMPLING, Twenty-Second Session, Budapest, Hungary, 23-27 November 1998.

Daniel W.W., Biostatistics: A Foundation For Analysis In The Health Sciences, Third Edition, John Wiley&Son, 1983.

EURACHEM Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide Method Validation and Related Topics, 1998.

EURACHEM CITAC GUIDE CG4 Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement Second Edition, 2000.

Farrent T.J., Practical Statistics for the Analytical Scientist, The Royal Society of Chemistry, Laboratory of the Government Chemist (LGC), Valid Analytical Measurement (VAM). UK.

Garfield F.M., Klesta E. and Hirsch J., Quality Assurance Principles for Analytical Laboratories, 3rd Edition AOAC INTERNATIONAL, MD USA, 2000.

Guide To The Expression Of Uncertainty In Measurement, International Organization for Standardization, 1993.

Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis, Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, 17th Edition, 2000.

Hootsmann, M.J.M. and Vermaat J.E., Data analysis: Statistical processing and graphical presentation. EE136/96/1. International Institute for Infrastructural, Hydraulic and Environmental Engineering. The Netherlands, 1996.

International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of analytical procedures, Methodology, ICH-Q2AB, Geneva 1996.

ISO Guide 31, Reference Materials-Contents of Certificates and Labels, Second Edition, 2000.

ISO Guide 34, General Requirements for the Competence of Reference Material Producers, Second Edition, 2000.

ISO 5725-1 Accuracy (trueness and precision) of Measurement Methods and Results, Part 1: General Principles and Definitions, First Edition, 1994.

ISO/IEC 17025. General Requirements for Competence of Testing and Calibration Laboratory, 2005.

Miller J.N. and Miller J.C., Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, 4th ed., Pearson Education Limited, 2000.

NAMAS, The Expression of Uncertainty and Confidence in Measurement, 1997.

NMIA Training Manual, EMU Course V2.3, Measurement Uncertainty, National Measurement Institute Australia, 2005.

Otto M., (1999), Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry WILEY-VCH, Germany.

Taylor J.K., Quality Assurance of Chemical Measurements, Lewis Publishers, 1989.

Thomson M, Ellison S.L.R. and Wood R., Harmonization Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis, IUPAC Technical Report, Pure Appl.Chem., Vol. 74, No.5, pp. 835-855, 2002.

Vessman J., Selectivity or Specificity? Validation of Analytical Methods from the Perspective of an Analytical Chemist in the Pharmaceutical Industry, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 14(1996) 867-869.

Wernimont, G.T. (1996). Use of Statistics to Develop and Evaluate Analytical Methods. Spendley, W. Editor. AOAC International.

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, แนวทางการทดสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์, 2545.

ศิริชัย พงษ์วิชัย, การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2548

สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, นิยามศัพท์ เกี่ยวกับระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2546.

สมพงษ์ จินายน, หลักการประเมินผลคุณสมบัติของเทคนิคการวิเคราะห์ สำหรับห้องปฏิบัติการ, 2529

ภาคผนวก 1

นิยาม (Definitions)

(จาก นิยามศัพท์เกี่ยวกับระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2546)

Accuracy (ความแม่นยำ)

(ISO 3534-1:1993)

The closeness of agreement between a test result and the accepted reference value.

เป็นค่าแสดงความใกล้เคียงระหว่างผลการทดสอบและค่าอ้างอิงที่ยอมรับ

Note: The term accuracy, when applied to a set of test results, involves a combination of random components and a common systematic error or bias component.

ข้อสังเกต: ความแม่นยำเมื่อใช้กับชุดของผลการทดลอง ความแม่นยำจะเกี่ยวข้องกับผลรวมของความผิดพลาดสุ่มและความผิดพลาดระบบหรือองค์ประกอบของความเบี่ยงเบน

Bias (ความเบี่ยงเบน)

(ISO 3534-1:1993)

The difference between the expectation of the test results and an accepted reference value.

ความแตกต่างระหว่างค่าที่คาดว่าจะได้จากการทดสอบกับค่าอ้างอิงที่ยอมรับ

Note: Bias is the total systematic error as contrasted to random error. There may be one or more systematic error components contributing to the bias.

ข้อสังเกต: ความเบี่ยงเบนคือผลรวมความผิดพลาดระบบ อาจจะมีองค์ประกอบมากกว่า 1 ที่มีผลต่อค่าความเบี่ยงเบน

Random error (ความผิดพลาดสุ่ม)

(VIM: 1993)

Result of a measurement minus the mean that would result from an infinite number of measurements of the same measurand carried out under repeatability conditions.

ผลต่างระหว่างค่าที่วัดได้กับค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวัดของสิ่งเดียวกันซ้ำหลายๆครั้ง

Systematic error (ความผิดพลาดระบบ)

(VIM : 1993)

Mean that would result from an infinite number of measurements of the same measurand carried out under repeatability conditions minus a true value of the measurand.

ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวัดของสิ่งเดียวกันซ้ำหลายๆ ครั้ง ลบด้วยค่าจริง

Limit of detection LOD (ขีดจำกัดของการตรวจพบ)

(NATA Tech Note # 17 : 1997)

The lowest concentration of analyte in a sample that can be detected, but not necessarily quantitated under the stated conditions of test.

ความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถตรวจพบได้ แต่ไม่จำเป็นต้องทราบว่ามีความเข้มข้นเท่าไร ภายใต้สภาวะการทดสอบที่กำหนด

Limit of Quantitation LOQ (ขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณ)

The Lowest concentration of an analyte that can be determined with acceptable precision (repeatability) and accuracy under the stated conditions of the test.

ความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่วิเคราะห์ที่สามารถตรวจหาปริมาณได้ โดยมี ความแม่นยำและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ภายใต้สภาวะการทดสอบที่กำหนด

Linearity (ความเป็นเส้นตรง)

(AOAC -PVMC : 1993)

The ability of the method to obtain test results proportional to the concentration of analyte.

ความสามารถของวิธีที่ให้ผลการทดสอบเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสาร ที่วิเคราะห์

Precision (ความเที่ยง)

(ISO 3534-1 :1993)

The closeness of agreement between independent test results obtained under stipulated conditions.

ความใกล้เคียงระหว่างผลการทดลองอิสระที่ได้มาภายใต้เงื่อนไขที่กำหนดไว้

Range (พิสัย)

(NATA Tech Note 17 : 1997)

The range of applicability of the test method is the interval between the upper and lower levels of concentration of the analyte that have been demonstrated to be capable of the determination with the required precision, accuracy and linearity under the stated conditions of test.

ผลลัพธ์ของวิธีทดสอบที่ใช้คือช่วงความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ระหว่างค่าต่ำสุดและค่าสูงสุดที่เป็นเส้นตรง และให้ผลการทดสอบที่มีความเที่ยง ความแม่นยำตามเกณฑ์ที่ยอมรับ ภายใต้สภาวะการทดลองที่ระบุไว้

Repeatability (ความทวนซ้ำได้)

(ISO 3534-1 : 1993)

Precision under repeatability conditions, i.e. conditions where dependent test results are obtained with the same method on identical test items in the same laboratory by the same operator using the same equipment within short intervals of time.

ความเที่ยงภายใต้สภาวะการทดลองเดียวกัน โดยวิเคราะห์ซ้ำในห้องปฏิบัติการเดียวกันนักวิเคราะห์คนเดียวกันและเครื่องมือเดียวกัน ในช่วงเวลาใกล้เคียงกัน

Reproducibility (ความทำซ้ำได้)

(ISO 3534-1 : 1993)

Precision under reproducibility conditions, i.e. conditions where test results are obtained with the same method on identical test items in different laboratories with different operators using different equipment.

ความเที่ยงเมื่อทำการทดลองซ้ำๆกันโดยทำการทดลองวิธีเดียวกันภายใต้สถานการณ์ที่แตกต่างกัน ได้แก่ เครื่องมือต่างกัน ห้องปฏิบัติการต่างกันและผู้วิเคราะห์คนละคนกัน

Robustness (ความคงทน)

(ICH Q2A, CPMP/ICH/381/9)

The robustness of an analytical procedure is a measure of its capacity to remain unaffected by small, but deliberate variations in method

parameters and provides an indication of its reliability during normal usage.

ความคงทนของวิธีวิเคราะห์เป็นตัวชี้ให้เห็นถึงประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ว่าคงใช้ได้เป็นที่น่าเชื่อถือ แม้ว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงตัวแปรบางอย่างในวิธีวิเคราะห์

Ruggedness (ความทน)

(AOAC International: Intralaboratory Analysis Method Short Course)

The ability of a method to resist changes in the final result arising from minor changes in local or environment variables.

ประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่ยังให้ผลการวิเคราะห์เหมือนเดิม แม้ว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยของสภาวะแวดล้อมที่เกิดขึ้น

Selectivity or Specificity (ความจำเพาะเจาะจง)

(NATA Technical Note 17 : 1997)

The ability of method to determine accurately and specifically the analyte of interest in the presence of the other components in a sample matrix under the stated conditions of the test.

ความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่สามารถตรวจวิเคราะห์สารที่ต้องการวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้อง และสามารถตรวจแยกเฉพาะเจาะจงสำหรับสารที่สนใจออกจากสารประกอบอื่นในตัวอย่าง ภายใต้สภาวะการทดลองที่ระบุไว้

Trueness (ค่าที่แท้จริง)

(ISO 3534-1 : 1993)

The closeness of agreement between the average value obtained from a large set of test results and an accepted reference value.

ความใกล้เคียงระหว่างค่าเฉลี่ยของผลการทดลองที่ได้จากหลายชุดกับค่าอ้างอิงที่ยอมรับ

Note : The measure of trueness is normally expressed in terms of bias.

ข้อสังเกต การหาค่าที่แท้จริงนิยมอธิบายในรูปของความเบี่ยงเบน

Uncertainty (of Measurement) (ความไม่แน่นอนของการวัด)

(VIM : 1993)

Parameter associated with the result of a measurement, that characterises the dispersion of the values that could reasonably be attributed to the measurand.

พารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับผลของการวัดซึ่งบอกลักษณะการกระจายของค่าของสิ่งวัดอย่างสมเหตุสมผล

ภาคผนวก 2

วิธีการทางสถิติ

(Statistical techniques)

สถิติที่เกี่ยวข้องกับการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่จะกล่าวถึง ได้แก่ ค่าเฉลี่ยเลขคณิต (arithmetic mean) ค่าแปรปรวน (variance) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation), ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (standard error หรือ standard deviation of the mean), Grubb's test, Cochran test, F-test, t-test, สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient), สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination), ความถดถอยเชิงเส้น (linear regression) เป็นต้น ซึ่งสถิติเหล่านี้ใช้กับข้อมูลที่มีการแจกแจงแบบโค้งปกติ (normal or Gaussian curve)

1. ค่าเฉลี่ยเลขคณิต (Arithmetic mean)

ค่าเฉลี่ยเลขคณิต หรือค่าเฉลี่ย เป็นค่าบอกจุดตรงกลางของกลุ่มข้อมูล ถ้าเป็นค่าเฉลี่ยของข้อมูลทั้งหมด (ประชากร) ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยจริงใช้สัญลักษณ์ " μ " ถ้าเป็นค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างที่สุ่มมา (sample) ใช้สัญลักษณ์ " $\bar{x}$ " โดยปกติการทดสอบหรือการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ จะไม่ทราบค่า μ แต่จะทราบค่า $\bar{x}$ ดังนั้น $\bar{x}$ จึงเป็นตัวแทนหรือค่าโดยประมาณ (estimator) ของ μ ค่า $\bar{x}$ จะใกล้เคียงกับค่า μ มากน้อยเพียงใด ขึ้นอยู่กับจำนวนข้อมูล เช่น จำนวนการทดสอบหรือวิเคราะห์ซ้ำ

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

โดย x_i เป็น ค่าของข้อมูลหรือผลวิเคราะห์แต่ละค่า และ n เป็นจำนวนข้อมูล

ตัวอย่างที่ 1

ในการวิเคราะห์ความเข้มข้นของคลอไรด์ในตัวอย่างน้ำดื่มโดยการทำซ้ำรวม 8 ครั้ง มีผลการวิเคราะห์ (มิลลิกรัม/ลิตร) ดังนี้ 10.08, 10.11, 10.09, 10.10, 10.12, 9.8, 10.14, 10.02 ต้องการทราบความเข้มข้นเฉลี่ยของคลอไรด์ในน้ำตัวอย่างนี้

ความเข้มข้นเฉลี่ยของ คลอไรด์ ($\bar{x}$) หาได้โดยใช้สูตรที่ (1) ได้ดังนี้

$$\begin{aligned} \bar{x} &= \frac{\sum (x_i)}{n} \\ &= 80.54/8 \\ &= 10.07 \end{aligned}$$

น้ำตัวอย่างนี้มีคลอไรด์ 10.07 มิลลิกรัม/ลิตร

2. ค่าแปรปรวน (Variance)

จากตัวอย่างที่ 1 จะเห็นว่าผลวิเคราะห์ที่ทำซ้ำ ๆ แต่ละค่าไม่เท่ากัน และมีความแตกต่างจากค่าเฉลี่ย ต่างกัน แสดงว่าข้อมูลมีความแปรปรวนซึ่งจะมีผลต่อความน่าเชื่อถือของข้อมูล ถ้ามีความแปรปรวนมากความน่าเชื่อถือก็ลดลง ดังนั้นจึงต้องหาค่าแปรปรวน โดยแสดงในรูปของค่าแปรปรวนเฉลี่ย สำหรับ population แทนด้วยสัญลักษณ์ “ σ^2 ” สำหรับของกลุ่มตัวอย่าง (เช่นผลวิเคราะห์ซ้ำ ๆ) ใช้ “ s^2 ”

$$\sigma^2 = \frac{\sum (x_i - \mu)^2}{n} \dots\dots\dots(2)$$

ในความเป็นจริงไม่อาจหาค่า σ^2 ถ้าไม่ทราบค่า μ ดังนั้นจึงต้องหาค่า estimator ของ σ^2 แทน คือ s^2 ซึ่งหาได้จากสูตร

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

โดย n-1 คือ degree of freedom

การใช้ n-1 จะทำให้ ค่า s^2 ใกล้เคียงกับ σ^2 (และไม่น้อยกว่า σ^2) มากกว่าการใช้ n

สำหรับค่าแปรปรวนของค่าเฉลี่ย แทนได้ด้วย $s^2(\bar{x})$ และหาได้จาก

$$s^2(\bar{x}) = \frac{s^2}{n} \dots\dots\dots(4)$$

ตัวอย่างที่ 2

จากตัวอย่างที่ 1 สามารถหาค่าแปรปรวนได้จากสูตรที่ (3) ดังนี้

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

x_i	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$
10.08	0.0125	0.000156
10.11	0.0425	0.001806
10.09	0.0225	0.000506
10.1	0.0325	0.001056
10.12	0.0525	0.002756
9.88	-0.1875	0.035156
10.14	0.0725	0.005256
10.02	-0.0475	0.002256
$\bar{X} = 10.07$	$\sum (x_i - \bar{x})^2 = 0.002256$	

$$n = 8$$

$$s^2 = 0.002256/(8-1) = 0.000322$$

3. ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation)

เป็นค่าบอกความมากน้อยของการกระจายข้อมูล แสดงความคลาดเคลื่อนของผลวิเคราะห์ที่เกิดขึ้นเป็นครั้งคราว (random error) standard deviation มีค่าเท่ากับรากที่ 2 ของค่าแปรปรวน ถ้าเป็นค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของประชากรใช้ “σ” ถ้าเป็นกลุ่มตัวอย่างใช้สัญลักษณ์ “s”

$$\sigma = \sqrt{\frac{[\sum (x_i - \mu)^2]}{n}} \dots\dots\dots(5)$$

$$s = \sqrt{\frac{(\sum (x_i - \bar{x})^2)}{(n-1)}} \dots\dots\dots(6)$$

ตัวอย่างที่ 3

จากตัวอย่างที่ 2 สามารถหา s ได้จาก สูตรที่ (6) ดังนี้

$$\begin{aligned} s &= \sqrt{\frac{(\sum (x_i - \bar{x})^2)}{(n-1)}} \\ &= \sqrt{(0.000322)} = 0.018 \text{ มิลลิกรัม/ลิตร} \end{aligned}$$

3.2.4 ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Standard error หรือ standard deviation of the mean)

ใช้สัญลักษณ์ “s(x)” เป็นค่าที่แสดงถึงการกระจายตัวของ x ที่แตกต่างจาก μ

$$s(\bar{x}) = \frac{s}{\sqrt{n}} \dots\dots\dots(7)$$

ตัวอย่างที่ 4

จากตัวอย่างที่ 3 หาค่า standard error ได้จาก สูตรที่ (7) ดังนี้

$$s(\bar{x}) = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

$$= \frac{0.018}{\sqrt{8}} \text{ มิลลิกรัม/ลิตร}$$

$$= 0.0063 \text{ มิลลิกรัม/ลิตร}$$

Standard error มีประโยชน์มากในการประเมินผลทางสถิติ โดยเฉพาะการวัดความคลาดเคลื่อนที่เกิดเป็นประจำในวิธีวิเคราะห์ (systematic error) เช่นในการทำ recovery study การทราบค่า $\bar{x}$ เพียงอย่างเดียวไม่อาจบอกถึงค่า μ ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยที่แท้จริงได้โดยตรง แต่เราสามารถคาดคะเนค่า μ ได้ดีขึ้นโดยการหาช่วงของความเชื่อมั่น (confidence interval) ของ $\bar{x}$ โดยใช้ $\bar{x}$ และ standard error (ซึ่งจะกล่าวถึงอย่างละเอียดใน หัวข้อ t-test)

4. สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of variation: CV)

คือค่าที่แสดงความคลาดเคลื่อนของวิธีที่เกิดขึ้นเป็นครั้งคราว เช่นเดียวกับ standard deviation แต่ CV เป็นค่าสัมพัทธ์ นิยมแสดงเป็นค่าร้อยละจึงใช้เปรียบเทียบความคลาดเคลื่อนที่ความเข้มข้นต่างระดับ และบอก precision ของวิธีได้

$$\%CV = \%RSD = \frac{s \times 100}{\bar{x}} \dots\dots\dots(8)$$

ตัวอย่างที่ 5

จากตัวอย่างที่ 1 และ 3 สามารถหาค่า %CV ได้จากสูตรที่ (8) ดังนี้

$$\begin{aligned} \%CV = \%RSD &= \frac{s \times 100}{\bar{x}} \\ &= \frac{0.018 \times 100}{10.07} \\ &= 0.8 \% \end{aligned}$$

5. สมมติฐานทางสถิติ (Statistical hypothesis)

การทดสอบทางสถิติเพื่อตอบปัญหา จะเริ่มโดยการตั้งสมมติฐาน (statistical hypothesis) ซึ่งขึ้นอยู่กับปัญหา เรียกสมมติฐานนี้ว่าสมมติฐานหลัก หรือสมมติฐานว่าง (Null hypothesis: H_0) การตั้งสมมติฐานทางสถิติจะทำเป็นคู่เสมอเพื่อรองรับหากสมมติฐานหลักไม่เป็นความจริง โดยสมมติฐานที่สองเรียกว่า สมมติฐานรองหรือสมมติฐานแย้ง (Alternative hypothesis: H_a หรือ H_1) ตัวอย่าง เช่น ในงานวิเคราะห์ทางเคมีปัญหาหรือคำถามคือวิธีวิเคราะห์ที่ใช้มีความถูกต้องเหมาะสมหรือไม่ ในการพิสูจน์จำเป็นต้องมีการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับผลที่ได้จากการใช้วิธีมาตรฐาน หรือใช้วิธีนั้นตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่ทราบค่า (ค่าอ้างอิง) ของสารที่ต้องการศึกษาเพื่อดูว่าผลการวิเคราะห์ที่ได้แตกต่างจากค่าอ้างอิงหรือไม่ กรณีเช่นนี้จะตั้งสมมติฐานว่าค่าเฉลี่ยทั้งสองนั้นไม่แตกต่างกัน แล้วจึงพิสูจน์สมมติฐานนั้นโดยใช้สถิติที่เหมาะสม

จะกำหนดสมมติฐานได้ดังนี้ (เป็น สมมติฐานแบบ 2 ทาง (two-tailed))

$$H_0 : \mu_0 = \mu_1$$

$$H_a : \mu_0 \neq \mu_1$$

หรือ เมื่อต้องการพิสูจน์ว่าค่าเฉลี่ยของวิธีที่ 1 น้อยกว่าของวิธีที่ 2 (เป็นสมมติฐานแบบทางเดียว (one-tailed) เพราะ พิจารณาด้านเดียว) จะกำหนดสมมติฐานได้ดังนี้

$$H_0 : \mu_0 = \mu_1$$

$$H_a : \mu_0 < \mu_1$$

ข้อสังเกต: การกำหนดสมมติฐานหลัก จะมีเครื่องหมายเท่ากับ (=) ด้วยเสมอ

หมายเหตุ

- ขั้นตอนในการวิเคราะห์ทางสถิติจะประกอบด้วย 1) การตั้งสมมติฐาน 2) เลือกวิธีสถิติ ที่จะใช้ 3) กำหนดระดับนัยสำคัญ 4) คำนวณค่าสถิติที่เกี่ยวข้อง 5) เปรียบเทียบกับค่าวิกฤติ (critical value) จากตารางของสถิติ 6) สรุปผลการวิเคราะห์ ถ้าค่าที่คำนวณได้น้อยกว่าค่าวิกฤติ แสดงว่ายอมรับ สมมติฐานหลัก และ 7) ตีความเพื่อตอบโจทย์

- 2) การใช้โปรแกรมสำเร็จรูปในการวิเคราะห์ทางสถิติ เช่น SPSS จะไม่ใช่วิธีอ่านจากตาราง แต่จะเป็นการหาค่าความน่าจะเป็น (probability: p value) ที่จะยอมรับสมมติฐานหลัก ซึ่งผู้ใช้จะต้องเปรียบเทียบกับค่า α ที่กำหนดขึ้นเอง จึงจะสรุปได้

6. ระดับนัยสำคัญ/ระดับความเชื่อมั่น (Significance level/confidence level)

การทดสอบทางสถิติเกี่ยวข้องกับระดับนัยสำคัญหรือระดับความเชื่อมั่น (level of significance/ level of confidence) ซึ่งเป็นขอบเขตที่กำหนดทางสถิติ ระดับนัยสำคัญใช้สัญลักษณ์ α (บางตำรา ใช้ p) เช่น $\alpha = 0.05$ จะบอกโอกาสที่จะไม่ยอมรับสมมติฐานหลักที่ถูก ด้วย 0.05

โดยทั่วไประดับนัยสำคัญที่ใช้ในการวิเคราะห์ทางเคมีนิยมใช้ที่ระดับ 0.05 (ระดับความเชื่อมั่น 95%) ดังนั้นถ้าไม่มีการระบุไว้เป็นอย่างอื่นก็สามารถใช้ ที่ 0.05 ได้เลย ยกเว้นการกำหนดค่า limit of detection นิยมใช้ที่ 0.01 (99%)

7. การทดสอบค่าสุดต่าง (outlier) ด้วย Grubb's test

ค่าสุดต่าง (outlier) หมายถึงค่าที่แตกต่างจากค่าอื่นๆในกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ เป็นค่าที่ควรกำจัดออกเพื่อไม่ให้มีผลกระทบกับค่าเฉลี่ย การทดสอบค่าสุดต่างของข้อมูลในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะ Grubb's test ซึ่งทำได้โดยการหาอัตราส่วน (G หรือบางตำราใช้ T) ระหว่างความเบี่ยงเบนของค่าที่สงสัยจากค่าเฉลี่ย กับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$$G = \frac{|\text{suspect value} - \bar{x}|}{s} \dots\dots\dots(9)$$

ค่า s คือ standard deviation ที่คำนวณโดยมีค่าที่สงสัยรวมอยู่ด้วย จากนั้นจึงเปรียบเทียบ ค่า G ที่คำนวณได้กับค่า G จากตารางโดยเลือกใช้ตารางที่ระดับนัยสำคัญที่ต้องการ (เช่น 0.05) ถ้า G จากการคำนวณน้อยกว่า แสดงว่าไม่มีค่าสุดต่างในกลุ่มข้อมูลนี้

ตัวอย่างที่ 6

การวิเคราะห์คลอรีนในน้ำ (มิลลิกรัม/ลิตร) จำนวน 10 ครั้ง มีผลวิเคราะห์ดังนี้ :

10.08, 10.11, 10.09, 10.10, 10.12, 9.88, 10.14, 10.02, 10.35, 10.00

ค่า 10.35 ซึ่งเป็นค่าที่มากที่สุด เป็นค่าสุดต่างหรือไม่

พิสูจน์ได้ตามสูตรที่ (9) ดังนี้

$$G = \frac{|\text{suspect value} - \bar{x}|}{s}$$

หาค่า $\bar{x}$ ด้วยสูตรที่ (1) และ s ด้วยสูตรที่ (6) ได้ $\bar{x} = 10.089$ และ $s = 0.1$ ดังนั้น

$$G = \frac{(10.35 - 10.089)}{0.1196}$$

$$= 2.18$$

จากตาราง Grubb's test (ที่ $\alpha = 0.05$, $n=10$); ค่า $G = 2.29$

ค่า G จากผลการทดสอบมีค่าน้อยกว่า G จากตาราง แสดงว่า ค่า 10.35 ไม่เป็นค่าสุดต่าง

8. การทดสอบค่าแปรปรวนสุดต่างด้วย Cochran's test

Cochran's test เป็นสถิติที่ใช้ในการทดสอบค่าสุดต่างของค่าแปรปรวน หรือความแตกต่างของค่า duplicate ซึ่งทำได้โดยการหาอัตราส่วน (R หรือบางตำราใช้ C) ระหว่างค่าแปรปรวนที่มีค่าสูงสุดกับผลรวมของค่าแปรปรวนทั้งหมด

$$R = \frac{\max s_i^2}{\sum s_i^2} \dots\dots\dots(10)$$

โดย $\max s_i^2$ หมายถึง ค่าแปรปรวนของข้อมูลชุดที่ i ซึ่งมีค่ามากที่สุด
ข้อมูลอาจมีหลายชุด แต่ทุกชุดจะต้องมี ค่า n เท่ากัน

เปรียบเทียบค่า R ที่คำนวณได้กับค่า R จากตาราง ถ้า R จากการคำนวณน้อยกว่า แสดงว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างค่าแปรปรวนเหล่านั้น

ตัวอย่างที่ 7

การวิเคราะห์ตัวอย่างที่เหมือนกัน โดยนักวิเคราะห์ 10 คน โดยทุกคนทำ 2 ซ้ำ เท่ากัน ความแตกต่างของการทำซ้ำมีดังนี้ : 0.20, 0.16, 0.50, 0.04, 0.36, 0.03, 0.03, 0.03, 0.02, 0.04

ต้องการพิสูจน์ว่า 0.50 ซึ่งเป็นความแตกต่างที่มีค่าสูงสุดเป็น outlier หรือไม่ ใช้สูตรที่ 10 ดังนี้

$$R = \frac{\max s_i^2}{\sum s_i^2}$$

$\sum s_i^2$ ของข้อมูลชุดนี้ คือ 1.41 ดังนั้น $R = 0.50/1.41 = 0.355$

จากตาราง Cochran: ที่ $p = 0.05$, จำนวนข้อมูล = 10 และจำนวนการทำซ้ำ = 2: ค่า C = 0.602 (มากกว่า 0.355)

แสดงว่า 0.50 ไม่เป็นค่าสุดต่าง

9. การทดสอบค่าแปรปรวนด้วย F-test

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \dots\dots\dots(11)$$

s_1^2 = ค่าแปรปรวนของ ข้อมูลกลุ่มที่ 1 (หรือวิธีที่ 1)

s_2^2 = ค่าแปรปรวนของ ข้อมูลกลุ่มที่ 2 (หรือวิธีที่ 2)

โดย $s_1^2 > s_2^2$

ค่า F ขึ้นกับขนาดของกลุ่มข้อมูล (n) และระดับนัยสำคัญ

เปรียบเทียบ ค่า F จากการคำนวณกับค่า F จากตาราง (F_c) ถ้า F จากการคำนวณ น้อยกว่าค่า F จากตาราง แสดงว่าค่าแปรปรวนทั้งสองไม่แตกต่างกัน

ตัวอย่างที่ 8

ในการทดสอบวิธีวิเคราะห์สาร a ในอาหารของห้อง Lab แห่งหนึ่งโดยการวิเคราะห์เทียบกับวิธีมาตรฐาน มีผลการวิเคราะห์ดังนี้

	Mean (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	Standard deviation (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)
วิธีที่กำลังทดสอบ	12.50	1.55
วิธีมาตรฐาน	11.25	1.29
จำนวนซ้ำ (n)	10	10

ทั้งสองวิธีนี้มีความเที่ยงแตกต่างกันหรือไม่

วิธีทำ

เนื่องจากความเที่ยงเกี่ยวข้องกับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานหรือค่าแปรปรวน จึงใช้ F-test ทดสอบความแตกต่างได้โดยใช้สูตรที่ (12)

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

$$s_1^2 = \text{Variance ของ วิธีที่ 1} = 1.55^2$$

$$s_2^2 = \text{Variance ของ วิธีที่ 2} = 1.29^2$$

$$F = 1.55^2 / 1.29^2 = 3.40 / 1.66$$

$$= 1.44$$

จากตาราง F : ที่ $p = 0.05$ และ $df_1 = 9$, $df_2 = 9$ ค่า $F = 4.03$

นั่นคือ F จากการคำนวณน้อยกว่า F จากตาราง แสดงว่า 2 วิธีนี้มีความเที่ยงไม่แตกต่างกัน

10. การทดสอบค่าเฉลี่ยด้วย t-test

t-test ใช้ในการทดสอบค่าเฉลี่ยของข้อมูล 1 กลุ่มตัวอย่าง และ 2 กลุ่มตัวอย่าง และใช้ ในการหาช่วงของความเชื่อมั่นของค่าเฉลี่ย (confidence interval of the mean)

10.1 สำหรับข้อมูล 1 กลุ่มตัวอย่าง

$$t = \frac{(\bar{x} - \mu)}{\left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)} \dots\dots\dots(12)$$

t เป็นอัตราส่วนระหว่างความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์กับค่าอ้างอิง (ซึ่งแสดงถึงความคลาดเคลื่อนแบบ systematic error) กับ standard error

ในการทดสอบนั้นใช้การเปรียบเทียบค่า t ที่ได้จากการคำนวณ กับค่า t จากตาราง (critical t- value, t_c) ซึ่งขึ้นอยู่กับระดับนัยสำคัญและ degree of freedom (df) ถ้าค่า t ที่ได้จากการคำนวณน้อยกว่า ค่า t จากตาราง แสดงว่า ค่าเฉลี่ยทั้งสองไม่แตกต่างกัน

ตัวอย่างที่ 9

ในการทดสอบวิธีวิเคราะห์ สาร a ในอาหารของห้องปฏิบัติการแห่งหนึ่งโดยใช้ CRM ซึ่งมีค่ารับรองของสาร a = 15.0 มก/กก จากการวิเคราะห์ CRM ด้วยวิธีดังกล่าว โดยการทำ 10 ซ้ำ ได้ค่าความเข้มข้นของสาร a = 12.50 (มิลลิกรัม/กิโลกรัม) และ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน = 1.55 (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)

ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธีนี้ยอมรับได้หรือไม่ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

วิธีทำ

ใช้ t-test ตามสูตรที่ (12)

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

โดย $\bar{x}$ = 12.5 มก/กก , μ =15.0 มก/กก , s =1.55 มก/กก , n = 10

$$t = \frac{(12.5 - 15.0)}{\left(\frac{1.55}{\sqrt{10}}\right)} = -5.10$$

เปรียบเทียบค่า t จากการคำนวณโดยไม่ต้องคำนึงถึงเครื่องหมายกับค่า critical t-value จากตาราง โดยเลือก df = 9 และ p = 0.05 ได้ค่า t_c = 2.262 พบว่า t จากการคำนวณ มากกว่า critical t-value ($t > t_c$) นั่นคือ ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีดังกล่าว แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับค่าอ้างอิงผลการวิเคราะห์นี้ยอมรับไม่ได้

10.2 การใช้ t-test เพื่อหาช่วงของความเชื่อมั่น (confidence interval) ของค่าเฉลี่ย

การวิเคราะห์วัตถุตัวอย่างซ้ำๆกันหลายครั้งทำให้เราทราบค่า $\bar{x}$ ซึ่งเป็นค่าประมาณของ μ แต่เราไม่ทราบค่า μ ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยที่แท้จริงของสิ่งที่เราทำการวิเคราะห์ เนื่องจากเราไม่ได้วิเคราะห์วัตถุตัวอย่างทั้งหมดแต่สุ่มมาบางส่วนเท่านั้น อย่างไรก็ตามเราสามารถสรุปอ้างอิงค่า μ ได้จากค่า $\bar{x}$ นี้ว่าอยู่ใกล้หรือไกลจากค่า $\bar{x}$ เพียงใด โดยการหาช่วงของความเชื่อมั่น (confidence interval : CI) ของ $\bar{x}$

Confidence interval ของ $\bar{x}$ ได้จาก

$$CI = \bar{x} \pm t \frac{s}{\sqrt{n}} \quad \dots\dots\dots(13)$$

อาจแสดง confidence interval ของ $\bar{x}$ ดังนี้

$$\bar{x} - t \frac{s}{\sqrt{n}} \leq \mu \leq \bar{x} + t \frac{s}{\sqrt{n}}$$

ตัวอย่างที่ 10

จากตัวอย่างที่ 9 สามารถหา CI ของ $\bar{x}$ ได้ดังนี้

วิธีทำ

ค่า Confidence intervals หาได้จากสมการที่ (13)

$$CI = \bar{x} \pm t \frac{s}{\sqrt{n}}$$

$\bar{x}$ คือ ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดสอบ = 12.5 มก/กก, μ คือ ค่าเฉลี่ยของประชากร

s คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน = 1.55 มก/กก, n คือ จำนวนซ้ำ = 10

t ในกรณีนี้คือ t จากตารางโดยเลือกที่ $p = 0.05$ และ $df = 9$ ได้ค่า $t_c = 2.262$ เมื่อแทนค่าต่างๆลงในสูตร ที่ (13) จะได้

$$\begin{aligned} CI &= 12.5 \pm (2.262 \times 1.55 / \sqrt{10}) \\ &= 12.5 \pm 1.11 \end{aligned}$$

CI ของ $\bar{x}$ มีช่วงอยู่ระหว่าง 11.39 มก/กก ถึง 13.61 มก/กก ไม่ครอบคลุมค่าอ้างอิง(15.0มก/กก)ดังนั้นค่าที่วิเคราะห์ได้จึงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอ้างอิง

10.3 สำหรับข้อมูล 2 กลุ่มตัวอย่างที่เป็นอิสระต่อกันและมีค่าแปรปรวนไม่แตกต่างกัน ($\sigma_1^2 = \sigma_2^2$)

การทดสอบว่า ค่าแปรปรวนของข้อมูล 2 กลุ่มแตกต่างกันหรือไม่ ใช้ F-test (สูตร ที่ 11)

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \dots\dots\dots(14)$$

โดย s ได้จาก

$$s^2 = \frac{[(n_1-1) s_1^2 + (n_2-1) s_2^2]}{(n_1+n_2-2)} \dots\dots\dots(15)$$

ค่า degree of freedom $df = (n_1 + n_2 - 2) \dots\dots\dots(16)$

10.4 สำหรับข้อมูล 2 กลุ่มตัวอย่างที่เป็นอิสระต่อกัน และมีค่าแปรปรวนแตกต่างกัน ($\sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$)

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \dots\dots\dots(17)$$

$$df = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\left(\frac{s_1^4}{n_1^2(n_1-1)} + \frac{s_2^4}{n_2^2(n_2-1)}\right)} \dots\dots\dots(18)$$

ตัวอย่างที่ 11

จากตัวอย่างที่ 8 วิธีทั้งสองให้ผลวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ ?

วิธีทำ

ก่อนอื่นต้องตรวจสอบก่อนว่าค่าแปรปรวนของ 2 กลุ่ม (ผลวิเคราะห์) มีความแตกต่างกันหรือไม่ ซึ่งได้พิสูจน์แล้วว่าไม่แตกต่าง ดังนั้นเราจึงเลือกใช้สูตร ที่ (14), (15), (16)

$$\bar{x}_1 = 12.50 \text{ mg/kg} \quad s_1 = 1.55 \text{ mg/kg} \quad n_1 = 10$$

$$\bar{x}_2 = 11.25 \text{ mg/kg} \quad s_2 = 1.29 \text{ mg/kg} \quad n_2 = 10$$

คำนวณค่า s^2 จาก สูตรที่ (15) :

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

$$s^2 = \frac{(9 \times 1.55^2 + 9 \times 1.29^2)}{18} = 2.03$$

จะได้

$$s = 1.426$$

คำนวณค่า t จาก สูตรที่ (14):

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{s^2}{n_1} + \frac{s^2}{n_2}}}$$

$$t = \frac{(12.50 - 11.25)}{1.426 \sqrt{\frac{1}{10} + \frac{1}{10}}} = 1.95$$

เปิดค่า critical- t จากตาราง ที่ $df = (n_1 + n_2 - 2) = 18$ และระดับความเชื่อมั่น 95% $t_c = 2.101$

พบว่า ค่า t จากการคำนวณ น้อยกว่า t_c ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า 2 วิธีให้ผลไม่แตกต่างกัน

10.5 สำหรับข้อมูล 2 กลุ่มตัวอย่างที่มีความสัมพันธ์กัน เช่น ผลวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกันจาก 2 วิธีที่ระดับความเข้มข้นหลายระดับในช่วงที่ไม่กว้างนัก (paired t-test)

$$t = \frac{d}{s/n^{1/2}} \dots\dots\dots(19)$$

d คือ ค่าเฉลี่ยของความแตกต่างระหว่างผลที่ได้จาก 2 วิธีที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

s คือ standard deviation ของความแตกต่าง เหล่านั้น

ตัวอย่างที่ 12

ในการหาปริมาณตะกั่วโดยวิธี wet oxidation และ direct extraction มีผลดังนี้

ตัวอย่างที่	Wet oxidation	Direct extraction
1	71	76
2	61	68
3	50	48
4	60	57

สองวิธีนี้ให้ผลที่แตกต่างกันหรือไม่ ?

วิธีทำ

1. หาความแตกต่างของแต่ละคู่ (ผลของวิธีที่ 1-วิธีที่ 2) กรณีนี้ได้ -5, -7, 2, 3
2. หาค่าเฉลี่ย และ standard deviation ของความแตกต่าง ได้

$$\bar{x}_d = (-1.75), \text{ sd} = 4.99$$

3. คำนวณค่า t จากสูตรที่ (19)

$$t = \frac{\bar{d}}{s/\sqrt{n}}$$

$$= -0.61$$

4. หาค่า t_c จากตาราง ($n-1 = 3$, $p = 0.05$, two-tailed) : $t_c = 3.18$
ค่า t ที่คำนวณได้ น้อยกว่า t_c แสดงว่า 2 วิธีนี้ให้ผลวิเคราะห์ที่ไม่แตกต่างกัน

11. การทดสอบหาความสัมพันธ์ระหว่าง 2 ตัวแปร กรณีที่ข้อมูลทั้ง 2 ตัวแปรนำมาคำนวณได้ (Correlation analysis)

ลักษณะของความสัมพันธ์นี้อาจมีได้หลายรูปแบบ ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง และวิธีการทางสถิติที่เรียกว่า สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (Pearson correlation coefficient : r)

$$r = \frac{\sum [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{[\sum (x_i - \bar{x})^2][\sum (y_i - \bar{y})^2]}} \dots\dots\dots(20)$$

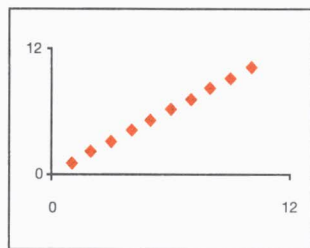
หรือ

$$r = \frac{\sum x_i y_i - (\sum x_i)(\sum y_i)/n}{\sqrt{\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2/n} \sqrt{\sum y_i^2 - (\sum y_i)^2/n}} \dots\dots\dots(21)$$

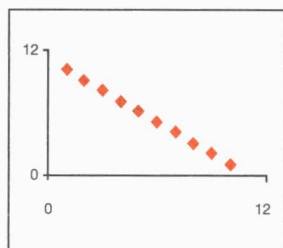
x_i คือ ข้อมูลของชุด x $\bar{x}$ คือ ค่าเฉลี่ย (mean) ของ x ทั้งหมด

y_i คือ ข้อมูลของชุด y $\bar{y}$ คือ ค่าเฉลี่ย (mean) ของ y ทั้งหมด

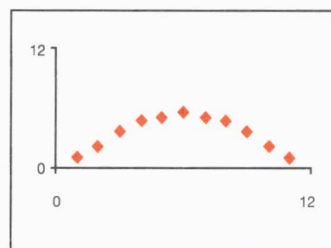
ค่า r มีค่าได้ตั้งแต่ -1 ถึง +1 ดังนั้นค่า r ควรเข้าใกล้ -1 หรือ +1 ทั้งนี้ ขึ้นอยู่กับเกณฑ์การยอมรับที่กำหนด



$r = +1$



$r = -1$



$r = 0$

ในกรณีที่ค่า r บอกได้ไม่ชัดเจน ควรทดสอบด้วย t -test โดยตั้งสมมติฐานหลักว่า ไม่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างตัวแปรทั้งสอง

$$t = \frac{r \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \dots\dots\dots(22)$$

ถ้า t ที่คำนวณได้มีค่ามากกว่าค่า t ที่อ่านจากตาราง t (ตาราง two-tailed ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % และ degree of freedom = $n-2$) แสดงว่ามีความสัมพันธ์ระหว่าง y และ x อย่างมีนัยสำคัญ

ค่า r เพียงอย่างเดียว อาจไม่เพียงพอที่จะใช้ยืนยันความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรง ควรใช้สถิติอื่นประกอบด้วย เช่น พิจารณาจาก residual plots (13) เป็นต้น

12. การวิเคราะห์การถดถอยแบบเส้นตรงอย่างง่าย (Simple linear regression)

การวิเคราะห์การถดถอยเพื่อศึกษาว่าข้อมูลที่เกิดขึ้นชุดหนึ่ง (เรียกว่าตัวแปรตาม หรือ dependent variable) จะต้องมีสาเหตุหรือผลกระทบจากข้อมูลชุดอื่น (เรียกว่าตัวแปรอิสระ หรือ independent variable)

การวิเคราะห์การถดถอยจะแตกต่างจากการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ เพราะการวิเคราะห์สหสัมพันธ์เป็นการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร โดยสนใจแต่เพียงว่าตัวแปรที่กำหนดมีความสัมพันธ์กันหรือไม่ ขนาดไหน ทิศทางใด โดยไม่จำเป็นต้องทราบว่าตัวแปรใดเป็นตัวแปรอิสระและตัวแปรตาม แต่การวิเคราะห์การถดถอย เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร โดยมุ่งเน้นที่จะพยากรณ์ตัวแปรตาม ด้วยค่าความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตามและตัวแปรอิสระ ซึ่งเรียกว่าค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (Regression coefficient) ซึ่งหมายถึง slope ของจากสมการที่สร้างขึ้นจากความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระ และตัวแปรตาม สำหรับสมการเชิงเส้นตรง อาจเรียกว่าสมการถดถอยเชิงเส้นตรง (Linear regression equation) และกราฟเส้นตรงที่ได้จากสมการนี้เรียกว่า เส้นถดถอย (Regression line)

$$y^{\wedge} = a + bx \dots\dots\dots(23)$$

การวิเคราะห์ทำได้ด้วยการพิจารณาความคลาดเคลื่อนต่างๆที่เกิดขึ้นเพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (**Coefficient of determination: R^2**) ซึ่งเป็นอัตราส่วนระหว่างความคลาดเคลื่อนที่อธิบายได้ด้วยสมการถดถอย ($\sum(y_i^{\wedge}-\bar{y})^2$) กับความคลาดเคลื่อนทั้งหมด ($\sum(y_i-\bar{y})^2$)

$$R^2 = \frac{\sum(y_i^{\wedge}-\bar{y})^2}{\sum(y_i-\bar{y})^2} \dots\dots\dots(24)$$

$$\sum(y_i-\bar{y})^2 = \sum(y_i^{\wedge}-\bar{y})^2 + \sum(y_i-y_i^{\wedge})^2$$

$\sum (y_i - \hat{y}_i)^2$ คือ residual เป็นความคลาดเคลื่อนที่อธิบายไม่ได้ด้วยสมการถดถอย

R^2 จะบอกถึงอิทธิพลของค่า x ต่อค่า y จึงใช้อธิบายการเปลี่ยนแปลงของค่า y ที่เกิดจากค่า x

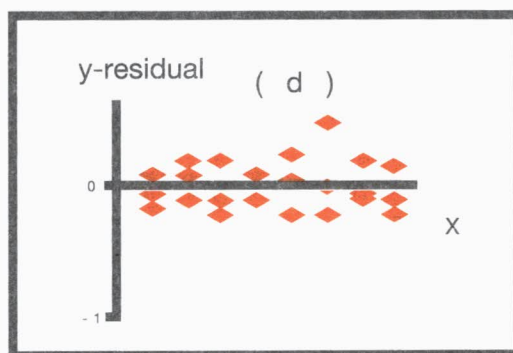
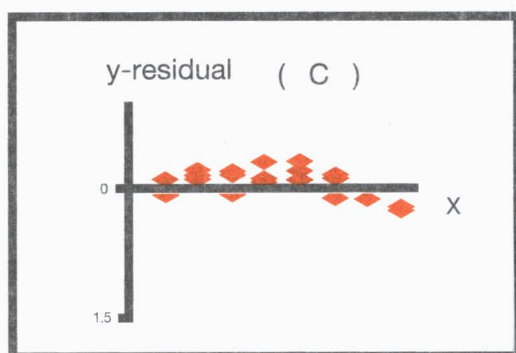
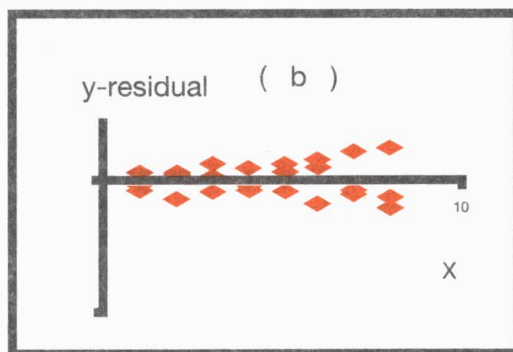
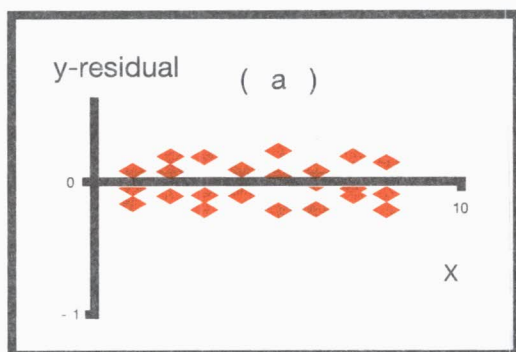
สมการถดถอยที่ดีควรจะได้ค่า R^2 สูง ๆ (R^2 มีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 1) ซึ่งเป็นการแสดงว่าตัวแปรอิสระ x (เช่น ความเข้มข้นของสารที่ศึกษา) สามารถอธิบายการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตาม y (เช่น สัญญาณที่อ่านจากเครื่องมือวัด) ได้ดี

13. การยืนยันความสัมพันธ์เชิงเส้นด้วย Residual plots

Residual plots คือ การ plot ระหว่างค่า y -residual บนแกน y และค่า x บนแกน x เพื่อยืนยันความเป็นเส้นตรงของเส้นกราฟที่สร้างขึ้นจาก y และ x และเพื่อดูว่า มีค่าสุดต่างหรือไม่ ถ้าเส้นกราฟมีความเป็นเส้นตรง ควรมีการกระจายของ y -residuals รอบๆ ค่าศูนย์ เพราะถึงแม้ว่า ค่า y ที่อ่านได้แต่ละค่าจะไม่ขึ้นกับค่า y อื่นๆ แต่ y -residual จะขึ้นซึ่งกันและกันเพราะ ผลรวม จะเป็นศูนย์เสมอ

Residual plots รูปแบบต่างๆ แสดงในภาพต่อไปนี้

- (a) แสดงความสัมพันธ์ของ x และ y อย่างเป็นเส้นตรง
- (b) แสดงความสัมพันธ์ของ x และ y อย่างเป็นเส้นตรง แต่ค่าแปรปรวนของ y ที่ x มีค่าสูงๆ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากค่าแปรปรวนของ y ที่ x ต่ำๆ กรณีนี้การ plot curve ต้อง plot แบบ weighted regression line
- (c) แสดงความสัมพันธ์ของ x และ y ที่ไม่ใช่แบบเส้นตรง
- (d) แสดงความสัมพันธ์ของ x และ y อย่างเป็นเส้นตรง โดยมีค่าสุดต่าง



หมายเหตุ : unweighted regression line หรือ simple regression line หมายถึง regression line ที่มีสมมติฐานว่าความแปรปรวน (variation) ของทุกระดับความเข้มข้นใน working range มีค่าไม่แตกต่างกัน แต่ถ้าข้อสมมติดังกล่าวไม่เป็นความจริง การทำ regression line ต้องมีการเอา variance มาคิดด้วย เรียกว่า weighted regression line ซึ่งเป็นเรื่องที่ยากพอสมควร

ตารางสถิติ (Statistical Table)

ตารางที่ 1 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
∞	1.64	1.96	2.33	2.58

ตารางที่ 2 Critical values of F for a one-tailed test ($p = 0.05$)

						df ₁						
df ₂	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
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.41	19.43
3	10.13	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.786	8.745	8.703
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964	5.912	5.858
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735	4.678	4.619
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060	4.000	3.938
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637	3.575	3.511
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.687	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347	3.284	3.218
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137	3.073	3.006
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978	2.913	2.845
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854	2.788	2.719
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.753	2.687	2.617
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671	2.604	2.533
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602	2.534	2.463
15	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901	2.790	2.707	2.641	2.588	2.544	2.475	2.403

df₁ = number of degrees of freedom of the numerator and

df₂ = number of degrees of freedom of the denominator

ตารางที่ 3 Critical values of F for a two-tailed test ($p = 0.05$)

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

df₁ = number of degrees of freedom of the numerator and

df₂ = number of degrees of freedom of the denominator

ตารางที่ 4 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

ตารางที่ 5 Critical values of C ($p = 0.05$) for $n = 2$

k	Critical value
3	0.967
4	0.906
5	0.841
6	0.781
7	0.727
8	0.680
9	0.638
10	0.602

n = จำนวนซ้ำของแต่ละกลุ่ม, k = จำนวนกลุ่มข้อมูล

เอกสารอ้างอิง (References)

Hootsmann, M.J.M. and Vermaat J.E., Data analysis: Statistical processing and graphical presentation. EE136/96/1. International Institute for Infrastructural, Hydraulic and Environmental Engineering. The Netherlands, 1996.

Miller, J.N. and Miller, J.C. Statistics and chemometrics for analytical chemistry. 4thEd. Pearson Education Limited. England, 2000.

Otto, M., Chemometrics. Wiley-VCH. Germany, 1999.

Taylor, J.K., Quality assurance of chemical measurements. Lewis Publishers, Inc. U.S.A. , 1989.

Wernimont, G.T., Use of statistics to develop and evaluate analytical methods. Spendley, W. Editor. AOAC International, 1996.

ศิริชัย พงษ์วิชัย, การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ สำนักพิมพ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2548.

สมพงษ์ จินายน, หลักการประเมินผลคุณสมบัติของเทคนิคการวิเคราะห์ สำหรับห้องปฏิบัติการ, 2529

**แนวปฏิบัติการทดสอบ
ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์
ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว**

**A PRACTICAL GUIDE
FOR SINGLE LABORATORY METHOD
VALIDATION OF CHEMICAL METHODS**