



**ข้อแนะนำในการตรวจสอบความใช้ได้
ของวิธีทดสอบ
ด้านเคมีผลิตภัณฑ์
(LA-G-25)**

สำนักบริหารและรับรองห้องปฏิบัติการ

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

75/7 ถนนพระรามที่ 6 เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

โทรศัพท์ : 0-2201-7125 0-2201-7165 0-2201-7134

<http://bla.dss.go.th>

บทนำ

เอกสารฉบับนี้จัดทำขึ้นเพื่อเป็นแนวทางในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (Method Validation) ด้านเคมีผลิตภัณฑ์ ให้มีความเหมาะสมตามหลักวิชาการ และสอดคล้องกับมาตรฐานที่เกี่ยวข้อง เพื่อเป็นประโยชน์สำหรับการเตรียมความพร้อมของห้องปฏิบัติการในการยื่นขอรับการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตาม ISO/IEC 17025 และมาตรฐานการยอมรับความสามารถห้องปฏิบัติการทดสอบของกรมวิทยาศาสตร์บริการ รวมทั้งคณะผู้ประเมินได้นำไปใช้เป็นแนวทางในการดำเนินการในการรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการ

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	i
สารบัญ	ii
1. ขอบข่าย	1
2. นิยาม	1
3. แนวทางการดำเนินการการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017	2
4. ข้อควรปฏิบัติก่อนเริ่มการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี	3
5. ขั้นตอนการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี	4
5.1 การพิจารณาการเลือกวิธีทดสอบที่เหมาะสม	4
5.2 กำหนดวัตถุประสงค์ของวิธีทดสอบ	5
5.3 กำหนดเกณฑ์ที่ต้องการ	5
5.4 เลือกคุณลักษณะเฉพาะที่แสดงคุณสมบัติของวิธี	5
5.4.1 ความแม่นยำ (Accuracy)	5
5.4.2 ความเป็นเส้นตรง (Linearity)	6
5.4.3 ช่วง (Range)	6
5.4.4 ความเสถียร (Stability)	6
5.4.5 ขีดจำกัดการตรวจจับและขีดจำกัดการหาปริมาณ (Limit of Detection and Limit of Quantitation)	6
5.4.6 ความเที่ยง (Precision)	7
5.4.7 ความเลือกจำเพาะ (Selectivity)	7
5.5 กำหนดความต้องการทางเทคนิค	8
5.6 จัดทำขั้นตอนการดำเนินการหรือคู่มือการปฏิบัติงาน	8
5.7 ดำเนินการตรวจสอบคุณลักษณะเฉพาะ	8
5.8 การบรรลุผลของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี	8
เอกสารอ้างอิง	9

1. ขอบข่าย

เอกสารฉบับนี้ใช้สำหรับห้องปฏิบัติการที่ยื่นขอการรับรองหรือได้รับการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการทดสอบตาม ISO/IEC 17025 และมาตรฐานการยอมรับความสามารถห้องปฏิบัติการทดสอบของกรมวิทยาศาสตร์บริการ

2. นิยาม

2.1 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (Method Validation) หมายถึง กระบวนการยืนยันโดยอาศัยหลักฐานเชิงประจักษ์และการประเมินเชิงสถิติ ว่าวิธีทดสอบหรือวิธีวิเคราะห์มีความเหมาะสมกับวัตถุประสงค์การใช้งาน และสามารถให้ผลการวัดที่ถูกต้อง น่าเชื่อถือ และสอดคล้องกับข้อกำหนดที่กำหนดไว้ภายใต้เงื่อนไขการใช้งานจริงของห้องปฏิบัติการ

2.2 การทวนสอบวิธีมาตรฐาน (Method Verification) หมายถึง กระบวนการยืนยันว่าห้องปฏิบัติการสามารถนำวิธีทดสอบหรือวิธีวิเคราะห์ที่เป็นวิธีมาตรฐานมาใช้ได้จริง และให้ผลการทดสอบที่ถูกต้อง น่าเชื่อถือ และเป็นไปตามสมรรถนะที่ระบุไว้ในวิธีนั้น ภายใต้สภาพการทำงาน เครื่องมือ บุคลากร และสภาพแวดล้อมของห้องปฏิบัติการเอง

2.3 ความแม่นยำ (Accuracy) หมายถึง ความใกล้เคียงกันระหว่างผลการวัดที่ได้จากวิธีทดสอบกับค่าที่แท้จริง หรือค่าที่ได้รับการยอมรับเป็นค่าอ้างอิง ซึ่งสะท้อนถึงความถูกต้องโดยรวมของวิธีทดสอบในการวัดปริมาณหรือคุณลักษณะของสารวิเคราะห์

2.4 ความเป็นเส้นตรง (Linearity) หมายถึง ความสามารถของวิธีทดสอบหรือวิธีวิเคราะห์ในการให้ผลการวัดที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นกับความเข้มข้นหรือปริมาณของสารวิเคราะห์ภายในช่วงที่กำหนดไว้ โดยผลการตอบสนองของวิธีต้องเปลี่ยนแปลงเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารวิเคราะห์ และเป็นไปตามเกณฑ์สมรรถนะที่ยอมรับได้

2.5 ช่วง (Range) หมายถึง ช่วงของความเข้มข้นหรือปริมาณของสารวิเคราะห์ที่วิธีทดสอบได้รับการยืนยันแล้วว่าสามารถให้ผลการวัดที่มีความถูกต้อง ความเที่ยง ความเป็นเส้นตรง และความเชื่อถือได้ตามเกณฑ์ที่กำหนด โดยช่วงดังกล่าวต้องเหมาะสมกับการใช้งานตามวัตถุประสงค์ของการทดสอบ

2.6 ความเสถียร (Stability) หมายถึง ความสามารถของตัวอย่าง สารมาตรฐาน หรือสารละลายที่ใช้ในการทดสอบ ในการคงสภาพคุณลักษณะทางเคมีและให้ผลการวัดที่ไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญตลอดระยะเวลาที่กำหนด ภายใต้เงื่อนไขการเก็บรักษาและการใช้งานที่ระบุไว้ เพื่อให้มั่นใจว่าผลการทดสอบมีความถูกต้องและเชื่อถือได้

2.7 ขีดจำกัดของการตรวจหา (Limit of Detection, LOD) หมายถึง ปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ แต่ไม่ยืนยันว่าสามารถวัดเชิงปริมาณได้ถูกต้อง คุณลักษณะข้อนี้ต้องจัดทำในกรณีตัวอย่างที่วัดมีสารที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาณน้อยหรือตรวจไม่พบ การรายงานค่าขีดจำกัดการตรวจหาไม่ต้องแสดงค่าความไอออนเอียง ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าความไม่แน่นอนของการวัด

2.8 ขีดจำกัดของการวัดปริมาณ (Limit of Quantification, LOQ) หมายถึง ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดปริมาณได้ โดยมีความแม่นยำและความเที่ยงตามที่กำหนด และให้ความไม่แน่นอนของการวัดอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

2.9 ความเที่ยง (Precision) หมายถึง ความใกล้เคียงกันของผลการวัดซ้ำที่ได้จากการใช้วิธีทดสอบเดียวกันกับตัวอย่างเดียวกัน ภายใต้เงื่อนไขที่กำหนด โดยแสดงถึงระดับความแปรปรวนของผลการทดสอบและสะท้อนถึงความสม่ำเสมอของวิธีทดสอบ

2.10 ความเลือกจำเพาะ (Selectivity) หมายถึง ความสามารถของวิธีทดสอบหรือวิธีวิเคราะห์ในการวัดหรือระบุสารวิเคราะห์เป้าหมายได้อย่างถูกต้อง โดยไม่ถูกรบกวนจากสารอื่นที่อาจมีอยู่ในตัวอย่าง เช่น สารเจือปน เมทริกซ์ หรือสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกัน ภายใต้เงื่อนไขการทดสอบที่กำหนด

3. แนวทางการดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017

เพื่อให้การดำเนินงานของห้องปฏิบัติการทดสอบและสอบเทียบเป็นไปตามข้อกำหนดของมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 (ข้อ 7.2) ซึ่งกำหนดให้ห้องปฏิบัติการต้องมีการเลือก การทวนสอบ และการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบหรือสอบเทียบ (Selection, Verification, and Validation of Methods) โดยกำหนดให้ห้องปฏิบัติการต้องเลือกวิธีที่เหมาะสม, ทวนสอบความถูกต้อง, และตรวจสอบว่าวิธีนั้นสามารถใช้ได้จริงกับงานที่ทำ รวมถึงการจัดการวิธีมาตรฐานและวิธีที่พัฒนาขึ้นเอง เพื่อให้ผลการวัดมีความเชื่อถือได้และเป็นไปตามความต้องการของลูกค้าและเพื่อสร้างความเชื่อมั่นในความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของผลการทดสอบ ห้องปฏิบัติการควรกำหนดแนวทางการดำเนินการด้านการเลือก การทวนสอบ และการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบหรือสอบเทียบอย่างเป็นระบบ ครอบคลุมทั้งด้านการบริหารจัดการและด้านวิชาการ โดยให้ความสำคัญกับความสามารถทางเทคนิค ความถูกต้องของวิธีการ และความชำนาญของบุคลากรที่เกี่ยวข้อง

ห้องปฏิบัติการควรเริ่มจากการเลือกวิธีทดสอบที่เหมาะสมกับลักษณะของงาน ชนิดของตัวอย่าง และวัตถุประสงค์ของการทดสอบ โดยพิจารณาข้อกำหนดของลูกค้า ข้อกำหนดทางกฎหมาย มาตรฐานที่เกี่ยวข้อง และขีดความสามารถของห้องปฏิบัติการ ในกรณีที่เป็นวิธีมาตรฐาน ควรดำเนินการทวนสอบ (Verification) เพื่อยืนยันว่าห้องปฏิบัติการสามารถนำวิธีดังกล่าวไปใช้ได้จริงภายใต้สภาพแวดล้อม เครื่องมือ และบุคลากรของตนเอง ส่วนกรณีที่เป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นเองหรือมีการดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน ควรดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (Method Validation) อย่างครบถ้วนก่อนนำไปใช้งาน

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบควรดำเนินการในลักษณะของกระบวนการพิสูจน์เชิงสถิติและเชิงวิทยาศาสตร์ เพื่อยืนยันว่าวิธีทดสอบมีความเหมาะสมกับวัตถุประสงค์การใช้งาน ห้องปฏิบัติการควรกำหนดแผนการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีอย่างชัดเจน ระบุขอบเขตการใช้งานของวิธี ชนิดของตัวอย่าง ช่วงความเข้มข้น และพารามิเตอร์ที่ต้องประเมินให้สอดคล้องกับลักษณะของงานทดสอบ

ในการประเมินสมรรถนะของวิธีทดสอบ ควรพิจารณาตัวชี้วัดที่เหมาะสม เช่น ความจำเพาะหรือการเลือกสรร ความถูกต้อง ความเที่ยงตรง ความเป็นเส้นตรง ช่วงการวิเคราะห์ ขีดจำกัดการตรวจหา (LOD) ขีดจำกัดการวัดปริมาณ (LOQ) รวมถึงความทนทานและความแข็งแกร่งของวิธี โดยควรกำหนดเกณฑ์การยอมรับ (Acceptance Criteria) ที่ชัดเจนล่วงหน้า และประเมินผลตามหลักการทางสถิติที่เหมาะสม เพื่อให้ผลการตรวจสอบมีความน่าเชื่อถือและสามารถตรวจสอบย้อนกลับได้

สำหรับงานทดสอบด้านเคมีผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีความหลากหลายของชนิดผลิตภัณฑ์ องค์ประกอบทางเคมี และช่วงระดับความเข้มข้นของสาร ห้องปฏิบัติการควรให้ความสำคัญกับการเลือกพารามิเตอร์การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีให้สอดคล้องกับลักษณะของผลิตภัณฑ์และความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นจากการรายงานผลที่คลาดเคลื่อน ทั้งนี้ การนำแนวคิดการคิดบนพื้นฐานของความเสี่ยง (Risk-Based Thinking) มาประยุกต์ใช้ใน

การวางแผนและดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี จะช่วยให้ห้องปฏิบัติการสามารถจัดสรรทรัพยากรได้อย่างเหมาะสม ลดความเสี่ยงในการดำเนินงาน และเพิ่มประสิทธิภาพของระบบงานโดยรวม

นอกจากนี้ ห้องปฏิบัติการควรจัดทำเอกสารที่เกี่ยวข้องกับการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ อย่างครบถ้วนและเป็นระบบ ตั้งแต่แผนการดำเนินการ ข้อมูลการทดลอง การวิเคราะห์ผล การสรุปผลการตรวจสอบ ไปจนถึงการอนุมัติและการควบคุมการเปลี่ยนแปลงของวิธี เพื่อให้สามารถใช้เป็นหลักฐานแสดงความสอดคล้องกับข้อกำหนดของ ISO/IEC 17025:2017 และสนับสนุนการทวนสอบและการตรวจประเมินจากหน่วยรับรองระบบงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

4. ข้อควรปฏิบัติก่อนเริ่มการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

ก่อนเริ่มดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ห้องปฏิบัติการควรจัดเตรียมความพร้อมในด้านต่าง ๆ อย่างเป็นระบบ เพื่อให้การตรวจสอบเป็นไปอย่างถูกต้องตามหลักวิชาการ และให้ผลการประเมินมีความน่าเชื่อถือ โดยมีแนวทางปฏิบัติที่สำคัญดังต่อไปนี้

4.1 การเลือกและทวนสอบวิธีทดสอบ วิธีทดสอบที่นำมาใช้ต้องเป็นวิธีที่ได้รับการคัดเลือกอย่างเหมาะสมกับวัตถุประสงค์การใช้งาน ในกรณีที่เป็นวิธีมาตรฐาน ห้องปฏิบัติการต้องดำเนินการทวนสอบ (Verification) เพื่อยืนยันว่าสามารถปฏิบัติตามวิธีดังกล่าวได้ภายใต้สภาพแวดล้อม เครื่องมือ และบุคลากรของห้องปฏิบัติการ หากไม่มีวิธีมาตรฐาน หรือไม่สามารถปฏิบัติตามวิธีมาตรฐานได้ ห้องปฏิบัติการสามารถพัฒนาวิธีวิเคราะห์หรือวิธีทดสอบขึ้นเองได้ โดยต้องดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method Validation) ในพารามิเตอร์ที่เหมาะสมและสอดคล้องกับลักษณะของงานทดสอบ

4.2 ความพร้อมด้านบุคลากรและความรู้ทางสถิติ ผู้ดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ควรมีความรู้ ความเข้าใจ และประสบการณ์ในงานวิเคราะห์นั้นเป็นอย่างดี รวมถึงมีความรู้พื้นฐานด้านสถิติที่จำเป็นต่อการออกแบบการทดลอง การประเมินผล และการแปลผลการตรวจสอบ เพื่อให้การสรุปผลมีความถูกต้องและสามารถอ้างอิงได้ทางวิชาการ

4.3 ความพร้อมของเครื่องมือและอุปกรณ์ เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบต้องได้รับการสอบเทียบ (Calibration) หรือการทวนสอบสมรรถนะ (Performance Verification) เรียบร้อยแล้ว เพื่อยืนยันว่าสามารถให้ค่าการวัดที่มีความถูกต้อง (Accuracy) และความเที่ยงตรง (Precision) ก่อนเริ่มดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

4.4 การวางแผนและการจัดเตรียมทรัพยากร ห้องปฏิบัติการควรจัดเตรียมงบประมาณ เวลา และทรัพยากรที่จำเป็นให้เพียงพอ เพื่อให้สามารถดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีได้ครบถ้วนตามวัตถุประสงค์และขอบเขตที่กำหนด รวมถึงมีการวางแผนการดำเนินงานอย่างเหมาะสมและเป็นระบบ

4.5 การจัดเตรียมตัวอย่าง วัสดุ และสารเคมี วัสดุและตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีควรมีความคงตัว มีความเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneity) มีองค์ประกอบหรือเมทริกซ์ใกล้เคียงกับตัวอย่างที่ทดสอบเป็นประจำ และมีปริมาณเพียงพอต่อการดำเนินการ ทั้งนี้ ผู้ตรวจสอบควรเตรียมตัวอย่างควบคุม (Control Sample) ให้เพียงพอสำหรับการใช้งานสารเคมีที่ใช้ควรเป็นสารเคมีเกรดวิเคราะห์ (Analytical Reagent Grade) หรือเกรดที่เหมาะสมกับลักษณะของวิธีทดสอบ

4.6 การใช้วัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Material: CRM) ในกรณีที่วิธีวิเคราะห์สามารถใช้วัสดุอ้างอิงรับรอง (CRM) ได้ ห้องปฏิบัติการควรจัดเตรียม CRM ที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการประเมินความแม่นยำ (Trueness/Accuracy) ของวิธี โดยต้องมีการจัดการและใช้งาน CRM ตามข้อกำหนดที่เกี่ยวข้อง

4.7 การเตรียมความพร้อมของผู้ปฏิบัติงาน ห้องปฏิบัติการควรจัดเตรียมและมอบหมายผู้ปฏิบัติงานที่มีความเหมาะสม มีการฝึกอบรมและความเข้าใจในขั้นตอนการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีอย่างชัดเจน เพื่อให้การดำเนินงานเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพและลดความคลาดเคลื่อนที่อาจเกิดขึ้น

5. ขั้นตอนการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

5.1 การพิจารณาการเลือกวิธีทดสอบที่เหมาะสม เลือกวิธีทดสอบที่เหมาะสมกับประเภทตัวอย่างและปริมาณธาตุที่ต้องการทดสอบตามความต้องการของลูกค้าหรือเลือกจากวิธีที่ได้รับการยอมรับในกรณีที่ลูกค้าไม่ได้เจาะจงวิธีทดสอบ การเลือกวิธีทดสอบต้องพิจารณาดังนี้

5.1.1 วิธีมาตรฐานระดับนานาชาติ (International standard) เป็นมาตรฐานที่ได้จากข้อตกลงร่วมกันของประเทศสมาชิกต่าง ๆ ที่มีความสนใจร่วมกัน เช่นวิธีมาตรฐานของ ISO (International Standards Organization)

5.1.2 วิธีมาตรฐานระดับภูมิภาค (Regional standard) เป็นมาตรฐานที่เกิดขึ้นจากการประชุมปรึกษาหารือกันระหว่างประเทศในภูมิภาคเดียวกัน แล้วกำหนดข้อตกลงร่วมกัน ส่วนมากจะเป็นการปรับมาตรฐานระดับประเทศในภูมิภาคเดียวกัน เช่น

5.1.2.1 วิธีมาตรฐานของสหภาพยุโรป (European standard) หรือ European Norm (EN) ที่พัฒนาและเผยแพร่โดย European Committee for Standardization (CEN) หรือในภาษาฝรั่งเศสคือ Commitee Europeen de Normalisation ตัวอย่างเช่น

- EN 1233: 1996 Water quality - Determination of chromium - Atomic absorption spectrometric methods ใช้สำหรับการวิเคราะห์เชิงปริมาณของโครเมียมในน้ำโดยวิธีอะตอมมิกแอบซอร์บชันสเปกโทรเมตรี

- EN 14084:2003 Foodstuffs-Determination of trace elements - Determination of lead, cadmium, zinc, copper and iron by atomic absorption spectrometry (AAS) after microwave digestion ใช้สำหรับการวิเคราะห์เชิงปริมาณของธาตุต่าง ๆ ในอาหาร

5.1.3 วิธีมาตรฐานระดับประเทศ (National standard) เป็นมาตรฐานที่ได้จากการประชุมหารือเพื่อหาข้อตกลงร่วมกันของผู้เกี่ยวข้องหลายฝ่ายในชาติ โดยมีหน่วยงานมาตรฐานของชาตินั้น ๆ เป็นศูนย์กลาง เช่น มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (มอก.) ของประเทศไทย ที่กำหนดโดยสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (สมอ.)

5.1.3.1 มาตรฐานระดับประเทศที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง ได้แก่ Japanese Industrial Standard (JIS) ของประเทศญี่ปุ่น และ British Standard (BS) ของสหราชอาณาจักร

5.1.3.2 ประเทศสหรัฐอเมริกา มีมาตรฐานระดับประเทศที่ยอมรับกันทั่วโลก ได้แก่

- The United States Environmental Protection Agency (USEPA)
- American Public Health Association (APHA)
- American Water Works Association (AWWA)
- National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH)

- Occupational Safety and Health Administration (OSHA)

5.1.4 มาตรฐานระดับสมาคม (Association standard) เป็นมาตรฐานที่กำหนดขึ้นจากกลุ่มบริษัทหรือโดยกลุ่มบุคคลที่อยู่ในวงการค้าเดียวกัน หรือเกิดจากข้อตกลงของกลุ่มบริษัทหรือโรงงานที่มีกิจกรรมของอุตสาหกรรมเป็นอย่างเดียวกัน หรือมีการผลิตของชนิดเดียวกัน ตัวอย่างเช่น

5.1.4.1 American Association of Textile Chemists and Colorists (AATCC) เป็นสถาบันมาตรฐานของประเทศสหรัฐอเมริกาที่เกี่ยวกับการกำหนดมาตรฐาน การควบคุมคุณภาพมาตรฐานการทดสอบของวัสดุสิ่งทอและสีย้อมสิ่งทอที่ได้รับการยอมรับและนิยมใช้ทั่วโลก เช่น AATCC 112:2014 Formaldehyde Release from Fabric, Determination of: Sealed Jar Method

5.1.4.2 มาตรฐานการทดสอบอุปกรณ์ไฟฟ้า เช่น ANSI/ESD STM11.13-2018 ESD Association Standard Test Method for The Protection of Electrostatic Discharge Susceptible Items - Two-Point Resistance Measurement เป็นต้น

5.1.5 วิธีมาตรฐานที่ตีพิมพ์โดยองค์กรทางวิชาการที่มีชื่อเสียงและเป็นที่ยอมรับ ในปัจจุบันมีหลายองค์กรที่เป็นที่ยอมรับในระดับนานาชาติ เช่น

5.1.5.1 American Society for Testing and Materials (ASTM) ตัวอย่างเช่น ASTM F726-06 Standard Test Method for Sorbent Performance of Adsorbents

5.1.5.2 Association of Official Analytical Chemists (AOAC) ตัวอย่างเช่น AOAC Official Method 999.10 Lead, Copper, Zinc and Iron in Foods: Atomic Absorption Spectrometry after Microwave Digestion

5.2 กำหนดวัตถุประสงค์ของวิธีทดสอบ เช่นเป็นการวิเคราะห์เชิงคุณภาพหรือปริมาณ ประเภทของสารที่สนใจ (analyte) ประเมินระดับความเข้มข้นของสารที่สนใจ พิจารณาเมทริกซ์จากตัวอย่าง องค์ประกอบทางกายภาพและเคมีอื่นที่เกี่ยวข้อง เป็นต้น

5.3 กำหนดเกณฑ์ที่ต้องการ (requirement) ในการทดสอบนั้น ซึ่งอาจกำหนดตามมาตรฐานที่กฎหมายกำหนด หรือตามวิธีมาตรฐานที่อ้างอิง หรือเกณฑ์กำหนดจากประสบการณ์ที่ผ่านมาหรือความสามารถของห้องปฏิบัติการ ประเภทวิธีทดสอบ ปริมาณธาตุที่ทดสอบ ช่วงความเข้มข้น และเนื้อหาของตัวอย่าง เกณฑ์กำหนดที่ชัดเจนสามารถนำไปเลือกคุณลักษณะเฉพาะที่แสดงคุณสมบัติของวิธีทดสอบได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม

5.4 เลือกคุณลักษณะเฉพาะที่แสดงคุณสมบัติของวิธี (method performance characteristics) เลือกคุณลักษณะเฉพาะที่แสดงคุณสมบัติของวิธี ต้องตรวจสอบ และกำหนดเกณฑ์การยอมรับและสถิติที่ใช้ในการตรวจสอบคุณลักษณะเฉพาะแต่ละตัว เช่น เกณฑ์การยอมรับความเที่ยง และความถูกต้อง เป็นต้น

5.4.1 ความแม่นยำ (Accuracy)

ความแม่นยำของวิธีการ คือความใกล้เคียงกันระหว่างผลการวัดที่ได้จากวิธีทดสอบกับค่าที่แท้จริงหรือค่ามาตรฐานอ้างอิง โดยประเมินจากการวิเคราะห์สารมาตรฐาน วัสดุอ้างอิงรับรอง (CRM) หรือการเติมสารมาตรฐาน (spike recovery)

เกณฑ์การยอมรับ (Acceptance Criteria): ค่า %Recovery อยู่ในช่วง 80–120% สำหรับงานควบคุมคุณภาพทั่วไป แนะนำช่วง 90–110% เกณฑ์อาจปรับตามชนิดผลิตภัณฑ์ ช่วงความเข้มข้น และข้อกำหนดกฎหมาย

5.4.2 ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ความเป็นเส้นตรงของวิธีการวิเคราะห์ คือ ความสามารถในการสร้างผลลัพธ์การตรวจสอบที่อาจเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารวิเคราะห์ภายในช่วงที่กำหนด หรือโดยอาศัยการปรับเปลี่ยนทางคณิตศาสตร์ที่อธิบายไว้อย่างชัดเจน

การหาความเป็นเส้นตรงทำได้โดยการฉีดสารละลายมาตรฐาน/สารละลายเจือจาง ลงในตัวทำละลาย/เฟสเคลื่อนที่อย่างน้อย 5 ความเข้มข้น ในช่วง 50–150% ของช่วงการทำงานที่คาดหวัง กราฟความเป็นเส้นตรงจะถูกสร้างขึ้นด้วยตนเอง/โดยใช้ Microsoft Excel หรือซอฟต์แวร์ของคอมพิวเตอร์ (ความเข้มข้นเทียบกับพื้นที่ peak)

เกณฑ์การยอมรับ (Acceptance Criteria)

- ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ Correlation coefficient (r) ≥ 0.995 หรือ
- Coefficient of determination (R^2) ≥ 0.99
- Residual plot ที่มีลักษณะของการกระจายแบบ random รอบๆ เส้นกลาง

5.4.3 ช่วง (Range)

ช่วงของวิธีวิเคราะห์คือช่วงระหว่างระดับบนและระดับล่างที่ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าสามารถหาค่าได้อย่างแม่นยำ ถูกต้อง และเป็นเส้นตรงโดยใช้วิธีการที่กำหนดไว้ ช่วงนี้จะเป็นช่วงความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบความเป็นเส้นตรง

5.4.4 ความเสถียร (Stability)

สารวิเคราะห์หลายชนิดสลายตัวได้ง่ายก่อนการตรวจสอบด้วยวิธีโครมาโทกราฟี เช่น ในระหว่างการเตรียมสารละลายตัวอย่าง ระหว่างการสกัด การทำความสะอาด การถ่ายโอนเฟส และระหว่างการเก็บรักษาตัวอย่างในหลอดทดลอง ในกรณีเช่นนี้ การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ควรตรวจสอบความเสถียรของสารวิเคราะห์ การทดสอบความถูกต้องจะช่วยตรวจสอบความเสถียร จำเป็นต้องระบุในวิธีวิเคราะห์ว่าตัวอย่างหลังการสกัดสามารถเก็บรักษาได้นานแค่ไหนก่อนการวิเคราะห์ขั้นสุดท้าย โดยอิงจากระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบความถูกต้อง

5.4.5 ขีดจำกัดการตรวจจับและขีดจำกัดการหาปริมาณ (Limit of Detection and Limit of Quantitation)

International Council for Harmonisation (ICH), Q2(R1) ระบุ LOD หมายถึงความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่องมือสามารถตรวจจับได้ แต่ไม่สามารถวัดปริมาณได้ และอัตราส่วนสัญญาณรบกวนต่อสัญญาณสำหรับ LOD ควรเป็น 1:3 ส่วนคำว่า LOQ หมายถึงความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่องมือสามารถตรวจจับและวัดปริมาณได้ และอัตราส่วนสัญญาณรบกวนต่อสัญญาณสำหรับ LOQ ควรเป็น 1:10 การหาค่าขีดจำกัดการตรวจจับ (LOD) และขีดจำกัดการหาปริมาณ (LOQ) จากการทดลองความเป็นเส้นตรงของตัวตรวจจับ (ใช้ได้เฉพาะกับความไวของเครื่องมือเท่านั้น) ค่า LOD และ LOQ คำนวณด้วยตนเองโดยการหาอัตราส่วนของสัญญาณรบกวนต่อสัญญาณของความเข้มข้นต่ำสุด/ที่ทราบของตัวอย่างเชิงเส้น และจะแสดงในหน่วย $\mu\text{g/ml}$ หรือ ppm สำหรับการคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ ค่า LOD และ LOQ จะถูกคูณด้วย 100/ความเข้มข้นต่ำสุดหรือที่ทราบของสารทดสอบ (mg/L) ที่ใช้ในการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์หรือสารเจือปนนั้นๆ

5.4.6 ความเที่ยง (Precision)

ความเที่ยงของวิธีการ คือระดับความสอดคล้องกันของผลการทดสอบที่ได้จากการใช้วิธีเดียวกันซ้ำกับตัวอย่างที่เป็นเนื้อเดียวกัน ภายใต้เงื่อนไขที่กำหนด โดยประเมินจากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และแสดงผลในรูปของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

5.4.6.1 Repeatability (r) คือความเที่ยงจากการวัดซ้ำภายใต้สภาวะที่ควบคุมให้คงที่มากที่สุด เช่น ผู้วิเคราะห์คนเดิม เครื่องมือเดียวกัน สารเคมีชุดเดียวกัน และทำในช่วงเวลาใกล้เคียงกัน (Intra-day) วัตถุประสงค์: เพื่อดูขีดจำกัดเบื้องต้นของวิธีทดสอบ

5.4.6.2 Intermediate Precision คือความเที่ยงเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงปัจจัยภายในห้องปฏิบัติการ เช่น ผู้วิเคราะห์ต่างคน วันทดสอบต่างกัน (Inter-day) หรือเครื่องมือคนละชุด วัตถุประสงค์: เพื่อยืนยันว่าวิธีทดสอบมีความคงตัวแม้สภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย

5.4.6.3 Reproducibility (R) คือความเที่ยงจากการทดสอบตัวอย่างเดียวกันในห้องปฏิบัติการที่แตกต่างกัน วัตถุประสงค์: ใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีมาตรฐาน (Standard Method) หรือการทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing)

ขั้นตอนการปฏิบัติ คือเตรียมตัวอย่างที่มีความเข้มข้นอย่างน้อย 3 ระดับ (ต่ำ, กลาง, สูง) ให้ครอบคลุมช่วงการใช้งาน (Working Range) ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อยระดับละ 6-10 ครั้ง (Replicates) คำนวณค่า %RSD ของแต่ละระดับเปรียบเทียบกับค่า %RSD ที่ได้กับเกณฑ์เป้าหมาย (Target Precision) ที่กำหนดไว้ในแผน Validation

เกณฑ์การยอมรับ (Acceptance Criteria):

- ค่า %RSD ไม่เกินเกณฑ์ตามที่มาตรฐานกำหนดไว้ ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณทั่วไป
- ในกรณีความเข้มข้นต่ำ หรือเมทริกซ์ซับซ้อน อาจยอมรับได้ไม่เกิน %RSD \leq 5.0%
- เกณฑ์ที่ใช้ต้องสอดคล้องกับวัตถุประสงค์การใช้งาน และระบุไว้ในแผน Method Validation

5.4.7 ความเลือกจำเพาะ (Selectivity) คือความสามารถของวิธีทดสอบในการวัดค่าสารวิเคราะห์ (Analyte) ได้อย่างถูกต้อง ท่ามกลางส่วนประกอบอื่นๆ ที่อยู่ในตัวอย่าง (Matrix) เช่น สารเจือปน, สารที่เกิดจากการเสื่อมสภาพ หรือสารรบกวนอื่นๆ และ Specificity (ความจำเพาะ) คือระดับสูงสุดของ Selectivity คือวิธีนั้นสามารถตอบสนองต่อ "สารตัวเดียวเท่านั้น" อย่างสมบูรณ์

ขั้นตอนการปฏิบัติ คือต้องพิสูจน์พารามิเตอร์โดยการเปรียบเทียบระหว่าง Blank และ Spiked Sample นำ Blank Matrix (ตัวอย่างที่ไม่มีสารที่ต้องการวัด) มาวิเคราะห์ เพื่อดูว่ามีสัญญาณรบกวน (Interference) ที่ตำแหน่งเดียวกับสารวิเคราะห์หรือไม่ นำ Spiked Sample (ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานลงไป) มาวิเคราะห์ เพื่อยืนยันว่าสัญญาณของสารวิเคราะห์ยังคงชัดเจนและไม่ถูกรบกวนจาก Matrix ข. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพีค (Peak Purity Check) สำหรับเทคนิคทางโครมาโทกราฟี (เช่น HPLC, GC)

การจัดการเมื่อเกิดปัญหา Matrix Effect หากพบว่าวิธีขาด Selectivity (มีการรบกวนสูง) ผู้เชี่ยวชาญให้ปรับปรุงขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง: เช่น การใช้ Solid Phase Extraction (SPE) เพื่อกำจัดสารรบกวนปรับสภาวะเครื่องมือ: เช่น เปลี่ยน Mobile Phase หรือเปลี่ยน Column ที่มีประสิทธิภาพการแยก (Resolution) สูงขึ้น หรือ Matrix-Matched Calibration: ใช้การเตรียมกราฟมาตรฐานใน Matrix เดียวกับตัวอย่างเพื่อชดเชยผลกระทบ

เกณฑ์การยอมรับ (Acceptance Criteria):

- ไม่พบสัญญาณรบกวน ณ ตำแหน่งการตรวจวัดของสารวิเคราะห์ในตัวอย่าง blank, matrix blank หรือสารรบกวนที่เกี่ยวข้อง
- ค่าสัญญาณของสารรบกวนที่ตำแหน่งเดียวกับสารวิเคราะห์ต้องไม่เกิน 20% ของสัญญาณที่ระดับ LOQ
- สำหรับวิธีที่ใช้เทคนิคโครมาโทกราฟี ต้องมีการแยกพีคของสารวิเคราะห์ออกจากสารรบกวนอย่างชัดเจน โดยมีค่า Resolution (Rs) ≥ 1.5
- ในกรณีใช้การเติมสารมาตรฐาน (spike) ผลการทดสอบต้องไม่แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่า recovery หรือค่าการตอบสนองอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสารมาตรฐานในตัวทำละลาย

5.5 กำหนดความต้องการทางเทคนิค เช่นสารเคมี เครื่องมือวิเคราะห์ สารมาตรฐาน เครื่องมือพื้นฐานที่ได้ผ่านการสอบเทียบแล้ว

5.6 จัดทำขั้นตอนการดำเนินการหรือคู่มือการปฏิบัติงาน (standard operation procedure) อย่างละเอียดและครบถ้วน

5.7 ดำเนินการตรวจสอบคุณลักษณะเฉพาะ แต่ละตัวที่เลือกตามวิธีที่กำหนด

5.8 การบรรลุผลของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ตรวจสอบว่าเกณฑ์กำหนดต่าง ๆ สามารถบรรลุผลหรือไม่ เปรียบเทียบผลการทดสอบที่ได้กับเกณฑ์ที่กำหนดไว้ โดยใช้หลักสถิติช่วยในการตรวจสอบ หากผลการตรวจสอบไม่ผ่านเกณฑ์ อาจจำเป็นต้องดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีใหม่ ปรับเปลี่ยนวิธีทดสอบ หรือปรับเกณฑ์กำหนด เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

1. ISO/IEC 17025:2017 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
2. The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. (2025). [Online]. Eurachem. Available from: <https://www.eurachem.org>
3. International Council for Harmonisation (ICH). Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology; 2005.
4. คณะทำงานจัดทำคู่มือวิชาการด้านการตรวจสอบและรับรอง กรมวิทยาศาสตร์บริการ. (2568). *แนวทางการจัดทำความใช้ได้ของสารวัด*. กรุงเทพมหานคร: กรมวิทยาศาสตร์บริการ.