การควบคุมคุณภาพภายในสำหรับห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ทดสอบ

นีระนารถ แจ้งทอง
ปัทมา นพรัตน์

"คุณแน่ใจได้อย่างไรว่าผลการวิเคราะห์ทดสอบของคุณถูกต้อง?" เป็นคำถามที่ผู้วิเคราะห์ทดสอบคงเคยได้ยินกันอยู่เสมอ ๆ สำหรับผู้วิเคราะห์ทดสอบแล้ว การทำให้ผลการวิเคราะห์ทดสอบมีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ ถือเป็นหน้าที่และความรับผิดชอบ ซึ่งการควบคุมคุณภาพ (Quality Control, QC) ถือเป็นปัจจัยสำคัญที่จะทำให้ผู้วิเคราะห์ทดสอบมีความมั่นใจในผลการวิเคราะห์ทดสอบมากยิ่งขึ้น

การควบคุมคุณภาพ หมายถึง การดำเนินการและกิจกรรมด้านวิชาการ (operation techniques and activities) ที่นำมาใช้เพื่อให้ตรงตามข้อกำหนดด้านคุณภาพ ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ การควบคุมคุณภาพภายนอก เช่น การเข้าร่วมโปรแกรมการทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการ โดยการเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ และการควบคุมคุณภาพภายใน เช่น การใช้ตัวอย่างควบคุม ในบทความนี้จะขอกล่าวเฉพาะรายละเอียดของการควบคุมคุณภาพภายในเท่านั้น

การควบคุมคุณภาพภายใน (Internal Quality Control, IQC) หมายถึง การดำเนินการของห้องปฏิบัติการในการเฝ้าระวังการทดสอบและผลการทดสอบให้น่าเชื่อถือก่อนรายงานผล กระบวนการควบคุมคุณภาพต้องครอบคลุมทุกขั้นตอนการวิเคราะห์ ตั้งแต่การสุ่มตัวอย่าง การเตรียมตัวอย่าง การวิเคราะห์ตัวอย่าง ตลอดจนถึงการรายงานผลการทดสอบ

ในกรณีที่มีการวิเคราะห์ทดสอบเป็นชุดตัวอย่าง (batch) วิธีการควบคุมคุณภาพภายในของห้องปฏิบัติการจะต้องเลือกตัวอย่างควบคุม (Quality Control Sample, QC Sample) แล้วทำการทดสอบพร้อมกับตัวอย่างในแต่ละชุด การเลือกตัวอย่างควบคุมขึ้นอยู่กับวิธีวิเคราะห์ ธรรมชาติของตัวอย่าง สิ่งที่ต้องการวิเคราะห์ (analyte) และความเข้มข้นของสิ่งที่ต้องการวิเคราะห์

วิธีการควบคุมคุณภาพภายในโดยทั่วไปจะเกี่ยวข้องกับตัวอย่างควบคุมต่าง ๆ ต่อไปนี้

1. การวิเคราะห์ Certified Reference Materials (CRMs)
2. การวิเคราะห์ QC check standard (Instrument check standard)
3. การวิเคราะห์รีเอเจนต์แบลงค์หรือแบลงค์ของวิธีทดสอบ (reagent blank or method blank)
4. การวิเคราะห์ spiked sample หรือ การหา % recovery ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตลอดช่วงใช้งาน
5. การวิเคราะห์ซ้ำในตัวอย่างเดียวกัน (duplicate analysis pair)
6. การวิเคราะห์ check หรือ control sample
7. การตรวจสอบสมรรถนะ (performance) ของเครื่องมือ

รายละเอียดของตัวอย่างควบคุมแต่ละชนิด เป็นดังนี้

1. การวิเคราะห์ Certified Reference Materials (CRMs)

Certified Reference Materials เป็นวัสดุหรือสารอ้างอิงมาตรฐานที่ได้รับการรับรอง โดยการดำเนินการที่ถูกต้องทางวิชาการ มีใบรับรอง และสามารถสอบกลับ (traceable) ไปยังมาตรฐานระหว่างประเทศ (International Standard, SI unit) ได้ การวิเคราะห์ Certified Reference Materials

เพื่อเป็นการทวนสอบให้แน่ใจว่าค่าที่ได้จากการวิเคราะห์สารอ้างอิงมาตรฐานที่เตรียมขึ้นเอง (In-house Reference Materials) หรือตัวอย่างควบคุมต่างๆ มีความถูกต้อง จึงควรวิเคราะห์ CRMs อย่างน้อยเดือนละครั้ง โดยใช้ความเข้มข้นใกล้เคียงกับตัวอย่าง

เกณฑ์ยอมรับ : ± 10 % ของค่าจริง (true value) หรือใช้ t - test หรือพิจารณาจาก % ความถูกต้อง ซึ่งคำนวณได้จากสูตร

$$\text{\% ความถูกต้อง} = \frac{\text{ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ x 100}}{\text{ค่าจริง}}$$

2. การวิเคราะห์ QC check standard (Instrument check standard) ตัวอย่างควบคุมชนิดนี้แบ่งเป็น

2.1 Calibration Verification of Standard (CVS) หมายถึง สารมาตรฐานจากแหล่งที่แตกต่างจากแหล่งที่ใช้เตรียมกราฟมาตรฐาน เช่น รุ่นการผลิต (batch) ที่ต่างกัน ผู้ผลิตที่ต่างกัน หรือการชั่งสาร มาตรฐานมาใหม่ การใช้ CVS ควรใช้ความเข้มข้นเดียว ที่ความเข้มข้นใกล้จุดกลางของ calibration range (กรณี range กว้าง อาจเพิ่มจำนวนจุดที่ความเข้มข้นอื่น) และควรวิเคราะห์ CVS ทุก 10 ตัวอย่าง หรือทุก 12 ชั่วโมง หรือทุกครั้งก่อนเริ่มตัวอย่างชุดใหม่ หรือตรวจสอบระหว่างการทดสอบตัวอย่างแต่ละชุด

เกณฑ์ยอมรับ :

± 10 % ของค่าจริง

2.2 Continuing Calibration Standard (CCS) ใช้สารมาตรฐานที่ใช้สร้างกราฟมาตรฐาน โดยใช้ ความถี่และความเข้มข้น เช่นเดียวกับ CVS แต่เกณฑ์ยอมรับจะแคบกว่า คือ ± 5 % ของค่าจริง

ถ้าผลการวิเคราะห์ QC check standard เกินเกณฑ์การยอมรับ ต้องสร้างกราฟมาตรฐานหรือวิเคราะห์ตัวอย่างในชุดทดสอบนั้นใหม่

ค่าจริงในที่นี้หมายถึง ค่าที่ได้จากใบรับรอง หรือค่าที่คำนวณได้จากใบรับรอง

3. การวิเคราะห์รีเอเจนต์แบลงค์หรือแบลงค์ของวิธีทดสอบ (Reagent blank or Method blank)

รีเอเจนต์แบลงค์ หรือแบลงค์ของวิธีทดสอบ หมายถึง ตัวอย่างที่ปราศจากสิ่งที่ต้องการวิเคราะห์ (analyte-free sample) โดยทั่วไปใช้น้ำกลั่นที่ผ่านกระบวนการเช่นเดียวกับตัวอย่างที่เราจะวิเคราะห์ โดยใช้รีเอเจนต์ เครื่องแก้ว และเครื่องมือเดียวกัน การทำแบลงค์เพื่อให้แน่ใจว่าสัญญาณทั้งหมดเป็นของสิ่งที่ต้องการวิเคราะห์ ไม่ใช่จากรีเอเจนต์ หรือจากสิ่งอื่นๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์

ประโยชน์ของรีเอเจนต์แบลงค์หรือแบลงค์ของวิธีทดสอบ คือ ชี้บ่งและแก้ไขความคลาดเคลื่อนจากระบบ (systematic error) ที่มาจากความไม่บริสุทธิ์ของรีเอเจนต์ การปนเปื้อนจากเครื่องแก้ว หรือเครื่องมือ

อย่างไรก็ตามถ้ามีการสุ่มตัวอย่างและการขนย้าย จะมีแบลงค์อีกชนิดหนึ่งที่เรียกว่า ฟิลด์แบลงค์ (field blank) ซึ่งหมายถึง ตัวอย่างที่ปราศจากสิ่งที่ต้องการวิเคราะห์ที่นำจากห้องปฏิบัติการ ไปยังบริเวณที่มีการสุ่มตัวอย่างเพื่อให้สัมผัสกับสิ่งแวดล้อมเหมือนตัวอย่าง แล้วถ่ายใส่ขวดบรรจุตัวอย่างที่สะอาด แล้วจึงนำกลับห้องปฏิบัติการพร้อมกับตัวอย่าง

ควรทำการวิเคราะห์แบลงค์ทุกๆ 10-20 % ของจำนวนตัวอย่างในแต่ละชุดตัวอย่าง และเมื่อทำการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นสูง ต้องวิเคราะห์แบลงค์ตามทันที เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากตัวอย่างนั้นไปยังตัวอย่างถัดไป (carry-over of analyte)

เกณฑ์ยอมรับ : ถ้าค่าแบลงค์น้อยกว่าขีดจำกัดต่ำสุดของวิธีทดสอบ (Method Detection Limit, MDL) สามารถยอมรับได้ ถ้าค่าแบลงค์มากกว่าขีดจำกัดต่ำสุดของวิธีทดสอบ จะไม่ยอมรับ แต่ถ้าค่าแบลงค์มากกว่าขีดจำกัดต่ำสุดของวิธีทดสอบ และผลการทดสอบมากกว่า Limit of Quantity สามารถยอมรับได้ แต่ควรตรวจสอบว่ามีสิ่งที่ต้องการวิเคราะห์ปะปนกับแบลงค์หรือไม่

4. การวิเคราะห์ spiked sample หรือ การหา % recovery ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตลอดช่วงใช้งาน

การเตรียม spiked sample ทำได้โดยเติมสารมาตรฐานความเข้มข้นสูงๆ ปริมาณน้อยๆ ลงในตัวอย่าง เพื่อตรวจสอบ analyte recovery ใน sample matrix หรือถ้ามีการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มี matrix

ที่แตกต่างไป ก็เป็นการทวนสอบปริมาณสารรบกวน นอกจากนี้ยังสามารถเติมสารมาตรฐานลงในแบลงค์ของวิธีทดสอบ หรือฟิลด์แบลงค์ เพื่อตรวจสอบสมรรถนะของวิธีวิเคราะห์ทดสอบสารมาตรฐานที่ใช้ควรมาจากคนละแหล่งกับที่ใช้เตรียมกราฟมาตรฐาน และความเข้มข้นของ spiked sample ควรอยู่ในช่วงเดียวกันกับตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ ทั้งนี้ผู้วิเคราะห์ทดสอบควรแน่ใจว่าสิ่งที่เติมลงไปมีคุณสมบัติทางเคมีเหมือนตัวอย่างและรวมตัวเป็นเนื้อเดียวกับตัวอย่าง

วิธีการเตรียม spiked sample

1. ชั่งหรือตวงตัวอย่างจำนวน เท่าๆ กัน 2 ส่วน (portions) ส่วนแรกเติมสารมาตรฐานลงไป เรียก ส่วนนี้ว่า spiked sample ส่วนที่สองไม่ต้องเติมสารมาตรฐาน เรียกส่วนนี้ว่า ตัวอย่างเริ่มต้น (original sample)
2. เตรียมตัวอย่างทั้งสองส่วนตามขั้นตอนการวิเคราะห์
3. วิเคราะห์หาปริมาณสิ่งที่ต้องการวิเคราะห์
4. หา % recovery จากสูตร

$$\% \text{ recovery} = \frac{(\text{ความเข้มข้นของ spiked sample - ความเข้มข้นของตัวอย่างเริ่มต้น}) \times 100}{\text{ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงไป}}$$

% recovery สามารถตรวจสอบความคลาดเคลื่อนจากระบบในขั้นตอนต่างๆ ของการวิเคราะห์ทดสอบได้ กล่าวคือเมื่อวิเคราะห์ spiked sample แล้วพบว่า % recovery เกินเกณฑ์การยอมรับ ในขั้นตอนใดจะแสดงผล ดังต่อไปนี้

- % recovery เกินเกณฑ์การยอมรับในฟิลด์แบลงค์ แต่ไม่เกินในแบลงค์ของวิธีทดสอบ แสดงว่ามีความคลาดเคลื่อนจากระบบในกระบวนการสุ่มและขนย้าย
- % recovery เกินเกณฑ์การยอมรับทั้งในฟิลด์แบลงค์ และแบลงค์ของวิธีทดสอบ แสดงว่ามีความคลาดเคลื่อนจากระบบของห้องปฏิบัติการ
- % recovery เกินเกณฑ์การยอมรับใน matrix spiked sample แสดงว่ามีความคลาดเคลื่อนจากระบบเนื่องจาก matrix ของตัวอย่าง ซึ่งหากพบว่า matrix มีผลต่อการวิเคราะห์ทดสอบ ผู้วิเคราะห์ทดสอบจะต้องทำ standard addition ในการวิเคราะห์ตัวอย่างนั้น

ผู้วิเคราะห์ทดสอบสามารถทำการวิเคราะห์ matrix spiked sample โดยใช้ความเข้มข้นประมาณ 10 เท่าของขีดจำกัดต่ำสุดของวิธีทดสอบ หรือเท่ากับความเข้มข้นที่จุดกึ่งกลางของความเข้มข้นของช่วงการทดสอบ (working range) หรือตามข้อมูลของการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (method validation)

เกณฑ์ยอมรับ : % recovery จากข้อมูลของการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

ตัวอย่างเกณฑ์การยอมรับ % recovery สำหรับการวิเคราะห์น้ำ และน้ำทิ้ง

สิ่งที่ต้องการวิเคราะห์	เกณฑ์ยอมรับ % recovery
กรด	60 -140
แอนไอออน	80 -120
เบส หรือสารเป็นกลาง	70 - 130
ยาฆ่าแมลงชนิดคาร์บาเมต	50 - 150
ยาฆ่าวัชพืช	40 - 160
โลหะ	80 - 120

5. การวิเคราะห์ซ้ำในตัวอย่างเดียวกัน (duplicate analysis pair)

เกณฑ์ยอมรับ : ระบุเกณฑ์การยอมรับของ % ความแตกต่างสัมพัทธ์ (% Relative Percent Difference, RPD) หรือเมื่อผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์ควบคุม (control limit) ถ้าใช้แผนภูมิควบคุม ซึ่งขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นของสิ่งที่ต้องการวิเคราะห์

$$\text{\% ความแตกต่างสัมพัทธ์} = \frac{(\text{ผลการทดสอบครั้งที่ 1 - ผลการทดสอบครั้งที่ 2}) \times 100}{\text{ค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบทั้งสองครั้ง}}$$

ถ้าในวิธีวิเคราะห์ทดสอบใดไม่สามารถวิเคราะห์ซ้ำได้ต้องวิเคราะห์ matrix spiked sample

ตัวอย่างเกณฑ์การยอมรับ % ความแตกต่างสัมพัทธ์สำหรับการวิเคราะห์น้ำ และน้ำทิ้ง

สิ่งที่ต้องการวิเคราะห์	% ความแตกต่างสัมพัทธ์ เมื่อสิ่งที่ต้องการวิเคราะห์ มีปริมาณน้อยกว่า 20 เท่าของ ขีดจำกัดต่ำสุดของวิธีทดสอบ	% ความแตกต่างสัมพัทธ์ เมื่อสิ่งที่ต้องการวิเคราะห์ มีปริมาณมากกว่า 20 เท่าของ ขีดจำกัดต่ำสุดของวิธีทดสอบ
กรด	40	20
แอนไอออน	25	10
เบส หรือสารเป็นกลาง	40	20
ยาฆ่าแมลงชนิดคาร์บาเมต	40	20
ยาฆ่าวัชพืช	40	20
โลหะ	25	10

6. การวิเคราะห์ check หรือ control sample

check หรือ control sample หมายถึง ตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์แล้ว มีความคงสภาพและมีความสม่ำเสมอ (homogeneity) นำมาทดสอบแทรกเข้าไปในชุดตัวอย่าง

เกณฑ์ยอมรับ : ระบุเกณฑ์ % ความแตกต่างจากค่าจริง หรือ % ความถูกต้อง หรือเมื่อผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์ควบคุม

การวิเคราะห์ matrix spiked sample, check หรือ control sample และการทดสอบซ้ำ ควรทำ ทุกๆ 10-20 % ของจำนวนตัวอย่างในแต่ละชุดตัวอย่าง

7. การตรวจสอบสมรรถนะของเครื่องมือ

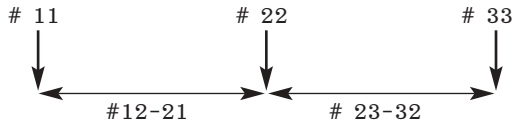
ทำได้โดยพิจารณาจากช่วงความเป็นเส้นตรง หรือใช้วิธีอื่นที่เหมาะสม ผู้วิเคราะห์ทดสอบสร้างกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารมาตรฐาน 3 - 5 ความเข้มข้น แล้วพิจารณาช่วงความเป็นเส้นตรง โดยดูจากค่าสัมประสิทธิสหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) หรือสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) ในการทดสอบที่สามารถตรวจสอบค่าสัมประสิทธิสหสัมพันธ์ หรือสัมประสิทธิ์การตัดสินใจได้ ควรตรวจสอบทุกครั้ง แต่ถ้าทำไม่ได้ก็ควรตรวจสอบอย่างน้อยทุกๆ 6 เดือน **เกณฑ์ยอมรับ** : r ไม่น้อยกว่า 0.995, R^2 ไม่น้อยกว่า 0.990

เมื่อพิสูจน์ช่วงความเป็นเส้นตรงได้แล้ว การสร้างกราฟมาตรฐานอาจทำโดยใช้สารมาตรฐานเพียงความเข้มข้นเดียวได้ แต่อย่างไรก็ตามไม่ควรรายงานผลเกินจุดสูงสุดของกราฟมาตรฐาน การรายงานผลเกินจุดสูงสุดของกราฟมาตรฐานจะทำได้ต่อเมื่อ มีการพิสูจน์แล้วว่าค่าที่ได้ยังคงอยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรง และไม่ทำให้องค์ประกอบของเครื่องมือ (instrument parameter) เปลี่ยนแปลงไป แต่ต้องไม่เกิน 1.5 เท่าของความเข้มข้นสูงสุดของสารมาตรฐานที่ใช้สร้างกราฟมาตรฐาน

ตัวอย่างการแทรกตัวอย่างควบคุม แสดงในตารางต่อไปนี้

ชุดตัวอย่างที่ 1	ชุดตัวอย่างที่ 2
สารมาตรฐานที่ใช้สร้างกราฟมาตรฐาน (จากความเข้มข้นต่ำไปหาสูง)	สารมาตรฐานที่ใช้สร้างกราฟมาตรฐาน (จากความเข้มข้นต่ำไปหาสูง)
รีเอเจนต์แบลงค์	Check sample
ตัวอย่างที่ 1	รีเอเจนต์แบลงค์
ตัวอย่างที่ 2	ตัวอย่างที่ 6
Check sample (หรือ spiked sample)	ตัวอย่างที่ 7
ตัวอย่างที่ 3	สารมาตรฐานที่ใช้สร้างกราฟมาตรฐาน (CCS)
ตัวอย่างที่ 4	ตัวอย่างที่ 8
ตัวอย่างที่ 2 (duplicate analysis)	ตัวอย่างที่ 9
รีเอเจนต์แบลงค์	ตัวอย่างที่ 7 (duplicate analysis)
ตัวอย่างที่ 5	รีเอเจนต์แบลงค์
สารอ้างอิงมาตรฐาน	ตัวอย่างที่ 10
สารมาตรฐานที่ใช้สร้างกราฟมาตรฐาน (CCS)	

อย่างไรก็ตามการทำ IQC อย่างน้อยควรใช้ตัวอย่างควบคุมตัวใดตัวหนึ่งในทุก ๆ 10 ตัวอย่างทดสอบ ดังแสดงในภาพ



Horwizt แนะนำว่า ในแต่ละชุดตัวอย่างควรมี QC check standard 1 ตัวอย่าง รีเอเจนต์แบลงค์หรือแบลงค์ของวิธีทดสอบ 1 ตัวอย่าง การวิเคราะห์ซ้ำ 1 ตัวอย่าง และ spiked sample 1 ตัวอย่าง โดยในแต่ละวิธีทดสอบควรกำหนดตัวอย่างควบคุม และความถี่ในการวิเคราะห์ไว้เป็นลายลักษณ์อักษร ทั้งนี้ขึ้นกับเครื่องมือที่ใช้ ความคงสภาพของตัวอย่างควบคุม และความเข้มข้นของสิ่งที่ต้องการวิเคราะห์

ความถี่ในการใช้ตัวอย่างควบคุม ในทุกชุดตัวอย่างขึ้นกับวิธีทดสอบ ว่ามีความซ้ำซ้อน มีขั้นตอนที่ต้องควบคุมหลายขั้นตอน ปริมาณตัวอย่างมีจำนวนมากแต่มีเวลาทดสอบจำกัด ความถี่ของงาน เป็นงานประจำ หรือเป็นครั้งคราว สำหรับงานทดสอบที่นาน ๆ ทำครั้ง ห้องปฏิบัติการต้องควบคุมเครื่องมือ สารเคมี สารมาตรฐานต่าง ๆ ให้เป็นไปตามมาตรฐานของสิ่งนั้น และเพื่อให้มั่นใจในผลการทดสอบต้องเพิ่มจำนวนการทดสอบตัวอย่างควบคุมในชุดตัวอย่างให้มากขึ้น บางครั้งอาจเป็น 6-8 เท่าของตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ แต่ถ้าเป็นงานที่ทำเป็นประจำ งานทดสอบต่อเนื่อง หรืองานทดสอบที่ไม่ต่อเนื่อง มีการเว้นระยะช่วงการทดสอบเป็นช่วงสั้น ๆ เครื่องมือ สารเคมี มีการควบคุมการใช้งานอย่างต่อเนื่อง โดยทั่วไปกำหนดให้มีการใช้ตัวอย่างควบคุม ทุก ๆ 10 - 20 % ของจำนวนตัวอย่างในแต่ละชุดตัวอย่าง ทั้งนี้เพื่อให้เกิดความมั่นใจในผลการวิเคราะห์ทดสอบนั่นเอง.

เอกสารอ้างอิง

American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20th ed. Washington DC: Publication Office. 1998. p.3-3 - 3-5.

Garfield, F.M. **Quality assurance principles for analytical laboratories**. Virginia : AOAC International,1991. p.87-94.

Harvey, D. **Modern analytical chemistry**. New York : McGraw Hill, 2000. p.1-20.

National Association of Testing Authorities. Guidelines for Quality Control in the Analytical Laboratory, **NATA technical note** no.23, October 1995.