

ความสำคัญของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสำหรับการประเมินความเสี่ยงการได้รับสัมผัสสารเคมีในอาหาร

ปรัชญรัชต์ ธนวิยุทธภักดี^{1,*} วีรยา การพานิช¹ รติกร อลงกรณ์โชติกุล²

¹ สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล

² กองบริหารและรับรองห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์บริการ

บทคัดย่อ

การประเมินความเสี่ยงของสารเคมีในอาหารเป็นหลักการทางวิทยาศาสตร์ ที่ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน 1) การระบุอันตราย 2) การอธิบายลักษณะอันตราย 3) การประเมินการได้รับสัมผัส 4) การอธิบายลักษณะความเสี่ยง ขั้นตอนที่ 1 และ 2 ต้องใช้ข้อมูลความเป็นพิษจากการศึกษาในสัตว์ทดลอง หรือมนุษย์ และต้องมีการตรวจวัดค่าความเข้มข้นทางชีวเคมีในร่างกายที่บ่งบอกถึงการตอบสนองของร่างกายต่อการได้รับสารเคมี ซึ่งวิธีการในการตรวจวัดจำเป็นต้องมีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ขั้นตอนที่ 3 เป็นขั้นตอนเพื่อให้ทราบปริมาณการบริโภคอาหาร และระดับความเข้มข้นของสารที่สนใจ โดยที่มาของข้อมูลความเข้มข้นอาจได้จากค่าปริมาณสูงสุดของสารปนเปื้อนหรือวัตถุเจือปนอาหารที่อนุญาต หรือจากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการของสารที่สนใจ แต่ทั้งนี้ค่าความเข้มข้นที่ได้จะเป็นที่น่าเชื่อถือหรือไม่ วิธีการวิเคราะห์จะต้องผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี เพื่อให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับคุณสมบัติของวิธีวิเคราะห์และความสามารถของวิธีทดสอบ เนื่องจากในการประเมินความเสี่ยงไม่มีความเสี่ยงที่เป็นศูนย์ ชีดจำกัดของการตรวจพบ และชีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณของวิธีทดสอบ จะถูกนำมาพิจารณาในการคำนวณการได้รับสัมผัสสารเคมีที่สนใจ ประโยชน์ของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีไม่เพียงแต่ให้ข้อมูลของประสิทธิภาพและความน่าเชื่อถือของวิธีทดสอบ ยังให้ประโยชน์ในการปกป้องสุขภาพของผู้บริโภค

คำสำคัญ: การประเมินความเสี่ยง ความเข้มข้นของสารเคมี วัตถุเจือปนอาหาร สารปนเปื้อน การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

รับบทความ: 15 มิถุนายน 2565 แก้ไข: 20 มิถุนายน 2565 ตอรับ: 28 มิถุนายน 2565

*ผู้รับผิดชอบบทความ

ปรัชญรัชต์ ธนวิยุทธภักดี

หน่วยพิษวิทยาทางอาหาร สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล

อีเมล: pharrunrat.tan@mahidol.ac.th

The Importance of Method Validation for Risk Assessment of Exposure to Chemicals in Foods

Pharrunrat Tanaviyutpakdee^{1,*}, Weeraya Karnpanit¹, Ratikorn Alongkornchotikul²

¹ Institute of Nutrition, Mahidol University

² Bureau of Laboratory Accreditation, Department of Science Service

Abstract

Risk assessment of chemicals in foods is the scientific principle, which consists of 4 steps: 1) hazard identification, 2) hazard characterization, 3) exposure assessment and 4) risk characterization. Step 1 and 2 require toxicity data from animal or human studies, and require measurements of biochemical concentrations that indicate the body's response to chemical exposure. Then, method validation is required for measurement method. In the step 3, it is the step to acquire the amount of food consumption and concentration of a chemical of interest. The sources of concentration data may be derived from the allowance maximum levels of contaminants and food additives or from laboratory analysis of the chemical of interest. Nevertheless, whether the acquired concentration will be reliable, method validation is needed to be performed to provide an information related to the method characteristics and performances. Because in the risk assessment there is no zero risk, the limit of detection and limit of quantitation of test methods are considered for calculating an exposure to chemicals of interest. The benefits of method validation do not only provide the efficiency and reliability of the method itself but also provide benefit in protecting consumer health.

Keywords: Risk assessment, Concentration of chemicals, Food additives, Contaminants, Method validation of analysis method

Received: 15 June 2022, Revised: 20 June 2022, Accepted: 28 June 2022

*Corresponding author

Pharrunrat Tanaviyutpakdee

Food Toxicology Unit, Institute of Nutrition, Mahidol University

E-mail: pharrunrat.tan@mahidol.ac.th

บทนำ

การประเมินความเสี่ยง (risk assessment) จากการได้รับสารเคมีเป็นกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ ที่ดำเนินการโดยผู้วิเคราะห์ความเสี่ยง (risk assessor) เป็นกระบวนการประเมินโอกาสที่จะเกิดผลเสียต่อสุขภาพอนามัยของมนุษย์จากการได้รับสารเคมี โดยตามแนวทางขององค์การอนามัยโลก และองค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ หรือ World Health Organization/ Food and Agriculture Organization of United Nations (WHO/FAO)^{1,2} ขั้นตอนของการประเมินความเสี่ยง ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน (รูปที่ 1) โดยขั้นตอนที่ 1 การระบุอันตรายจะเป็นการรวบรวมข้อมูลต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับสารที่สนใจตั้งแต่คุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ ไปจนถึงข้อมูลการศึกษาด้านความเป็นพิษ ขั้นตอนที่ 2 การอธิบายลักษณะอันตราย เป็นขั้นตอนเพื่อให้ได้มาซึ่งค่าความปลอดภัยของการได้รับสารที่สนใจในมนุษย์ ซึ่งในขั้นตอนนี้ ค่าความปลอดภัยจะเป็นค่าที่ได้จากคณะกรรมการผู้เชี่ยวชาญของหน่วยงานระดับนานาชาติมาพิจารณาข้อมูลร่วมกัน โดยมีหลักการของการคำนวณเพื่อกำหนดค่าที่ปลอดภัยสำหรับมนุษย์ในการได้รับสัมผัสจากการรับประทานต่อวัน (acceptable daily intake; ADI) อธิบายในหัวข้อถัดไป ขั้นตอนที่ 3 การประเมินการได้รับสัมผัส เป็นขั้นตอนเพื่อให้ได้มาซึ่งค่าปริมาณการบริโภคต่อวัน และค่าความเข้มข้นของสารที่สนใจ ขั้นตอนที่ 4 นำข้อมูลการได้รับสัมผัสมาเปรียบเทียบกับค่าความปลอดภัย เพื่อพิจารณาว่ามีความเสี่ยงต่อสุขภาพหรือไม่ ดังนั้นการประเมินความเสี่ยงเป็นหลักการที่ใช้ในการเฝ้าติดตามความปลอดภัยของสารเคมี

รวมถึงผลของการประเมินความเสี่ยงจะเป็นข้อมูลสำคัญในการจัดการความเสี่ยง (risk management) เพื่อประกอบการตัดสินใจก่อนดำเนินมาตรการต่าง ๆ เพื่อลดปริมาณและการปนเปื้อนของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม ทั้งในน้ำ อากาศ ดิน รวมถึงอาหารให้อยู่ในระดับที่ปลอดภัยต่อมนุษย์

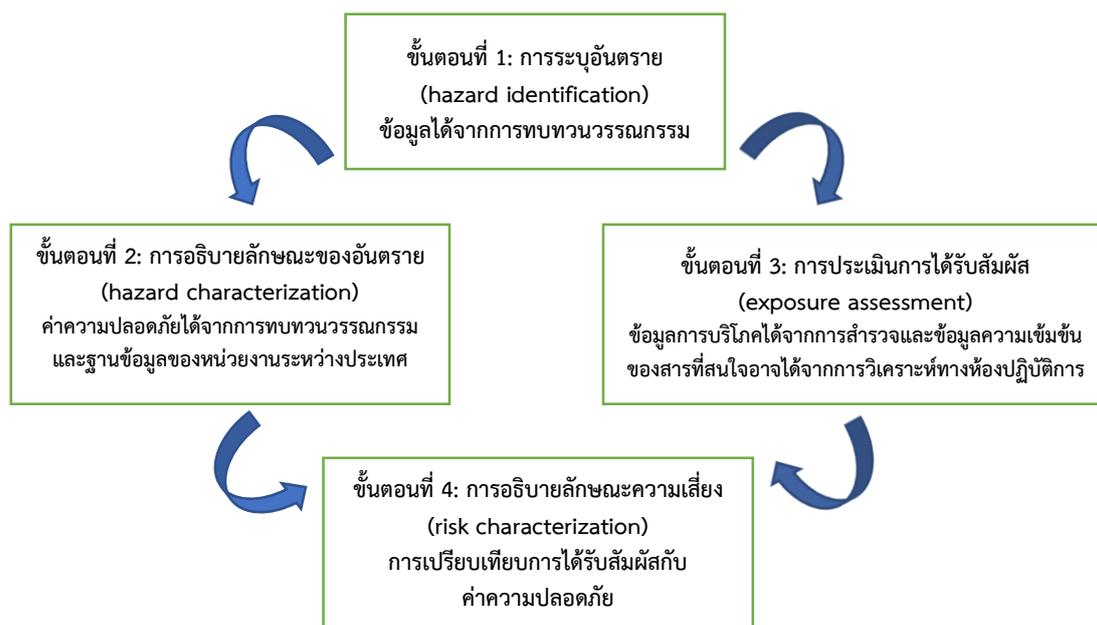
ขั้นตอนของการประเมินความเสี่ยง (step of risk assessment)^{1,2}

(1) การระบุอันตราย (hazard identification) เป็นขั้นตอนของการเก็บรวบรวมข้อมูลต่าง ๆ ทางวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับสารเคมีที่เราสนใจ ข้อมูลได้แก่ ข้อมูลด้านคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ (physicochemical property) ข้อมูลพิษจลนศาสตร์ (toxicokinetics) คือ กระบวนการต่าง ๆ เมื่อได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกาย ได้แก่ การดูดซึม การกระจาย เมทาบอลิซึม และการกำจัดหรือขับออก ข้อมูลพิษพลศาสตร์ (toxicodynamics) คือ ข้อมูลการศึกษาการเกิดพิษในสัตว์ทดลองทั้งแบบเฉียบพลัน กึ่งเฉียบพลัน กึ่งเรื้อรัง และ เรื้อรัง ข้อมูลการเกิดพิษต่อระบบของร่างกาย และข้อมูลการศึกษาด้านระบาดวิทยา (epidemiological study) เป็นต้น โดยข้อมูลเหล่านี้จะถูกนำมาวิเคราะห์เพื่อสรุปว่าการได้รับสารเคมีที่กำลังสนใจอยู่นั้นมีผลเสียต่อสุขภาพอนามัยหรือไม่อย่างไร^{1,2}

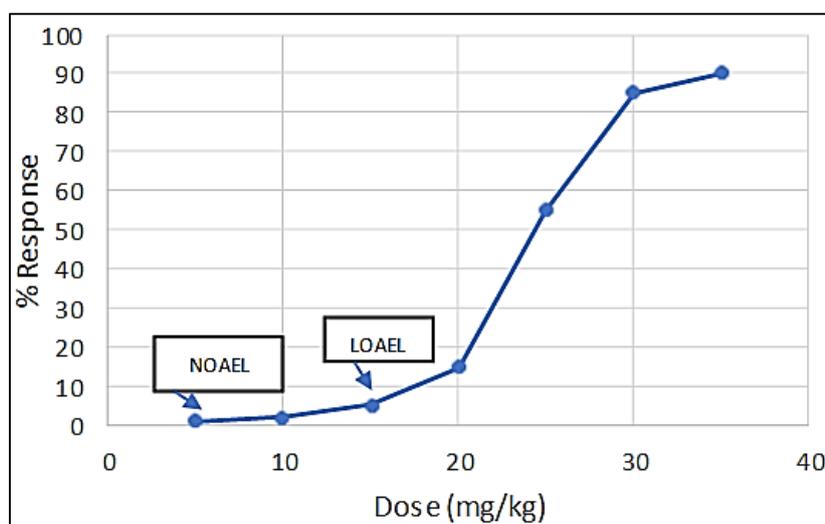
(2) การอธิบายลักษณะอันตราย (hazard characterization) เป็นขั้นตอนของการประเมินขนาดการตอบสนอง (dose-response assessment) ซึ่งจะแสดงเป็นความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของสารที่ได้รับและความรุนแรงของความเป็นพิษทั้งเชิงคุณภาพ (qualitative) และเชิงปริมาณ

(quantitative) ข้อมูลส่วนใหญ่ได้จากการศึกษาในสัตว์ทดลอง และอาจมีบางส่วนที่ได้จากการศึกษาในมนุษย์ โดยข้อมูลที่จะใช้ในการคำนวณความเสี่ยงจากการได้รับสารเคมีที่มาจากการศึกษาในสัตว์ทดลองนั้นต้องเป็นข้อมูลจากการศึกษาแบบกึ่งเรื้อรัง และ เรื้อรัง ที่ทราบความสัมพันธ์เชิงปริมาณระหว่างความเป็นพิษและปริมาณสารเคมี

ที่ได้รับที่เรียกว่า dose-response relationship ซึ่งในส่วนของคุณสมบัติที่แกน Y เป็นการวัดหรือประเมินการตอบสนอง ต้องใช้การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ โดยวิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์จำเป็นต้องมีการควบคุมคุณภาพและผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (method validation)^{1,2}



รูปที่ 1. ขั้นตอนของการประเมินความเสี่ยง (ประยุกต์จาก FAO/WHO, 2004)³



รูปที่ 2. กราฟขนาดการตอบสนอง (dose-response curve)

ตารางที่ 1. การแบ่งประเภทการทดสอบและพารามิเตอร์ของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

Performance characteristic or parameter	Type of analytical procedure			
	Identification	Testing for impurity		Assay dissolution (measurement only content/potency)
		Quantitative	Limit test	
Specificity	+	+	+	+
Linearity	-	+	-	+
Range	-	+	-	+
Trueness	-	+	-	+
Precision		+	-	+
- Repeatability	-	+	-	+
- Intermediate	-			
Limit of Detection	-	+	+	-
Limit of Quantitation	-	+	-	-

+ เป็นพารามิเตอร์ที่ต้องทดสอบ - เป็นพารามิเตอร์ที่ไม่ต้องทดสอบ

ในขั้นตอนการประเมินขนาดการตอบสนอง จำเป็นต้องใช้ค่าทางชีวเคมีต่าง ๆ ทางพิษวิทยาที่ได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของสารกับการตอบสนองของร่างกายดังรูปที่ 2

ในขั้นตอนนี้จะต้องเลือกค่า NOAEL (no-observed-adverse-effect level) หมายถึง ปริมาณของสารเคมีที่มากที่สุดที่ได้รับทุกวันแล้วไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษหรือผลเสียใด ๆ ต่อร่างกาย หรือใช้ค่า LOAEL (lowest-observed-adverse-effect level) หมายถึง ปริมาณของสารเคมีที่น้อยที่สุด ซึ่งได้รับทุกวันแล้วทำให้เกิดความเป็นพิษหรือ

ผลเสียต่อร่างกายอย่างใดอย่างหนึ่ง เช่น ภาวะไขมันคั่งในตับ (fatty liver) และน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นหรือลดลง ซึ่งค่า NOAEL หรือ LOAEL จะนำมาใช้คำนวณหาค่าอ้างอิง (reference dose; RfD) หรือ ค่า ADI การคำนวณ RfD หรือ ADI ได้จากสมการที่ 1 โดยทั่วไปค่า RfD หรือ ADI จะถูกกำหนดโดยกลุ่มคณะกรรมการระหว่างประเทศ เช่น กรณีของวัตถุเจือปนอาหาร ค่า ADI จะถูกกำหนดโดยคณะกรรมการผู้เชี่ยวชาญร่วมวัตถุเจือปนอาหาร หรือ Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)^{1,2}

$$\text{RfD หรือ ADI (mg/kg BW/day)} = \text{NOAEL}/(\text{UF} \times \text{MF})$$

สมการที่ 1

UF (uncertainty factor) เป็นค่าที่นำมาใช้เพื่อแก้ไขความไม่แน่นอน (uncertainty) ที่เกิดขึ้นจากการนำเอา NOAEL ในสัตว์ทดลองมาคำนวณหา RfD หรือ ADI สำหรับมนุษย์ โดยปกติ UF เท่ากับ 100 ซึ่ง UF ประกอบด้วย factor ย่อยได้แก่ ความแตกต่างระหว่างสัตว์กับมนุษย์ (interspecies) 10 เท่า และความแตกต่างระหว่างมนุษย์กับมนุษย์ 10 เท่า แต่ UF ที่ใช้ในการหารอาจเพิ่มอีก 10 เท่า ถ้าใช้ค่า LOAEL ในการคำนวณ RfD หรือ ADI และอาจจะมีค่า MF (modifying factor) ซึ่งเป็น factor ที่แสดงถึงความ

สมบูรณ์และความน่าเชื่อถือของข้อมูลที่น่ามาใช้ เช่น จำนวนสัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มที่ใช้ในการหา NOAEL รายละเอียดของการทดลองมีมากน้อยเพียงใด เช่น การตรวจทางพยาธิวิทยา (pathology) ทำให้ละเอียด ถูกต้องเพียงใด ข้อมูลเหล่านี้เป็นการแสดงความน่าเชื่อถือของผลการทดลอง MF มีค่าอยู่ระหว่าง > 0 ถึง 10 โดยปกติค่า default value ของ MF มีค่าเท่ากับ 1 แต่จะมีค่าอื่นได้ เช่น 2, 5 หรือ 10 ก็ขึ้นอยู่กับคุณภาพของข้อมูลและการพิจารณาและตัดสินใจของผู้เชี่ยวชาญบนพื้นฐานของข้อมูลที่มี^{1,2}

ตารางที่ 2. ช่วงเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของการวิเคราะห์ความเข้มข้น 100% ถึง 1 ppb⁸

Concentration	Recovery limit, % (Target mean recovery ranges)
100%	
10%	98-102
1%	97-103
0.1%	95-105
0.01% (100 µg/g, mg/kg, ppm)	90-107
10 µg/g (mg/kg, ppm)	
1 µg/g (mg/kg, ppm or = 1000 µg/kg, ppb)	80-110
100 µg/kg (ppb)	
10 µg/kg	60-115
1 µg/kg	40-120

อ้างอิงจาก AOAC, 2019

(3) การประเมินการได้รับสัมผัส (exposure assessment) เป็นการประเมินการได้รับสารเคมีจากทุกทาง (route) คือ การได้รับสารเคมีทางปากจากการหายใจ และดูดซึมผ่านผิวหนัง ซึ่งถือว่าเป็นขั้นตอนที่สำคัญขั้นตอนหนึ่งของการประเมินความเสี่ยง ทั้งนี้เพราะความเป็นพิษของ

สารเคมีจะไม่เกิดขึ้นถ้าไม่ได้รับสารนั้นเข้าสู่ร่างกาย และความรุนแรงของความเป็นพิษขึ้นอยู่กับปริมาณการได้รับสารนั้นเข้าสู่ร่างกาย^{1,2} ดังนั้นถ้าการประเมินปริมาณการได้รับสารมีความผิดพลาดจากความเป็นจริง การคำนวณความเสี่ยงก็就会有ความคลาดเคลื่อนสูง¹ ในบทความนี้จะเน้น

การประเมินการได้รับสัมผัสสารเคมีทางการบริโภคจากอาหารและเครื่องดื่ม ซึ่งดำเนินการโดยการสำรวจปริมาณอาหารที่บริโภคทั่วไปหรืออาหารเฉพาะกลุ่มที่อาจมีการปนเปื้อน หรือเจือปนด้วยสารที่สนใจว่ามีการบริโภคมากน้อยเพียงใด โดยใช้แบบสอบถามความถี่เชิงปริมาณ (semi-quantitative food frequency questionnaire) ร่วมกับคู่มือภาพของอาหารที่จะศึกษา และในการสำรวจการบริโภค ก็จะได้อัตราส่วนน้ำหนักตัวมาด้วย ในส่วนของความเข้มข้นของสารที่สนใจ อาจ

ได้มาจากการเก็บตัวอย่างอาหารนั้น ๆ มาวิเคราะห์หาปริมาณสารที่สนใจทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งวิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ต้องมีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี และการควบคุมคุณภาพ (quality assurance) เมื่อได้ข้อมูลปริมาณการบริโภค ข้อมูลความเข้มข้นของสารที่สนใจ และข้อมูลน้ำหนักตัว สามารถคำนวณค่าประมาณการได้รับสัมผัส (estimated daily intake; EDI) ตามสมการที่ 2

$$\text{EDI (mg/kg BW/day)} = \frac{[\text{ปริมาณอาหารที่บริโภค (g/day)} \times \text{ความเข้มข้นของสาร (mg/g)}]}{\text{น้ำหนักตัว (kg)}} \quad \text{สมการที่ 2}$$

(4) การอธิบายลักษณะความเสี่ยง (risk characterization) เป็นการเปรียบเทียบปริมาณของสารเคมีที่ได้รับจากการประเมินการได้รับสัมผัส (exposure assessment) ในขั้นตอนที่ 3 กับค่าอ้างอิงของการได้รับสัมผัสสารเคมีในระดับที่

ไม่เป็นอันตราย (health-based guidance value; HBGV) ซึ่งได้มาจากขั้นตอนที่ 2 (hazard characterization) เช่น ค่า ADI^{1,2}

Risk characterization ทำได้โดยการคำนวณหา hazard quotient (HQ) ได้จากสมการที่ 3

$$\text{HQ} = \text{EDI/ADI} \quad \text{สมการที่ 3}$$

โดย ค่า estimated daily intake (EDI) คือ ค่าประมาณการได้รับสัมผัส

ค่า acceptable daily intake (ADI) คือ ปริมาณสารที่บริโภคได้ตลอดช่วงอายุขัยโดยไม่เกิดอันตรายต่อสุขภาพ

การคำนวณความเสี่ยงโดยใช้ HQ นั้นเป็นการเปรียบเทียบปริมาณที่ได้รับสัมผัสกับ RfD หรือ ADI ซึ่ง ถ้า HQ มีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 1 หมายความว่า สถานการณ์การได้รับสารที่สนใจนั้นยังไม่รุนแรงจนเป็นอันตรายต่อสุขภาพ แต่ถ้า HQ มีค่ามากกว่า 1 หมายความว่าสถานการณ์การได้รับสารที่สนใจนั้นอาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพได้ ซึ่งข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้มีบทบาท

ดูแลด้านความปลอดภัยของผู้บริโภค เช่น ถ้าผลจากการประเมินการได้รับสัมผัสวัตถุเจือปนอาหาร พบว่าได้ค่า HQ มากกว่า 1 จำเป็นต้องมีการควบคุมดูแลหรือดำเนินการพิจารณาการปรับค่าปริมาณสูงสุด (maximum limit; ML) ของวัตถุเจือปนอาหารที่อนุญาตให้ใช้โดยพิจารณาที่กลุ่มอาหารที่พบว่าเป็นกลุ่มที่มีการบริโภคเป็นส่วนใหญ่ หรือ ปริมาณการบริโภคมากกว่า เป็นต้น^{1,2}

ดังที่กล่าวไปข้างต้นในส่วนของค่า ADI ที่ส่วนใหญ่มาจากข้อมูลการศึกษาจากสัตว์ทดลอง เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ของความเข้มข้น สารเคมีที่ให้กับสัตว์ทดลอง กับค่าการตอบสนอง เช่น ค่าระดับเอนไซม์ที่จะใช้ประเมินการทำงานของตับ ไต ซึ่งก็ต้องมีการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการเช่นกัน สำหรับการประเมินการได้รับสัมผัส ข้อมูลสำคัญที่ต้องใช้ในการคำนวณคือ ปริมาณอาหารที่บริโภคทั่วไปหรืออาหารเฉพาะกลุ่มที่สนใจ โดยมีหน่วยเป็นกรัม และ น้ำหนักตัวของผู้บริโภค มีหน่วยเป็นกิโลกรัม ซึ่งทั้งสองข้อมูลจะได้มาจากการสำรวจข้อมูลการบริโภค (consumption survey) ว่ามีการบริโภคมากน้อยเพียงใด ส่วนข้อมูลประเภทของอาหาร ไม่ว่าจะเป็นอาหารทั่วไป หรืออาหารเฉพาะกลุ่มก็จะได้มาจากการสำรวจการบริโภค ในส่วนของค่าความเข้มข้นที่จะใช้ในการคำนวณการได้รับสัมผัส อาจมาได้จากค่า maximum limit ที่อนุญาตให้ใช้ สำหรับประเทศไทยอ้างอิงปริมาณสูงสุดตามประกาศของกระทรวงสาธารณสุข แต่การที่จะได้ค่าความเข้มข้นของสารที่สนใจที่แท้จริง หรือใกล้เคียงความเป็นจริงมากที่สุด จำเป็นต้องได้จากการเก็บตัวอย่างอาหารนั้นมาวิเคราะห์หาปริมาณสารที่สนใจทางห้องปฏิบัติการเท่านั้น ซึ่งการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการเพื่อให้ได้ค่าความเข้มข้นของสารที่สนใจ ก็ต้องมาจากวิธีการวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือ มีความถูกต้อง แม่นยำในการวิเคราะห์ ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ที่จะใช้ เพื่อให้ทราบถึงความเข้มข้นของสารที่สนใจจะต้องผ่านการทดสอบความใช้ได้ของวิธี โดยทั่วไปวิธีวิเคราะห์หาปริมาณของสารที่สนใจอาจจะมีอยู่แล้ว แต่เครื่องมือที่ห้องปฏิบัติการ อุปกรณ์ต่าง ๆ

ชนิดของตัวอย่าง ช่วงของความเข้มข้น สารเคมีที่ใช้ อาจจะไม่เหมือนกับที่ระบุไว้ในวิธีวิเคราะห์ดังกล่าว รวมถึงผู้วิเคราะห์ที่เปลี่ยนไป ซึ่งห้องปฏิบัติการอาจต้องมาปรับเปลี่ยน คัดแปลงให้เข้ากับเครื่องมือ อุปกรณ์ของห้องปฏิบัติการ จึงต้องมีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (method validation)

เป็นกระบวนการที่ทำเพื่อยืนยันหรือพิสูจน์วิธีวิเคราะห์นั้น ๆ ว่ามีความเหมาะสมที่จะใช้ในการวิเคราะห์หาสารที่สนใจภายในขอบเขตการใช้งานที่ต้องการได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ เป็นที่น่าเชื่อถือเพียงพอหรือไม่ ช่วยให้ทราบถึงคุณสมบัติ เงื่อนไข หรือข้อจำกัดของวิธีการวิเคราะห์นั้น เพื่อความมั่นใจก่อนนำวิธีทดสอบนั้นมาใช้วิเคราะห์ตัวอย่าง คำนิยามของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ถูกกำหนดโดย 3 หน่วยงานคือ ISO 9000, ISO/IEC 17025 และ VIM (International Vocabulary of Metrology) นอกจากนี้ห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับการวิเคราะห์ ควรปฏิบัติตามข้อกำหนดทั่วไปว่าด้วยความสามารถของห้องปฏิบัติการทดสอบ และสอบเทียบ เป็นมาตรฐานสากลที่ช่วยเสริมสร้างความเชื่อมั่นในความสามารถในการทดสอบ โดยฉบับล่าสุดจะเป็นฉบับปี 2017⁴ ในบทความนี้จะบรรยายถึงคุณสมบัติของวิธีวิเคราะห์ที่เกี่ยวกับวิธีวิเคราะห์สารในกลุ่มสารปนเปื้อน (contaminants) และวัตถุเจือปนอาหาร (food additives) ซึ่งวิธีวิเคราะห์จะเกี่ยวข้องกับการใช้เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ เช่น Atomic Absorption Spectroscopy (AAS), Gas Chromatography (GC)

และ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เป็นต้น

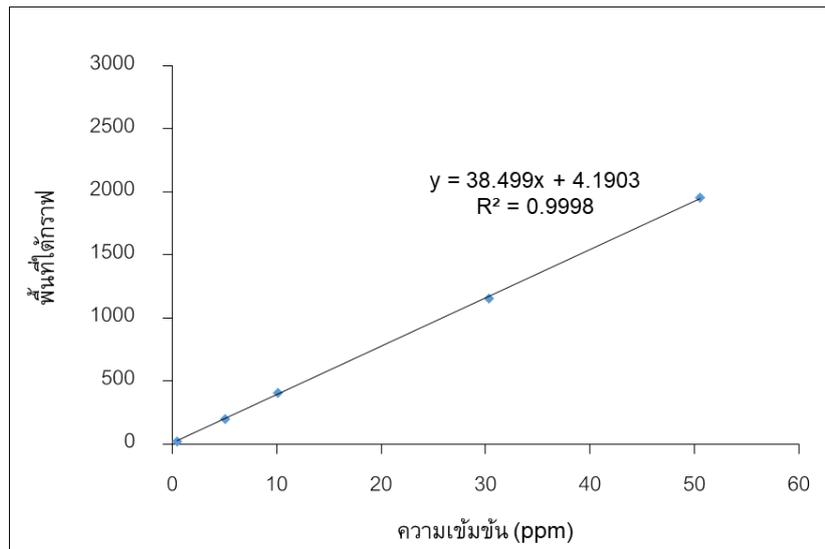
การประเมินความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ไม่จำเป็นต้องดำเนินการครบทุกหัวข้อ การจะดำเนินการหัวข้อใดบ้าง ขึ้นอยู่กับประเภทของวิธีวิเคราะห์ แนวทางการพิจารณาเลือกพารามิเตอร์ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตามแนวทาง ASEAN⁵ แสดงในตารางที่ 1

ในบทความนี้จะนำเสนอพารามิเตอร์ที่สำคัญในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี^{6,7} ครอบคลุมถึงคุณลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์ (method performance characteristics) ดังนี้

1. ความจำเพาะเจาะจง (specificity/selectivity) คือ ความสามารถของวิธีวิเคราะห์ในการจำแนกสารที่ต้องการวิเคราะห์ออกจากสารอื่นๆ โดยสารที่สนใจในการวิเคราะห์จะเป็นส่วนประกอบหนึ่งในตัวอย่างอาหาร รวมถึงอาจมีสารปนเปื้อน (impurities) สารที่เกิดจากการสลายตัว (degradants) และองค์ประกอบของตัวอย่าง (matrix) ความจำเพาะเจาะจงเป็นพารามิเตอร์ที่กำหนดให้ทดสอบสำหรับวิธีวิเคราะห์ทุกประเภท ซึ่งอาจดำเนินการโดยวิเคราะห์สารที่สนใจในตัวอย่างเทียบกับสารมาตรฐาน เช่น กรณีการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคการแยกสารผสมในสถานะของเหลวด้วยความดันสูง (high performance liquid chromatography; HPLC) โดยพิจารณาความแตกต่างของเวลาที่สารแต่ละชนิดเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งตรวจวัดได้ (retention time; RT) คำนวณเป็นร้อยละของความแตกต่างสัมพัทธ์ (relative percent difference; % RPD) โดยเกณฑ์

การยอมรับขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของตัวอย่างและความเข้มข้นของสารที่สนใจ

2. ความเป็นเส้นตรงและช่วงของการทดสอบ (linearity/range) คือการประเมินความเป็นเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารที่สนใจกับค่าสัญญาณของการวิเคราะห์จากเครื่องมือที่ใช้ (รูปที่ 3) เช่น ถ้าเป็นเครื่อง spectroscopy ค่าสัญญาณ คือ ค่า optical density หรือ ค่า OD ถ้าเป็นเครื่อง HPLC ค่าสัญญาณ คือ ค่าพื้นที่ใต้กราฟหรือค่า peak area เป็นต้น โดยต้องประเมินตลอดช่วง (range) ที่ระบุสำหรับการวิเคราะห์นั้น การศึกษา linearity อาจใช้สารละลายสารมาตรฐานโดยเตรียมความเข้มข้นเป็นชุดจากค่าน้อยไปค่ามาก หรือเตรียมจากสารมาตรฐานที่มีส่วนผสมขององค์ประกอบของตัวอย่าง เรียกว่าวิธีการเติมสารมาตรฐาน (standard addition method) ควรใช้ระดับความเข้มข้นอย่างน้อย 5 ระดับ การประเมิน linearity จะทำการประเมินโดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นในแกน X กับค่าการตอบสนอง เช่น ค่าการดูดกลืนแสง ค่าพื้นที่ใต้กราฟ ที่อยู่ในแกน Y จากนั้นสามารถหาสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ correlation coefficient (r) หรือ คำนวณหา regression line เป็นการหาความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง โดยวิธี least squares ที่จะมีค่า y-intercept, slope of the regression line และ residual sum of squares รวมทั้งกราฟแสดงที่ได้ ส่วนช่วงของการทดสอบ (range) คือช่วงระดับความเข้มข้นต่ำสุดและสูงสุดที่วิธีวิเคราะห์นั้นซึ่งจะดำเนินการควบคู่ไปกับค่า linearity



รูปที่ 3. กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารที่สนใจกับค่าสัญญาณของการวิเคราะห์จากเครื่องมือ

3. ความถูกต้อง (Trueness) และความเอนเอียง (bias) ถ้าความเอนเอียงน้อย และความเที่ยง (precision) ก็แสดงว่ามีความถูกต้องสูง หมายถึงวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์สามารถวัดค่าได้ใกล้เคียงกับค่าที่แท้จริงหรือค่าอ้างอิง ซึ่งในทางปฏิบัติจะประเมินได้จากค่าความเอนเอียงซึ่งสามารถทำได้โดย

3.1) วิเคราะห์วัสดุอ้างอิงที่ได้รับการรับรอง (certified reference material; CRM) สำหรับสารในกลุ่มของสารปนเปื้อน เช่น โลหะหนัก ดำเนินการวัดค่าใน CRM อย่างน้อย 7 ซ้ำ และนำค่าเฉลี่ยมาคำนวณหาระดับความถูกต้องในรูปของความเอนเอียงสัมพัทธ์ (relative bias) ตามสมการที่ 4

$$\text{ค่าความเอนเอียงสัมพัทธ์} = (\text{ค่าเฉลี่ยที่วิเคราะห์ได้} / \text{ค่าที่แท้จริง}) \times 100$$

สมการที่ 4

เกณฑ์การยอมรับโดยทั่วไปของค่าความเอนเอียงสัมพัทธ์ อยู่ระหว่าง 90-110 % หรือ 98-102 % ตาม AOAC, 2019⁸

การหาระดับความถูกต้องโดยการวิเคราะห์ CRM นอกจากพิจารณา จากค่า relative

bias ยังสามารถใช้ สถิติ t-test ในการเปรียบเทียบค่าที่วิเคราะห์ได้ (7 ซ้ำ) ของ CRM กับค่าที่แท้จริงของ CRM ทำได้โดยการเปรียบเทียบค่า t จากการคำนวณ กับค่า t จากตาราง (critical t-value; t_c) ตามสมการที่ 5

$$t \text{ จากการคำนวณ} = (\text{mean} - \mu) / (\text{SD} \times \sqrt{n})$$

สมการที่ 5

Mean = ค่าเฉลี่ยของ CRM ที่วิเคราะห์ได้

μ = ค่าที่แท้จริงของ CRM

SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation)

n = จำนวนครั้งที่ทำซ้ำ

ค่า t_c สามารถดูได้จากตาราง t - distribution ซึ่งค่า t_c ขึ้นอยู่กับระดับความเชื่อมั่น และ ค่า degree of freedom ($df = n-1$) มีหลักการในการพิจารณา คือ ถ้าค่า t ที่ได้จากการคำนวณมากกว่า t_c แสดงว่าค่าที่แท้จริงของ CRM กับค่าที่วิเคราะห์ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ถ้าค่า t ที่ได้จากการคำนวณมีค่าน้อยกว่า t_c แสดงว่าค่าที่แท้จริงของ CRM กับค่าที่วิเคราะห์ได้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

3.2) ในกรณีที่ไม่มี หรือไม่สามารถหา CRM ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ได้ สามารถประมาณค่าความเอนเอียงได้โดยการคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (% recovery) โดยนำตัวอย่างมาเติมสารมาตรฐาน (spiking of sample)

$$\% \text{ recovery} = \frac{[(\text{ค่าจากตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน}) - (\text{ค่าจากตัวอย่างที่ไม่เติม}) \times 100]}{\text{ค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติม}} \quad \text{สมการที่ 6}$$

4. ความเที่ยง (precision) เป็นอีกคุณลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์ ที่แสดงความใกล้เคียงกันระหว่างค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกันจากการทดสอบซ้ำหลาย ๆ ครั้ง ภายใต้เงื่อนไขที่ถูกระบุไว้ของการทดสอบ โดยค่าที่แสดงถึงค่าความเที่ยงในวิธีวิเคราะห์ต่าง ๆ นิยมใช้คำว่า การทวนซ้ำได้ของการวัด (repeatability) และ การทำซ้ำได้ของการวัด (reproducibility) ซึ่งเป็นค่าที่บ่งชี้ว่าการทดสอบมีความสม่ำเสมอเมื่อมีการทดสอบซ้ำหลาย ๆ ครั้ง โดยเงื่อนไขของการการวัดความเที่ยงแบ่งได้ 3 ระดับ

ซึ่งจะมีข้อจำกัดว่าความเอนเอียงที่ได้นั้นครอบคลุมเฉพาะ ขั้นตอนการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (spiked sample) เท่านั้น การทำ % recovery จะทำ 3 ระดับความเข้มข้น และอย่างน้อยความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ คำนวณได้ตามสมการที่ 6 และ เกณฑ์การยอมรับของ % recovery ขึ้นกับวิธีทดสอบตามมาตรฐานที่ระบุไว้รวมทั้งระดับของความเข้มข้นที่จะวัด เช่น เกณฑ์การยอมรับได้ของการคืนกลับตาม AOAC, 2019⁸ แสดงในตารางที่ 2 ยกตัวอย่างการวิเคราะห์หาระดับของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช โดยทั่วไปถ้ามีการเติมสารละลายมาตรฐานในระดับ 10 ng/g ถึง 50 ng/g จะมีช่วงการยอมรับของ % recovery อยู่ที่ 70-120 %⁹⁻¹¹

4.1) การทวนซ้ำได้ของการวัด (repeatability) เป็นสถานะการทดสอบที่ทำในสถานะเดิมทั้งหมด เป็นการวิเคราะห์ซ้ำที่ทำในสถานะเดียวกัน ทั้งวิธีดำเนินการวัดเดียวกัน ตัวอย่างชนิดเดียวกัน ผู้ปฏิบัติงานคนเดียวกัน ระบบวัดเดียวกัน ภาวะปฏิบัติงานเดียวกัน และสถานที่ปฏิบัติงานเดียวกัน และการวัดซ้ำหลาย ๆ ครั้ง ในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ เช่น 2 ถึง 3 วัน เป็นต้น

4.2) ความเที่ยงระดับกลางของการวัด (intermediate precision) คือการแสดงความเที่ยงของการวิเคราะห์ เป็นการวิเคราะห์ซ้ำ กับวัตถุเดิม หรือที่มีลักษณะคล้ายเดิม มีวิธีดำเนินการวัด

เดียวกันหรือระบบวัดเดียวกัน สถานที่ปฏิบัติงานเดียวกัน แต่ผู้ปฏิบัติงานอาจคนเดียวกันหรือเปลี่ยนผู้ปฏิบัติงาน เป็นการวิเคราะห์ต่างวันกันในช่วงระยะเวลาระยะหนึ่งที่ไม่สั้นจนเกินไป เพื่อให้ครอบคลุมการเปลี่ยนแปลงที่อาจเกิดขึ้นในสภาวะการทำงานจริง ข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้ควบคุมคุณภาพการทดสอบในระยะยาวของห้องปฏิบัติการได้

4.3) การทำซ้ำได้ของการวัด (reproducibility) คือการแสดงความเที่ยงของการวิเคราะห์ที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำ ๆ กับวัตถุเดิมหรือที่มีลักษณะคล้ายเดิมโดยใช้วิธีเดียวกัน ผู้วิเคราะห์ต่างกัน เครื่องมือคนละเครื่องกัน และดำเนินการในห้องปฏิบัติการคนละแห่งกัน

การวัดความเที่ยงจะถูกแสดงด้วยตัวเลขซึ่งบอกขนาดของความไม่เที่ยงหรือความคลาดเคลื่อน เช่น ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; s) ค่าความแปรปรวน (variance; s^2) หรือ สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation; CV) หรือค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation; RSD) ซึ่งเกี่ยวกับการความคลาดเคลื่อนแบบสุ่ม (random error) ภายใต้ง่อนไขที่ถูกระบุไว้ของการวัด

การหาระดับความแม่นยำหรือความเที่ยงสามารถดำเนินการไปพร้อม ๆ กับการหาความถูกต้อง โดยการวิเคราะห์ซ้ำใน certified reference material (CRM) รวมถึงการวิเคราะห์ซ้ำของตัวอย่างควบคุมที่เตรียมขึ้นมาเอง (in-house reference material) ก็ได้ ความเที่ยงก็เช่นเดียวกับความถูกต้องที่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร ดังนั้นจึงควรหาค่า %RSD ที่ความเข้มข้นหลาย

ระดับ (ระดับต่ำ กลาง และ สูง) เมื่อได้ค่า %RSD ของแต่ละระดับ อาจแสดงหรือระบุค่าความเที่ยงเป็น %RSD ที่ใหญ่ที่สุดเพียงค่าเดียวได้ (สมการที่ 7) ถ้าความแปรปรวนที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ไม่แตกต่างจากค่าความแปรปรวนที่ระดับความเข้มข้นสูงในช่วงของการใช้งาน (ทดสอบโดยใช้ F-test, S_1^2/S_2^2 , โดย ถ้า F จากการคำนวณน้อยกว่าค่า F จากตาราง แสดงว่าความแปรปรวนทั้งสองระดับความเข้มข้นไม่แตกต่างกัน)

$$\%RSD = (SD \times 100) \div \bar{X} \quad \text{สมการที่ 7}$$

RSD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

SD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

\bar{X} = ค่าเฉลี่ยของข้อมูลทั้งหมด

โดยการประเมินและยอมรับผลการตรวจสอบความใช้ได้ของความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ดำเนินการได้ดังนี้

1) ทำการทดสอบตัวอย่างซ้ำในช่วงความเข้มข้นที่ครอบคลุมช่วงการใช้งาน ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ (ไม่น้อยกว่า 7 ซ้ำ)

2) ทดสอบอย่างน้อย 3 ความเข้มข้น คือความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง หรือระดับความเข้มข้นที่ LOQ (ถ้ามีการหา LOQ) และ 0.5, 1.0 และ 1.5 เท่า (หรือ 2.0 เท่า) ของค่าความเข้มข้นที่กำหนด (target concentration)

3) คำนวณค่า standard deviation (s) และ relative standard deviation (RSD)

4) นำค่าที่ได้ไปเทียบกับเกณฑ์ที่กำหนดให้เลือกวิธีใดวิธีหนึ่ง ดังนี้

เกณฑ์การยอมรับที่ถูกกำหนดไว้ตามข้อกำหนดตามวิธีมาตรฐาน หรือคำแนะนำสำหรับการยอมรับ ดังตารางที่ 3

5. การหาค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ หรือ limit of detection (LOD) และ ขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณ หรือ limit of quantitation (LOQ) สามารถอธิบายเพิ่มเติมได้ว่า LOD หมายถึงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ใน

ตัวอย่างที่สามารถตรวจวัดได้ที่ความเชื่อมั่น 99% และ LOQ หมายถึงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่สามารถหาปริมาณ หรือ รายงานผลโดยมีความถูกต้อง และความแม่นยำที่ยอมรับได้

ตารางที่ 3. ค่าแนะนำสำหรับการยอมรับความเที่ยงของสารที่สนใจที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ⁸

ปริมาณสารที่สนใจ (%)	อัตราส่วนสารที่สนใจ	หน่วย	RSD (%)
100	1	100%	1.3
10	10 ⁻¹	10%	1.9
1	10 ⁻²	1%	2.7
0.1	10 ⁻³	0.1%	3.7
0.01	10 ⁻⁴	100 ppm	5.3
0.001	10 ⁻⁵	10 ppm	7.3
0.0001	10 ⁻⁶	1 ppm	11
0.00001	10 ⁻⁷	100 ppb	15
0.000001	10 ⁻⁸	10 ppb	21
0.0000001	10 ⁻⁹	1 ppb	30

5.1) การหาค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ หรือ limit of detection (LOD)

โดยทั่วไปการหาค่า LOD สามารถทำได้ หรือมีที่มาได้จาก 3 แบบ คือ แบบที่ 1 ทำการประเมินด้วยตา แบบที่ 2 อัตราส่วนของสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (signal to noise ratio; s/n) และแบบที่ 3 คำนวณจากจุดตัดบนแกน y ของกราฟเส้นตรงที่สร้างขึ้นระหว่างความเข้มข้นกับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณ (standard deviation of the response and slope) แต่ทั้ง 3 แบบข้างต้นจะกำหนดจากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการวิเคราะห์ ซึ่งโดยทั่วไปต้องมีการวิเคราะห์

7-10 ซ้ำการคำนวณ LOD สามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่

1. การคำนวณสัญญาณของตัวอย่างที่ไม่มีสารที่สนใจ (sample blank)

การที่จะใช้วิธีนี้ sample blank ต้องมีค่าที่อ่านได้จากเครื่องมือวัด หรือ based on signal-to-noise วิธีนี้สามารถใช้กับเทคนิคที่ให้ baseline noise เช่น เทคนิค HPLC โดยทำการเปรียบเทียบ signal ที่วัดได้จากตัวอย่างที่รู้ความเข้มข้นต่ำของสารที่วิเคราะห์ กับตัวอย่างที่เป็น blank โดย signal-to-noise ratio ที่ยอมรับคือ 3 หรือ 2 ต่อ 1 ความหมายคือ ค่าสัญญาณที่วัดได้ในตัวอย่างที่มี

ค่าต่ำ จะให้สัญญาณเป็น 3 หรือ 2 เท่า ของสัญญาณใน sample blank¹⁰ สูตรการคำนวณ LOD ตามสมการที่ 8

$$\text{LOD} = 3(S/N) \quad \text{สมการที่ 8}$$

การพิจารณา signal และ noise สามารถพิจารณาได้จากรูปที่ 4 โดย S คือ ความสูงของ signal และ N คือ ความสูงของ noise

2. การคำนวณจากสัญญาณจากตัวอย่างที่มีสารที่สนใจในปริมาณต่ำ

ในกรณีที่ตัวอย่างสามารถอ่านสัญญาณได้ สามารถใช้ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของสารที่จะวิเคราะห์ในระดับต่ำ วิเคราะห์จำนวน 7-10 ซ้ำ และคำนวณค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) สามารถคำนวณ LOD ได้จากสูตรในสมการที่ 9

$$\text{LOD} = \text{mean} + 3\text{SD} \quad \text{สมการที่ 9}$$

3. การคำนวณจากสัญญาณของ spiked sample blank

วิธีการนี้จะใช้ในกรณีที่ sample blank ไม่สามารถอ่านสัญญาณได้ จะทำโดยการเติมสารมาตรฐานลงใน sample blank โดยเติมที่ระดับต่ำสุดของความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน และทำการวิเคราะห์ spiked sample blank จำนวน 7-10 ซ้ำ และคำนวณค่า SD คำนวณค่า LOD จากสมการที่ 10

$$\text{LOD} = 3 \times \text{SD} \quad \text{สมการที่ 10}$$

4. การคำนวณจากจุดตัดของกราฟเส้นตรงที่ plot ระหว่างค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของ spiked sample กับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน สามารถทำได้โดย

- เติมสารมาตรฐานของสารที่สนใจลงในตัวอย่าง sample blank โดยทำหลายระดับหรือที่ระดับ ต่ำ กลาง และ สูง
- ทำการวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ย 7-10 ซ้ำ
- คำนวณหาค่า mean และ SD
- Plot กราฟระหว่าง mean (แกน X) และ SD (แกน Y) และลากเส้นตัดแกน Y โดยจุดตัดแกน Y คือค่า SD_0
- คำนวณค่า LOD จากสูตรตามสมการที่ 11

$$\text{LOD} = 3\text{SD}_0 \quad \text{สมการที่ 11}$$

5.2) การหาค่าขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณ หรือ limit of quantitation (LOQ)

การหาค่า LOQ สามารถดำเนินการได้ 2 ขั้นตอน คือ การหาค่า LOQ โดยการประมาณค่า และเพื่อการยืนยันค่า LOQ ที่มีความแม่นยำและความเที่ยงในระดับที่ยอมรับได้

1. การประมาณค่า LOQ จากการประมาณค่าจาก SD_0 สามารถคำนวณได้จากสมการที่ 12

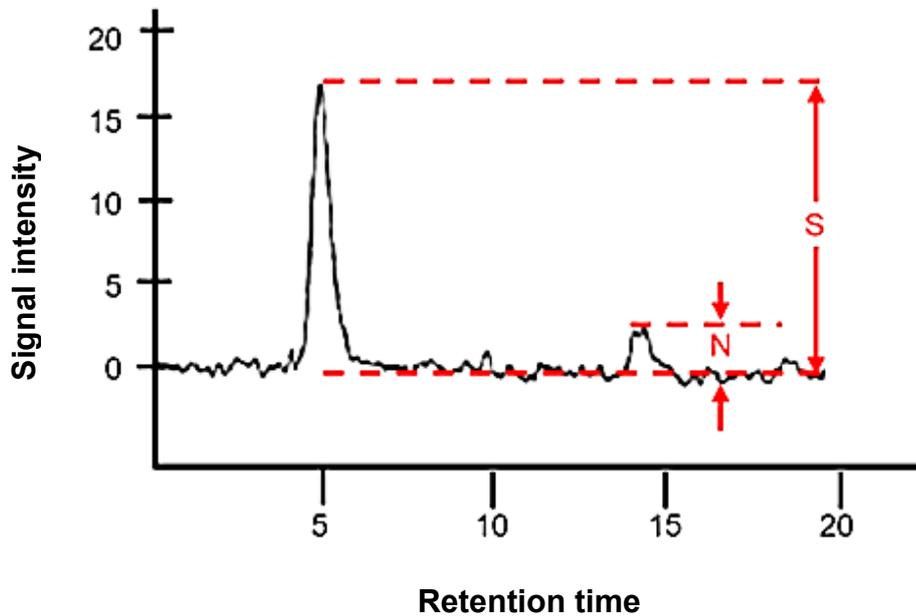
$$\text{LOQ} = 10\text{SD}_0 \quad \text{สมการที่ 12}$$

ตามสมการข้างต้น โดยทั่วไป Eurachem⁶ กำหนดค่าคงที่เท่ากับ 10 ซึ่งสอดคล้องกับ %RSD ที่มีค่าประมาณ 10 % แต่ค่าคงที่อาจเท่ากับ 5 หรือ 6 ขึ้นกับเกณฑ์การใช้งานในกรณี %RSD มีค่าประมาณ 20 % หรือ 17 % ตามลำดับ

2. การยืนยันค่า LOQ ที่มีความแม่นยำและความเที่ยงในระดับที่ยอมรับได้ ดำเนินการโดย

เตรียม spiked sample ให้มีความเข้มข้นเท่ากับค่าที่ระดับ LOQ หรือใกล้เคียง ทำการวิเคราะห์ 10 ซ้ำ คำนวณค่าความเข้มข้นเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบน

มาตรฐาน และประเมินการยอมรับของความแม่นยำและความเที่ยง ตามที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น



รูปที่ 4. ภาพตัวอย่าง signal และ noise ของสัญญาณที่วัดได้จากเครื่องมือ

การพิจารณาใช้ LOD และ/หรือ LOQ ในการประเมินความเสี่ยงการได้รับสารเคมีจากการบริโภคอาหาร

มีความแตกต่างที่สำคัญหลายประการในวิธีการวิเคราะห์ขึ้นอยู่กับว่าตัวอย่างอาหารถูกวิเคราะห์เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการประเมินการได้รับสัมผัส หรือถูกวิเคราะห์เพื่อใช้ในการกำหนดค่าปริมาณการตกค้างสูงสุด (maximum residue limits; MRLs) หรือ ปริมาณสูงสุดที่อนุญาตให้ใช้ (maximum level; MLs) ความไวหรือระดับต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้โดยวิธีการวิเคราะห์อาจแตกต่างกันตามวัตถุประสงค์การนำไปใช้ ซึ่งค่า LOD และ LOQ ได้ถูกนำมาใช้เป็นแนวทางในการคำนวณปริมาณการได้รับสัมผัส

โดยหลักการเพื่อให้การประเมินการได้รับสัมผัสสารเคมีจากการบริโภคอาหารได้อย่างถูกต้อง ค่า LOD หรือ LOQ ควรต่ำที่สุดเท่าที่จะวิเคราะห์ได้ในทางเทคนิค เพราะอาหารส่วนใหญ่จะไม่พบสารตกค้างในระดับที่ตรวจวัดได้ และค่าที่กำหนดให้กับสารเคมีในตัวอย่างอาหารเหล่านั้นจะส่งผลต่อการประมาณการได้รับสัมผัส^{1,12}

ผลวิเคราะห์ที่ตรวจไม่พบ (not detected; ND หรือ not quantified; NQ) หรือ หน่วยงานความปลอดภัยด้านอาหารแห่งสหภาพยุโรป (European Food Safety Authority: EFSA) เรียกข้อมูลนี้ว่า left-censored data ซึ่งมีความสำคัญต่อการประมาณการได้รับสัมผัส อย่างไรก็ตามไม่มีแนวปฏิบัติสากลเกี่ยวกับการรายงานค่า LOD และ

LOQ ดังนั้นการรายงานผลที่ LOD หรือ LOQ ไม่สอดคล้องกัน อาจทำให้เกิดความแตกต่างกันของค่าที่ควรกำหนดเป็นตัวเลขสำหรับผลวิเคราะห์ที่ตรวจไม่พบสำหรับใช้ในการประมาณการได้รับสัมผัส ผู้ประเมินความเสี่ยงควรสันนิษฐานว่าสารเคมีในตัวอย่างอาหารที่ระดับตรวจไม่พบ อาจมีสารเคมีต่ำกว่า LOD หรือ LOQ และควรกำหนดว่าจะใช้ค่าใด เว้นแต่ในบางกรณีที่สมมติฐานว่าอาหารอาจไม่มีการปนเปื้อนของสารที่สนใจ ยกตัวอย่างเช่น อาหารที่มีการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ไม่ได้ขึ้นทะเบียน หรือ ใช้วัตถุเจือปนอาหารที่ไม่ได้รับการอนุญาต หรือ อาหารที่ผ่านกระบวนการแปรรูปจนทำให้สารเคมีถูกกำจัดออกไปหมด¹³

วิธีการกำหนดค่าของผลวิเคราะห์ที่ตรวจไม่พบ ถูกจำแนกเป็น 4 ประเภท ได้แก่ วิธีการแทนค่า (substitution method) วิธีการคำนวณการถดถอยแบบ log-probit (log-probit regression method) วิธีการประมาณความน่าจะเป็นสูงสุด (maximum likelihood estimation method) และวิธีการคำนวณข้อมูลการแจกแจงแบบไม่ปกติ (non-parametric method) ซึ่งวิธีการแทนค่า เป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุดและใช้เป็นหลักสำหรับการประเมินการได้รับสัมผัส อย่างไรก็ตามอาจมีข้อจำกัดในเรื่องของการคำนวณเปอร์เซ็นต์ไทล์และการประยุกต์ใช้เทคนิคทางสถิติพื้นฐาน วิธีการแทนค่าที่นิยมใช้โดยทั่วไป มี 3 รูปแบบ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่นำมาประเมินการได้รับสัมผัสครอบคลุมค่า LOD และ LOQ ที่แตกต่างกัน¹³ ได้แก่

1) ค่าต่ำ (lower-bound) คือ ผลวิเคราะห์ที่มีค่าต่ำกว่า LOD และต่ำกว่า LOQ จะถูกแทนค่าด้วย “0”

2) ค่ากลาง (middle-bound) คือ ผลวิเคราะห์ที่มีค่าต่ำกว่า LOD จะถูกแทนค่าด้วย “1/2 LOD” หรือ ผลวิเคราะห์ที่มีค่าต่ำกว่า LOQ จะถูกแทนค่าด้วย “1/2 LOQ”

3) ค่าสูง (upper-bound) คือ ผลวิเคราะห์ที่มีค่าต่ำกว่า LOD แทนค่าด้วย “LOD” หรือ ผลวิเคราะห์ที่มีค่าต่ำกว่า LOQ แทนค่าด้วย “LOQ”

การใช้ค่าต่ำ (lower-bound) และค่าสูง (upper-bound) โดยทั่วไปถูกใช้สำหรับสารเคมีที่ส่วนใหญ่ถูกพบในอาหาร เช่น สารปนเปื้อนที่มีอยู่ตามธรรมชาติ สารอาหาร และสารพิษจากเชื้อรา ควรนำทั้งค่าต่ำและสูงมาคำนวณค่าเฉลี่ยของสารเคมีในอาหาร ส่วนการกำหนดค่ากลาง (1/2 LOD หรือ 1/2 LOQ) มีข้อจำกัดคือ ถ้าจำนวนตัวอย่างที่ตรวจไม่พบมีปริมาณมาก การกำหนดในลักษณะนี้อาจทำให้การคำนวณค่าเฉลี่ยและความแปรปรวนคลาดเคลื่อนไป ดังนั้นการใช้ค่ามัธยฐาน (median) ที่ได้จากชุดข้อมูลที่ตัวอย่างมากกว่า 50% มีค่าต่ำกว่า LOD หรือ LOQ จะเป็นตัวแทนของชุดข้อมูลได้ดีกว่าค่าเฉลี่ย นอกจากนี้มีข้อเสนอแนะแนวปฏิบัติการพิจารณาคำหนดค่าผลวิเคราะห์ที่ตรวจไม่พบในกรณีต่างๆ ยกตัวอย่างเช่น คณะผู้เชี่ยวชาญโครงการ GEMS/Food ของสหภาพยุโรปเสนอว่าถ้าผลวิเคราะห์ตัวอย่างน้อยกว่า 60% มีค่าต่ำกว่าค่า LOD หรือ LOQ ให้แทนด้วยค่ากลางที่สมเหตุสมผล คือ 1/2 LOD หรือ 1/2 LOQ และมีข้อเสนอแนะว่าควรมีการพิจารณาใช้ค่ากลาง (1/2

LOD หรือ 1/2 LOQ) หากตัวอย่างมากกว่า 10-15% แต่ไม่เกิน 50% มีค่าต่ำกว่าค่า LOD หรือ LOQ^{1,13} โดยทั่วไปเมื่อชุดข้อมูลมีตัวอย่างจำนวนมากที่ผลวิเคราะห์ต่ำกว่า LOD หรือ LOQ มีข้อเสนอแนะให้ทำการประเมินการได้รับสัมผัสโดยเริ่มจากวิธีการแทนค่าต่ำ (lower-bound) และค่าสูง (upper-bound) จากนั้นประเมินว่าปริมาณการได้รับสัมผัสเปลี่ยนแปลงไปอย่างไร ซึ่งความคลาดเคลื่อนจะสูงขึ้นสำหรับวิธีวิเคราะห์ที่มีความไวต่ำ หรือ มีค่า LOD สูง¹³⁻¹⁶

ในกรณีที่ทำการประเมินการได้รับสัมผัสสารเคมีชนิดกลุ่มที่มีโครงสร้างคล้ายกัน¹ เช่น ไดออกซิน ซึ่งมีหลายอนุพันธ์ การแทนค่าตัวเลขสำหรับผลวิเคราะห์ที่ตรวจไม่พบต้องมีความระมัดระวัง เนื่องจากค่า LOD หรือ LOQ ของสารชนิดกลุ่มมีหลายค่า การที่จะนำความเข้มข้นของแต่ละอนุพันธ์มารวมกันต้องมีการคำนวณกลับโดยคูณค่าปัจจัยเฉพาะก่อน ซึ่งโดยทั่วไปจะเรียกว่าค่าปัจจัยสมมูล (equivalent factor) เพื่อไม่ให้ผลการประเมินการได้รับสัมผัสมีค่าสูงกว่าความเป็นจริง

บทสรุป

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบเป็นขั้นตอนที่สำคัญและมีความจำเป็นมากในการประเมินความเสี่ยงการได้รับสารเคมีจากการบริโภคอาหาร โดยเฉพาะในขั้นตอนการแสดงลักษณะของอันตราย (hazard characterization) และการประเมินการได้รับสัมผัส ดังนั้นผู้ประเมินความเสี่ยงควรพิจารณาทบทวนความเหมาะสมและคุณลักษณะเฉพาะของวิธีทดสอบต่างๆ เช่น ความถูกต้อง ความแม่นยำ ช่วงการวัด และความ

เป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณ (LOQ) รวมถึงเลือกแนวปฏิบัติที่เหมาะสมในการประมาณการได้รับสัมผัสโดยการแทนค่าผลวิเคราะห์ที่ตรวจไม่พบด้วยค่าต่ำ (lower-bound) ค่ากลาง (middle-bound) หรือ ค่าสูง (upper-bound) ในกรณีต่างๆ ซึ่งอาจขึ้นอยู่กับธรรมชาติของสารเคมีที่พบในอาหาร เพื่อให้การประเมินความเสี่ยงครอบคลุม มีความถูกต้อง และมีความน่าเชื่อถือ เพื่อประโยชน์ในการออกมาตรการจัดการความเสี่ยงที่เหมาะสมสำหรับคุ้มครองสุขภาพผู้บริโภค

กิตติกรรมประกาศ

-

ผลประโยชน์ทับซ้อน

คณะผู้นิพนธ์ขอยืนยันว่าไม่มีผลประโยชน์ทับซ้อนใดๆ

เอกสารอ้างอิง

1. FAO/WHO. Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food. Environmental Health Criteria 240, 2009. Available at <https://www.who.int/publications/i/item/9789241572408>, accessed on Mar 9, 2022.
2. สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2548. หลักการทำงานในการวิเคราะห์ความเสี่ยง (working principles for risk analysis). ราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศทั่วไป เล่ม 122 ตอนที่ 122 ง วันที่ 22 ธันวาคม พุทธศักราช 2548.
3. FAO/WHO. Working principles for risk analysis for application in the framework of the Codex Alimentarius. In: Codex Alimentarius

- Commission: procedural manual. 14th ed. Joint FAO/WHO Food Standards Programme, 2004, 101- 7.
4. ISO/IEC 17025: General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. International Organization for Standardization and International Electrotechnical Commission. Geneva. 2017. 30 p.
 5. ASEAN. Technical guidelines to ACTR on quality: ASEAN analytical validation guideline, 1996. Available at <https://asean.org/wp-content/uploads/2012/10/Asean-Analytical-Validation-gl.pdf>, accessed on Apr 20, 2022.
 6. Magnusson B, and Örnemark U. Eurachem guide: the fitness for purpose of analytical methods – a laboratory guide to method validation and related topics. 2nd ed., 2014. Available at https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf, accessed on Feb 5, 2022.
 7. ICH. Harmonised tripartite guideline validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1), 2005. Available at <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>, accessed on Apr 20, 2022.
 8. AOAC: Official methods of analysis of the association of official analytical chemists: official methods of analysis of AOAC international, 21st ed. Washington DC., 2019.
 9. European Commission. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. Document No. SANTE/11813/2017, 2017. 42 p.
 10. Huber L. Validation and qualification in analytical laboratories, 2nd ed. Informa Healthcare, 2007. 288 p.
 11. AOAC. Peer-verified methods program, manual on policies and procedures. AOAC International, Rockville, 1998.
 12. Wenzl T, Headrich J, Schaechtele A, et al. Guidance document on the estimation of LOD and LOQ for measurements in the field of contaminants in feed and food. European Union Reference Laboratory 2016: 9-11. Available at <https://data.europa.eu/doi/10.2787/8931>, accessed on May 4, 2022.
 13. EFSA. Management of left-censored data in dietary exposure assessment of chemical substances. EFSA Journal 2010; 8: 1557 Available at <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2010.1557>, accessed on Mar 27, 2022.
 14. WHO. Second workshop on reliable evaluation of low-level contamination of food. Report on a workshop in the frame of GEMS/Food-EURO, GEMS/Food-EURO. World Health Organization Regional Office for Europe, Kulmbach, Rome. 1995.
 15. Helsel DR. Less than obvious-statistical treatment of data below the detection limit. Environ Sci Technol 1990; 24: 1766-74.
 16. International Life Science Institute (ILSI). Aggregate exposure assessment. Washington DC, International Life Sciences Institute Research Foundation, Risk Science Institute, 1998. 215 p.