

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวัดทางเคมี

Analytical Method Validation

(Single Laboratory Validation)



Course outline



- ความสำคัญของ **method validation** และนิยามศัพท์ต่างๆ
- ทำไมต้องทำ **method validation**?
- เมื่อไหร่ต้องทำ **method validation**?
- สถิติพื้นฐานที่ใช้สำหรับ **method validation**
- **Key performance characteristics** ที่สำคัญสำหรับการทำ **method validation**

Measurement in Chemistry



- การวัดทางเคมีคือการวัดสารที่สนใจที่อยู่ในตัวกลางต่างๆ Chemical analytical measurements are about measuring “something” in “something”

- ระบุและนับปริมาณของสิ่งที่เจตนาวัด (Identifying and counting)
- ปริมาณของสารที่จำเพาะนั้น มีอยู่เท่าไรในตัวกลางต่างๆ

How much there is of a specified substance (chemical element, molecular species) in a simple, complex or very complex material (water, sediment, soil, blood)

- การวัดคือกระบวนการกระทำซึ่งมีจุดประสงค์เพื่อหาปริมาณ

Measurement is set of operations having the object of determining a value of a quantity

- ผลการที่ได้จากการวัดประกอบด้วยตัวเลขและหน่วยรวมทั้งค่าความไม่แน่นอน

Number and its unit including an uncertainty

Measurement in Chemistry



ISO/IEC 17025 Clause 5.4.2

ห้องปฏิบัติการต้องเลือกใช้วิธีการทดสอบที่ดีที่สุดพิมพ์ในมาตรฐานระหว่างประเทศ ระดับภูมิภาค หรือระดับประเทศก่อน

Method published in international, regional or national standards shall preferably be used

ISO/IEC 17025 Clause 5.4.4

กรณีที่ต้องใช้วิธีทดสอบซึ่งไม่ครอบคลุมตามวิธีมาตรฐาน วิธีดังกล่าวต้องได้รับการตรวจสอบความใช้ได้ตามความเหมาะสมก่อนนำไปใช้

The method developed shall have been **validated** appropriately before use

Measurement in Chemistry



สมมติ

- ผู้วิเคราะห์ได้รับการฝึกอบรมจนมีความสามารถในการทำการทดสอบตัวอย่างทางธรณีวิทยาและเครื่องมือทุกเครื่องได้รับการ **calibrated** ด้วยมาตรฐานที่มี **metrological traceability**
- มีการทำการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องมือ (**performance test**)
- นักวิเคราะห์สามารถทำการทดสอบตัวอย่างหินได้ในการวิเคราะห์ประจำวัน (**routine analysis of rock sample**)

Measurement in Chemistry



- แต่ลูกค้าได้ส่งตัวอย่างชนิดใหม่ซึ่งเป็นวัสดุที่ได้จากโรงงาน recycle (a new material from a mineral recycling plant) เพื่อให้ทำการทดสอบ โดยลูกค้าต้องการค่า trueness สูงๆและกำหนด LOD (high level of trueness and the detection limit)
- นักวิเคราะห์ต้องทำอะไรเพื่อที่จะให้สามารถทดสอบตัวอย่างชนิดใหม่นี้ได้

Measurement in Chemistry



- จะมีข้อผิดพลาดอะไรเกิดขึ้นได้บ้าง

- สิ่งที่ต้องการจะวัดอาจไม่สามารถวัดได้

What you expected to measure may not be measuring

- อาจมีการรบกวนการวัดจากสารตัวอื่นๆ

Measurement of the target measurand may be interfered by unknown substances

- การวัดในช่วงที่เราสนใจอาจไม่เป็นแบบเชิงเส้น

The response of the measurement may not be linear within the given range

- อาจไม่สามารถหาสารอ้างอิงที่เหมาะสมได้

The suitable reference material may not be available

Measurement in Chemistry



- สิ่งที่มาคือ:

- ไม่สามารถได้ผลการวัดที่ต้องการเพราะเครื่องมือที่มีไม่เหมาะสมกับตัวอย่างใหม่

หรือ

- ได้ผลการวัดแต่ไม่ตรงตามสมมติฐานของลูกค้า

หรือ

- ต้องใช้วิธีการที่ซับซ้อนมากขึ้น มีค่าใช้จ่ายและใช้เวลามากขึ้น

Employ more complicated methodologies, increasing cost and time

Measurement in Chemistry



- จะต้องทำอย่างไร?

- นักวิเคราะห์ที่มีความสามารถและเครื่องมือได้รับการ **calibrated** เพียงพอที่จะทำให้เกิดความเชื่อมั่นต่อผลการวิเคราะห์ได้หรือไม่

Are trained and qualified analyst, calibrated and verified instrument sufficient contribution to trust on the outcome?

- ได้มีการตรวจสอบว่าวิธีทดสอบที่ใช้ให้ผลการทดสอบที่น่าเชื่อถือหรือนั่นก็คือ คุณ ได้ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบหรือยัง

check if the method give you results that can be trusted

Denote:

“Method Validation”

Definition



‘**Validation** is the confirmation by examination and provision of objective evidence that the particular requirements for a specific intended use **are fulfilled**’

การ**ตรวจสอบ**ความใช้ได้คือการยืนยัน โดยการตรวจสอบและจัดทำหลักฐานที่เป็นรูปธรรมเพื่อแสดงว่ากำหนดพิเศษโดยเฉพาะต่างๆ สำหรับการใช้ตามที่ตั้งใจไว้โดยเฉพาะ สามารถบรรลุผลได้ครบถ้วน (คู่มือประกอบการประเมินตาม มอก. 17025-2548)

ISO/IEC 17025 clause 5.4.5.1

Validation



Validation ประกอบด้วยกระบวนการตรวจสอบเพื่อดูว่า

- วิธีทดสอบที่ใช้ให้ผลตอบสนองต่อสารที่ต้องการทดสอบอย่างไร

How your method will respond if you are going to analyze samples of a certain type

- วิธีทดสอบที่ใช้ นั้นสามารถให้ผลการทดสอบที่ค่า **trueness**, **detection limits** และ **uncertainty** ตามที่ต้องการ

If your method is capable to give you results of the request level of trueness, detection limits and uncertainty

- ความสัมพันธ์ของปริมาณสารกับการตอบสนองของเครื่องมือเป็นแบบเชิงเส้น

The linearity of the response of your instrument

Validation



การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบจะบอกให้ทราบว่าวิธีทดสอบจะตอบสนองต่อตัวอย่างของเราอย่างไรภายใต้สภาวะการทดลองและเครื่องมือที่มีอยู่

Validation tells you how the method you are going to use, under your experimental conditions, with your instruments and for your samples will respond

วิธีทดสอบที่เลือกใช้นั้นไม่จำเป็นต้องเป็นวิธีที่ให้ผลการทดสอบที่ดีที่สุดแต่จะต้องให้ผลการทดสอบที่ตรงตามวัตถุประสงค์การใช้งานของลูกค้า

This is not necessarily the best in the world

But it should be fit for the intended purpose of the customer

Definition



‘**Verification** is the confirmation by examination and provision of evidence that specified requirements **have been met**’

การ**ทวนสอบ**ความใช้ได้ของวิธีเพื่อยืนยันความเป็นไปตามข้อกำหนดที่ระบุไว้ใน
วิธีทดสอบ

ISO/IEC 17025

Why is Method Validation Necessary?



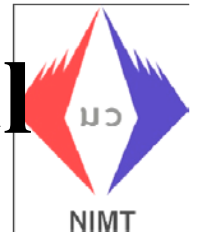
Importance of analytical measurement

- Trading, supporting healthcare, checking the quality of products
- The cost of carrying out the measurements is high and additional costs arise from decisions made on the basis of the results

The professional duty of the analytical chemist

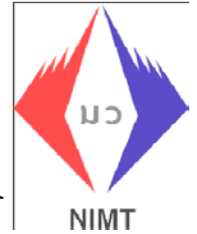
- Method validation enables chemists to demonstrate that a method is “fit for purpose”
- An analytical result must be sufficiently reliable that any decision based on it can be taken with confidence
- Most of information required for evaluate uncertainty can be obtained during validation of the method

Six Principles of Valid Analytical Measurement (VAM)



- ทำตามความต้องการของลูกค้า (Work to an agreed customer requirement)
- ใช้วิธีทดสอบที่ได้รับการตรวจสอบความใช้ได้และใช้เครื่องมือที่ผ่านการ **calibrated** แล้ว (Use validated methods and calibrated equipment)
- ผู้วิเคราะห์มีความสามารถพอเพียง (Staff are qualified and competent)
- มีการเข้าร่วมการประเมินความสามารถเชิงเทคนิค (Participate in independent assessments of technical performance)
- มีระบบประกันคุณภาพและการควบคุมคุณภาพที่ดี (Use sound quality assurance and quality control practices)
- ผลการวัดสามารถเปรียบเทียบกับผลของแลปอื่นๆ นั่นคือผลการวัดมี **metrological traceability** (Ensure comparability with measurements made in other laboratories)

Implication of Method Validation



- Documented evidence
มีการบันทึกหลักฐานเป็นเอกสาร
- High degree of assurance
มีการใช้การประกันคุณภาพ
- Specific process
มีกระบวนการที่ชัดเจน
- Consistently
มีความคงที่
- Predetermined specifications
มีข้อกำหนดที่ได้ระบุไว้แล้ว

Publications on Validation



- IUPAC Technical Report (2002) (International Union of Pure and Applied Chemistry)
- NATA Technical Note 17 (National Association of Testing Authorities)
- ICH Guidelines (2005) (International Conference on Harmonization)
- Joint FAO / WHO Food Standards Programme (Food and Agriculture Organization, World Health Organization)
- USFDA Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry (2001) (Food and Drug Administration)

When is Method Validation Necessary?



ต้องทำการ validate เมื่อ

- วิธีการทดสอบที่ไม่ใช่วิธีมาตรฐาน (Non-standard methods)
- วิธีการทดสอบที่ห้องปฏิบัติการพัฒนาขึ้นเอง (Laboratory-designed/develop methods)
- การใช้วิธีมาตรฐานแต่ใช้นอกขอบข่ายที่กำหนด (Standard methods used outside of their intended scope)
- การขยายและดัดแปลงวิธีมาตรฐาน (Amplifications and modifications of standard methods)

When is Method Validation Necessary?



เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงบางอย่างกับวิธีการทดสอบที่ไม่ใช่วิธีมาตรฐานที่ได้รับการ validated แล้ว (validated non-standard methods):

- ต้องทำการบันทึกเป็นหลักฐาน

The influence of such changes should be documented

- อาจต้องทำการ **validate** ใหม่ตามความเหมาะสม หากพบว่าการเปลี่ยนแปลงส่งผลกระทบต่อผลการทดลอง

A new validation should be carried out, if appropriate

ISO/IEC 17025 clause 5.4.5.2, Note 3

When is Method Validation Necessary?



การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีจำเป็นเมื่อมีการขยายขอบข่ายของวิธี (extension of methods) เช่น :

- วิเคราะห์สารตัวใหม่ (New analytes)
- วิเคราะห์สารในตัวอย่างใหม่ (New matrices)
- วิเคราะห์สารที่ระดับความเข้มข้นต่ำมากๆ (Much lower concentrations)
- ใช้ปริมาณตัวอย่างน้อยมากๆ (Much smaller test portions)
- แลปอื่นๆ นำวิธีดังกล่าวไปใช้ (Use of the method in other labs)

When is Method Validation Necessary?



ถึงแม้จะมีการเปลี่ยนแปลงวิธีวัดเพียงเล็กน้อยก็จำเป็นต้องทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี โดยเริ่มจาก

- ทำการทวนสอบประสิทธิภาพของวิธี (performance verification)
- เมื่อผลการทำ performance verification ไม่น่าพอใจ อาจจำเป็นต้องทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีอีกครั้ง (re-validation)

AOAC/FAO/IAEA/IUPAC

When is Method Validation Necessary?



ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงต่อไปนี้ ต้องทำ method validation

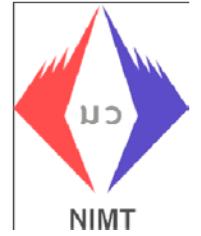
- เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสถานะของวิธี ต้องทำการ re-validate ส่วนที่ได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลง

When method conditions are changed, the affected part of the method must be re-validate

- การเปลี่ยนแปลงเครื่องมือพื้นฐาน ไม่จำเป็นต้องทำการ validate ใหม่

Replacement of the basic equipment does not require validation

- หลังการเปลี่ยนเครื่องมือหลักต้องทำ system suitability checks ซึ่งผลที่ได้จะบ่งบอกว่าต้องทำการ re-validation หรือไม่



Workshop: When is method validation necessary?

แลป A ได้รับการร้องขอให้พัฒนาวิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณยาฆ่าแมลงที่ตกค้างในดินด้วยเทคนิค GC-MS

หมายเหตุ ไม่มีวิธีมาตรฐานที่เหมาะสม

แลป A ต้องทำการ validate วิธีทดสอบหรือไม่ ทำไม?



Workshop: When is method validation necessary?

แลป B ได้รับตัวอย่างมะเขือเทศเพื่อวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงที่ตกค้าง แต่แลป
ตัดสินใจจะใช้วิธีวิเคราะห์เดียวกับวิธีที่ใช้กับตัวอย่างแตงกวา

แลป B ต้องทำการ validate วิธีทดสอบหรือไม่ ทำไม?



Workshop: When is method validation necessary?

แลป C ใช้ AOAC method ในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในโยเกิร์ต
หมายเหตุ วิธีวิเคราะห์ดังกล่าวอยู่ในระหว่างการทำ collaborative trial

แลป C ต้องทำการ validate วิธีทดสอบหรือไม่ ทำไม?

Workshop: When is method validation necessary?



แลป D ได้มีการดัดแปลงวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสาร organochlorine ที่ตกค้างในเนื้อ เพื่อให้เหมาะสมกับเครื่องมือที่มีอยู่ ซึ่งวิธีดังกล่าวได้รับการพัฒนาโดยสถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติ

แลป D ต้องทำการ validate วิธีทดสอบหรือไม่ ทำไม?

Summary



เมื่อไหร่ต้องทำการ **validate/revalidate** วิธีทดสอบ?

- วิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ (*New method developed for particular problem*)
- วิธีที่มีอยู่เดิมแต่ทำการปรับปรุงหรือขยายขอบเขต (*Established method revised to incorporate improvements or extended to a new problem*)
- เมื่อผลจากการทำการควบคุมคุณภาพแสดงให้เห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น (When quality control indicates and established method is changing with time)
- วิธีทดสอบนั้นๆ ได้ถูกนำไปใช้ในแลปอื่น นักวิเคราะห์คนอื่นหรือเครื่องมือที่ใช้แตกต่างออกไปจากเดิม (Established method used in a different laboratory, or with different analyst or different instrumentation)
- เพื่อแสดงให้เห็นถึงความเท่าเทียมกันของวิธีสองวิธี (To demonstrate the equivalence between two methods)
- มีการเปลี่ยนแปลงเครื่องมือหลัก (Major instruments replaced)
- ใช้สารมาตรฐานต่าง batch กัน (New batches of standards)
- เมื่อนำวิธีทดสอบเก่าๆ ที่ได้รับการตรวจสอบความใช้ได้มาใช้อีกครั้ง (Used of validated method after out-of use for a long time)



Basic Statistics Used in Method Validation

สถิติขั้นพื้นฐานที่ใช้ในการทดสอบความใช้ได้ของวิธี

Analytical problems answered by statistics



- How good is a set of analytical data?
- Do the data obtained from the two methods equivalent? Is one method more precise than the other?
- All the values in a set of data appear to be consistent except one, should it be included or discarded?
- From data it appears that measurement Y varies with factor X , are they linearly related?

Statistical Terms



Term	Population parameter	Sample statistic
Mean (ค่าเฉลี่ย)	μ	\bar{x}
Standard deviation (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)	$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \mu)^2}{n}}$	$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$
Variance(ค่าความแปรปรวน)	σ^2	s^2
Relative standard deviation (RSD) or coefficient of variance (CV)	σ / μ	s / \bar{x}

Note that the coefficient of variation is RSD expressed as a %

Outliers-single points Grubbs' test

การทดสอบ outliers



If data is normally distributed:

-Calculate **mean** and **standard deviation** of data set (including suspect value)

-Calculate **G**

-Test G against $G_{n,0.05}$ from tables

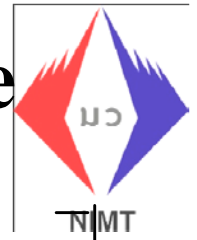
-If $G > G_{n,0.05}$ **reject** suspect point

-If $G < G_{n,0.05}$ **retain** suspect point

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

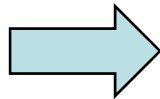
n	$G_{n,0.05}$
3	1.15
4	1.48
5	1.72
6	1.89
7	2.02
8	2.13
9	2.22
10	2.29
12	2.41
14	2.51
16	2.59

Outliers-single points Grubbs' test: Example



NaCl in mg/L n=16

112	112
150	117
136	120
117	122
132	127
120	130
146	132
139	133
133	133
133	134
122	136
130	139
160	143
143	146
127	150
134	160



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

Mean, $\bar{x} = 133.38$ mg/L

Standard deviation, $s = 12.55$ mg/L

$$G = \frac{|160 - 133.38|}{12.55}$$

$$G = 2.12$$

$$G_{16,0.05} = 2.59$$

$$G < G_{16,0.05}$$

Therefore **retain** the point!

Confidence Interval



- A replicate sample analysis will give a mean value of the result
- The confidence interval from analysis of a sample is a range within which the true value for the “entire population”, μ , is reasonably assumed to be found.
- The relationship to the experimentally determined mean, \bar{x} , with standard deviation, s , is:

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

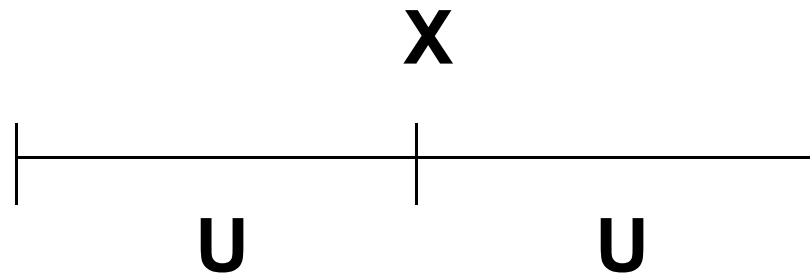
- t is the value of the Student's t -distribution at the desired probability (e.g. 95%) and with $n-1$ degrees of freedom, obtained from tables

Measurement Uncertainty



Non-negative parameter characterizing the dispersion of the quantity values being attributed to the measurand based on the information used.

JCGM 200: 2008 (VIM, 2008)



Measurement Uncertainty



UNCERTAINTY is a RANGE or DISPERSION.

The “true” value need not be known for uncertainty

ERROR is a DIFFERENCE between measured and ‘true’ value.

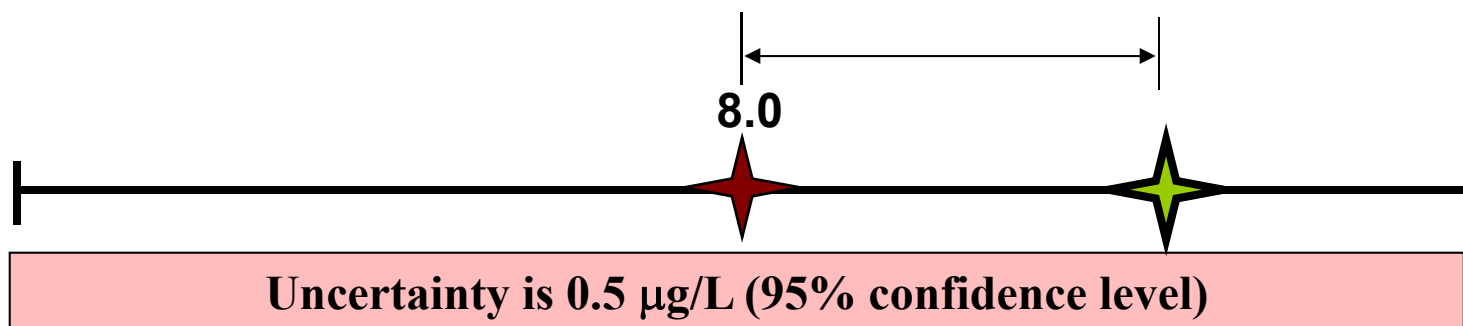
The ‘true’ value must be known for error estimation.

It is a measure of ‘accuracy’

Concentration Pb= $8.0 \pm 0.5 \mu\text{g/L}$
Value lies between 7.5 and 8.5 $\mu\text{g/L}$

Error = - 0.3 $\mu\text{g/L}$

“True” value = 8.3 $\mu\text{g/L}$



Degrees of freedom, df



- The number of degrees of freedom is the number of variables minus the number of parameters calculated from them
- For a set of repeated data points, $df = n - 1$
(the mean is the calculated parameter)
- For straight line graphs, $df = n - 2$
(the slope and intercept are calculated parameters)

การทดสอบนัยสำคัญ



- การตั้งสมมติฐาน
 - H_0 : สมมติฐานความไม่ต่าง
 - H_1 : สมมติฐานความต่าง
- การคำนวณการทดสอบทางสถิติ
 - ค่าเฉลี่ย และค่าจำกัด , t
 - ค่าเฉลี่ย 2 ค่า , t
 - ค่าความแปรปรวน 2 ค่า , F
- การกำหนดค่าวิกฤต (critical value)
 - จากตารางและคอมพิวเตอร์
 - ความเหมาะสมของ degrees of freedom(องศาอิสระ)
 - ที่ระดับความเชื่อมั่น ที่เหมาะสม
 - การทดสอบแบบ one tail หรือ two tails

การทดสอบนัยสำคัญ

- ถ้า การทดสอบทางสถิติ $>$ ค่าวิกฤต
 - ยอมรับ H_1 : สมมติฐานความต่าง
 - การทดสอบนัยสำคัญ แสดงความต่าง
- ถ้า การทดสอบทางสถิติ $<$ ค่าวิกฤต
 - ไม่ยอมรับ H_1 : สมมติฐานความต่าง
 - การทดสอบนัยสำคัญ ไม่แสดงความต่าง
- จำไว้ว่า
 - การปฏิเสธความต่าง มิได้หมายถึงการพิสูจน์ว่าเหมือนกัน

ค่าเฉลี่ย และค่าจำกัด: mean and limit value



- การกำหนดสมมติฐาน

$$H_0 \quad \bar{x} = \mu$$

$$H_1 \quad \bar{x} \neq \mu \quad \text{Two tailed}$$

$$H_1 \quad \bar{x} < \mu \text{ or } \bar{x} > \mu \quad \text{One tailed}$$

- การคำนวณการทดสอบทางสถิติ, t

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

- เปรียบเทียบกับค่าวิกฤต Student's t

– Degrees of freedom (องศาอิสระ) = $n - 1$

ค่าความแปรปรวน 2 ค่า: two variances - F -test



- F -test
- การกำหนดสมมติฐาน

H_o	$s_1^2 = s_2^2$	
H_1	$s_1^2 \neq s_2^2$	Two tailed
H_1	$s_1^2 < s_2^2$ or $s_1^2 > s_2^2$	One tailed

F -statistic

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

Arrange s_1 and s_2 so $F > 1$

เปรียบกับค่าวิกฤตของ F -test.

- Degrees of freedom (องศาอิสระ), V
- numerator, V_1
- denominator, V_2

F-critical in Excel:ค่าวิกฤต *F*



For the 95% confidence interval

- *F*-critical : “ =**FINV(0.05,df₁,df₂)** ” ; give **one-tailed** to answer
“ is data set 2 more precise than set 1?”
- *F*-critical: “ =**FINV(0.05/2,df₁,df₂)** ” ; give **two-tailed** to answer
“ is there any difference in precision between data set 1 and data set 2”

Testing variances: ตัวอย่าง



- A proposed method for measuring chemical oxygen demand was compared with the standard method. A sewage effluent sample was analyzed 8 times by each method with the following results
 - Standard method: mean = 72, s 3.31 mg/L
 - Proposed method: mean = 72, s 1.51 mg/L
- Is the proposed method more precise?

Testing variances: Answer



- We need to test whether the variance of the standard method is significantly greater than that of the proposed method.
- H_0 is that it is not significantly greater
- H_1 is that it is significantly greater
$$F = (3.31)^2 / (1.51)^2 = 4.8$$
$$F_{0.05, 7, 7} = 3.79$$
- Therefore as $F > F$ -table reject H_0 and conclude that at the 95% level the proposed method is more precise.

The *t*-test: Two Means

- *t*-test
 - ข้อมูล 2 ชุด ที่พิจารณาว่า ความแปรปรวนไม่แตกต่างจากการทำ *F*-test
- Null and alternative hypotheses

$$H_0 \quad \bar{x}_1 = \bar{x}_2$$

$$H_1 \quad \bar{x}_1 \neq \bar{x}_2 \quad \text{Two tailed}$$

$$H_1 \quad \bar{x}_1 < \bar{x}_2 \quad \text{or} \quad \bar{x}_1 > \bar{x}_2 \quad \text{One tailed}$$

t-statistic

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

$$s_{pooled} = \sqrt{\frac{s_1^2(n_1 - 1) + s_2^2(n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2}}$$

Compare with critical value of Student's *t*
degrees of freedom = $n_1 + n_2 - 2$

The *t*-test: Two Means



t-test

- ข้อมูล 2 ชุด ที่พิจารณาว่าความแปรปรวนแตกต่างจากการทำ *F*-test
- ถ้ากรณีที่ข้อมูล 2 ชุดไม่ได้มาจากประชากรที่ ความแปรปรวนเท่ากัน (หรือทดสอบความแปรปรวนแล้ว เราปฏิเสธ *F*-test), ดังนั้นจะต้องใช้สูตรในการคำนวณ *t* เป็นดังนี้

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2}}$$

Note: s/\sqrt{n} is the standard deviation of the mean

Compare with critical value of Student's *t* (degrees of freedom),

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

ตัวอย่างการใช้ t-test (two means)



ในการเปรียบเทียบวิธีการวัด 2 วิธีเพื่อหาปริมาณ โบรอน ในพืช ได้ผลการวัด
ในหน่วย ppm ดังนี้

- วิธี spectrophotometry:

- Mean = 28.0 ppm, s = 0.3 ppm, n = 10

- วิธี Fluorimetry:

- Mean = 26.25 ppm, s = 0.23 ppm, n = 10

- จงทดสอบว่า สองวิธีนี้ให้ผลออกมาต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่



ตัวอย่างการใช้ **t-test (two means): คำตอบ**

Pooled standard deviation

$$s_p^2 = (9 \times 0.3^2 + 9 \times 0.23^2) / 18$$

= 0.0715 **t-test. H_0 is that the population**

$s_p = 0.267$ **means are equal:**

$$t = \frac{(28.0 - 26.25)}{0.267 \sqrt{1/10 + 1/10}} = 14.7$$

***t*-critical**

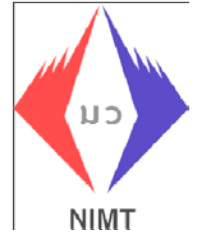
- Degrees of freedom, $df = n_1 + n_2 - 2 = 10 + 10 - 2 = 18$
- $t''_{0.05, 18} = 2.1$
- Therefore reject H_0

Paired-*t*-test



ใช้ในกรณีที่เราเปรียบเทียบวิธีการวัด 2 วิธีในการวิเคราะห์ตัวอย่าง แต่ละวิธี วัด n ตัวอย่างที่แตกต่างกันและไม่ได้มีการวิเคราะห์ซ้ำ (ตัวอย่างต่างกัน)

ใช้การทดสอบแบบ **paired-*t*-test** โดยมองตรงผลต่างของแต่ละค่า ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างนั้นๆ ตั้งสมมุติฐานว่า **mean** ของผลต่างเท่ากับ 0



ตัวอย่างการใช้ **pair -t-test**

ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำที่แตกต่างกัน 4 ตัวอย่างเพื่อหาปริมาณ ไนเตรต ได้ผลแสดงดังนี้ จงทดสอบว่าวิธีทดสอบ 2 วิธีนี้ให้ผลออกมาต่างกันอย่างไร มีนัยสำคัญหรือไม่ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

Method A/ppm

23

116

44

65

Method B/ppm

24

119

39

67

Paired *t*-test: คำตอบ



Method A/ppm	Method B/ppm	(A-B)= di /ppm
23	24	-1
116	119	-3
44	39	+5
65	67	-2

1) Calculate mean and standard deviation of differences mean $\bar{d}_i = -0.25$ ppm; $s = 3.59$ ppm

2) H_0 is that expected mean of the differences is zero.

Therefore calculate

$$t = \frac{-0.25 - 0}{\sqrt{4}} / 3.59 = 0.14$$

3) Test against $t_{0.05,3} = 3.18$.

As $t\text{-cal} < t_{0.05,3}$ accept H_0 that there is no difference



Student t in Excel

- “ **=TINV(α , df)** ” gives the *two-tailed* Student t value at df degrees of freedom
- “ **=TINV(2α , df)** ” gives the *one-tailed* student t value at df degrees of freedom

Calibration and Regression



- Regression analysis describes the relationship between two variables (e.g. concentration and response)
- The relationship between the two variables can be used to predict future experiments
- Most often done with a technique known as **least squares regression**

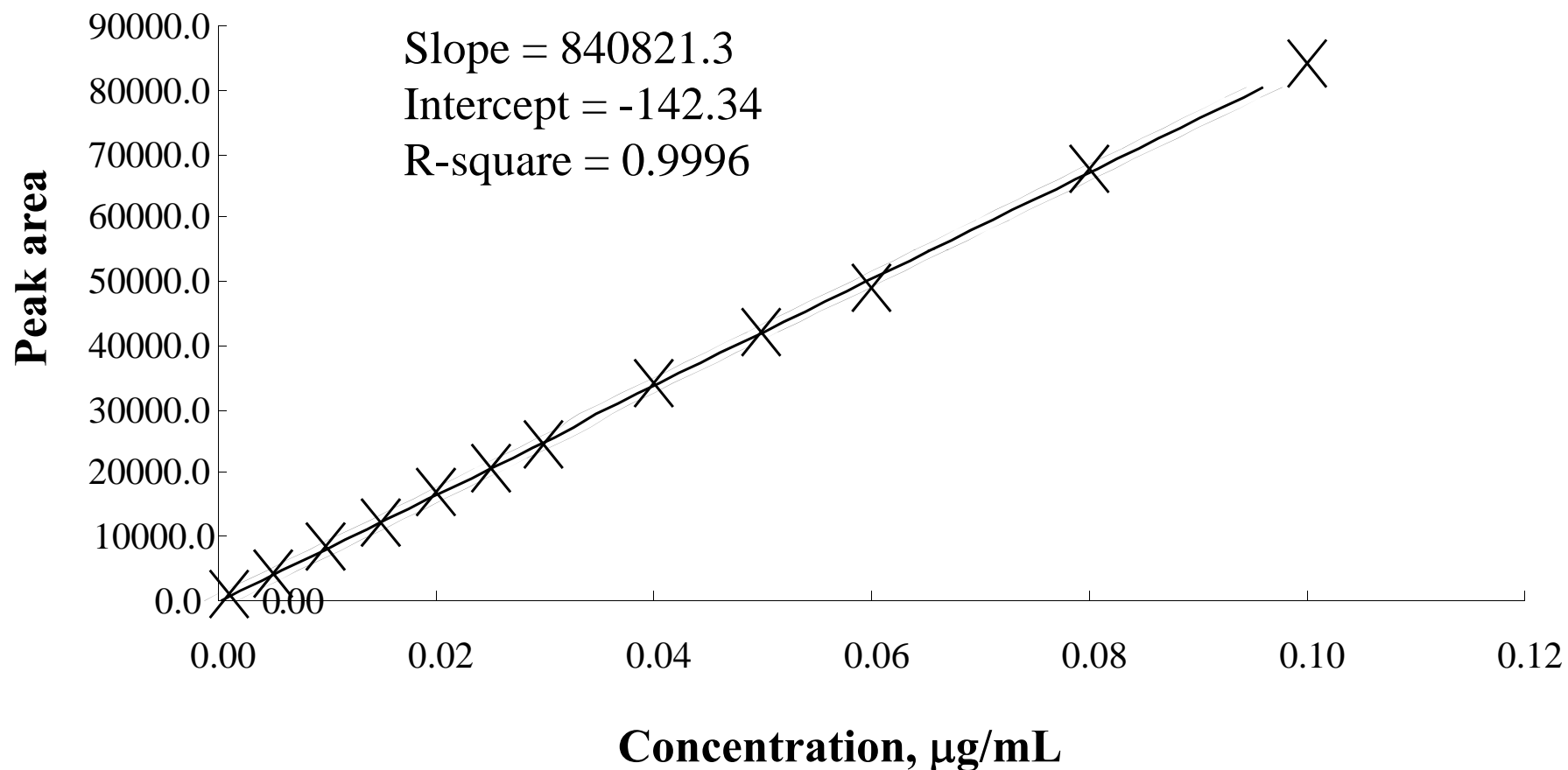
Calibration and Regression



- Typical calibration curve for dimethoate by LC-MS/MS
 - At least 5 standard solutions whose concentrations span 20-120% of expected concentration range
 - 2-3 readings for each standard
- Estimate
 - The concentration of the unknown
 - The standard deviation

Concentration $\mu\text{g/mL}$	Average Peak area
0.001	852
0.005	4152
0.010	8283
0.015	12412
0.020	16902
0.025	21000
0.030	24500
0.040	33902
0.050	42020
0.060	49023
0.080	67804
0.100	84040 ⁵³

Dimethoate Analysis by LC-MS/MS





Linearity

Pearson correlation coefficient, r

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

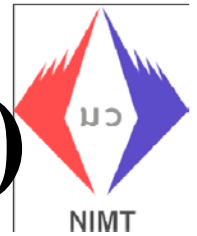
$$-1 \leq r \leq 1$$

Coefficient of determination, r^2

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

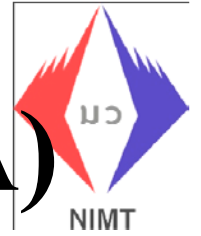
$$r^2 \rightarrow 1$$

Analysis of Variance (ANOVA)



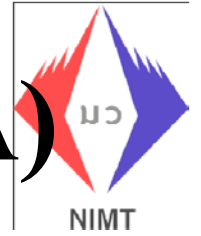
- ANOVA เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการเปรียบเทียบ ค่า mean ของข้อมูล 2 ชุด ข้อมูล หรือมากกว่า เพื่อทดสอบว่าชุดข้อมูลเหล่านี้ต่างกันอย่างไรมีนัยสำคัญหรือไม่
- A difference in means can lead to spread in the results of the combined data (increased variance)
- Two possible sources of variation:
 - Random error or repeatability of measurement
 - Variation due to the factor

Analysis of Variance (ANOVA)



- Factor (ปัจจัย): quantity that is being investigated
- Effect (ผลกระทบ): how much the measurand changes as the factor is varied
- One-way ANOVA: instances of the factor are varied with replicate results for each instance
- Between factors: includes the measurement variance as well as differences between the instances of the factor
- Within factors: estimates measurement variance

Analysis of Variance (ANOVA)



- ANOVA allows us to obtain a probability of finding the observed data given that there is no effect of a particular influence factor, i.e. observed variance arises from random effects (null hypothesis)
- Compare the between and within factor variances
- Expectation that between factor variance $>$ within factor variance (i.e. the probability is one-tailed)

Excel ANOVA Output



Anova: Single Factor

SUMMARY

<i>Groups</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Average</i>	<i>Variance</i>
Row 1	2	0.93	0.465	5E-05
Row 2	2	0.98	0.49	0.0008
Row 3	2	0.95	0.475	5E-05
Row 4	2	0.98	0.49	0.0002
Row 5	2	0.99	0.495	5E-05
Row 6	2	1	0.5	0.0002
Row 7	2	1.02	0.51	0.0002
Row 8	2	0.97	0.485	5E-05
Row 9	2	0.98	0.49	0.0002
Row 10	2	1.01	0.505	0.00125

ANOVA

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	0.003245	9	0.000361	1.182149	0.396424	3.020382
Within Groups	0.00305	10	0.000305			
Total	0.006295	19				



Horwitz Equation

- This equation was defined by Horwitz et al from a practical consideration of a number of collaborative studies done by AOAC over many years.
- Reproducibility, CV_R

$$CV_R = 2^{(1-0.5 \log C)}$$

$$CV_R = 2C^{-0.1505}$$

- Repeatability, CV_r

$$CV_r = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)}$$

C = concentration of analyte in term of decimal fraction

Horwitz Equation



Horwitz noted that values for RSD_r (the repeatability CV) were usually between half and two-thirds that of RSD_R . For this reason, repeatability acceptabilities are proposed as the Horwitz values for $RSD_R \times 0.67$.



Horwitz Ratio

Acceptance criteria

- HorRat = Horwitz Ratio =
$$\frac{RSD_{obs}}{RSD_{expected}}$$

Reference	HORRAT
AOAC	< 2
Codex, EU	≤ 2

Key Performance Characteristics for Method Validation



- Confirmation of identity
- Specificity/Selectivity
- Linearity and working range
- Sensitivity
- Accuracy
- Precision
- Limit of detection (LOD)
- Limit of quantitation (LOQ)
- Ruggedness and Robustness
- Measurement Uncertainty
- Metrological Traceability

Validation Parameters for Specific Tasks



Key performance characteristic	Major compounds-quantitative	Major compounds and traces-quantitative	Traces-qualitative	Traces-quantitative
LOD	<i>N</i>	<i>N</i>	Y	<i>N</i>
LOQ	<i>N</i>	Y	<i>N</i>	Y
Linearity	Y	Y	<i>N</i>	Y
Range	Y	Y	<i>N</i>	<i>N</i>
Precision	Y	Y	<i>N</i>	Y
Accuracy	Y	Y	<i>N</i>	Y
Specificity	Y	Y	Y	Y
Ruggedness	Y	Y	<i>N</i>	Y

From: Validation and Qualification in Analytical Laboratories by Ludwig Huber



Confirmation of Identity

Confirmation is an analytical process where a measurement is performed by more than one technique, to confirm the presence of an analyte

การทดสอบเพื่อแสดงให้เห็นว่าสารที่เราสนใจถูกตรวจพบได้ด้วยวิธีทดสอบที่เรา
ใช้อยู่ โดยทั่วไปจะใช้เทคนิคการทดสอบมากกว่า 1 เทคนิคเพื่อยืนยัน

That the entity you are observing and measuring some quantity is what you think it is!

-Speciation

-Interferences and impurities

Specificity/Selectivity

ความจำเพาะเจาะจง



- **Specific:** a method that produces a response for a **target analyte** only
- **Selective:** a method that provides responses for **a number of chemical entities** that may or may not be distinguished from each other
 - The ability to measure accurately an analyte in the presence of interferences (USP)
 - วิเคราะห์ตัวอย่างชนิดเดียวกันในตัวอย่างแต่ละตัวอย่างที่สงสัยว่าอาจรบกวนการวิเคราะห์ เลือกร้อยอย่างน้อย 5 ตัวอย่าง (*Analyze at least five independent sources of control matrix to assess interference effects*)

ความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ **analytes** ได้ถูกต้อง และสามารถแยกความเฉพาะเจาะจงสำหรับสารที่สนใจออกจากสารปนเปื้อนอื่นในตัวอย่าง ภายใต้สภาวะการทดลองที่ระบุไว้

How to improve selectivity

- *Good sample preparation*
- *Selective instrument e.g. mass spectrometer vs. UV spectrometer*

Confirmation of Identity and Selectivity/Specificity



วิธีตรวจสอบ

- วิเคราะห์ตัวอย่างและสารอ้างอิงด้วยวิธีที่กำลังทำการตรวจสอบความใช้ได้ และวิธีอื่นเพื่อเปรียบเทียบผลจากทั้งสองวิธี

Analyze samples and reference materials by candidate and other independent methods

- วิเคราะห์ตัวอย่างที่อยู่ในตัวกลางต่างๆ ที่สงสัยว่าอาจเกิดการรบกวนสารที่เราสนใจได้

Analyze samples containing various suspected interferences in the presence of the analyte of interest

- ถ้าพบการรบกวนทั้งในขั้นตอนการตรวจวัดด้วยเครื่องมือและการหาปริมาณ อาจจำเป็นต้องทำการพัฒนาวิธีทดสอบเพิ่มเติม

If detection or quantification is inhibited by the interferences, further method development will be required

Linearity and Working Range



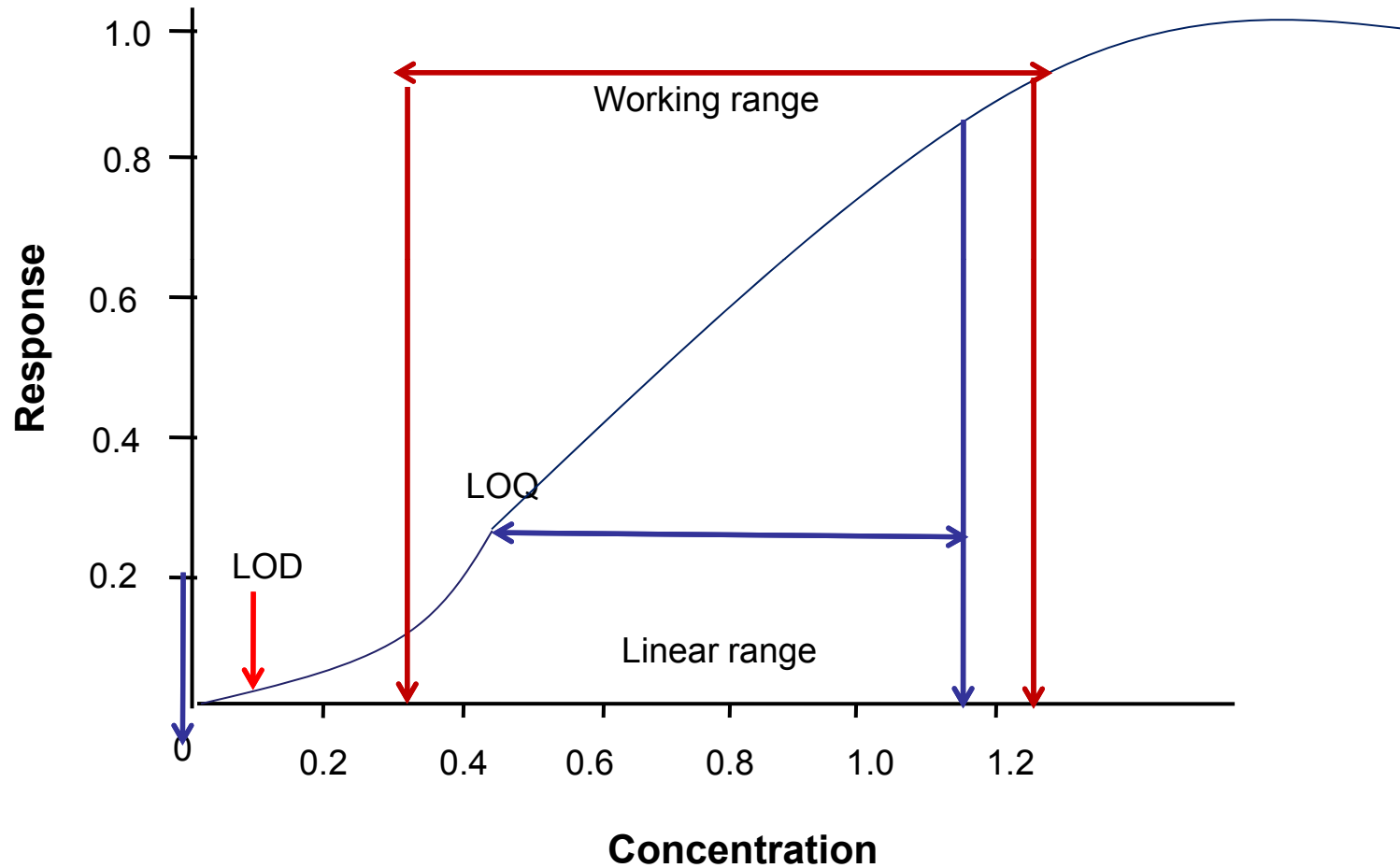
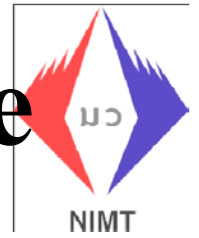
What is the range over which the calibration model holds?

- **Working or measuring range** is the set of values of measurands for which the error of a measuring instrument is intended to lie within specified limits
(*Eurachem Glossary A18*)
- **Linear range** is by inference the range of analytical concentrations over which the method gives test results proportional to the concentration of the analyte

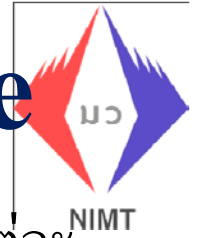
(*Eurachem Glossary A12*)

ช่วงการใช้งานที่ครอบคลุมช่วงความเข้มข้นที่สนใจ โดยมีระดับความเที่ยง (precision) ความแม่นยำ (accuracy) และความเป็นเชิงเส้น (linearity) ตามที่กำหนดในวิธีทดสอบ โดยทั่วไป lower level คือค่า LOD หรือ LOQ ส่วนค่า upper level ขึ้นอยู่กับเครื่องมือว่าจะสามารถตอบสนองต่อสารที่สนใจได้ดีมากน้อยเพียงใด

Linearity and Working Range



Linearity and Working Range



1. เตรียมสารละลายมาตรฐานอย่างน้อย 6 ความเข้มข้นและแบลงค์ วัดค่าที่แต่ละความเข้มข้น 1 ครั้ง

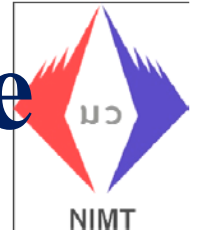
Blank plus RMs or fortified sample blanks at various concentrations (at least 6 conc. Plus blank), single measurement at each concentration

- พล็อตกราฟระหว่างที่การตอบสนองที่อ่านได้เทียบกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน
- การเตรียมสารมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ ให้เตรียมแต่ละขวดแยกกันเป็นอิสระ

คือไม่แนะนำให้ทำการเจือจางแบบ serial dilution จาก stock solution ขวดเดียวกัน

Different concentrations should be prepared independently, and not from aliquots of the same master solution

Linearity and Working Range



2. เตรียม RMs หรือ fortified sample blank ที่ความเข้มข้นต่างกันอย่างน้อย 6 ความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงที่มีความเป็นเชิงเส้น ทำการวัดค่า 3 ซ้ำที่แต่ละความเข้มข้น

at least 6 different concentrations within the linear range, 3 replicate measurements at each conc.

- พล็อตกราฟระหว่างที่การตอบสนองที่อ่านได้เทียบกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน

- คำนวณ ค่า regression coefficient

- คำนวณและพลอตค่า residues ของแต่ละความเข้มข้น

- การกระจายของค่า residual เป็นแบบสุ่มรอบๆ เส้นตรง เป็นการยืนยันความเป็นเชิงเส้นของ calibration curve แต่หากการกระจายเป็นแบบแนวโน้วอย่างใดอย่างหนึ่งเป็นการแสดงให้เห็นถึงความเบี่ยงเบนจากความสัมพันธ์เชิงเส้น

Random distribution of residual about the straight line confirms linearity.

Systematic trends indicate non-linearity

- ถ้าหากจำเป็นต้องพลอตกราฟแบบไม่เป็นเชิงเส้น ไม่แนะนำให้ใช้ฟังก์ชันที่สูงกว่า quadratic function

If non-linear curve is necessary, functions higher than quadratic are not advised

Sensitivity



The change in the response of a measuring instrument divided by the corresponding change in the stimulus

ความไว คือการเปลี่ยนแปลงของผลการตอบสนองของเครื่องมือวัดหารด้วยการเปลี่ยนแปลงของสิ่งเร้าที่สมนัยกัน เป็นความสามารถในการแยกความแตกต่างของปริมาณ analyte

No specification for sensitivity, consider the uncertainty of a result

Accuracy



Do we get the right answer?

Accuracy is the quality of the result in terms of “Trueness” and “Precision” in relation to the requirements of its use

ความแม่นยำเป็นค่าแสดงความใกล้เคียงระหว่างผลการทดสอบและค่าอ้างอิงที่ยอมรับ

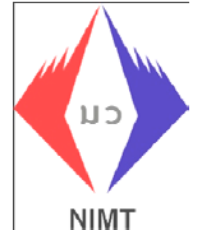
Trueness is the closeness of agreement between the average value obtained from a large set of test results and accepted reference value

ค่าที่แท้จริงคือความใกล้เคียงระหว่างค่าเฉลี่ยของผลการทดลองที่ได้จากหลายชุดกับค่าอ้างอิงที่ยอมรับ

Bias is the different between the expectation of the test results and an accepted reference value

ความเบี่ยงเบนคือความแตกต่างระหว่างค่าที่คาดว่าจะได้จากการทดสอบกับค่าอ้างอิงที่ยอมรับ

Accuracy and Trueness



1. วิเคราะห์ reagent blank และสารอ้างอิงมาตรฐานด้วยวิธีทดสอบที่ต้องการตรวจสอบความใช้ได้ (candidate method)
 - วิเคราะห์ 10 ซ้ำ
 - คำนวณค่าเฉลี่ยของเบลงค์แล้วนำไปหักลบออกจากค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวัดสารอ้างอิงมาตรฐาน
 - เปรียบเทียบค่าที่ได้หลังจากแก้ค่าเบลงค์แล้วกับค่าที่เป็นค่าอ้างอิงของสารอ้างอิงมาตรฐาน จะทำให้ทราบค่า method bias

“Method’s Bias”

Accuracy and Trueness



2. วิเคราะห์ reagent blank และ สารอ้างอิงมาตรฐานด้วยวิธีทดสอบที่ต้องการทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีและวิธีอื่นๆ ซึ่งอาจเป็นวิธีปฐมภูมิ

Analyze reagent blank and RM using candidate and independent method preferably primary method

- วิเคราะห์ 10 ซ้ำ

- คำนวณค่าเฉลี่ยของเบลงค์แล้วนำไปหักลบออกจากค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวัดสารอ้างอิงมาตรฐาน

- เปรียบเทียบค่าการวัดที่ได้จากวิธีทั้งสองจะทำให้ทราบค่า **method bias** เทียบกับวิธีปฐมภูมิ

“Method’s Bias” relative to independent/primary method



Recovery

The fraction of analyte added to a test sample (fortified or spiked sample) prior to analysis, the unfortified and fortified samples, percentage recover (%R) is calculated as follows:

$$\% \text{ Recovery} = (C_1 - C_2) \times 100 / C_3$$

C_1 = concentration determined in fortified sample

C_2 = concentration determined in unfortified sample

C_3 = concentration of fortification

วิเคราะห์ matrix blank, CRM หรือตัวอย่างที่ fortified ด้วยสารที่สนใจที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (ต่ำ กลาง และ สูง) ที่แต่ละความเข้มข้นให้ทำการวัดซ้ำ 6 ครั้ง แล้วคำนวณค่า recovery จากสมการ

Recovery



Analyte %	Analyte ratio	Unit	Mean recovery (%)
100	1	100%	98-102
10	0.1	10%	98-102
1	0.01	1%	97-103
0.1	0.001	0.1%	95-105
0.01	0.0001	100 ppm	90-107
0.001	0.00001	10 ppm	80-110
0.0001	0.000001	1 ppm	80-110
0.00001	0.0000001	100 ppb	80-110
0.000001	0.00000001	10 ppb	60-115
0.0000001	0.000000001	1ppb	40-120

Precision and Reproducibility



Can we reproduce the result?

- Repeatability:

- แลปเดียวกัน ผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน เครื่องมือเดียวกัน และทำการทดสอบภายในวันเดียวกันหรือเป็นการทดลองซ้ำภายในช่วงเวลาสั้นๆ

Same lab, same analyst, same instrument, relative short time span

- วิเคราะห์ตัวอย่างในตัวอย่างต่างๆกันอย่างน้อย 3 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 6 การทดสอบ และในช่วงความเข้มข้น 2-3 ช่วงความเข้มข้น แล้วคำนวณค่า RSD (ICH)

At least 6 determinations of 3 different matrices at 2 or 3 different concentrations the calculate the RSD (ICH)

- ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 9 ซ้ำให้ครอบคลุมทั้งช่วงความเข้มข้น เช่น แบ่งเป็น 3 ช่วงความเข้มข้น ๆ ละ 3 ซ้ำ (ICH)

At least 9 replicates covering the complete specified range e.g. 3 concentrations with 3 injections at each concentration (ICH)

- ทำการทดสอบ 10 ซ้ำ โดยค่า RSD ที่ได้ควรน้อยกว่า 1% (US EPA)

At least 10 injections with RSD <1% (US EPA)

Repeatability Limit



- 95% confidence interval on the difference between duplicate results measured under repeatability conditions

$$r = 2\sqrt{2}s_r = 2.8s_r$$

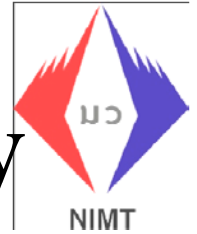
Precision and Reproducibility



Analyte %	Analyte Ratio	Unit	RSD (%)
100	1	100%	1.3
10	10 ⁻¹	10%	1.8
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

Expected % RSD_r calculated from Horwitz's equation = $0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)}$

Precision and Reproducibility



- Intermediate precision (ICH)
 - The long term variability of the measurement process
 - Comparing the results of a method run within a single lab over a number of weeks

เปรียบเทียบผลที่ได้จากวิธีทดสอบในช่วงเวลาดำเนินการที่นานขึ้น เช่น หลายๆ สัปดาห์

Precision and Reproducibility



- ค่า **intermediate precision** อาจสะท้อนให้เห็นความขัดแย้งของผลการวัด เมื่อผลการวัดได้มาจาก
 - เปลี่ยนผู้ทดสอบ
different operators
 - เปลี่ยนขั้นตอนบางอย่าง
inconsistency working practice of the same operator
 - เปลี่ยนเครื่องมือ
different instruments
 - เปลี่ยนแหล่งของสารเคมีหรืออุปกรณ์บางชนิด
chemicals from different suppliers, columns from different batches

Precision and Reproducibility



- Reproducibility (ICH)
 - Precision obtained from different labs, different analysts, different operational and environmental conditions
 - Analyzing aliquots from homogeneous lots

แสดงความแปรปรวนของผลการทดสอบเมื่อเปลี่ยนผู้ทดสอบ เปลี่ยนเครื่องมือและต่างห้องปฏิบัติการ โดยการทดสอบตัวอย่างที่มีความเป็นเนื้อเดียวกัน

“Inter-laboratory tests”

Reproducibility Limit

$$R = 2\sqrt{2}S_R = 2.8S_R$$

Precision and Reproducibility



	Repeatability	Intermediate Precision	Reproducibility
Instrument	same	different	different
Batches of accessories e.g. columns	same	different	different
Analyst	same	different	different
Sample matrices	same	different	different
Concentration	same	different	different
Batches of material e.g. reagents	Same	different	different
Environmental conditions	Same	different	different
Laboratory	same	same	different

Limit of Detection (LOD)



What is the smallest concentration that can be detected?

- ระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถให้สัญญาณที่แตกต่างจากศูนย์ด้วยระดับความเชื่อมั่นที่ระบุ

The smallest amount or concentration of an analyte that can be reliably distinguished from zero with a specified level of confidence

- ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้ด้วยวิธีที่กำลังทำการตรวจสอบความใช้ได้ ซึ่งระดับความเข้มข้นดังกล่าวต้องมากกว่าค่าความไม่แน่นอนที่ประเมินได้

The lowest value measured by a method that is greater than the uncertainty associated with it (NATA technical Note 17, 2006)

- ส่วนใหญ่ขีดจำกัดการตรวจวัดคือระดับความเข้มข้นที่ให้สัญญาณเป็น 3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของเบลงค์ เมื่อทำการวิเคราะห์ตัวอย่างเบลงค์ 10 ตัวอย่างหรือมากกว่า

Limit of Detection (LOD)



การหาขีดจำกัดการตรวจวัด

1. เตรียมตัวอย่างแบบลวงค์ (sample blank) 10 ขวด วัดค่าความเข้มข้นขวดละ 1 ครั้ง จากนั้นคำนวณค่าความเข้มข้นเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้น (standard deviation)

$$\text{LOD} = \text{mean of sample blank value} + 3s$$

- หรือ** 2. เตรียมตัวอย่างแบบลวงค์ (sample blank) ที่ fortified ด้วยสารที่ต้องการวัดที่ความเข้มข้นต่ำๆ (lowest acceptable concentration) 10 ขวด วัดค่าขวดละ 1 ครั้ง จากนั้นคำนวณค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของความเข้มข้นที่ fortified ลงไป

$$\text{LOD} = 0 + 3s$$

- หรือ** 3. เตรียมตัวอย่างแบบลวงค์ (sample blank) ที่ fortified ด้วยสารที่ต้องการวัดที่ความเข้มข้นต่ำๆ (lowest acceptable concentration) 10 ขวด วัดค่าขวดละ 1 ครั้ง จากนั้นคำนวณค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของความเข้มข้นที่ fortified ลงไป

$$\text{LOD} = \text{mean of sample blank value} + 4.65s \text{ (derives from hypothesis testing)}$$

(Eurachem Guide page 17-18)

Limit of Detection (LOD)



- LOD determined from calibration curve
 - $s_{y/x}$ is the standard error of the regression
 - b is the slope of the linear calibration

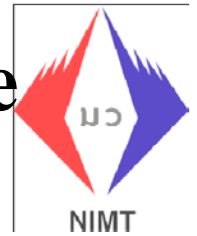
$$c_{dl} = \frac{3s_{y/x}}{b}$$

Or

$$c_{dl} = \frac{2t_{0.05', n-2} s_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{c}^{-2}}{\sum_i (c_i - \bar{c})^2}}$$

From IUPAC

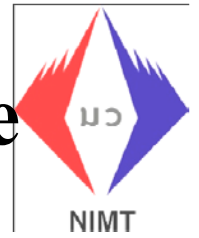
Limit of Detection (LOD) for Qualitative Measurement



ขีดจำกัดการตรวจวัดของการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

- วิเคราะห์ตัวอย่างแบบลวกที่ spiked ด้วยสารที่ต้องการวัดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน
Sample blanks spiked with the analyte at a range of concentration levels
- วัดค่าของตัวอย่างแบบลวกที่ spiked 10 ซ้ำ ที่แต่ละความเข้มข้น
Measure 10 independent replicates at each concentration level
- คำนวณเปอร์เซ็นต์ที่ตรวจพบ (% positive) หรือเปอร์เซ็นต์ที่ตรวจไม่พบ (% negative) ที่แต่ละความเข้มข้น
- จากนั้นหาขีดจำกัดความเข้มข้นต่ำสุดที่ผลการวัดให้ความไม่น่าเชื่อถือ
determine, by inspection, the threshold concentration at which the test becomes unreliable

Limit of Detection (LOD) for Qualitative Measurement



Spiked conc, mg/kg	No. of replicates	Positive/negative results
200	10	10/0
100	10	10/0
80	10	8/2
60	10	5/5

If the criteria is 100% positive: cut-off (threshold) is 100 mg/kg =LOD

Limit of Quantitation (LOQ)



What is the smallest concentration that can be measured with a given measurement uncertainty?

- ความเข้มข้นต่ำสุดที่หาปริมาณได้มีค่า **trueness** และ **repeatability** ที่ยอมรับได้

The lowest concentration of analyte that can be determined with an acceptable level of repeatability precision and trueness

(Eurachem Guide)

- ความเข้มข้นของสารที่สนใจที่สามารถหาปริมาณได้ด้วยระดับความไม่แน่นอนที่ยอมรับได้

The concentration of analytes that can be determined with an acceptable uncertainty

(NATA technical Note 17)

Limit of Quantitation (LOQ)



การหาขีดจำกัดการหาปริมาณ

1. เตรียมตัวอย่างแบบลวงค์ (sample blank) 10 ขวด วัดค่าความเข้มข้นขวดละ 1 ครั้ง จากนั้นคำนวณค่าความเข้มข้นเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้น (standard deviation)

$$\text{LOQ} = \text{mean sample blank value} + 5s \text{ (or } 6s \text{ or } 10s)$$

2. เตรียมตัวอย่างแบบลวงค์ที่ fortified ด้วยสารที่สนใจที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ที่ใกล้เคียงค่า LOD ระดับความเข้มข้นละ 10 ขวดแล้ววัดค่าความเข้มข้นทั้ง 10 ขวดๆ ละ 1 ครั้ง

คำนวณ standard deviation ที่แต่ละความเข้มข้น ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้และมีค่าความไม่แน่นอนที่ยอมรับได้คือค่า LOQ

LOQ = the lowest analyte conc. which can be determined with acceptable uncertainty

(Eurachem Guide page 19)

Robustness/Ruggedness



When there are small changes in conditions do we get the same answers?

Robustness of an analytical procedure is a measure of its capability to remain unaffected by small, but deliberate variations in method parameters and provided an indication of its reliability during normal usage

(Eurachem Glossary A25.2)

ความคงทนของวิธีวิเคราะห์ เป็นตัวชี้ให้เห็นถึงประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ว่ายังคงน่าเชื่อถือแม้ว่าจะมีการจงใจเปลี่ยนแปลงตัวแปรบางอย่างในวิธีวิเคราะห์

Robustness/Ruggedness



- **Ruggedness** testing is an inter-laboratory study to study the behavior of an analytical process, when small changes are made in the environmental and/or operating conditions are made, akin to likely to arise in different test environments
- Effects of minor changes
- เป็นประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่ยังให้ผลการวิเคราะห์เหมือนเดิม แม้ว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยของสภาวะแวดล้อมที่เกิดขึ้น

(Eurachem Glossary A25.1)

Robustness/Ruggedness



- ระบุตัวแปรที่อาจมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพของวิธีทดสอบ
- ทำการศึกษาผลของตัวแปร โดยการวิเคราะห์ RMs หรือ CRMs
- ประเมินผลกระทบของตัวแปรต่างๆ
- ปรับปรุงวิธีวิเคราะห์เพื่อลดผลกระทบหรือมีระบบควบคุมคุณภาพที่เหมาะสม

Robustness/Ruggedness



- ปัจจัยจากผู้ทำการทดสอบ Human factors
 - ประสบการณ์ การฝึกอบรม
 - Control via education and on the job training
- ปัจจัยทางเทคนิค Technical factors
 - ความคงตัวของสารเคมี
 - Stability of analytical solutions
 - การเตรียมตัวอย่าง
 - Sample preparation
 - ผลจากการเปลี่ยนแปลงค่า pH อุณหภูมิ และอัตราการไหล เป็นต้น
 - Influence of variation of pH, temperature, flow rate, etc
- ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม Environmental factors
 - อุณหภูมิ ความดัน ความชื้น สารรบกวนต่างๆ
 - Temperature, pressure, humidity, pollution, contamination

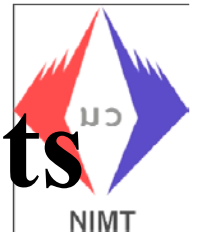
Robustness/Ruggedness



Techniques used for ruggedness testing

- Significance testing, F-test
 - Are the sets of data significantly different?
- Factorial design เหมาะสำหรับการใช้ศึกษาตัวแปรที่มีไม่เกิน 5 ตัวแปรและสามารถบ่งบอกถึงผลกระทบซึ่งกันและกันของตัวแปร
 - Allow investigation of the interaction of variables
 - More economical when variables are less than 5
- Plackett-Burman method design สามารถวัดผลกระทบจากแต่ละตัวแปรให้อยู่ในรูปตัวเลขได้ โดยสมมติว่าไม่มีผลกระทบซึ่งกันและกันของตัวแปร
 - Assumes interaction effects are negligible
 - Calculate the effect of each factor on a measurable quantity
- Youden-Steiner testing สามารถวัดผลกระทบจากแต่ละตัวแปรให้อยู่ในรูปตัวเลขได้ โดยสมมติว่าไม่มีผลกระทบซึ่งกันและกันของตัวแปร
 - Assumes interaction effects are negligible
 - Calculate the effect of each factor on a measurable quantity

Factorial Design of Experiments



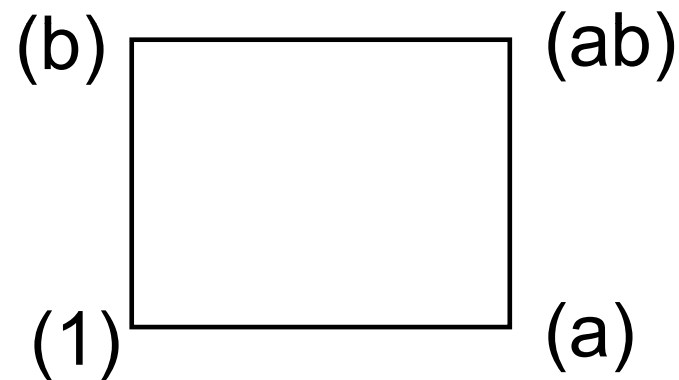
Factorial design is an experiment design in which every level of each variable is paired with every level of each other variable

Number of factors (k)	Number of runs = 2^k
2	4
3	8
4	16
5	32

2² Factorial Design of Experiments



2² Factorial Experiment, 2 parameters, 4 experiments



2² Factorial Design of Experiments



Parameters studied: **A = pH**

B = temperature

Coefficient:

+1 = changed condition

-1 = normal condition

Experiment	Factor	
	A	B
1 {1}	-1	-1
2 (a)	+1	-1
3 (b)	-1	+1
4 (ab)	+1	+1

2² Factorial Design of Experiments

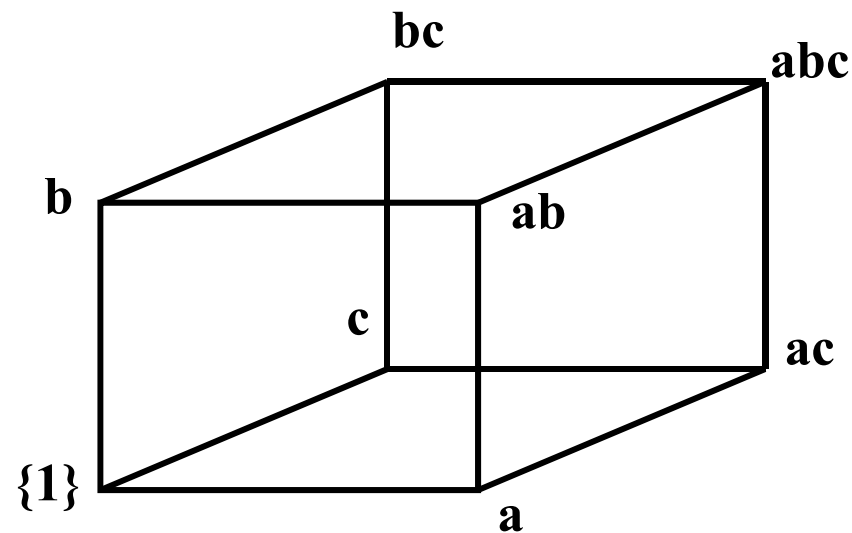


Experimental code	A	B	AB
{1}	-1	-1	+1
a	+1	-1	-1
b	-1	+1	-1
ab	+1	+1	+1

2³ Factorial Design of Experiments



- 2³ Factorial Experiment, 3 parameters, 8 experiments

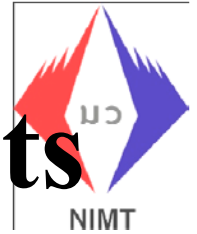


2³ Factorial Design of Experiments



Exp	Factor						
	A	B	C	AB	AC	BC	ABC
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	1	-1	-1	-1	-1	1	1
3	-1	1	-1	-1	1	-1	1
4	1	1	-1	1	-1	-1	-1
5	-1	-1	1	1	-1	-1	1
6	1	-1	1	-1	1	-1	-1
7	-1	1	1	-1	-1	1	-1
8	1	1	1	1	1	1	1

Factorial Design of Experiments



Advantages

- Allows greater generalization of findings from data
- Allows for investigation of the interaction of variables
- More economical than a one-way design when the number of variables is less than 5

Plackett-Burman Method Design



- Assumes interaction effects are negligible compared to main effects within the method
- Calculates the effect of each factor on a measurable quantity e.g. recovery
- Economical designs with the run number a multiple of four (rather than a power of 2)
- Very efficient screening designs when only main effects are of interest.

Plackett-Burman Method Design



Generating factor

examining n parameters in $k = n+1$ runs

no. of code (+1) = no. of code (-1) + 1

total code + 1 = no. of runs

Run = 8 (+ + + - + - -)

Run = 12 (+ + - + + + - - - + -)

Run = 16 (+ + + + - + - + + - - + - - -)

Run = 20 (+ + - - + + + + - + - + - - - - + + -)

Run = 24 (+ + + + + - + - + + - - + + - - + - + - - - -)

Plackett-Burman Method Design



7 factors, 8 experiments

Plackett-Burman Design Matrix							
Exp no.	A	B	C	D	E	F	G
1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1
2	+1	+1	-1	-1	+1	-1	+1
3	+1	+1	+1	-1	-1	+1	-1
4	-1	+1	+1	+1	-1	-1	+1
5	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1
6	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1
7	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

Youden-Steiner Test for Robustness



7 different factors affecting a result if the nominal values are slightly changed

$2^7 = 128$ combinations possible but only 8 determinations are needed in Youden-Steiner test

A, B, C, D, E, F, G

Alternative values

a, b, c, d, e, f, g

Youden-Steiner Test for Robustness



Factor value	Experiment no.							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A or a	A	A	A	A	a	a	a	a
B or b	B	B	b	b	B	B	b	b
C or c	C	c	C	c	C	c	C	c
D or d	D	D	d	d	d	d	D	D
E or e	E	e	E	e	e	E	e	E
F or f	F	f	f	F	F	f	f	F
G or g	G	g	g	G	g	G	G	g
Observed result	s	t	u	v	w	x	y	z

Youden-Steiner Test for Robustness



- Influence of each variable can be determined by

$$"A - a" = \left(\frac{s + t + u + v}{4}\right) - \left(\frac{w + x + y + z}{4}\right)$$

$$"B - b" = \left(\frac{s + t + w + x}{4}\right) - \left(\frac{u + v + y + z}{4}\right)$$

⋮

$$"G - g" = \left(\frac{s + v + x + y}{4}\right) - \left(\frac{t + u + w + z}{4}\right)$$

Youden-Steiner Test for Robustness



- List [A-a], [B-b],.....[G-g] in the order of size
- Calculate the standard deviation, s , of all 7 differences
- Obtain acceptance criterion: $\sqrt{2} * s$
- If [A-a].....[G-g] $> \sqrt{2} * s$: significant sensitive for changes
- If [A-a].....[G-g] $< \sqrt{2} * s$: no significant sensitive for changes, robust

Youden-Steiner Test for Robustness



Factor value	Experiment no.							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A or a	A	A	A	A	a	a	a	a
B or b	B	B	b	b	B	B	b	b
C or c	C	c	C	c	C	c	C	c
D or d	D	D	d	d	d	d	D	D
E or e	E	e	E	e	e	E	e	E
F or f	F	f	f	F	F	f	f	F
G or g	G	g	g	G	g	G	G	g
Observed result	18.80	20.58	19.90	18.03	19.50	19.16	19.88	19.85

% water distilled from phosphoric acid

Youden-Steiner Test for Robustness



Condition	Factor	% difference
Amount of water	A,a	-0.20
Reaction time	B,b	-0.08
Distillation rate	C,c	0.11
Distillation time	D,d	0.63
N-heptane	E,e	-0.07
Aniline	F,f	-0.83
Reagent	G,g	-0.92
s		0.54
$\sqrt{2} * s$		0.76

Measurement Uncertainty



Contributions of measurement uncertainty including

- Overall long term precision
- Bias and its uncertainty, including the statistical uncertainty involved in the bias measurements and the reference material or method uncertainty
- Calibration uncertainties
- Any significant effects operating in addition to those listed above

Measurement Uncertainty



Source of data for estimation of uncertainty components obtained from method validation:

- Accuracy (bias, recovery)
- Precision (repeatability, reproducibility)
- Robustness/ruggedness

Measurement Uncertainty



4 Approaches

- Bottom-up method: the “GUM” approach
- Top-down method using results from an interlaboratory study by the harmonized IUPAC/AOAC protocol or ISO 5725
- Estimation by applying the Horwitz formula relating the relative standard deviation to concentration
- The supplement GUM approach using Monte Carlo calculation

Measurement Uncertainty



Bottom-up

- Identify each source of uncertainty for the entire measurement, step-by-step, and combine all contributions
- Requires a complete measurement equation and measuring process
- Complex and time consuming
- Homogenization and between-operator variability are not taken into account
- High risk of under-estimation



Uncertainty sources from analysis

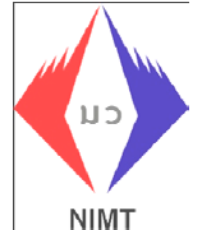
1. **Sample concentration obtained from calibration curve**
2. **Concentration of working standards**
3. **Sample volume**
4. **Precision**
5. **Sample weight**
6. **Recovery**

Uncertainty from Method Validation: Precision



Conc, mg/kg	10	50	200	400
Replicate	Calculated conc			
1	7.5	42	155	320
2	6.9	41	158	318
3	6.5	38	162	322
4	6.8	42	148	332
5	6.3	39	157	351
6	7.2	40	165	315
7	7.4	35	171	328
8	6.8	41	172	326
9	7.1	36	156	317
10	7.4	37	168	333
mean	6.99	39.1	161.2	326.2
s	0.40	2.51	7.76	10.71
%RSD	5.74%	6.43%	4.81%	3.28%

Uncertainty from Method Validation: Precision



$$RSD_{pooled} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)(RSD_1)^2 + (n_2 - 1)(RSD_2)^2 + (n_3 - 1)(RSD_3)^2 + (n_4 - 1)(RSD_4)^2}{(n_1 + n_2 + n_3 + n_4 - 4)}}$$

$$RSD_{pooled} = 5.2\% = u_{prec}$$

Uncertainty from Method Validation: Recovery



- **Determination of organophosphate pesticides in bread by GC**
- **EURACHEM Example A4**
- **Bias study**
 - **The bias of the analytical procedure was investigated during the in-house validation study using **spiked samples**.**
 - **Mean recovery from 42 samples = 90 % with $s_{\text{pooled}} = 28$ %**
 - **The uncertainty in the spiked concentration is small and can be **neglected**.**

Uncertainty from Method Validation: Recovery



- **Mean Recovery = 90 %**
 - **Recovery factor (R) = 0.900**

$$R_m = \frac{C_{obs}}{C_{ref}}$$

- **Uncertainty from Recovery calculated from Standard Deviation of Mean (SDM)**

$$u_R = \frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{0.28}{\sqrt{42}} = 0.0432$$

Uncertainty from Method Validation: Recovery



- Check if R is significant different from 1 by **t-test**

$$H_0 : R = 1$$

$$H_1 : R \neq 1$$

$$t = \frac{|1 - R|}{u_R} = \frac{|1 - 0.9|}{0.0432} = 2.315$$

- $t_{crit} = 2.02$, (df = 41; 95 % CI)
- $t > t_{crit}$, accept H_1
- R is significant different from 1

Uncertainty from Method Validation: Recovery



$$u_R = R_m \sqrt{\left(\frac{u_{C_{obs}}}{C_{obs}}\right)^2 + \left(\frac{u_{C_{ref}}}{C_{ref}}\right)^2}$$

u_R = standard uncertainty of the recovery factor

R_m = recovery factor

C_{obs} = observed concentration

$u_{C_{obs}}$ = standard uncertainty of the observed concentration

C_{ref} = reference concentration

$u_{C_{ref}}$ = standard uncertainty of the reference concentration

Uncertainty from Method Validation: Recovery



In case R is insignificant different from 1
(insignificant bias)

Assume $R = 1$, can neglect uncertainty from
recover and assume that the uncertainty
from recover is included in the uncertainty
from precision

Measurement Uncertainty



Top-down

- Uncertainty is the contribution of reproducibility and bias obtained from interlaboratory comparison
- Human factor is included
- No insight in individual sources of each contribution
- Risk of over-estimation
- Useful for verification of bottom-up approach

Measurement Uncertainty



Bottom-up

- Identify each source of uncertainty for the entire measurement, step-by-step, and combine all contributions
- Requires a complete measurement equation and measuring process
- Complex and time consuming
- Homogenization and between-operator variability are not taken into account
- High risk of under-estimation

Measurement Uncertainty



The Horwitz formula

- Based on review of greater than 10,000 interlaboratory results published in J. AOAC International
- Anticipated uncertainty
- No insight of each contribution
- Horwitz uncertainty is not just the uncertainty of measurement, it reflects the uncertainty due to the inhomogeneity of the samples which increases at the lower mass fractions

Measurement Uncertainty – Important Documents



- **JCGM 100:2008** – Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement – The GUM (2008)
 - Available for free from the BIPM (www.bipm.org)
- **Eurachem Guide** – Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement (2000) (<http://www.eurachem.ul.pt/>)
- **NATA Technical Note 33** - Guidelines for Estimating and Reporting Measurement Uncertainty in Chemical Test Results
- **Nordtest Report** – Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories (2004)
- **Eurolab Technical Report No. 1/2007** – Measurement Uncertainty Revisited: Alternative approaches to uncertainty evaluation (2007)
- <http://www.measurementuncertainty.org/mu/examples/>

Metrological Traceability



Property of a measurement result or of a quantity value with associated measurement uncertainty , carried by a CRM

The result can be related to a reference through a documented unbroken chain of calibrations

Not to a measurement method

Not to a measuring instrument

Not to a material

Not to a measurement institute

But always to a quantity value obtained by a measurement procedure

Metrological Traceability



SI unit for amount of substance

value



Reference Standard

value



Working Standard

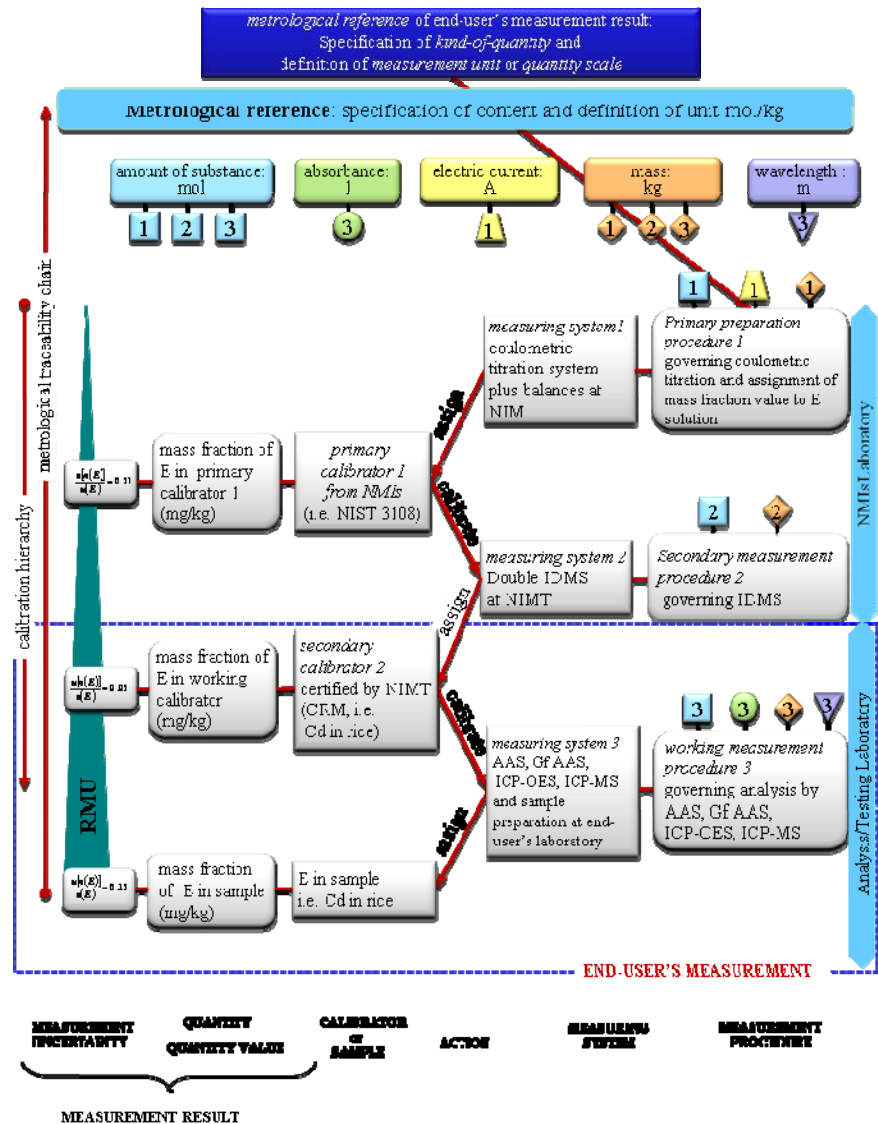
value



amount content of X
compound in solution

Metrological Traceability

Inorganic element (E) in Matrices



Degree of Validation of a Method



Degree of external validation

1. The method is externally validated in a method-performance study
2. The method is externally validated but is used on a new matrix or using new instrument(s)
3. Well established but not tested method

Recommended internal validation

1. Verification of trueness and precision
2. Verification of trueness and precision, possibly also detection limit
3. Verification, possibly a more extensive validation

Degree of Validation of a Method



Degree of external validation

4. The method is published in the scientific literature and states importance characteristics
5. The method is published in scientific literature without presentation of performance characteristics
6. The method was internally developed

Recommended internal validation

4. Verification, possibly a more extensive validation
5. The method needs to be fully validated
6. The method needs to be fully validated

Recommended Steps and Internal Validation Characteristics



1. Design a validation or protocol:
 - The needs of the client
 - What is analytical achievable
 - Conditions of lab (environment, equipment)
2. Determine specificity and standard curve
3. Determine precision, expressed as repeatability and reproducibility
4. Determine trueness
5. Determine working range/measuring range
6. Determine detection limit
7. Determine limit of quantification/limit of determination
8. Determine robustness
9. Determine sensitivity
10. Evaluate the result from step2-8 against the protocol
11. Documented the work in a report

Validation Tools



- Blanks: reagent blanks and sample blanks
- Fortified/Spiked samples
- Incurred materials
- Reference materials (RMs)
- Certified reference materials (CRMs)

Validation Tools



Reagent blanks (solvent blanks)

- Reagents used during the analytical process (including solvents used for extraction or dissolution) are analyzed in isolation in order to see whether they contribute to the measurement signal. The measurement signal arising from the analyte can then be corrected accordingly
- แบบลงค์ที่ประกอบด้วยสารเคมีทุกชนิดที่ใช้ในทุกขั้นตอนการวิเคราะห์ โดยปราศจากสารที่สนใจ (analyte) เพื่อจะตรวจสอบว่าสารเคมีเหล่านั้นให้สัญญาณตอบสนองต่อเครื่องมือวัดหรือไม่

Sample blanks (matrix blanks)

- The matrices with no analyte. They are difficult to obtain but such materials are necessary to give a realistic estimate of interferences that would be encountered in the analysis of test samples
- แบบลงค์ที่เตรียมตามขั้นตอนการวิเคราะห์ทั้งหมด โดยมีตัวกลางของตัวอย่าง (matrix) รวมอยู่ด้วยแต่ปราศจากสารที่สนใจ (analyte) หรือมีในระดับต่ำๆ เพื่อตรวจสอบการรบกวนของสารที่ปนเปื้อนในตัวกลางของตัวอย่าง



Validation Tools

Fortified samples

- These are materials or solutions which have been fortified with the analyte(s) of interest.
- The fortification is usually made by spiking. These materials or solutions may already contain the analyte of interest
- Fortification with a known amount of analyte enables the increase in response to the analyte to be measured and calculated in terms of the amount added

ตัวอย่างที่เติม analyte ลงไปเพื่อเพิ่มสัญญาณจาก analyte และเพื่อศึกษาค่า recovery การ fortify มักใช้กับการเติม analyte เพิ่มลงไป

Spiked samples

- Similar to the fortified sample but spiking does not necessary have to be restricted to the analyte of interest

ความหมายจะคล้ายกับ fortify แต่การ spike จะไม่จำกัดเฉพาะกับ analyte เท่านั้น แต่จะรวมถึงการเติมสารตัวอื่นๆ เช่น internal standard, สารที่สงสัยว่าจะเป็นตัวรบกวนตัวอย่าง เป็นต้น

Validation Tools



Incurred samples

- The materials in which the analyte of interest may be essentially alien, but has been introduced to the bulk at some point prior to the material being sampled
- The analyte is thus more closely bound in the matrix than it would be by spiking
 1. *Herbicides in flour from cereal sprayed with herbicides during its growth.*
 2. *Growth promoters in meat derived from beast fed with feeds containing the promoters*
 3. *Active ingredients in pharmaceutical formulations added at the formulation stage*

ตัวอย่างที่มี analyte เป็นองค์ประกอบตามธรรมชาติหรือทำให้เกิดขึ้นคล้ายคลึงกับการเกิดตามธรรมชาติ เพื่อให้ analyte จับกับตัวกลางแน่นกว่าการ fortify หรือการ spike

Validation Tools



Reference materials (RMs)

- Any materials used as a basis for reference, and could include laboratory reagents of known purity, industrial chemicals, or other artifacts
- The property or analyte of interest needs to be stable and homogenous
- The material does not need to have the high degree of characterization, traceability and certification more properly associated with certified reference materials

วัสดุหรือสารที่มีคุณสมบัติหนึ่งอย่างหรือหลายอย่าง มีความเป็นเนื้อเดียวกันและเตรียมขึ้นอย่างดีเพื่อใช้สำหรับการสอบเทียบเครื่องมือ ใช้ในการประเมินวิธีวัดหรือใช้กำหนดค่าของวัสดุต่างๆ

(นิยามศัพท์เกี่ยวกับระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์)

Validation Tools



Certified reference materials (CRMs)

- The characterization of the parameter of interest in a *certified reference material* is generally more strictly controlled than for a *reference material*
- The characterized value is certified with a stated uncertainty by a recognized institution
- Characterization is normally done using several different methods, so that as far as possible,
- Any bias in the characterization is reduced or even eliminated
- วัสดุอ้างอิงที่มีใบประกาศนียบัตรรับรองค่าของคุณสมบัติอย่างหนึ่งหรือหลายอย่าง ผ่านการรับรองโดยวิธีการที่สามารถสอบกลับไปได้ยังค่าที่ถูกต้องที่แสดงไว้ พร้อมระบุค่าความไม่แน่นอนที่ระดับความเชื่อมั่นตามที่กำหนด

(นิยามศัพท์เกี่ยวกับระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์)

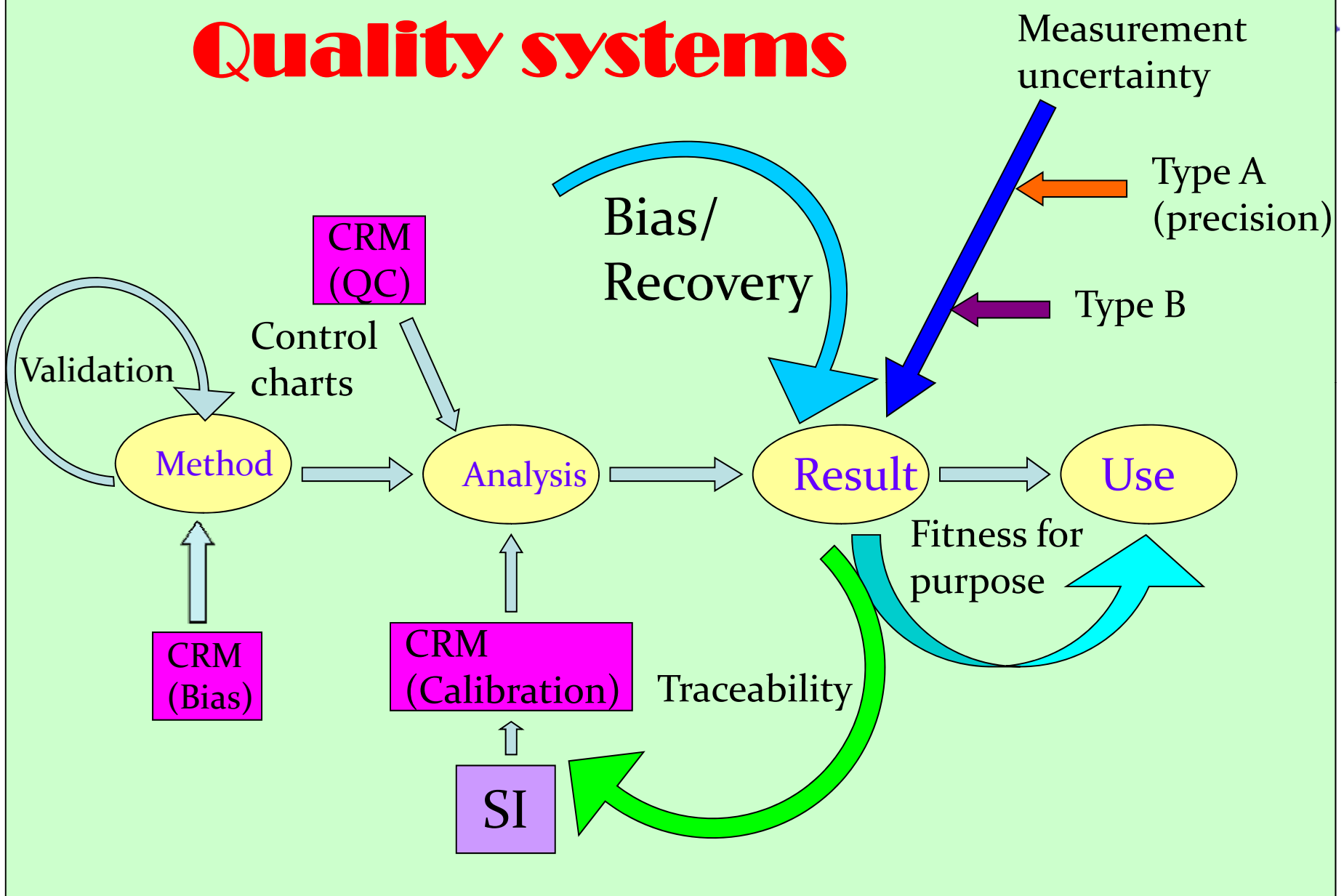
สรุปความหมายของ *RM* และ *CRM*



- **RM** → Homogeneous
 - Stable
 - Specified properties value
- **CRM** → Homogeneous
 - Stable
 - Specified property value
 - **Certificate (acc. ISO Guide 31)**
 - + **Uncertainty + Traceability**
 - **Metrologically valid procedure**



Quality systems



References



- Eurachem Guide “The Fitness for Purpose of Analytical Methods” LGC, UK, December 1998
- NATA Technical Note 17 “Guidelines for the validation and verification of chemical test methods”, Australia, April 2009
- Train-the –trainer course “Analytical Method Validation”, National Measurement Institute, Australia, September, 2010
- The Association of Official Analytical Chemists (AOAC international), “Peer-Verified Methods Program”, November, 1993



Thank You