



VIỆN KIỂM NGHIỆM AN TOÀN VỆ SINH THỰC PHẨM QUỐC GIA

EBOOKBKMT.COM

HỖ TRỢ TÀI LIỆU HỌC TẬP

# THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP TRONG PHÂN TÍCH HÓA HỌC & VI SINH VẬT



NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT

**VIỆN KIỂM NGHIỆM AN TOÀN VỆ SINH THỰC PHẨM QUỐC GIA**

**EBOOKBKMT.COM**

**HỖ TRỢ TÀI LIỆU HỌC TẬP**

# **THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP TRONG PHÂN TÍCH HÓA HỌC VÀ VI SINH VẬT**



**NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT  
HÀ NỘI**

**Chủ biên:**

DS. Trần Cao Sơn

**Nhóm biên soạn:**

DS. Trần Cao Sơn

PGS. TS. Phạm Xuân Đà

TS. Lê Thị Hồng Hảo

CN. Nguyễn Thành Trung

**Hiệu đính:**

PGS. Phạm Gia Huệ

KS. Phạm Thanh Nhã

## LỜI GIỚI THIỆU

Cùng với sự phát triển của khoa học công nghệ, kinh tế - xã hội việc chăm sóc và bảo vệ sức khỏe, nâng cao chất lượng cuộc sống của con người ngày càng được quan tâm, trong đó có vấn đề an toàn thực phẩm. Bảo đảm nguồn thực phẩm an toàn sẽ góp phần bảo vệ và cải thiện sức khỏe, chất lượng cuộc sống và giống nòi dân tộc. Tuy nhiên, công tác bảo đảm an toàn thực phẩm luôn là một thách thức không chỉ với các nước đang phát triển mà ngay cả với các nước phát triển. Sự đa dạng của các chủng loại thực phẩm, công nghệ, các chất phụ gia, các chất hỗ trợ chế biến, các chất ô nhiễm thực phẩm luôn được cải tiến, bổ sung... là thách thức đối với hệ thống quản lý, kiểm soát an toàn thực phẩm, đặc biệt là đối với các phòng kiểm nghiệm. Do đó, việc nâng cao năng lực hệ thống phòng kiểm nghiệm an toàn thực phẩm đóng vai trò đặc biệt quan trọng trong công tác quản lý an toàn thực phẩm của mỗi quốc gia, nhất là trong giai đoạn hội nhập kinh tế toàn cầu hiện nay.

Tại Việt Nam, trong những năm gần đây công tác bảo đảm an toàn thực phẩm đã được Đảng và Nhà nước đặc biệt quan tâm và đã gặt hái được nhiều thành tựu đáng khích lệ. Hệ thống pháp luật, quản lý đã được hình thành và kiện toàn, trong đó có hệ thống kiểm nghiệm an toàn thực phẩm mà điển hình là sự ra đời của Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia (theo Quyết định số 376/QĐ-TTg ngày 23/3/2009) với chức năng là đơn vị trọng tài quốc gia trong kiểm nghiệm thực phẩm. Tuy nhiên, do nhiều yếu tố và nguồn lực đầu tư chưa đáp ứng, hệ thống kiểm nghiệm thực phẩm của Việt Nam còn gặp rất nhiều khó khăn, ngay cả ở cấp Trung ương. Bởi vì đối với hệ thống kiểm nghiệm thực phẩm, không chỉ cần đầu tư thỏa đáng về cơ sở vật chất, trang thiết bị, con người mà cần phải đầu tư các hệ thống quản lý chất lượng, kỹ thuật (phương pháp) phân tích phù hợp.

Hiện nay đa số các phòng kiểm nghiệm thực phẩm của các địa phương sử dụng các phương pháp thử nghiệm khác nhau, chưa được chuẩn

hoá hoặc không thống nhất nên rất khó đánh giá kết quả hoặc kết quả không bảo đảm độ tin cậy ảnh hưởng trực tiếp đến công tác quản lý nhà nước. Nhằm từng bước hướng tới tiêu chuẩn hoá các phòng kiểm nghiệm và phương pháp kiểm nghiệm thực phẩm, Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia ban hành cuốn tài liệu “Thẩm định phương pháp trong phân tích hoá học và vi sinh vật” như một tài liệu tham chiếu cho các phòng kiểm nghiệm thực phẩm. Nội dung cuốn tài liệu gồm hai phần chính là thẩm định phương pháp phân tích hoá học và thẩm định phương pháp phân tích vi sinh vật với những cách bố trí thí nghiệm và cách tính cụ thể có các ví dụ thực tiễn. Ngoài ra cuốn tài liệu cũng giới thiệu cách ước lượng độ không bảo đảm đo và các chương trình bảo đảm chất lượng kết quả thử nghiệm mà các phòng kiểm nghiệm có thể thực hiện được.

Hy vọng cuốn tài liệu nhỏ này sẽ ít nhiều hữu ích đối với bạn đọc. Do lần đầu tiên biên soạn nên cuốn tài liệu sẽ không tránh khỏi thiếu sót, ban soạn thảo rất mong nhận được sự đóng góp của đồng nghiệp xa gần.

*Xin trân trọng cảm ơn.*

*TM. Nhóm biên soạn*

**PGS.TS. Phạm Xuân Đà**

**Viện trưởng**

**VIỆN KIỂM NGHIỆM AN TOÀN  
VỆ SINH THỰC PHẨM QUỐC GIA**

## LỜI CẢM ƠN

Xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến những người thầy PGS. Phạm Gia Huệ và KS. Phạm Thanh Nhã - những người đã trực tiếp hỗ trợ và đóng góp ý kiến sửa chữa để hoàn thiện cuốn sách.

Xin chân thành cảm ơn những người thầy, người bạn, đồng nghiệp trong hội đồng khoa học thông qua nội dung cuốn sách PGS.TS. Trần Chương Huyền, PGS.TS. Tạ Thị Thảo, Trường Đại học Quốc gia Hà Nội; PGS.TS. Thái Phan Quỳnh Như, TS. Trần Việt Hùng, Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương; TS. Trần Đăng Ninh, Cục Quản lý chất lượng Nông lâm sản và Thủy sản; ThS. Lê Văn Giang, Cục An toàn vệ sinh thực phẩm và KS. Nguyễn Thị Vân Lan, Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia vì những ý kiến đóng góp quý báu trong quá trình biên soạn cuốn sách.

Xin chân thành cảm ơn các bạn đồng nghiệp tại Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia đã tạo điều kiện hỗ trợ để xuất bản cuốn sách.

*Nhóm biên soạn*

# MỤC LỤC

MỤC LỤC.....	7
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT.....	9
Chương I: CÁC YÊU CẦU CHUNG.....	10
1. Khái niệm về thẩm định phương pháp.....	10
2. Thẩm định phương pháp tiêu chuẩn (method verification).....	11
3. Thẩm định phương pháp không tiêu chuẩn (method validation) .....	13
4. Thẩm định lại.....	14
Chương II: THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH HÓA HỌC .....	16
1. Tính đặc hiệu/chọn lọc.....	19
1.1. Định nghĩa .....	19
1.2. Cách xác định.....	20
1.3. Tính đặc hiệu/chọn lọc đối với phương pháp chuẩn .....	24
2. Khoảng tuyến tính và đường chuẩn .....	25
2.1. Định nghĩa .....	25
2.2. Cách xác định khoảng tuyến tính.....	26
2.3. Xây dựng đường chuẩn .....	26
2.4. Các lưu ý khi xây dựng đường chuẩn .....	30
2.5. Giới hạn chấp nhận của đường chuẩn .....	31
3. Giới hạn phát hiện.....	32
3.1. Định nghĩa .....	32
3.2. Cách xác định.....	32
4. Giới hạn định lượng .....	36
4.1. Định nghĩa .....	36
4.2. Cách xác định.....	37
5. Độ chính xác (độ đúng và độ chụm).....	39
5.1. Độ chụm .....	40
5.2. Độ đúng (trueness) .....	47
6. Độ ổn định (hay độ vững/độ chắc chắn) của phương pháp.....	58
6.1. Định nghĩa .....	58

6.2. Cách xác định.....	59
<b>Chương III: THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH VI SINH VẬT .....</b>	<b>60</b>
1. Các yêu cầu chung .....	60
1.1. Chuẩn bị thẩm định .....	60
1.2. Lựa chọn thông số thẩm định .....	62
2. Thẩm định phương pháp tiêu chuẩn (method verification).....	63
2.1. Phương pháp định tính .....	63
2.2. Phương pháp định lượng .....	67
<b>Chương IV: ƯỚC LƯỢNG ĐỘ KHÔNG ĐẢM BẢO ĐO.....</b>	<b>74</b>
1. Khái niệm về độ không đảm bảo đo .....	74
2. Các nguồn gây ra độ không đảm bảo đo .....	74
3. Các cách đánh giá độ không đảm bảo đo.....	75
3.1. Cách 1: Ước lượng độ không đảm bảo đo theo hướng dẫn của EURACHEM.....	75
3.2. Cách 2: Ước lượng độ không đảm bảo đo từ dữ liệu phân tích mẫu thực.....	83
4. Công bố độ không đảm bảo đo .....	85
4.1. Cách viết độ không đảm bảo đo chuẩn tổng hợp.....	86
4.2. Cách viết độ không đảm bảo đo mở rộng.....	86
<b>Chương V: ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM.....</b>	<b>88</b>
1. Phép thử nghiệm lặp lại.....	89
2. Phép thử nghiệm tái lập.....	89
3. Phép thử nghiệm trên mẫu lưu.....	89
4. Phép thử nghiệm trên mẫu trắng.....	89
5. Phép thử nghiệm trên mẫu chuẩn .....	90
6. Phép thử nghiệm trên mẫu thêm.....	90
7. Sử dụng các phương pháp khác nhau .....	91
8. Đánh giá sự phù hợp của hệ thống.....	91
9. Tham gia các chương trình thử nghiệm liên phòng .....	92
10. Sử dụng biểu đồ kiểm soát .....	93
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO.....</b>	<b>101</b>
<b>PHỤ LỤC</b>	



## DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

<b>AOAC (Association of Official Analytical Chemists)</b>	Hiệp hội các nhà hóa phân tích chính thức
<b>ASTM (American Society for Testing of Materials)</b>	Hiệp hội phép thử Mỹ
<b>CRM (Certified reference material)</b>	Mẫu chuẩn được chứng nhận
<b>DAD (Diod array detector)</b>	Detector mảng diod
<b>GC-MS (Gas chromatography mass spectrometry)</b>	Sắc ký khí khối phổ
<b>HPLC (High performance liquid chromatography)</b>	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
<b>HR (High resolution)</b>	Độ phân giải cao
<b>ICH (International Conference on Harmonization)</b>	Hội đồng hòa hợp quốc tế
<b>IP (Identification point)</b>	Điểm nhận dạng
<b>ISO (International Standard Organization)</b>	Tổ chức tiêu chuẩn quốc tế
<b>LC-MS (Liquid chromatography mass spectrometry)</b>	Sắc ký lỏng khối phổ
<b>LOD (Limit of Detection)</b>	Giới hạn phát hiện
<b>LOQ (Limit of Quantification)</b>	Giới hạn định lượng
<b>LR (Low resolution)</b>	Độ phân giải thấp
<b>MRLs (Maximum residue Limits)</b>	Giới hạn tồn dư tối đa
<b>QC (Quality control)</b>	Kiểm tra chất lượng
<b>S/N (Signal to noise ratio)</b>	Tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu
<b>SOP (Standard Operation Procedure)</b>	Quy trình thao tác chuẩn
<b>TCVN</b>	Tiêu chuẩn Việt Nam
<b>USFDA (United States Food and Drug Administration)</b>	Cục Dược phẩm và Thực phẩm Mỹ
<b>USP (United States Pharmacopoeia)</b>	Dược điển Mỹ

## Chương I: CÁC YÊU CẦU CHUNG

### 1. Khái niệm về thẩm định phương pháp

Thẩm định phương pháp là sự khẳng định bằng việc kiểm tra và cung cấp bằng chứng khách quan chứng minh rằng phương pháp đó đáp ứng được các yêu cầu đặt ra (fitness for the purpose). Kết quả của thẩm định phương pháp có thể được sử dụng để đánh giá chất lượng, độ tin cậy của kết quả phân tích. **Thẩm định phương pháp phân tích là một phần không thể thiếu nếu muốn có một kết quả phân tích đáng tin cậy.**

Hiện nay nhiều thuật ngữ khác nhau được sử dụng để chỉ khái niệm trên, như định trị phương pháp, đánh giá phương pháp, xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp, phê duyệt phương pháp. Tất cả các thuật ngữ này đều là cách gọi khác nhau của thẩm định phương pháp (method validation).

Phòng thử nghiệm thường sử dụng nhiều phương pháp khác nhau. Dựa vào nguồn gốc có thể phân loại các phương pháp thành hai nhóm:

- Các phương pháp tiêu chuẩn: các phương pháp thử theo tiêu chuẩn quốc gia, quốc tế, hiệp hội khoa học được chấp nhận rộng rãi trên thế giới như TCVN, ISO, ASTM, AOAC...

- Các phương pháp không tiêu chuẩn hay phương pháp nội bộ (non-standard/alternative/in-house method): là các phương pháp do phòng thử nghiệm tự xây dựng, phương pháp theo hướng dẫn của nhà sản xuất thiết bị, phương pháp theo các tạp chí, tài liệu chuyên ngành...

**Theo yêu cầu của ISO 17025**, phương pháp phân tích phải được thẩm định hoặc thẩm định lại khi:

- Phương pháp áp dụng không phải là phương pháp tiêu chuẩn (non-standard method)
- Phương pháp do phòng thử nghiệm tự xây dựng mới trước khi đưa vào sử dụng thành thường quy.
- Có sự thay đổi về đối tượng áp dụng nằm ngoài đối tượng áp dụng của phương pháp đã thẩm định hoặc phương pháp tiêu chuẩn.
- Có sự thay đổi các điều kiện thực hiện phương pháp đã được thẩm định (ví dụ: thiết bị phân tích với các đặc tính khác biệt, nền mẫu, người phân tích ...).

## **2. Thẩm định phương pháp tiêu chuẩn (method verification)**

Trước khi áp dụng một phương pháp phân tích cần có các chứng minh rằng phương pháp đó đáp ứng yêu cầu đặt ra, tức là phương pháp phải được thẩm định. Yêu cầu này không chỉ cho các phương pháp thử nội bộ mà còn cần cho các phương pháp tiêu chuẩn. Việc thẩm định phương pháp tiêu chuẩn và phương pháp nội bộ có sự khác nhau, do đó cần chú ý khi lập kế hoạch thẩm định.

Có hai yêu cầu chủ yếu của việc thẩm định phương pháp tiêu chuẩn:

- Phải có kết quả thẩm định của phương pháp tiêu chuẩn, và kết quả này phải phù hợp với yêu cầu của phòng thử nghiệm.
- Phòng thử nghiệm cần đảm bảo có thể đạt được các thông số được mô tả trong phương pháp tiêu chuẩn.

Theo yêu cầu của ISO 17025, khi các phòng thử nghiệm áp dụng các phương pháp tiêu chuẩn cần có hồ sơ đánh giá các điều kiện cơ bản, các nguồn lực theo yêu cầu của phương pháp thử và việc đạt được kết quả thử nghiệm có độ chính xác như phương pháp yêu cầu hoặc như mong muốn

của phòng thử nghiệm. Đối với các phương pháp thử đã ban hành mà không có dữ liệu về độ chính xác thì phòng thử nghiệm phải xác định dữ liệu độ chính xác của phép thử dựa trên dữ liệu nghiên cứu thử nghiệm.

Để xây dựng các bước thẩm định phương pháp tiêu chuẩn cần kiểm tra:

1. Phương pháp đã được thẩm định hay chưa, thẩm định toàn bộ hay một phần?
2. Nền mẫu có giống nhau hay không?
3. Khoảng làm việc của phương pháp có phù hợp với yêu cầu của phòng thử nghiệm hay không?
4. Có cùng loại thiết bị (hãng sản xuất, model) hay không? Phương pháp tiêu chuẩn có cho sử dụng các loại thiết bị khác không?
5. Có những lưu ý gì đặc biệt của phương pháp tiêu chuẩn mà phòng thử nghiệm không thể đáp ứng không?

Nếu một trong các yếu tố trên không phù hợp, thì phòng thử nghiệm cần thực hiện các phép thử để đánh giá lại phương pháp. Các kết quả đánh giá này cần phải tương ứng với các kết quả thẩm định của phương pháp chuẩn, nếu không cần phải thẩm định lại toàn bộ phương pháp.

Việc đánh giá bao gồm:

1. Khẳng định tình trạng đầy đủ thiết bị, nhân viên, thuốc thử, môi trường và các điều kiện khác để thực hiện phép thử.
2. Kiểm tra các thông số cơ bản nhất của phương pháp, theo yêu cầu cụ thể của từng lĩnh vực hóa học và vi sinh sẽ được mô tả chi tiết trong các chương sau.

### 3. Thẩm định phương pháp không tiêu chuẩn (method validation)

Đối với phương pháp không tiêu chuẩn, việc thẩm định phải trải qua nhiều bước hơn, bắt đầu từ quá trình nghiên cứu khảo sát phương pháp, tối ưu hóa phương pháp đến khi hoàn thiện phương pháp. Thẩm định phương pháp là một yêu cầu bắt buộc phải thực hiện đi kèm với việc phát triển phương pháp mới và áp dụng các phương pháp không tiêu chuẩn vào thực hiện thành thường quy. Các bước tiến hành thẩm định bao gồm:

1. Xây dựng SOP dự kiến (theo các tài liệu tham khảo hoặc theo các nghiên cứu xây dựng phương pháp mới)
2. Xây dựng đề cương (kế hoạch) thẩm định bao gồm:
  - a. Xác định thời gian và người thực hiện
  - b. Chất cần phân tích: tên chất, dự đoán hàm lượng trong mẫu
  - c. Xác định đối tượng thẩm định: nền mẫu
  - d. Xác định mục đích cần phải đạt: yêu cầu về giới hạn cho phép (nếu có), cần đạt LOD, LOQ, độ chính xác... bao nhiêu?
  - e. Xác định các thông số cần thẩm định và khoảng chấp nhận
  - f. Xác định các thí nghiệm cần thực hiện
3. Kiểm tra các điều kiện cần cho công việc thẩm định
  - a. Các yêu cầu về trang thiết bị
  - b. Hóa chất, thuốc thử
  - c. Mẫu thí nghiệm
4. Thực hiện thẩm định

- a. Các phép thử thẩm định sơ bộ
- b. Thay đổi các thông số của phương pháp (nếu cần)
- c. Thực hiện thẩm định hoàn thiện

5. Hoàn thiện SOP của phương pháp

6. Báo cáo thẩm định: cần có các thông tin sau

- a. Tên người thẩm định, thời gian thẩm định
- b. Tóm tắt phương pháp: nguyên lý, thiết bị, hóa chất, quy trình, các lưu ý...
- c. Các kết quả thẩm định
- d. Các yêu cầu cần đáp ứng để đưa phương pháp vào thực hiện thường xuyên (routine): kiểm tra tính tương thích của hệ thống, mẫu QC, ước lượng độ không đảm bảo đo của kết quả...
- e. Xác định các thông số và thời gian cần thẩm định lại
- f. Tài liệu tham khảo (nếu có)
- g. Kết luận và đề xuất (nếu có)
- h. Ký tên, ngày của người làm báo cáo
- i. Ký phê duyệt của người có thẩm quyền

#### **4. Thẩm định lại**

Công việc thẩm định không phải chỉ thực hiện một lần khi phát triển phương pháp ban đầu mà cần thực hiện trong suốt quá trình áp dụng. Vì đa số các điều kiện thực hiện phương pháp có sự thay đổi trong suốt quá trình

áp dụng. Ví dụ như có sự thay đổi hoặc mở rộng đối tượng áp dụng, thay đổi địa điểm phòng thử nghiệm, thay đổi nhân viên, thay đổi thiết bị (áp dụng trên các thiết bị cùng loại khác), thay đổi các điều kiện về tiện nghi môi trường, thay đổi về dung môi hóa chất thuốc thử, những thay đổi nhỏ khác (ví dụ nhiệt độ cột phân tích, pH pha động...). Trong trường hợp kết quả phân tích mẫu kiểm tra (QC) hoặc kết quả đánh giá sự phù hợp của hệ thống nằm ngoài giới hạn cho phép thì phương pháp cũng cần phải thẩm định lại. Phòng thử nghiệm nên phối hợp quá trình tính độ ổn định (độ vững) với quá trình thẩm định lại các phương pháp phân tích hàng ngày (routine method).

Các thông số cần thẩm định lại phụ thuộc vào mức độ ảnh hưởng của các thay đổi đến các thông số của phương pháp. Thông thường tiến hành thẩm định các thông số cơ bản nhất như trong trường hợp thẩm định các phương pháp tiêu chuẩn. Tuy nhiên nếu những kết quả thẩm định này có sự sai khác nhiều so với kết quả thẩm định ban đầu thì cũng cần thực hiện thẩm định lại toàn bộ.

Các chương sau sẽ giới thiệu chi tiết các khái niệm, các cách bố trí thí nghiệm để thẩm định phương pháp phân tích hóa học và vi sinh, cũng như các cách nhằm đảm bảo chất lượng kết quả thử nghiệm.

## **Chương II: THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH HÓA HỌC**

Như đã nêu trong chương I, thẩm định phương pháp là một công việc rất khó khăn, nhàm chán, và tốn kém tuy nhiên lại là một nội dung quan trọng ảnh hưởng đến độ chính xác của kết quả phân tích. Cần cân nhắc mục đích yêu cầu của từng phương pháp và nguồn lực để lựa chọn thông số thẩm định cho phù hợp.

Theo các quy định của USFDA, AOAC, USP và ICH, đối với các phương pháp phân tích hóa học các thông số cần thẩm định bao gồm:

- Tính đặc hiệu, tính chọn lọc; (Specificity/Selectivity)
- Khoảng tuyến tính và đường chuẩn; (Linearity and Calibration curve)
- Giới hạn phát hiện; (Limit of Detection – LOD)
- Giới hạn định lượng; (Limit of Quantitation – LOQ)
- Độ đúng; (Trueness)
- Độ chụm; (Precision)
- Độ vững (ổn định) của phương pháp; (Robustness/Ruggedness)

Việc lựa chọn các thông số thẩm định tùy thuộc vào kỹ thuật áp dụng trong phương pháp, yêu cầu của phương pháp, điều kiện và nguồn lực của phòng thử nghiệm... Từng trường hợp cụ thể các thông số thẩm định có thể có sự khác nhau.



Mỗi phương pháp phân tích hóa học có một mục đích nhất định, từ việc xác định một chất ở nồng độ thấp đến xác định độ tinh khiết của một chất. Để dễ dàng cho việc lựa chọn các thông số thẩm định, các phương pháp có thể được chia làm bốn nhóm tùy thuộc vào mục đích của chúng:

- Các phương pháp phân tích định tính;
- Các phương pháp phân tích vi lượng;
- Các phương pháp phân tích đa lượng;
- Xác định giới hạn tạp chất (thử độ tinh khiết).

Các yêu cầu về thông số cần thẩm định cho từng loại phương pháp được mô tả ở bảng 1 (phương pháp không tiêu chuẩn) và bảng 2 (phương pháp tiêu chuẩn). Người thực hiện thẩm định cần lựa chọn đúng cách thẩm định cho từng thông số và lập kế hoạch cho từng nội dung.

**Bảng 1:** Lựa chọn thông số thẩm định phương pháp không tiêu chuẩn

Các thông số thẩm định	Phân tích định tính	Phân tích vi lượng	Phân tích đa lượng	Xác định giới hạn tạp chất
Độ đúng (Trueness)	–	+	+	–
Độ chụm (Precision)	–	+	+	–
Độ đặc hiệu, chọn lọc (Specification/Selectivity)	+	+	+	+
LOD	+	+	+/-	+

(Limit of detection)				
LOQ (Limit of quantitation)	–	+	+/-	–
Độ tuyến tính (Linearity/range)	–	+	+	–
Độ vững (ổn định) (Ruggedness/Robustness)	–	+	+	–

(+) Cần thực hiện thẩm định (-) Không cần thực hiện thẩm định

**Bảng 2:** Lựa chọn thông số thẩm định phương pháp tiêu chuẩn

Các thông số đánh giá	Phân tích định tính	Phân tích vi lượng	Phân tích đa lượng	Xác định giới hạn tạp chất
Độ đúng (Trueness)	–	+	+	–
Độ chụm (Precision)	–	+	+	–
Độ đặc hiệu, chọn lọc (Specification/Selectivity)	–	–	–	–
LOD (Limit of detection)	+	–	–	+

LOQ (Limit of quantitation)	–	+	–	–
Độ tuyến tính (Linearity/range)	–	–	–	–
Độ vững (ổn định) (Ruggedness/Robustness)	–	–	–	–

(+) Cần thực hiện thẩm định (-) Không cần thực hiện thẩm định

## 1. Tính đặc hiệu/chọn lọc

### 1.1. Định nghĩa

\* *Tính đặc hiệu*: Là khả năng phát hiện được chất phân tích khi có mặt các tạp chất khác như các tiền chất, các chất chuyển hóa, các chất tương tự, tạp chất.... Cụ thể, trong phép phân tích định tính đó là phải chứng minh được kết quả là dương tính khi có mặt chất phân tích, âm tính khi không có mặt nó, đồng thời kết quả phải là âm tính khi có mặt các chất khác có cấu trúc gần giống chất phân tích. Trong phép phân tích định lượng, là khả năng xác định chính xác chất phân tích trong mẫu khi bị ảnh hưởng của tất cả các yếu tố khác, nhằm hướng đến kết quả chính xác.

Tính đặc hiệu thường liên quan đến việc xác định chỉ một chất phân tích.

\* *Tính chọn lọc*: Là khái niệm rộng hơn tính đặc hiệu, liên quan đến việc phân tích một số hoặc nhiều chất chung một quy trình. Nếu chất cần xác định phân biệt rõ với các chất khác thì phương pháp phân tích có tính chọn lọc.

Như vậy, tính chọn lọc có thể bao trùm cả tính đặc hiệu. Do các phương pháp phân tích thường có nhiều chất cùng xuất hiện nên khái niệm tính chọn lọc thường mang tính khái quát hơn.

## **1.2. Cách xác định**

### **1.2.1. Trường hợp chung**

Để xác định tính đặc hiệu/chọn lọc của phương pháp định tính, định lượng cần bố trí các thí nghiệm như sau:

- Phân tích các mẫu trắng, lặp lại tối thiểu 6 lần đối với từng loại nền mẫu. Mẫu trắng phải không được cho tín hiệu phân tích. Nếu mẫu trắng có hơn 10% dương tính hoặc xuất hiện tín hiệu thì cần phải thay đổi phương pháp để loại trừ các ảnh hưởng.
- Phân tích mẫu thử hoặc mẫu trắng thêm chuẩn ở hàm lượng gần LOQ, lặp lại tối thiểu 6 lần. So sánh kết quả với mẫu trắng, phải cho tín hiệu chất cần phân tích.
- Sử dụng phương pháp thêm chuẩn sau chuẩn bị mẫu (co-chromatography), cách này thường áp dụng đối với các phương pháp sắc ký. Sau khi chuẩn bị mẫu (mẫu trắng hoặc mẫu thực) và phân tích mẫu trên thiết bị sắc ký thu được các pic sắc ký, ta thêm chuẩn vào mẫu đã chiết xuất và phân tích mẫu này. So sánh sắc ký đồ của hai mẫu để đánh giá tính đặc hiệu/chọn lọc.
- Phân tích mẫu không có chất phân tích nhưng có chất cấu trúc tương tự chất phân tích (nếu có): Phải cho kết quả âm tính (đối với phương pháp định tính) và không được ảnh hưởng đến kết quả định lượng của chất phân tích (đối với phương pháp định lượng).

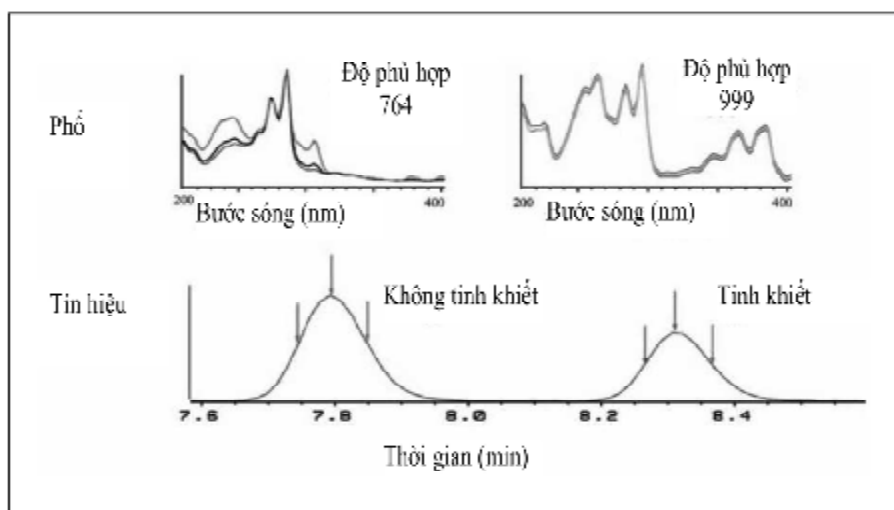
Trong trường hợp những chỉ tiêu phân tích không thể có mẫu trắng (sample blank) để xác định tính chọn lọc/đặc hiệu, có thể thực hiện các thí nghiệm trên các mẫu trắng thuốc thử (reagent blank), tức là thực hiện phân tích các bước tương tự như khi phân tích mẫu nhưng không có mẫu thử.

### **1.2.2. Các trường hợp đặc biệt**

- Sắc ký lỏng sử dụng detector DAD (màng diod)

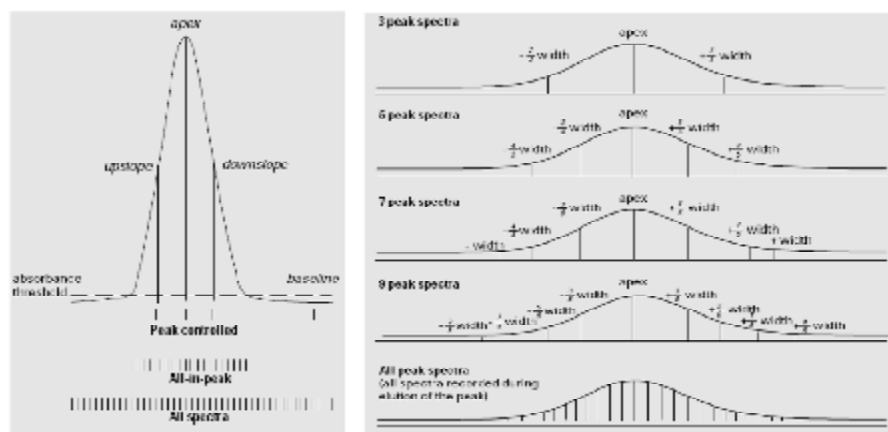
Tính chọn lọc trong sắc ký lỏng có thể đạt được thông qua việc lựa chọn cột tối ưu, điều kiện sắc ký tối ưu, nhiệt độ cột và bước sóng. Ngoài

việc thay đổi điều kiện sắc ký, thì giai đoạn xử lý mẫu cũng phải tối ưu để đạt được tính chọn lọc cao nhất. Trong sắc ký, cần xác định rằng pic sắc ký có phải là một pic đơn hay có lẫn các tạp chất khác. Đối với các hệ thống sắc ký có detector mảng diod (DAD) có thể xác định được tính chọn lọc thông qua xác định độ tinh khiết (peak purity) của pic, hay so sánh phổ của pic với thư viện phổ sẵn có.



**Hình 1:** Xác định độ tinh khiết của pic trong sắc ký lỏng HPLC-DAD

Độ tinh khiết của pic được xác định bằng cách so sánh phổ tại các điểm khác nhau trên pic sắc ký. Cách phổ biến nhất là chọn tại ba điểm: đỉnh pic (apex), và hai điểm về hai bên sườn của pic (upslope và downslope). Thông thường chọn hai điểm tại 2/3 độ rộng của pic về hai phía. Ngoài ra hiện nay đa số các thiết bị đều có phần mềm tính toán độ tinh khiết của pic, có thể dựa vào 3 điểm, 5 điểm, 7 điểm hay tất cả các điểm tạo thành pic. Các thiết bị hiện đại có thể tính toán độ tinh khiết trực tiếp thông qua phần mềm điều khiển.



**Hình 2:** Các cách xác định độ tinh khiết của pic sắc ký HPLC-DAD

So sánh phổ của pic với phổ chuẩn cũng là một cách phổ biến để xác định sự tinh khiết của pic. Một pic được xem là không tinh khiết khi giá trị phù hợp (hệ số match) không đạt xấp xỉ 100%. Tuy nhiên, nếu giá trị này có gần 100% cũng không thể khẳng định được chắc chắn sự tinh khiết của pic, có thể do một trong số các nguyên nhân sau:

- Tạp chất tồn tại với lượng thấp hơn nhiều so với chất phân tích do đó phổ UV-Vis không ảnh hưởng nhiều đến phổ của chất phân tích.
- Phổ của tạp chất và chất phân tích tương tự nhau.

#### • Sắc ký khối phổ

Các thiết bị sắc ký khí có gắn detector MS, thường so sánh phổ của chất phân tích với phổ chuẩn có sẵn trong thư viện đi kèm hoặc phổ của chất chuẩn tương ứng.

Sử dụng các phương pháp xác nhận (confirmation method) là một cách rất tốt để đảm bảo tính đặc hiệu của phương pháp. Hội đồng châu Âu quy định cách tính điểm IP (điểm nhận dạng – identification point) đối với

các phương pháp khác nhau để khẳng định chắc chắn sự có mặt của một chất. Cách tính điểm IP đối với các kỹ thuật khối phổ khác nhau được quy định như sau:

**Bảng 3:** Quan hệ giữa các kỹ thuật khối phổ và số điểm IP đạt được

Kỹ thuật khối phổ	Số điểm IP đạt được với 1 ion
MS phân giải thấp (LR-MS)	1,0
LR-MS (ion mẹ)	1,0
LR-MS (ion con)	1,5
MS phân giải cao (HR-MS)	2,0
HR-MS (ion mẹ)	2,0
HR-MS (ion con)	2,5

**Bảng 4:** Ví dụ về số điểm IP đạt được đối với các kỹ thuật khối phổ khác nhau

Kỹ thuật	Số ion	Số điểm IP
GCMS (EI hoặc CI)	n	n
GCMS (EI và CI)	2 (EI) + 2 (CI)	4
GCMS (EI hoặc CI) hai dẫn xuất	2 (dc A) + 2 (dc B)	4
LC-MS	n	n
GC-MS-MS	1 ion mẹ, 2 ion con	4
LC-MS-MS	1 ion mẹ, 2 ion con	4
GC-MS-MS	2 ion mẹ, mỗi ion mẹ có 1 ion con	5
LC-MS-MS	2 ion mẹ, mỗi ion mẹ có 1 ion con	5
LC-MS-MS-MS	1 ion mẹ, 1 ion con và 2 ion cháu	5,5

HRMS	n	2n
GC-MS và LC-MS	2+2	4
GC-MS và HRMS	2+1	4

Các thiết bị sắc ký khí có gắn detector MS, thường so sánh phổ của chất phân tích với phổ chuẩn có sẵn trong thư viện đi kèm hoặc phổ của chất chuẩn tương ứng.

**Ví dụ:** Phương pháp phân tích chloramphenicol bằng kỹ thuật sắc ký lỏng khối phổ hai lần, người ta thực hiện bắn phá ion mẹ  $m/z$  321 và định lượng theo ion con tạo thành là 152 và 194. Theo cách tính điểm IP thì với 1 ion mẹ và 2 ion con thu được 4 điểm IP, như vậy phương pháp có tính đặc hiệu đáp ứng được yêu cầu.

Cần thực hiện thêm các phép thử trên mẫu trắng ( $n \geq 6$ ) và mẫu có nồng độ gần LOQ ( $n \geq 6$ ) để xác định chắc chắn phương pháp có tính đặc hiệu cao.

### ***1.3. Tính đặc hiệu/chọn lọc đối với phương pháp chuẩn***

Đối với các phương pháp chuẩn, như đã nêu trong bảng 2, thông thường không cần xác định tính đặc hiệu/chọn lọc. Tuy nhiên, cần cân nhắc thực hiện việc xác định độ đặc hiệu trong các trường hợp sau:

- Nền mẫu phân tích tại phòng thử nghiệm khác với nền mẫu với mẫu nêu trong phương pháp tiêu chuẩn. Trong trường hợp này cần thực hiện đầy đủ như khi thẩm định phương pháp nội bộ.



- Có sự khác nhau về thiết bị phân tích mà sự khác nhau này có thể ảnh hưởng đến tính chọn lọc. Có thể thực hiện đầy đủ hoặc xác định ảnh hưởng nếu có thông qua xác định hiệu năng của thiết bị.

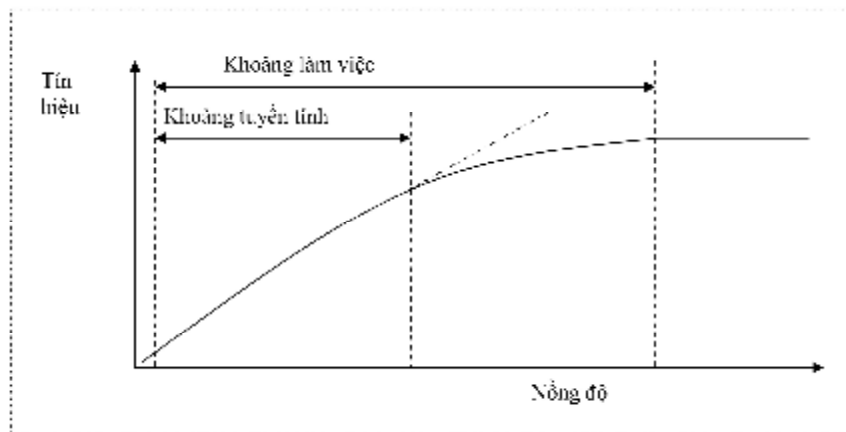
## 2. Khoảng tuyến tính và đường chuẩn

### 2.1. Định nghĩa

Khoảng tuyến tính của một phương pháp phân tích là khoảng nồng độ ở đó có sự phụ thuộc tuyến tính giữa đại lượng đo được và nồng độ chất phân tích.

Khoảng làm việc của một phương pháp phân tích là khoảng nồng độ giữa giới hạn trên và giới hạn dưới của chất phân tích (bao gồm cả các giới hạn này), tại đó được chứng minh là có thể xác định được bởi phương pháp nhất định với độ đúng, độ chính xác và độ tuyến tính như đã nêu.

Để đơn giản hơn, hai khái niệm này được mô tả trong hình 3 dưới đây:



**Hình 3:** Khoảng tuyến tính (linear range) và khoảng làm việc (working range)

## **2.2. Cách xác định khoảng tuyến tính**

Đối với hầu hết các phương pháp định lượng, cần phải thực hiện việc xác định khoảng tuyến tính. Việc xác định khoảng tuyến tính thường được khảo sát bắt đầu từ giới hạn định lượng (điểm thấp nhất) và kết thúc là giới hạn tuyến tính (điểm cao nhất). Nói chung, để xác định khoảng tuyến tính cần khoảng 10 (tối thiểu là 6) nồng độ khác nhau.

Để xác định khoảng tuyến tính cần thực hiện đo các dung dịch chuẩn có nồng độ thay đổi và khảo sát sự phụ thuộc của tín hiệu vào nồng độ. Vẽ đường cong phụ thuộc giữa tín hiệu đo và nồng độ, sau đó quan sát sự phụ thuộc cho đến khi không còn tuyến tính. Khoảng tuyến tính dài hay ngắn phụ thuộc vào nhiều yếu tố, trong đó quan trọng nhất là bản chất của chất phân tích và kỹ thuật sử dụng. Các chất khác nhau có khoảng tuyến tính khác nhau do sự khác nhau về tính chất lý hóa. Trong khi các kỹ thuật sử dụng khác nhau ảnh hưởng lớn đến độ dài ngắn của khoảng tuyến tính. Ví dụ, kỹ thuật HPLC nếu sử dụng detector UV-Vis hoặc DAD có thể cho khoảng tuyến tính đến  $10^6$  thậm chí đến  $10^7$ , trong khi nếu sử dụng detector huỳnh quang hay chỉ số khúc xạ thì chỉ cho khoảng tuyến tính khoảng  $10^4 - 10^5$ .

## **2.3. Xây dựng đường chuẩn**

Sau khi xác định khoảng tuyến tính cần xây dựng đường chuẩn và xác định hệ số hồi quy tương quan. Trong phân tích thực tế, có thể xây dựng các đường chuẩn ngắn, trùm lên vùng nồng độ trong mẫu, không nhất thiết phải lập đường chuẩn toàn bộ khoảng tuyến tính. Nồng độ trong mẫu không được vượt ra ngoài giới hạn cao nhất và thấp nhất của đường chuẩn và tốt nhất phải nằm ở vùng giữa đường chuẩn.

Có nhiều loại đường chuẩn khác nhau tùy thuộc vào các phương pháp và kỹ thuật khác nhau, sau đây là các loại đường chuẩn chủ yếu:

### 2.3.1. Đường chuẩn với chuẩn tinh khiết

Chuẩn bị dãy nồng độ chuẩn (tối thiểu 6 nồng độ). Xác định các giá trị đo được  $y$  theo nồng độ  $x$  (lặp lại 2 lần lấy giá trị trung bình). Nếu sự phụ thuộc tuyến tính, ta có khoảng khảo sát đường biểu diễn là một phương trình:

$$y = ax + b$$

Trong đó:  $a$ : giá trị độ dốc slope;

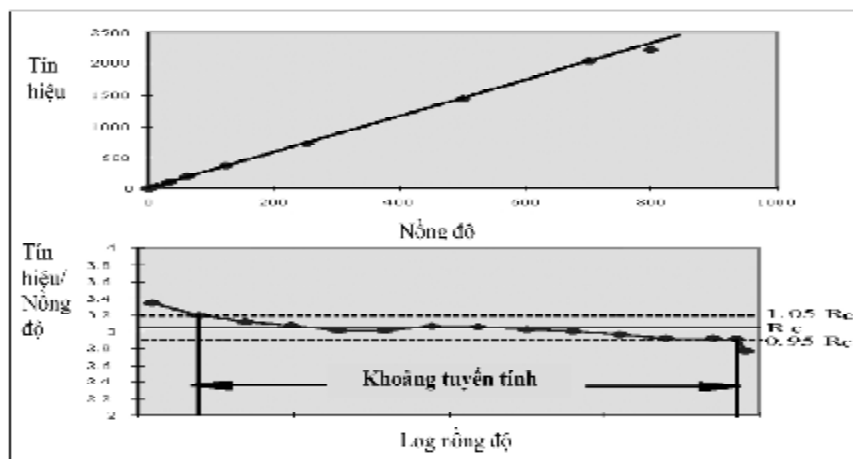
$b$ : giá trị hệ số chặn intercept

và hệ số tương quan:

$$R = \frac{\sum (x_i - \bar{X})(y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{X})^2 \sum (y_i - \bar{Y})^2}}$$

Nếu  $0,995 < R \leq 1$ : Có tương quan tuyến tính rõ rệt.

Có thể khảo sát độ tuyến tính dựa vào tính hệ số đáp ứng (đồ thị dưới). Khoảng tuyến tính nằm trong khoảng đồ thị nằm ngang.



**Hình 4:** Các cách lập đường chuẩn tuyến tính

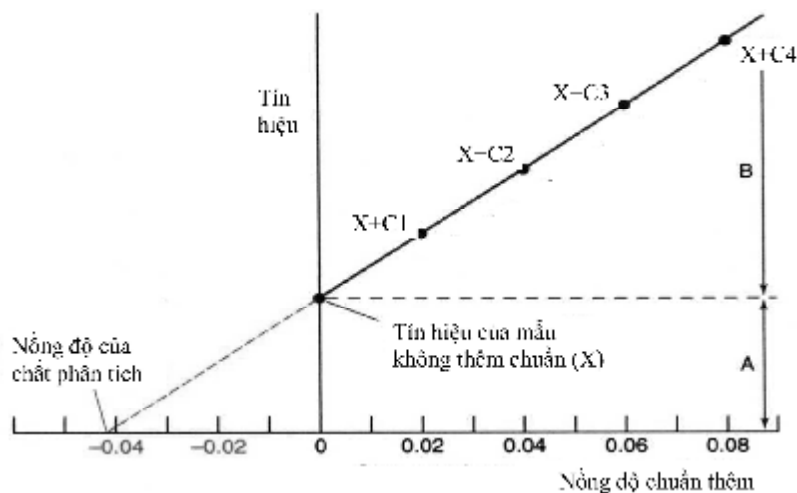
### 2.3.2. Đường chuẩn trên mẫu trắng

Phân tích các mẫu trắng thêm chuẩn với nồng độ khác nhau (ít nhất 6 nồng độ), trong khoảng tuyến tính ước lượng ở trên, mỗi nồng độ làm 3 lần. Vẽ đường cong phụ thuộc giữa tín hiệu đo (trục tung y) phụ thuộc vào nồng độ (trục hoành x). Tính các hệ số hồi quy ( $a$ ,  $b$  trong phương trình hồi quy  $y = ax + b$ ) và hệ số tương quan ( $R$ ) tương tự như trên.

Đường chuẩn xây dựng trên nền mẫu trắng thường cho độ tin cậy cao hơn khi xây dựng với chuẩn tinh khiết, do có thể loại trừ phần nào các ảnh hưởng của nền mẫu. Tuy nhiên, trong nhiều trường hợp khó tìm được mẫu trắng phù hợp và không được có chất phân tích. Do đó, có thể sử dụng phương pháp lập đường chuẩn trên nền mẫu thực như sau.

### 2.3.3. Đường chuẩn trên mẫu thực

Phân tích mẫu thực có cho thêm các nồng độ chuẩn khác nhau tương tự như trong phần làm với mẫu trắng. Vẽ đường cong tín hiệu đo (trục tung y) phụ thuộc vào nồng độ chuẩn thêm (trục hoành x). Dạng đường chuẩn trên nền mẫu thực thường có dạng như hình 5:

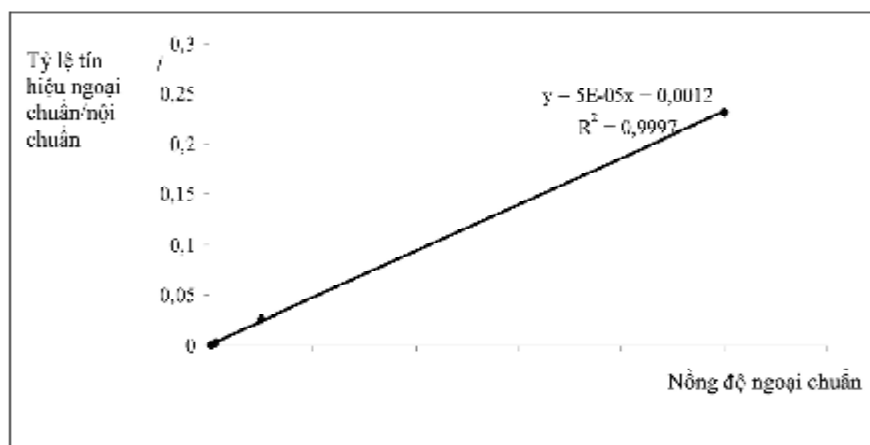


**Hình 5:** Đường chuẩn trên nền mẫu thực

Khi sử dụng đường chuẩn trên nền mẫu thực có thể loại trừ được các ảnh hưởng của nền mẫu đến kết quả phân tích. Sau khi lập được phương trình đường chuẩn  $y = ax + b$ , có thể dễ dàng tính được nồng độ:  $X = b/a$

#### 2.3.4. Đường chuẩn có sử dụng nội chuẩn

Một phương pháp rất hữu ích trong phân tích, đặc biệt trong phân tích hiện đại là sử dụng nội chuẩn. Nội chuẩn được thêm vào dung dịch chuẩn để đo máy, với nồng độ phù hợp và giống nhau ( $C_{IS}$ ). Vẽ đường cong phụ thuộc giữa tỷ lệ tín hiệu chất ngoại chuẩn chia cho nội chuẩn (trục tung y) phụ thuộc vào nồng độ ngoại chuẩn (trục hoành x). Tính các hệ số hồi quy ( $a$ ,  $b$  trong phương trình hồi quy  $y = ax + b$ ) và hệ số tương quan ( $R$ ) tương tự như trên.



**Hình 6:** Ví dụ đường chuẩn sử dụng chất nội chuẩn

Khi phân tích mẫu, nội chuẩn cũng phải được thêm vào (tốt nhất là từ đầu, sau khi cân, đóng) để sao cho tạo được nồng độ cuối cùng bằng nồng độ nội chuẩn trong các dung dịch chuẩn. Với cách tiến hành như thế này có thể hạn chế được hầu hết các ảnh hưởng trong quá trình phân tích (bao gồm

từ cân mẫu, chuẩn bị mẫu đến phân tích trên thiết bị) đến kết quả phân tích. Đối với các kỹ thuật phân tích hiện đại như khối phổ, đặc biệt là sắc ký lỏng khối phổ, việc sử dụng nội chuẩn là một yêu cầu tiên quyết, nếu không muốn nói là bắt buộc. Thông thường trong sắc ký lỏng khối phổ, các chất nội chuẩn được ưu tiên lựa chọn là các chất đồng vị, thông thường như  $^2\text{H}$  (D),  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ... Ví dụ, khi phân tích chloramphenicol thì ngoài chất ngoại chuẩn là chloramphenicol, sử dụng thêm chất nội chuẩn là chloramphenicol-d5; clenbuterol thì sử dụng clenbuterol-d9, melamin thì sử dụng melamin- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ ... Các chất đồng vị này có ưu điểm nổi bật là tính chất hóa lý gần như tương tự chất phân tích do đó đại diện tốt cho chất phân tích trong cả quá trình. Ngoài ra, trong một số trường hợp có thể chọn các chất nội chuẩn khác, với điều kiện là các chất này phải có một số tính chất cơ bản giống chất phân tích, và có thể phân tích được bằng phương pháp đang thực hiện.

#### ***2.4. Các lưu ý khi xây dựng đường chuẩn***

- Cần đảm bảo nồng độ chuẩn chính xác: Đường chuẩn là yếu tố sống còn, quyết định sự đúng đắn của kết quả phân tích, do đó nếu trong quá trình xây dựng đường chuẩn mắc những sai số lớn sẽ dẫn đến sự mất chính xác của kết quả. Điều đầu tiên để kiểm soát được sự chính xác của các nồng độ chuẩn khi xây dựng đường chuẩn là cần đảm bảo độ chính xác của chất chuẩn (chất chuẩn mua từ nhà sản xuất) về hàm lượng, độ tinh khiết. Theo yêu cầu của ISO 17025, các chất chuẩn khi sử dụng cần có chứng nhận của nhà sản xuất và vẫn còn hạn sử dụng. Trong một số trường hợp, có thể bố trí các thí nghiệm để đánh giá chất lượng các chất chuẩn trước khi đưa vào sử dụng.

- Tín hiệu các lần đo của mỗi nồng độ phải có độ lặp lại đạt yêu cầu: Khi thẩm định phương pháp, mỗi nồng độ cần được đo vài lần (ba lần) để kiểm tra độ lặp của các nồng độ chuẩn.

- Loại trừ sai số thô nếu cần thiết: Một số trường hợp, có thể gặp các sai số thô (ngẫu nhiên) xuất hiện dẫn đến việc đường chuẩn không đáp ứng yêu cầu. Trong trường hợp này, có thể cân nhắc loại trừ các điểm này để đảm bảo sự chính xác.

### 2.5. Giới hạn chấp nhận của đường chuẩn

- Hệ số hồi quy tuyến tính (R): Chỉ tiêu đầu tiên của một đường chuẩn đạt yêu cầu là hệ số tương quan hồi quy (Coefficient of correlation). R phải đạt theo yêu cầu sau:

$$0,995 \leq R \leq 1$$

$$\text{Hay } 0,99 \leq R^2 \leq 1$$

- Độ chệch các điểm nồng độ dùng xây dựng đường chuẩn. Sau khi lập đường chuẩn xong cần kiểm tra bằng phương pháp tính ngược lại nồng độ của các điểm chuẩn sử dụng để xây dựng đường chuẩn, từ đó tính các giá trị độ chệch theo công thức sau:

$$\Delta_i = \frac{C_t - C_c}{C_c} \times 100$$

Trong đó:  $\Delta_i$ : Độ chệch của từng điểm chuẩn dùng xây dựng đường chuẩn

$C_t$ : Nồng độ tính ngược theo đường chuẩn của các điểm chuẩn

$C_c$ : Nồng độ của các điểm chuẩn

Theo quy định của nhiều tổ chức của Mỹ, Canada, châu Âu, giá trị  $\Delta$  không được vượt quá  $\pm 15\%$  cho tất cả các nồng độ, riêng ở nồng độ LOQ có thể chấp nhận giới hạn  $\pm 20\%$ .

### 3. Giới hạn phát hiện

#### 3.1. Định nghĩa

Giới hạn phát hiện là nồng độ mà tại đó giá trị xác định được lớn hơn độ không đảm bảo đo của phương pháp. Đây là nồng độ thấp nhất của chất phân tích trong mẫu có thể phát hiện được nhưng chưa thể định lượng được (đối với phương pháp định lượng).

#### 3.2. Cách xác định

##### 3.2.1. LOD của phương pháp định tính

Cần xác định được nồng độ nào mà tại đó sẽ xác định chắc chắn sự có mặt của chất phân tích.

Phân tích các mẫu trắng thêm chuẩn ở các nồng độ nhỏ khác nhau, mỗi nồng độ phân tích lặp lại 10 lần. Xác định tỷ lệ phần trăm số lần phát hiện (dương tính) hoặc không phát hiện (âm tính).

Ví dụ:

**Bảng 5:** Ví dụ cách tính LOD của phương pháp định tính

Nồng độ (ppm)	Số lần thử	Tỷ lệ dương tính/âm tính	Tỷ lệ %
200	10	10/0	100
100	10	10/0	100
75	10	5/5	50
50	10	1/9	10
25	10	0/10	0



Trong ví dụ trên, với nồng độ dưới 100 ppm kết luận dương tính không còn chắc chắn 100%, giới hạn phát hiện trong trường hợp này là 100 ppm.

### 3.2.2. LOD của phương pháp định lượng

Có nhiều cách xác định LOD khác nhau tùy thuộc vào phương pháp áp dụng là phương pháp công cụ hay không công cụ. Các cách tiếp cận có thể chấp nhận được bao gồm:

#### Dựa trên độ lệch chuẩn

**Cách 1.** Làm trên mẫu trắng (mẫu trắng có thành phần như mẫu thử nhưng không có chất phân tích).

Phân tích mẫu 10 lần song song, tính độ lệch chuẩn. Độ lệch chuẩn này phải khác 0.

Tính LOD: 
$$LOD = \bar{x}_0 + 3SD_0$$

Với 
$$SD_0 = \sqrt{\frac{\sum (x_{0i} - \bar{x}_0)^2}{n-1}}$$

Trong đó:  $\bar{x}_0$  = trung bình của mẫu trắng

$SD_0$  = độ lệch chuẩn của mẫu trắng

**Cách 2.** Làm trên mẫu thử: Làm 10 lần song song. Nên chọn mẫu thử có nồng độ thấp (ví dụ, trong khoảng 5 đến 7 lần LOD ước lượng).

Tính LOD: Tính giá trị trung bình  $\bar{x}$ , và độ lệch chuẩn SD

$$LOD = 3 \times SD$$

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

Đánh giá LOD đã tính được: tính  $R = \bar{x} / LOD$

- Nếu  $4 < R < 10$  thì nồng độ dung dịch thử là phù hợp và LOD tính được là đáng tin cậy
- Nếu  $R < 4$  thì phải dùng dung dịch thử đậm đặc hơn, hoặc thêm một ít chất chuẩn vào dung dịch thử đã dùng và làm lại thí nghiệm và tính lại R
- Nếu  $R > 10$  thì phải dùng dung dịch thử loãng hơn, hoặc pha loãng dung thử đã dùng và làm lại thí nghiệm và tính lại R

#### **Dựa trên tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu (S/N)**

Cách này chỉ áp dụng đối với các quy trình phân tích sử dụng các công cụ có nhiễu đường nền. Thông thường cách tính này áp dụng phổ biến cho các phương pháp sắc ký, điện di.

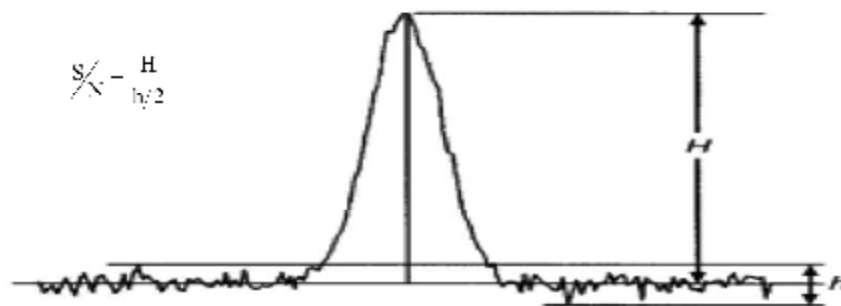
Phân tích mẫu (mẫu thực, mẫu thêm chuẩn hoặc mẫu chuẩn) ở nồng độ thấp còn có thể xuất hiện tín hiệu của chất phân tích. Số lần phân tích lặp lại <sup>3</sup> 4 lần. Xác định tỷ lệ tín hiệu chia cho nhiễu ( $S/N = \text{Signal to noise ratio}$ ),

trong đó S là chiều cao tín hiệu của chất phân tích,

N là nhiễu đường nền

Nhiều đường nền được tính về hai phía của đường nền và tốt nhất là tính nhiễu lân cận hai bên của pic, bề rộng mỗi bên tối thiểu gấp 10 lần chiều rộng của pic tại nửa chiều cao.

LOD được chấp nhận tại nồng độ mà tại đó tín hiệu lớn gấp 2-3 lần nhiễu đường nền, thông thường thường lấy  $S/N = 3$



**Hình 7:** Xác định LOD bằng cách tính S/N

#### Dựa trên đường chuẩn (tham khảo)

Chỉ áp dụng được cho các phương pháp có xây dựng đường chuẩn.

LOD có thể được xác định dựa vào độ dốc của đường chuẩn và độ lệch chuẩn của tín hiệu đo.

$$LOD = \frac{3,3 \times SD}{a}$$

Trong đó: SD: Độ lệch chuẩn của tín hiệu

a: Độ dốc của đường chuẩn

Giá trị a có thể dễ dàng tính được từ đường chuẩn, giá trị SD có thể được tính theo nhiều cách khác nhau, bao gồm:

- Dựa trên độ lệch chuẩn của mẫu trắng: Phân tích mẫu trắng lặp lại 10 lần và tính SD tương ứng;
- Dựa trên độ lệch chuẩn của mẫu thêm chuẩn ở nồng độ nhỏ gần LOD, lặp lại 10 lần (xem phần kiểm tra ở phía trên) và tính SD;
- Dựa trên hệ số chặn của đường chuẩn, làm nhiều lần để tính SD của giá trị b (intercept);

- Dựa trên độ lệch chuẩn của khoảng cách các giá trị đo thực với đường chuẩn.

#### 4. Giới hạn định lượng

##### 4.1. Định nghĩa

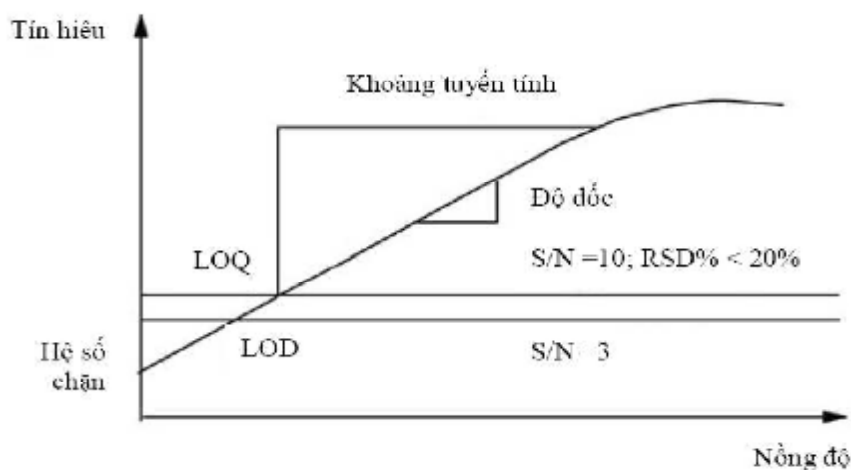
LOQ là nồng độ tối thiểu của một chất có trong mẫu thử mà ta có thể định lượng bằng phương pháp khảo sát và cho kết quả có độ chụm mong muốn.

LOQ chỉ áp dụng cho các phương pháp định lượng.

Giống như LOD, có nhiều cách khác nhau để xác định LOQ, phụ thuộc vào từng phương pháp cụ thể mà lựa chọn cho phù hợp.

Việc xác định LOQ cần tính đến các yếu tố ảnh hưởng trong mẫu phân tích, do đó cần thực hiện trên nền mẫu thật.

LOQ trong nhiều trường hợp có thể là điểm thấp nhất của khoảng tuyến tính. Hình 8 mô tả mối quan hệ giữa LOD, LOQ và khoảng tuyến tính.



**Hình 8:** Mối quan hệ giữa LOD, LOQ và khoảng tuyến tính

#### 4.2. Cách xác định

Việc bố trí thí nghiệm để xác định LOQ thường kết hợp với tính LOD. Có nhiều cách khác nhau để tính LOQ như sau:

##### Dựa trên độ lệch chuẩn:

Có hai trường hợp như trong phần tính LOD là thực hiện trên mẫu trắng và thực hiện trên mẫu thử. Các công thức tính toán như sau:

$$\text{Tính trên mẫu trắng: } LOQ = \bar{x}_0 + 10SD_0$$

$$\text{Tính trên mẫu thử: } LOQ = 10 SD$$

**Ví dụ:** Để xác định giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp phân tích metanol trong rượu, thực hiện phân tích mẫu trắng (mẫu có hàm lượng metanol rất thấp, gần với giới hạn dưới của đường chuẩn), thực hiện phân tích 10 lần lặp lại và tính giá trị trung bình và độ lệch chuẩn, thu được các kết quả như sau:

Phương trình đường chuẩn:  $y = 13,227 x + 0,004$

Lần	Abs tại 575nm	HL metanol (mg/l)	Trung bình (mg/l)	SD (mg/l)
1	0,021	12,85	13,61	1,75
2	0,024	15,12		
3	0,022	13,61		
4	0,024	15,12		

5	0,019	11,34		
6	0,025	15,88		
7	0,018	10,58		
8	0,024	15,12		
9	0,022	13,61		
10	0,021	12,85		

Như vậy,  $LOD = 13,61 + 3 \times 1,75 = 18,86 \text{ mg/l}$

$$LOQ = 13,61 + 10 \times 1,75 = 31,11 \text{ mg/l}$$

#### Dựa trên tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu:

Cách này chỉ áp dụng đối với các quy trình phân tích sử dụng các công cụ có nhiễu đường nền. Cách tính toán hoàn toàn tương tự như trong phần tính LOD.

LOQ được chấp nhận tại nồng độ mà tại đó tín hiệu lớn gấp 10-20 lần nhiễu đường nền, thông thường thường lấy  $S/N = 10$ .

**Ví dụ:** Xác định LOD của phương pháp phân tích axit benzoic trong nước giải khát bằng HPLC, người ta thực hiện phân tích các mẫu trắng có thêm chuẩn axit benzoic ở các nồng độ thấp dưới giới hạn thấp nhất của đường chuẩn. Tính chiều cao của pic sắc ký (H là tín hiệu S) và chiều cao của nhiễu đường nền ( $h = 2N$ ) về hai phía của pic. Thu được các kết quả như sau:

Nồng độ (mg/kg)	Lần	Chiều cao pic (H = S)	Chiều cao nhiễu (h = 2N)	S/N
0,01	1	1765	1231	2,87
	2	1723	1429	2,41
	3	1598	1364	2,34
	4	1628	1151	2,83
0,02	1	3021	1351	4,47
	2	3109	1491	4,17
	3	2919	1502	3,89
	4	2934	1385	4,24
0,05	1	6531	1421	9,19
	2	6691	1323	10,1
	3	6567	1299	10,1
	4	6519	1313	9,93

Như vậy LOD = 0,02 mg/kg

LOQ = 0,05 mg/kg

#### Dựa trên đường chuẩn:

Cách tính tương tự như trong phần LOD nhưng theo công thức sau:

$$LOQ = \frac{10 \times SD}{a}$$

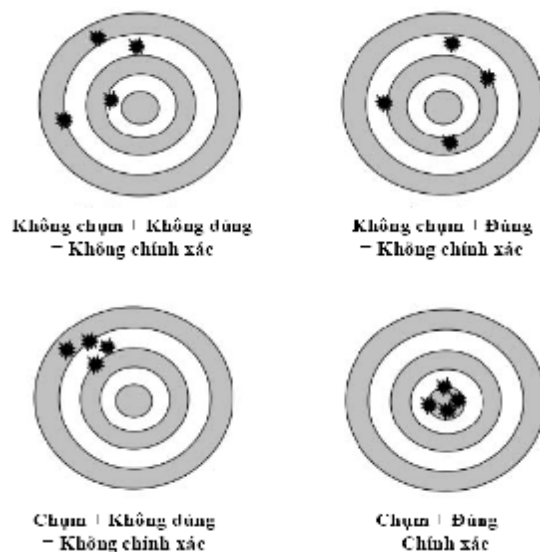
**Lưu ý**, ngoài việc tính toán như trên cần quan tâm đến độ lặp lại tại LOQ, tùy theo mỗi phương pháp, giá trị RSD% cần phải đạt được theo một mức yêu cầu nào đó. Xem thêm phần độ chụm về yêu cầu RSD% cho từng nồng độ cụ thể.

#### 5. Độ chính xác (độ đúng và độ chụm)

Hiện nay có nhiều cách hiểu khác nhau về thuật ngữ độ chính xác. Trước đây và đến bây giờ nhiều tài liệu có nói về độ đúng và độ chính xác

như là hai khái niệm khác nhau. Trong tài liệu này chúng tôi sử dụng hai thuật ngữ độ đúng và độ chụm để diễn tả độ chính xác của một phương pháp phân tích theo quan điểm mới nhất của tiêu chuẩn quốc tế (ISO 5725 1-6:1994) và tiêu chuẩn quốc gia (TCVN 6910 1-6:2005). Độ đúng chỉ mức độ gần nhau giữa giá trị trung bình của kết quả thử nghiệm và giá trị thực hoặc giá trị được chấp nhận là đúng  $\mu$ . Độ chụm chỉ mức độ dao động của các kết quả thử nghiệm độc lập quanh trị giá trung bình. Hình 9 mô tả sự mối quan hệ giữa độ chụm, độ đúng và độ chính xác.

Độ chính xác (accuracy) = độ chụm (precision) + độ đúng (trueness)



**Hình 9:** Minh họa khái niệm độ chính xác (độ chụm và độ đúng)

## 5.1. Độ chụm

### 5.1.1. Định nghĩa

Trong nhiều trường hợp các phép thử nghiệm trên những đối tượng và với những điều kiện khác nhau thường không cho kết quả giống nhau. Điều này do các sai số ngẫu nhiên của mỗi quy trình gây ra, ta không thể kiểm



soát được hoàn toàn tất cả các yếu tố ảnh hưởng đến kết quả thử nghiệm. Do đó, để kiểm soát được các sai số này, phải dùng đến khái niệm độ chụm. Độ chụm chỉ phụ thuộc vào sai số ngẫu nhiên và không liên quan đến giá trị thực. Độ chụm là một khái niệm định tính và được biểu thị định lượng bằng độ lệch chuẩn hay hệ số biến thiên. Độ chụm càng thấp thì độ lệch chuẩn hay hệ số biến thiên càng lớn.

Độ chụm có thể được phân ra thành ba trường hợp sau:

- Độ lặp lại (repeatability)
- Độ chụm trung gian (intermediate precision)
- Độ tái lập (reproducibility)

Sự khác nhau giữa các khái niệm độ lặp lại, độ chụm trung gian và độ tái lập được tóm tắt trong bảng 6.

**Bảng 6:** Sự khác nhau giữa độ lặp lại, độ chụm trung gian và độ tái lập

Điều kiện	Độ lặp lại	Độ chụm trung gian	Độ tái lập
Nền mẫu	Khác	Khác	Khác
Nồng độ	Khác	Khác	Khác
Thiết bị	Giống	Khác	Khác
Người phân tích	Giống	Khác	Khác
Dụng cụ, hóa chất	Giống	Khác	Khác
Điều kiện môi trường	Giống	Khác	Khác
Phòng thử nghiệm	Giống	Giống	Khác

### 5.1.2. Cách xác định

#### Cách 1. Bố trí thí nghiệm

Tiến hành làm thí nghiệm lặp lại 10 lần (ít nhất 6 lần) trên cùng một mẫu (mỗi lần bắt đầu từ cân hay đong mẫu). Mẫu phân tích có thể là mẫu chuẩn, hoặc mẫu trắng có thêm chuẩn, tốt nhất là làm trên mẫu thử hay mẫu thử thêm chuẩn.

Từng phòng thử nghiệm, có thể bố trí thí nghiệm để tính độ lặp lại hoặc độ chụm trung gian. Trong một số trường hợp tham gia so sánh với các phòng thử nghiệm khác (ví dụ trong chương trình thử nghiệm thành thạo, so sánh liên phòng).

Nên tiến hành ở nồng độ khác nhau (trung bình, thấp, cao) trong khoảng làm việc, mỗi nồng độ làm lặp lại 10 lần (ít nhất 6 lần). Tính độ lệch chuẩn SD và độ lệch chuẩn tương đối RSD hay hệ số biến thiên CV theo các công thức sau:

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

$$RSD\% = CV\% = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

Trong đó:

SD: Độ lệch chuẩn

n: Số lần thí nghiệm

$x_i$ : Giá trị tính được của lần thử nghiệm thứ “i”

$\bar{x}$ : Giá trị trung bình của các lần thử nghiệm

RSD%: Độ lệch chuẩn tương đối

CV%: Hệ số biến thiên

**Cách 2. Tính toán trên các kết quả phân tích mẫu thực đã làm.**

Trong một số trường hợp việc ước lượng độ lặp lại có thể thông qua tính toán dựa trên kết quả phân tích các mẫu thực. Do đó việc lưu giữ các kết quả phân tích có vai trò rất quan trọng.

Dựa trên kết quả phân tích làm trên mẫu thực trong nhiều tuần, ít nhất là 10 mẫu, có thể là các nền mẫu khác nhau, nồng độ khác nhau nhưng phải có kết quả làm lặp 2 lần .

Trường hợp các mẫu có nồng độ, hàm lượng gần như nhau. Tính độ lệch giữa hai kết quả lặp của mỗi mẫu  $d_i$  rồi tính độ lệch trung bình  $d_{tb}$ , sau đó tính độ lệch chuẩn s:

$$d_i = |x_{i1} - x_{i2}|$$

$$d_{tb} = \frac{\sum d_i}{n}$$

$$\overline{x_i} = \frac{x_{i1} + x_{i2}}{2}$$

$$\overline{X} = \frac{\sum \overline{x_i}}{n}$$

$$s = \frac{d_{tb}}{1,118}$$

$$RSD\% = \frac{s}{\overline{X}} \times 100$$

Nếu các mẫu có nồng độ  $x_i$  khác nhau nhiều thì thay cho độ lệch  $d_i$ , tính độ lệch tương đối  $D_i$ , và độ lệch tương đối trung bình  $D_{tb}$  và sau đó tính độ lệch chuẩn tương đối:

$$D_i = \frac{d_i}{x_i}$$

$$D_{tb} = \frac{\sum D_i}{n}$$

$$RSD\% = \frac{D_{tb}}{1,18} \times 100$$

### 5.1.3. Tiêu chí đánh giá

Đổi chiều giá trị tính được với giá trị mong muốn hay giá trị yêu cầu hoặc so với RSD% lặp lại cho trong bảng 7 (RSD% tính được không được lớn hơn giá trị trong bảng ở hàm lượng chất tương ứng). Độ chụm thay đổi theo nồng độ chất phân tích. Nồng độ chất càng thấp thì kết quả càng dao động nhiều (không chụm) nghĩa là RSD càng lớn.

**Bảng 7:** Độ lặp lại tối đa chấp nhận tại các nồng độ khác nhau (theo AOAC)

TT	Hàm lượng %	Tỷ lệ chất	Đơn vị	RSD (%)
1.	100	1	100%	1,3
2.	10	$10^{-1}$	10%	1,8
3.	1	$10^{-2}$	1%	2,7
4.	0,1	$10^{-3}$	0,1 %	3,7

5.	0,01	$10^{-4}$	100 ppm	5,3
6.	0,001	$10^{-5}$	10 ppm	7,3
7.	0,0001	$10^{-6}$	1 ppm	11
8.	0,00001	$10^{-7}$	100 ppb	15
9.	0,000001	$10^{-8}$	10 ppb	21
10.	0,0000001	$10^{-9}$	1 ppb	30

---

**Ví dụ:** Kết quả các lần phân tích lặp lại chỉ tiêu lipid tổng số trong sữa bột:

Lần	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$x_{i1}$	21,3	26,5	24,1	25,7	24,6	27,8	26,6	25,4	20,1	18,5
$x_{i2}$	21,5	25,9	24,1	25,3	24,5	27,6	26,5	25,1	20,5	18,3
$\bar{x}$	21,4	26,2	24,1	25,5	24,55	27,7	26,55	25,25	20,3	18,4
$d_i$	0,2	0,6	0,0	0,4	0,1	0,2	0,1	0,3	0,4	0,2
$D_i$	0,0093	0,0229	0,0000	0,0157	0,0041	0,0072	0,0038	0,0119	0,0197	0,0109

Lần	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
$x_{i1}$	27,1	25,3	24,6	25,1	27,6	22,4	26,3	19,8	22,6	24,5
$x_{i2}$	27,4	25,2	25	25,8	26,9	22,4	26,1	20,4	23,1	24,9
$\bar{x}$	27,25	25,25	24,8	25,45	27,25	22,4	26,2	20,1	22,85	24,7
$d_i$	0,3	0,1	0,4	0,7	0,7	0,0	0,2	0,6	0,5	0,4
$D_i$	0,0110	0,0040	0,0161	0,0275	0,0257	0,0000	0,0076	0,0299	0,0219	0,0162

$$D_{tb} = \frac{\sum D_i}{n} = \frac{0,265}{20} = 0,0133;$$

$$RSD\% = \frac{D_{tb}}{1,118} \times 100 = \frac{0,0133}{1,118} \times 100 = 1,19 \%$$

Ở khoảng nồng độ này, theo AOAC RSD% tối đa chấp nhận được là 1,8%, như vậy phương pháp áp dụng có độ chụm đạt yêu cầu.

Trong nội bộ mỗi phòng thử nghiệm ngoài việc tính toán độ lặp lại, cần phải bố trí thí nghiệm để tính được độ chụm trung gian (một số tác giả gọi là độ tái lập nội bộ phòng thử nghiệm) theo một trong các cách sau đây:

- Sử dụng các nhân viên thử nghiệm khác nhau;
- Sử dụng các thiết bị với một số đặc tính khác nhau, ví dụ các hệ thống HPLC khác nhau của các hãng khác nhau, hoặc của cùng một hãng nhưng với các model khác nhau;
- Sử dụng các dung môi hóa chất, thuốc thử có chất lượng khác nhau;
- Khác nhau về nhiệt độ và độ ẩm của phòng thử nghiệm;

- Khác nhau các điều kiện cụ thể của thiết bị, ví dụ thành phần dung môi pha động, tốc độ dòng, pH của pha động...

Việc tham gia thử nghiệm thành thạo, so sánh liên phòng thử nghiệm là điều kiện rất quan trọng trong đánh giá phương pháp. Các phòng thử nghiệm tham gia phải có kết quả thử nghiệm liên phòng trước khi được công nhận đạt ISO 17025 và để duy trì công nhận ISO 17025.

## 5.2. Độ đúng (*trueness*)

### 5.2.1. Định nghĩa

Độ đúng của phương pháp là khái niệm chỉ mức độ gần nhau giữa giá trị trung bình của kết quả thử nghiệm và giá trị thực hoặc giá trị được chấp nhận là đúng ( $\mu$ ).

Đối với đa số mẫu phân tích, giá trị thực không thể biết một cách chính xác, tuy nhiên nó có thể có một giá trị quy chiếu được chấp nhận là đúng (gọi chung là giá trị đúng).

Giống như độ chụm, độ đúng là một khái niệm định tính. Độ đúng thường được diễn tả bằng độ chệch (*bias*).

$$\Delta = \frac{X_{tb} - \mu}{\mu} \times 100$$

Trong đó:  $\Delta$  : Độ chệch (*bias*), %

$X_{tb}$ : Giá trị trung bình của kết quả thử nghiệm

$\mu$ : Giá trị thực hoặc giá trị được chấp nhận là đúng

### 5.2.2. Cách xác định độ đúng

Muốn xác định độ đúng cần phải tìm được giá trị đúng, có nhiều cách khác nhau để xác định độ đúng, bao gồm việc so sánh kết quả thực nghiệm với kết quả thực hiện bởi một phương pháp đối chiếu hoặc sử dụng mẫu đã

biết nồng độ (mẫu kiểm tra hoặc mẫu chuẩn được chứng nhận) và phương pháp xác định độ thu hồi (độ tìm lại).

### **Cách 1: So sánh với phương pháp chuẩn/đối chiếu**

Phân tích mẫu chuẩn hoặc mẫu thử, thực hiện 10 lần bằng phương pháp khảo sát và bằng một phương pháp đối chiếu. Phương pháp đối chiếu tốt nhất là phương pháp tiêu chuẩn của các tổ chức có uy tín, nếu không phương pháp đối chiếu là phương pháp đã qua thẩm định cho kết quả tin cậy trong dải đo đang thực hiện. Tính toán các kết quả trung bình và độ lặp lại (hệ số biến thiên) của hai phương pháp.

Đánh giá độ tương đồng về độ chụm của hai phương pháp bằng cách so sánh phương sai  $s^2$  của hai phương pháp đó, dùng tiêu chuẩn F (Fisher) và so sánh hai trị giá trung bình bằng tiêu chuẩn t (Student). Việc bố trí các thí nghiệm phải được thực hiện theo phương pháp tham chiếu một cách nghiêm ngặt và các phép đo phải được tiến hành dưới điều kiện lặp lại.

#### **- So sánh hai phương sai (chuẩn F – Fisher)**

Chuẩn F dùng để so sánh độ lặp lại của hai tập số liệu hoặc hai phương pháp khác nhau. Với tập số liệu nhỏ, tính toán giá trị  $F_{\text{tn}}$  (F thực nghiệm) theo công thức sau đây và so sánh với giá trị  $F_c$  (F tra bảng).

$$F_{\text{tn}} = \frac{S_1^2}{S_2^2} > 1$$

Trong đó:  $F_{\text{tn}}$ : Giá trị F thực nghiệm

$S_1^2, S_2^2$ : Các phương sai của hai phương pháp với  
quy ước  $S_1^2 > S_2^2$



Nếu:  $F_{tn} \leq F_c (\alpha, k_1, k_2)$ : Hai phương pháp có độ lặp lại (độ chụm) giống nhau.

Nếu:  $F_{tn} > F_c (\alpha, k_1, k_2)$ : Hai phương pháp có độ lặp lại khác nhau, trong trường hợp này nếu độ lặp lại của phương pháp thử nghiệm khác với phương pháp chuẩn thì cần xem xét thêm về độ lặp lại như đã mô tả trong phần trên.

Trong đó:  $F_c (\alpha, k_1, k_2)$ : Giá trị F tra bảng (xem phụ lục 2) với:

$k_1, k_2$  : Độ tự do ( $k_1 = n_1 - 1$ ;  $k_2 = n_2 - 1$ )

$n_1, n_2$ : Số lần làm thực nghiệm của hai phương pháp

$\alpha$ : Mức ý nghĩa (significance level), thường lấy  $\alpha = 0,05$  (tương ứng với độ tin cậy (confidence level) 95%)

- ***So sánh hai giá trị trung bình (chuẩn t – Student)***

Chuẩn t được dùng để so sánh xem có sự khác nhau giữa giá trị thực nghiệm và giá trị thực hay không; phương pháp này được ứng dụng hoặc để so sánh kết quả thực nghiệm với giá trị chuẩn trong mẫu kiểm tra (xem thêm cách 2) hoặc để so sánh kết quả của phương pháp phân tích với phương pháp đối chiếu.

Trước khi so sánh hai giá trị trung bình cần so sánh hai phương sai. Với số lần phân tích nhỏ hơn 30, **khi hai phương sai có sự đồng nhất**, tính độ lệch chuẩn chung và giá trị  $t_{tn}$  (t thực nghiệm) theo công thức sau đây và so sánh với giá trị  $t_c$  (t tra bảng):

$$S_c^2 = \frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

$$t_{tn} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{S_c^2 \left( \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$$

$$k = n_1 + n_2 - 2$$

Trong đó:  $t_{tn}$ : Giá trị t thực nghiệm

$t_c(\alpha, k)$ : Giá trị t tra bảng mức ý nghĩa  $\alpha$ , bậc tự do k (xem phụ lục 1)

$n_1, n_2$  : Số lần thí nghiệm lần lượt của phương pháp thử nghiệm và phương pháp đối chiếu

$S_1^2, S_2^2$ : Phương sai lần lượt của phương pháp thử nghiệm và phương pháp đối chiếu

$\bar{x}_1, \bar{x}_2$ : Giá trị trung bình lần lượt của phương pháp thử nghiệm và phương pháp đối chiếu

Nếu  $t_{tn} \leq t_c(\alpha, k)$  : Không có sự khác nhau về kết quả của hai phương pháp.

Nếu  $t_{tn} > t_c(\alpha, k)$  : Có sự khác nhau về kết quả của hai phương pháp, phương pháp thử nghiệm mắc sai số hệ thống.

Trong trường hợp **hai phương sai không đồng nhất** (khác nhau có ý nghĩa), tính giá trị  $t_{tn}$  và bậc tự do k theo các công thức sau và so sánh như trên.

$$t_{tn} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}}$$

$$k = \frac{\left[ \frac{\left( \frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2} \right)^2}{\frac{\left( \frac{S_1^2}{n_1} \right)^2}{n_1 + 1} + \frac{\left( \frac{S_2^2}{n_2} \right)^2}{n_2 + 1}} \right] - 2}{1}$$

**Ví dụ:** Để đánh giá phương pháp mới đề xuất để xác định hàm lượng nitơ trong mẫu thực phẩm, người ta so sánh phương pháp này với phương pháp tiêu chuẩn (phương pháp Kjeldahl) qua thí nghiệm sau:

Phương pháp tiêu chuẩn:  $n_1 = 10$ ;  $\bar{x}_1 = 10,5$ ;  $s_1 = 0,65$

Phương pháp nghiên cứu:  $n_2 = 10$ ;  $\bar{x}_2 = 10,9$ ;  $s_2 = 0,76$

Hãy đánh giá độ đúng của phương pháp đề xuất?

**Giải:**

- So sánh phương sai:  $F_{tn} = \frac{S_2^2}{S_1^2} = 1,3671$

Tra bảng ta có:  $F(0,05; 9; 9) = 3,18 > F_{tn}$ : Hai phương sai không có sự khác nhau có ý nghĩa, hai phương pháp có độ lặp lại tương đồng..

- So sánh hai giá trị trung bình:

$$S_c^2 = \frac{(10-1) \times 0,65^2 + (10-1) \times 0,76^2}{10+10-2} = \frac{3,8025 + 5,1984}{18} = 0,50$$

$$t_{tn} = \frac{|10,5 - 10,9|}{\sqrt{0,50 \times \left( \frac{1}{10} + \frac{1}{10} \right)}} = 1,265$$

Tra bảng có  $t(0,05; 18) = 2,101 > t_{tn}$ , do đó không có sự khác nhau về kết quả của hai phương pháp.

**Cách 2: Sử dụng vật liệu chuẩn (Reference material)**

Vật liệu chuẩn (còn gọi là mẫu chuẩn) là mẫu phân tích có hàm lượng chất phân tích đã được xác định trước và là đúng. Có nhiều cấp vật liệu chuẩn khác nhau, trong đó cao nhất là CRM (certified reference material – vật liệu chuẩn được chứng nhận) được cung cấp bởi các tổ chức có uy tín trên thế giới.

Các mẫu CRM luôn có kết quả kèm theo khoảng dao động, do đó khi phân tích mẫu CRM có thể đánh giá được độ đúng dựa vào khoảng dao động cho phép (ví dụ: Mẫu thịt, chỉ tiêu clenbuterol là  $1 \text{ ng/g} \pm 0,05 \text{ ng/g}$ ; nếu kết quả phân tích được trong khoảng từ 0,95-1,05 thì đạt).

Nếu không có các mẫu CRM có thể sử dụng các mẫu kiểm tra (QC-Quality Control) đã biết nồng độ. Phòng thử nghiệm có thể tự chuẩn bị các loại mẫu này, hoặc sử dụng các mẫu thực có hàm lượng đã biết hoặc sử dụng các mẫu lưu từ chương trình so sánh liên phòng thử nghiệm. Trong trường hợp khác phòng thử nghiệm có thể sử dụng các mẫu thêm chuẩn để đánh giá độ đúng, nội dung này sẽ được mô tả cụ thể trong cách 3 dưới đây.

Nhiều tổ chức có uy tín như USFDA, EURACHEM, ICH... quy định tính độ chệch (bias) để xác định độ đúng như sau:

$$\Delta = \frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \times 100$$

Trong đó:  $\Delta$ : Độ chệch (bias), %

$\bar{x}$ : Giá trị trung bình của kết quả thử nghiệm

$\mu$ : Giá trị thực hoặc giá trị được chấp nhận là đúng

USFDA quy định độ chệch của các phương pháp xác định dư lượng phải không được lớn hơn 15% và không lớn hơn 20% tại LOQ.

Có thể sử dụng chuẩn  $t$  để đánh giá kết quả như sau:

Phân tích mẫu chuẩn lặp lại 10 lần (tối thiểu 6 lần), tính giá trị trung bình và độ lệch chuẩn, từ đó tính giá trị  $t_{in}$  theo công thức sau đây và so sánh với  $t_c(p)$  :

$$t_{in} = \frac{|\mu - \bar{x}|}{\sqrt{\frac{S^2}{n}}}$$

Trong đó:  $t_{in}$ : Giá trị  $t$  thực nghiệm

$t_c(\alpha, k)$ : Giá trị  $t$  tra bảng với mức ý nghĩa 0,05 (xem phụ lục 1) và bậc tự do  $k = n - 1$ .

$\mu$ : Giá trị thực hoặc giá trị được chấp nhận (tham chiếu)

$\bar{x}$ : Giá trị trung bình của phương pháp thử nghiệm

$S^2$ : Phương sai của phương pháp thử nghiệm

$n$ : Số lần thí nghiệm

Nếu  $t_{in} \leq t_c$  : Không có sự khác nhau về kết quả của giá trị trung bình so với giá trị tham chiếu ở mức ý nghĩa  $\alpha$ , tức là phương pháp có độ đúng đạt yêu cầu.

Nếu  $t_{in} > t_c$  : Có sự khác nhau về kết quả của phương pháp thử nghiệm so với kết quả tham chiếu ở mức ý nghĩa  $\alpha$ , phương pháp thử nghiệm mắc sai số hệ thống.

**Ví dụ:** Phân tích mẫu QC bằng phương pháp đang nghiên cứu cho kết quả như sau:

$$n = 10; \bar{x} = 46,5 \text{ ng/g}; SD = 4,5 \text{ ng/g}$$

Cho biết mẫu QC có kết quả đúng là: 50 ng/g.

Đánh giá độ đúng của phương pháp đang nghiên cứu?

**Giải:**

$$\text{Tính giá trị } t_{in}: t_{in} = \frac{|50 - 46,5|}{\sqrt{\frac{4,5^2}{10}}} = 2,46$$

Tra bảng:  $t(0,95; 9) = 2,262 < t_{in}$ , do đó kết quả mẫu QC không đạt yêu cầu.

---

### **Cách 3: Xác định độ thu hồi**

Các phương pháp tính độ đúng theo cách 1 hay cách 2 đều gặp những khó khăn nhất định. Trong nhiều trường hợp không thể tìm hoặc áp dụng một phương pháp tiêu chuẩn để so sánh kết quả, cũng như không thể dễ dàng có được các mẫu chuẩn hoặc mẫu chuẩn được chứng nhận phù hợp với phương pháp. Việc xác định độ đúng do đó có thể thực hiện thông qua xác định độ thu hồi (còn gọi là độ tìm lại) của phương pháp.

Thêm một lượng chất chuẩn xác định vào mẫu thử hoặc mẫu trắng, phân tích các mẫu thêm chuẩn đó, làm lặp lại tối thiểu bốn lần bằng phương pháp khảo sát, tính độ thu hồi theo công thức sau đây:

- Đối với mẫu thử:

$$R\% = \frac{C_{m+c} - C_m}{C_c} \times 100$$

- Đối với mẫu trắng:

$$R\% = \frac{C_{tt}}{C_c} \times 100$$

Trong đó: R%: Độ thu hồi, %

$C_{m+c}$ : Nồng độ chất phân tích trong mẫu thêm chuẩn

$C_m$ : Nồng độ chất phân tích trong mẫu thử

$C_c$ : Nồng độ chuẩn thêm (lý thuyết)

$C_{tt}$ : Nồng độ chất phân tích trong mẫu trắng thêm chuẩn

Sau đó tính độ thu hồi chung là trung bình của độ thu hồi các lần làm lặp lại.

Thêm chất chuẩn ở ba mức nồng độ là mức thấp, trung bình và cao trong khoảng nồng độ làm việc. Theo quy định của hội đồng châu Âu đối với các chỉ tiêu an toàn (các chỉ tiêu thuộc nhóm độc, có quy định giới hạn cho phép, ví dụ tồn dư hormon, kháng sinh, hóa chất bảo vệ thực vật...) thêm chuẩn vào mẫu trắng ở ba mức nồng độ tại 0,5 lần, 1 lần và 2 lần giới hạn cho phép (MRL).

Hội đồng châu Âu cũng quy định đối với các mẫu phân tích hàng ngày (routine) các chỉ tiêu thuộc cùng nhóm (ví dụ: hóa chất bảo vệ thực vật nhóm clo hữu cơ) cần kiểm soát chất lượng bằng cách phân tích mẫu thêm chuẩn tối thiểu 10% số lượng chất, các chất khác cần thay phiên kiểm tra với tần suất tối đa 1 năm/lần cho từng chất.

**Ví dụ:** Để xác định độ thu hồi của phương pháp phân tích hàm lượng  $\text{SO}_2$  trong mẫu rượu vang, thực hiện phân tích các mẫu rượu vang và rượu vang có cho thêm chuẩn ở ba mức nồng độ, mỗi nồng độ thực hiện phân tích bốn lần lặp lại, thu được các kết quả như sau:

TT	Mẫu (ml)	Chuẩn thêm (mg/100 ml)	HL $\text{SO}_2$ (mg/100ml)	TB	R (%)
1	20	0	7,72	7,73	0
2	20	0	7,69		
3	20	0	7,76		
4	20	0	7,73		
5	20	5	12,4	12,6	97,5
6	20	5	12,5		
7	20	5	12,6		
8	20	5	12,9		
9	20	10	17,6	17,7	100
10	20	10	17,8		
11	20	10	17,8		
12	20	10	17,7		
13	20	25	32,4	32,3	98,4
14	20	25	32,1		
15	20	25	32,9		
16	20	25	31,9		



- Ở nồng độ thêm 5 mg/100 ml:  $R \% = \frac{12,6 - 7,73}{5} \times 100 = 97,5\%$
- Ở nồng độ thêm 10 mg/100 ml:  $R \% = \frac{17,7 - 7,73}{10} \times 100 = 100\%$
- Ở nồng độ thêm 25 mg/100 ml:  $R \% = \frac{32,3 - 7,73}{25} \times 100 = 98,4\%$

### 5.2.3. Tiêu chí đánh giá

Sau khi đánh giá độ thu hồi, so sánh kết quả với các giá trị cho trong bảng 8. Độ thu hồi ở các nồng độ khác nhau có kỳ vọng khác nhau. Trong trường hợp phân tích các chất hàm lượng vết có thể tham khảo tiêu chuẩn của hội đồng châu Âu (bảng 9).

**Bảng 8:** Độ thu hồi chấp nhận ở các nồng độ khác nhau (theo AOAC)

TT	Hàm lượng [%]	Tỷ lệ chất	Đơn vị	Độ thu hồi [%]
1.	100	1	100%	98-102
2.	$\geq 10$	$10^{-1}$	10%	98-102
3.	$\geq 1$	$10^{-2}$	1%	97-103
4.	$\geq 0,1$	$10^{-3}$	0,1 %	95-105
5.	0,01	$10^{-4}$	100 ppm	90-107
6.	0,001	$10^{-5}$	10 ppm	80-110
7.	0,0001	$10^{-6}$	1 ppm	80-110
8.	0,00001	$10^{-7}$	100 ppb	80-110
9.	0,000001	$10^{-8}$	10 ppb	60-115
10.	0,0000001	$10^{-9}$	1 ppb	40-120

**Bảng 9:** Quy định về độ thu hồi của hội đồng châu Âu

TT	Hàm lượng chất ( $\mu\text{g/kg}$ )	Đơn vị	Độ thu hồi [%]
1.	$\leq 1$	$\leq 1$ ppb	50-120%
2.	$> 1$ đến $< 10$	1-10 ppb	70-110%
3.	$\geq 10$	$\geq 10$ ppb	80-110%

## 6. Độ ổn định (hay độ vững/độ chắc chắn) của phương pháp

### 6.1. Định nghĩa

Độ ổn định của phương pháp là khả năng cung cấp các kết quả có độ chính xác (độ đúng và độ chụm) chấp nhận được dưới những điều kiện có sự thay đổi về một số điều kiện thực hiện phương pháp.

Người ta phân biệt hai khái niệm độ vững (robustness) và độ chắc chắn (ruggedness) như sau:

- Độ vững: Là mức độ lặp lại các kết quả phân tích khi có sự thay đổi nhỏ một số thông số của phương pháp (method parameters). Ví dụ đối với phương pháp sắc ký lỏng có thể kể ra các yếu tố này bao gồm pH pha động, tốc độ dòng, nhiệt độ cột, thể tích tiêm mẫu, thành phần pha động, bước sóng phát hiện...
- Độ chắc chắn: Là mức độ lặp lại các kết quả phân tích khi có sự thay đổi một số yếu tố thuộc về điều kiện phân tích (test conditions). Các điều kiện này có thể là người phân tích, thiết bị phân tích, cột sắc ký do các nhà cung cấp khác nhau, lô hóa chất thuốc thử, thời điểm thực hiện thí nghiệm... Nói chung, độ chắc chắn thường liên quan

đến việc tính độ chụm trung gian hay độ tái lập nội bộ phòng thử nghiệm.

Trong tài liệu này chúng tôi nói đến độ ổn định bao gồm cả hai yếu tố độ vững và độ chắc chắn của phương pháp.

### **6.2. Cách xác định**

Cho dù có sự khác nhau về điều kiện phân tích hay khác nhau về thông số phương pháp, thì cũng cần phải bố trí các thí nghiệm để so sánh các kết quả đạt được trong các điều kiện thay đổi này bằng cách so sánh hai phương sai (chuẩn F) và so sánh hai giá trị trung bình (chuẩn t) của hai nhóm kết quả A và B. Ví dụ, giữa người A với người B, giữa máy A và máy B, giữa điều kiện A và điều kiện B... Cách tiến hành so sánh giống như trong phần xác định độ đúng khi so sánh hai phương pháp đã nêu ở trên.

Trong trường hợp có mẫu CRM có thể bố trí các thí nghiệm (có sự thay đổi điều kiện phân tích hay các thông số của phương pháp) để tính kết quả mẫu CRM và so sánh với kết quả chuẩn để đánh giá độ ổn định của phương pháp.

## **Chương III: THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH VI SINH VẬT**

Phương pháp vi sinh vật có sự khác biệt rõ rệt với các phương pháp hóa học. Do đó việc thẩm định phương pháp phân tích vi sinh vật cũng có những yêu cầu và kỹ thuật riêng. Chương này sẽ giới thiệu một cách sơ lược các khái niệm và cách tiến hành thẩm định các thông số cơ bản nhất của phương pháp phân tích vi sinh vật thực hiện theo kỹ thuật nuôi cấy truyền thống.

### **1. Các yêu cầu chung**

#### ***1.1. Chuẩn bị thẩm định***

Trước khi thẩm định bất kể một phương pháp nào, phòng thử nghiệm phải có đầy đủ các trang thiết bị, dụng cụ và máy móc để thực hiện phương pháp đó cũng như các yêu cầu nghiêm ngặt về chất lượng các chỉ số kỹ thuật của trang thiết bị và dụng cụ (phải được hiệu chuẩn nếu cần, bởi một đơn vị/phòng hiệu chuẩn có đủ điều kiện, thích hợp so với yêu cầu). Có thể thực hiện kiểm tra chất lượng môi trường nuôi cấy, thuốc thử theo hướng dẫn tại tiêu chuẩn ISO 11133 phần I và II.

Thẩm định một phương pháp cần được thực hiện bởi các kiểm nghiệm viên nắm vững kiến thức chuyên môn, kỹ thuật thao tác tốt và có kinh nghiệm trong phân tích vi sinh vật.

**Chuẩn bị mẫu cho quá trình thẩm định:** Đối với phương pháp vi sinh, việc chuẩn bị mẫu thẩm định rất quan trọng do các mẫu vi sinh thường có độ ổn định không cao. Quá trình lựa chọn một dạng thực phẩm để làm tăng tỷ lệ mẫu bị nhiễm tự nhiên cần được tính toán hết sức cẩn thận.

Để thẩm định trên đối tượng mẫu thực phẩm, cần lựa chọn năm loại thực phẩm khác nhau thuộc năm nhóm. Chi tiết việc lựa chọn loại thực phẩm để thẩm định được mô tả trong phụ lục 3.

- Các mẫu tự nhiên được ưu tiên nhất. Đó là các sản phẩm được phân tích có chứa/nhiễm vi sinh vật đích. Quá trình bảo quản mẫu cần hạn chế tối đa sự thay đổi của vi sinh vật và trạng thái của chúng. Cần phải kiểm tra mức độ ổn định hàm lượng vi sinh nhiễm ngay trước thời điểm sử dụng mẫu để làm thẩm định.
- Mẫu tự nhiễm: Các dạng mẫu lỏng hoặc sệt có thể được gây nhiễm bằng cách trộn với các sản phẩm tương tự có nhiễm vi sinh vật tự nhiên. Cần phải đảm bảo tính đồng nhất của mẫu sau khi trộn.
- Mẫu thêm: Sử dụng các vi sinh vật đích để gây nhiễm vào mẫu trắng. Hàm lượng vi sinh vật gây nhiễm cần tương đương với lượng thường có trong các sản phẩm tự nhiên.
- Mẫu chuẩn: Mẫu chuẩn, đặc biệt là các mẫu chuẩn được chứng nhận, có chứa một lượng vi sinh vật đã biết và có độ ổn định cao. Mẫu chuẩn có thể được sử dụng để làm mẫu thêm chuẩn khi thẩm định các phương pháp định lượng. Đối với các phương pháp định tính, việc sử dụng thường không cần thiết.

### 1.2. Lựa chọn thông số thẩm định

Các phương pháp vi sinh, giống như các phương pháp hóa học cũng có thể phân loại thành hai nhóm phương pháp là các phương pháp tiêu chuẩn (reference method) và các phương pháp không tiêu chuẩn hay các phương pháp thay thế (alternative method). Hiện nay, các phòng thử nghiệm ở Việt Nam đa số đều sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn để thực hiện các chỉ tiêu vi sinh. Do đó, trong phạm vi của tài liệu này, chúng tôi chỉ xin giới thiệu việc thẩm định đối với phương pháp tiêu chuẩn, các thông số cần thẩm định như sau:

**Bảng 10:** Lựa chọn thông số thẩm định phương pháp phân tích vi sinh vật

Phương pháp định tính	Phương pháp định lượng
Giới hạn phát hiện	Giới hạn phát hiện
Độ đặc hiệu, độ nhạy	Giới hạn định lượng
Độ lệch dương, độ lệch âm	Độ lặp lại
Độ chính xác (độ đúng)	Độ tái lập

Các khái niệm về thông số thẩm định vi sinh cũng có những điểm khác so với thẩm định hóa học, các khái niệm này sẽ được làm rõ trong các phần sau.

Đối với các phương pháp không tiêu chuẩn, quá trình thẩm định phức tạp hơn và thông thường cần trải qua hai giai đoạn, giai đoạn I là thực hiện so sánh với một phương pháp chuẩn và giai đoạn II là so sánh liên phòng thử nghiệm. Để tìm hiểu kỹ hơn về thẩm định phương pháp tiêu chuẩn, có thể tham khảo thêm ISO 16140:2003.

## 2. Thẩm định phương pháp tiêu chuẩn (method verification)

### 2.1. Phương pháp định tính

#### 2.1.1. Giới hạn phát hiện

##### a. Định nghĩa

Giới hạn phát hiện của một phương pháp là nồng độ vi sinh vật thấp nhất trong mẫu có thể xác định được bằng phương pháp đó.

Đối với phương pháp định tính giới hạn phát hiện được tính ở nồng độ có tối thiểu 90% mẫu có kết quả dương tính.

##### b. Cách xác định

Thực hiện theo các bước sau:

- Chọn loại đối tượng mẫu cần thực hiện thẩm định.
- Thử năm mật độ vi khuẩn cho mỗi loại vi sinh vật đích cho một loại mẫu, gồm cả chứng âm. Các mức độ cụ thể như sau:

§ Mức độ 1 ( $L_0$ ) là chứng âm, chỉ cần thực hiện 1 lần.

§ Mức độ 2 là mức độ phát hiện theo lý thuyết từ  $[1 - 9]$  CFU/ 25g và mỗi mức độ gây nhiễm ký hiệu  $L_{1a}$ ,  $L_{1b}$ ,  $L_{1c}$  với  $(1 \leq L_{1a} < L_{1b} < L_{1c} \leq 9)$  CFU/ 25g. Mức độ 2 được thực hiện 5 lần cho mỗi mẫu nhiễm.

§ Mức độ 3 ( $L_2$ ) là mức trên mức phát hiện theo lý thuyết  $[10-50]$  CFU/ 25g, mức độ này chỉ cần thực hiện 1 lần.

##### c. Tính kết quả

LOD của mỗi loại thực phẩm được tính như sau:

LOD = nồng độ vi khuẩn nhiễm vào mẫu mà ở đó có ít nhất 90% mẫu phân tích có kết quả dương tính.

d. Đánh giá kết quả

LOD < 10 là đạt yêu cầu.

2.1.2. *Xác định độ chính xác (accuracy:AC), độ đặc hiệu (specificity:SP), độ nhạy (sensitivity:SE), độ lệch dương (positive deviation:PD) và độ lệch âm (negative deviation:ND)*

a. Định nghĩa

- Độ chính xác (hay độ đúng) là mức độ giống nhau giữa kết quả phân tích được với giá trị tham chiếu.
- Độ đặc hiệu là khả năng phân biệt vi sinh vật đích với các vi sinh vật khác.
- Độ nhạy là tỷ lệ của các vi sinh vật đích có thể được phát hiện.

b. Cách xác định

Với mỗi loại đối tượng, chuẩn bị các mẫu khác nhau, chuẩn bị các mẫu này thành hai nhóm, trong đó có một nhóm mẫu âm tính và một nhóm mẫu được gây nhiễm mức nồng độ khoảng bằng 10 lần LOD (không thông báo cho kiểm nghiệm viên). Bố trí các kiểm nghiệm viên phân tích độc lập theo cùng một phương pháp đang nghiên cứu.

c. Tính kết quả

Tính kết quả theo các công thức sau:



Kết quả	Mẫu chứng (+)	Mẫu chứng (-)
Mẫu có kết quả dương tính (+)	TP	FP
Mẫu có kết quả âm tính (-)	FN	TN

Trong đó: TP (True Positive): Dương tính đúng (Mẫu chứng có kết quả dương tính, kết quả phân tích cho kết quả dương tính)

FP (False Positive): Dương tính giả (Mẫu chứng có kết quả âm tính, kết quả phân tích cho kết quả dương tính)

FN (False Negative): Âm tính giả (Mẫu chứng có kết quả dương tính, kết quả phân tích cho kết quả âm tính)

TN (True Negative): Âm tính đúng (Mẫu chứng có kết quả âm tính, kết quả phân tích cho kết quả âm tính)

$n = TP + FP + FN + TN$ : Tổng số các kết quả

Độ chính xác, độ đặc hiệu, độ nhạy, độ lệch dương, độ lệch âm được tính toán theo các công thức sau đây:

$$\text{Độ chính xác} \quad AC = \frac{TP + TN}{N} \times 100$$

$$\text{Độ đặc hiệu} \quad SP = \frac{TN}{TN + FP} \times 100$$

$$\text{Độ nhạy} \quad SE = \frac{TP}{TP + FN} \times 100$$

$$\text{Độ lệch dương} \quad PD = \frac{FP}{FP + TP} \times 100$$

$$\text{Độ lệch âm} \quad ND = \frac{FN}{FN + TN} \times 100$$

d. Đánh giá kết quả

Các thông số cần được đánh giá theo các chuẩn mực sau:

- Độ chính xác (AC)  $\geq 90$  %
- Độ đặc hiệu (SP)  $\geq 90$  %
- Độ nhạy (SE)  $\geq 90$  %
- Độ lệch dương (PD)  $\leq 10$  %
- Độ lệch âm (ND)  $\leq 10$  %

**Ví dụ:** Bố trí các thí nghiệm để xác định độ chính xác, độ đặc hiệu và độ nhạy của một phương pháp vi sinh, thu được các kết quả như sau:

- Số mẫu dương tính phát hiện dương tính: 37 (TP)
- Số mẫu âm tính phát hiện dương tính: 3 (FP)
- Số mẫu dương tính phát hiện âm tính: 2 (FN)
- Số mẫu âm tính phát hiện âm tính: 38 (TN)

Ta có các kết quả:

- Tổng các kết quả:  $n = 80$
- Độ nhạy:  $SE = \frac{TP}{TP + FN} \times 100 = \frac{37}{37 + 2} \times 100 = 95$  %
- Độ đặc hiệu:  $SP = \frac{TN}{TN + FP} \times 100 = \frac{38}{38 + 3} \times 100 = 93$  %

$$\text{- Độ lệch dương: } PD = \frac{FP}{FP + TP} \times 100 = \frac{3}{3 + 37} \times 100 = 7,5 \%$$

$$\text{- Độ lệch âm: } ND = \frac{FN}{FN + TN} \times 100 = \frac{2}{2 + 38} \times 100 = 5 \%$$

$$\text{- Độ chính xác: } AC = \frac{TP + TN}{n} \times 100 = \frac{37 + 38}{80} \times 100 = 94\%$$

---

## 2.2. Phương pháp định lượng

### 2.2.1. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

#### a. Định nghĩa

- Đối với phương pháp định lượng, giới hạn phát hiện là nồng độ vi sinh vật thấp nhất mà phương pháp đó có thể xác định được nhưng chưa định lượng được.
- Giới hạn định lượng của phương pháp là nồng độ vi sinh vật thấp nhất mà phương pháp có thể định lượng được với một độ chụm mong muốn.

#### b. Quy trình thực hiện

Thực hiện kiểm nghiệm năm mẫu ở nồng độ tối thiểu - tại mức phát hiện là trên 0 (a minimum non zero level) hoặc gần 0 (near zero level) - để chắc chắn rằng số lượng mẫu dương tính có tỷ lệ < 50%.

Chọn 3-5 nồng độ trong khoảng nồng độ vi sinh vật dự kiến để phân tích (ví dụ 10, 20, 50 CFU/25g). Mỗi nồng độ thực hiện lặp lại 6 lần. Ước tính lượng vi sinh vật thấp nhất trong mẫu có thể phát hiện 50% kết quả dương tính.

c. Tính kết quả

Tính giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng theo công thức sau:

$$S_0 = \frac{LC}{1,65}$$

$$LOD = 3,3 \times S_0$$

$$LOQ = 10 \times S_0$$

Trong đó: LC (Critical Level): Lượng vi sinh vật thấp nhất trong mẫu có thể phát hiện 50% kết quả dương tính.

$S_0$ : Tín hiệu nền (baseline spread)

---

**Ví dụ:** Các kết quả dương tính: 0/6 tại nồng độ 10, 2/6 tại nồng độ 20 và 5/6 tại nồng độ 50

à Ước tính mức độ dương tính xấp xỉ phát hiện 50% là  $LC \approx 20 \text{ CFU/25g}$

Do đó,  $S_0 = 20/1,65 \approx 12$

Giới hạn phát hiện:  $LOD = 3,3 \times 12 \approx 40 \text{ (CFU/25g)}$

Giới hạn định lượng:  $LOQ = 10 \times 12 = 120 \text{ (CFU/25g)}$

---

2.2.2. *Xác định độ chụm (độ lặp lại và độ tái lập nội bộ)*

a. Định nghĩa

Như đã nêu trong chương 2, thẩm định phương pháp hóa học, khái niệm độ chụm được sử dụng để chỉ mức độ gần nhau giữa các kết quả phân tích.

Độ lặp lại chỉ độ chụm được thực hiện trong những điều kiện giống nhau, bởi cùng một kiểm nghiệm viên và trong một khoảng thời gian tương đối ngắn.

Độ tái lập chỉ độ chụm được thực hiện bởi các kiểm nghiệm viên khác nhau (độ tái lập nội bộ phòng thử nghiệm hay còn gọi là độ chụm trung gian), hoặc các phòng thử nghiệm khác nhau (độ tái lập liên phòng thử nghiệm).

b. Quy trình thực hiện

Chọn khoảng 3-5 loại nền mẫu thực phẩm, mỗi loại chọn 3-5 sản phẩm (mẫu tự nhiên hoặc mẫu tự nhiễm). Đối với mẫu tự nhiễm, cấy vi sinh vật với nồng độ khoảng  $10^2$ - $10^3$  CFU/đơn vị.

§ Xác định độ lặp lại: Một kiểm nghiệm viên thực hiện kiểm nghiệm các mẫu nói trên, mỗi mẫu lặp lại hai lần, trong một khoảng thời gian ngắn.

§ Xác định độ tái lập nội bộ phòng thử nghiệm (độ chụm trung gian): Hai kiểm nghiệm viên, kiểm nghiệm các mẫu nói trên, lặp lại hai lần song song; có thể thực hiện trong khoảng thời gian tương đối dài.

Các dữ liệu để xác định độ tái lập có thể thu được từ quá trình kiểm nghiệm mẫu thực tế, lưu lại các số liệu song song để tính toán.

c. Tính kết quả

▼ Độ lặp lại: Tính độ lệch chuẩn tương đối (RSD) theo công thức:

$$x_i = \frac{\log a_i + \log b_i}{2}$$

$$RSD_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [(\log a_i - \log b_i)/x_i]^2}{2n}}$$

Trong đó:  $a_i, b_i$ : Các kết quả phân tích song song của kiểm nghiệm viên.

$x_i$ : Kết quả trung bình của hai lần thí nghiệm song song ().

$n$ : Số kết quả phân tích song song của kiểm nghiệm viên.

- ▼ Độ tái lập nội bộ phòng thử nghiệm: Có nhiều cặp kết quả lặp lại (song song) của hai kiểm nghiệm viên A và B. Tính độ lệch chuẩn tương đối (RSD) theo công thức sau:

$$x_i = \frac{\log a_i + \log b_i}{2}$$

$$RSD_R = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [(\log a_i - \log b_i)/x_i]^2}{2n}}$$

Trong đó:  $a_i, b_i$ : Các kết quả phân tích song song của cả hai kiểm nghiệm viên A và B.

$x_i$ : Kết quả trung bình của hai lần phân tích song song.

$n$ : Số kết quả phân tích song song của cả hai kiểm nghiệm viên A và B.

Trường hợp có nhiều kiểm nghiệm viên cùng thực hiện cũng có thể áp dụng công thức trên để tính độ tái lập.

#### d. Đánh giá kết quả

Khi trong phương pháp chuẩn có cung cấp các thông số về độ chụm thì kết quả xác định độ lặp lại  $SD_r$  và độ tái lập  $SD_R$  cần phải nhỏ hơn các giá trị tương ứng nêu trong phương pháp chuẩn.

**GHI CHÚ:** Nếu trong phương pháp chuẩn có nêu giới hạn độ lặp lại  $r$  hay giới hạn độ tái lập  $R$  thì cách thẩm định/kiểm tra tối thiểu là: hiệu hay thương (tùy theo quy định trong phương pháp tiêu chuẩn) giữa hai kết quả phân tích song song phải nhỏ hơn  $r$  (nếu là hai kết quả lặp lại) hay nhỏ hơn  $R$  (nếu là hai kết quả tái lập).

**Ví dụ:** Kết quả xác định độ lặp lại và độ tái lập của hai kiểm nghiệm viên A và B khi định lượng một loại vi khuẩn trên mẫu thực phẩm và các tính toán độ lặp lại và độ tái lập như sau:

Mẫu	KNV	Kết quả				Hiệu $x_{ai} - x_{bi}$	TB $x_i =$ $\frac{x_{ai} + x_{bi}}{2}$	Hiệu/ Trung bình	(Hiệu/ Trung bình) <sup>2</sup>
		Lần 1 ( $a_i$ )	Lần 2 ( $b_i$ )	$x_{ai} =$ $\log(a_i)$	$x_{bi} =$ $\log(b_i)$				
1	A	93	86	1,968	1,934	0,034	1,951	0,017415	0,000303
2	B	36	28	1,556	1,447	0,109	1,502	0,072679	0,005282
3	A	34	30	1,531	1,477	0,054	1,504	0,036135	0,001306
4	B	70	64	1,845	1,806	0,039	1,826	0,021318	0,000454
5	A	98	73	1,991	1,863	0,128	1,927	0,066365	0,004404
6	B	262	242	2,418	2,384	0,034	2,401	0,014363	0,000206

7	A	89	83	1,949	1,919	0,030	1,934	0,015671	0,000246
8	B	136	105	2,134	2,021	0,112	2,077	0,054083	0,002925
9	A	116	105	2,064	2,021	0,043	2,043	0,021181	0,000449
10	B	54	49	1,732	1,690	0,042	1,711	0,024658	0,000608
11	A	168	156	2,225	2,193	0,032	2,209	0,014568	0,000212
12	B	86	68	1,934	1,833	0,102	1,884	0,054149	0,002932
13	A	62	56	1,792	1,748	0,044	1,770	0,024970	0,000623
14	B	35	28	1,544	1,447	0,097	1,496	0,064796	0,004199
15	A	38	28	1,580	1,447	0,133	1,513	0,087630	0,007679
16	B	71	64	1,851	1,806	0,045	1,829	0,024650	0,000608
<b>Tổng KNV A</b>									<b>0,015222</b>
<b>Tổng KNV B</b>									<b>0,017214</b>
<b>Tổng A+B</b>									<b>0,032436</b>

Độ lặp lại của KNV A:  $RSD_{r(A)} = \sqrt{\frac{0,015222}{2 \cdot 8}} = 0,0308;$

Độ lặp lại của KNV B:  $RSD_{r(B)} = \sqrt{\frac{0,017214}{2 \cdot 8}} = 0,0328;$

Độ tái lập nội bộ:  $RSD_R = \sqrt{\frac{0,032436}{2 \times 16}} = 0,045$





## Chương IV: ƯỚC LƯỢNG ĐỘ KHÔNG ĐẢM BẢO ĐO

Theo yêu cầu của ISO 17025, độ không đảm bảo đo là một yêu cầu cần thực hiện cho tất cả các phương pháp thử được áp dụng. Việc ước lượng độ không đảm bảo đo là một việc khó và rất phức tạp, và không phải một phòng thí nghiệm nào cũng có thể thực hiện được. Tuy nhiên, để có thể dần dần nâng cao chất lượng hệ thống phòng thí nghiệm phân tích hóa học và vi sinh vật thì cần phải thực hiện công việc này. Các phòng thử nghiệm có thể phối hợp để xác định độ không đảm bảo đo như là một phần của quá trình thẩm định phương pháp phân tích. Nội dung của chương này sẽ mang đến những khái niệm cơ bản nhất và các cách thực hiện các phép đánh giá độ không đảm bảo đo.

### 1. Khái niệm về độ không đảm bảo đo

Độ không đảm bảo đo của phép đo là thông số gắn với kết quả của phép đo, thông số này đặc trưng cho mức độ phân tán của các giá trị có thể chấp nhận được quy cho đại lượng đo của phép đo.

- Độ không đảm bảo đo nói lên độ tin cậy của phép đo.
- Kiến thức về độ không đảm bảo đo rất hữu ích cho việc phát triển phương pháp, thẩm định phương pháp, hay thay đổi bổ sung để điều chỉnh phương pháp tốt hơn.

### 2. Các nguồn gây ra độ không đảm bảo đo

Trong một phép thử có rất nhiều nguồn gây ra độ không đảm bảo đo:

- **Mẫu thử:** bản chất của mẫu thử không đồng nhất, trạng thái vật lý, độ ổn định của mẫu thử, ảnh hưởng của các yếu tố nhiệt độ và môi trường...

- **Lấy mẫu:** Lấy mẫu không đại diện, không đồng nhất...
- **Điều kiện bảo quản:** Quá trình vận chuyển, bảo quản và thời gian bảo quản mẫu có thể ảnh hưởng lớn đến kết quả phân tích.
- **Chuẩn bị mẫu:** Quá trình đồng nhất, cân mẫu, chiết tách...
- **Dung môi và thuốc thử:** Độ tinh khiết, tạp chất...
- **Thiết bị:** Thiết bị có những sai số trong quá trình hiệu chuẩn hoặc chưa được hiệu chuẩn, sai số ở các khoảng đo khác nhau...
- **Điều kiện môi trường:** Các ảnh hưởng của nhiệt độ, độ ẩm...
- **Con người:** Kỹ năng, trình độ, sai số tính toán...
- **Nguồn ngẫu nhiên khác.**

### 3. Các cách đánh giá độ không đảm bảo đo

Tài liệu này giới thiệu hai cách đánh giá độ không đảm bảo đo hiện nay đang được áp dụng, đầu tiên là ước lượng độ không đảm bảo đo từ tất cả các yếu tố cấu thành nó (theo hướng dẫn của EURACHEM và cách thứ hai là ước lượng độ không đảm bảo đo tổng từ việc bố trí thí nghiệm và xác định theo phương pháp thống kê. Trong phạm vi các phòng thử nghiệm hiện nay ở Việt Nam thì cách tiếp cận thứ hai thuận lợi hơn và có tính khả thi cao.

#### 3.1. Cách 1: Ước lượng độ không đảm bảo đo theo hướng dẫn của EURACHEM

##### 3.1.1. Bước 1: Xác định các đại lượng đo

Kết quả đo thu được cuối cùng là giá trị số học của đại lượng đo, giá trị này phụ thuộc vào giá trị các đại lượng đầu vào và giá trị các đại lượng trung gian.

Liệt kê các đại lượng đo có ảnh hưởng đến kết quả đo cuối cùng, thông thường dựa vào quy trình thao tác chuẩn (SOP) và công thức tính toán để xác định các đại lượng này.

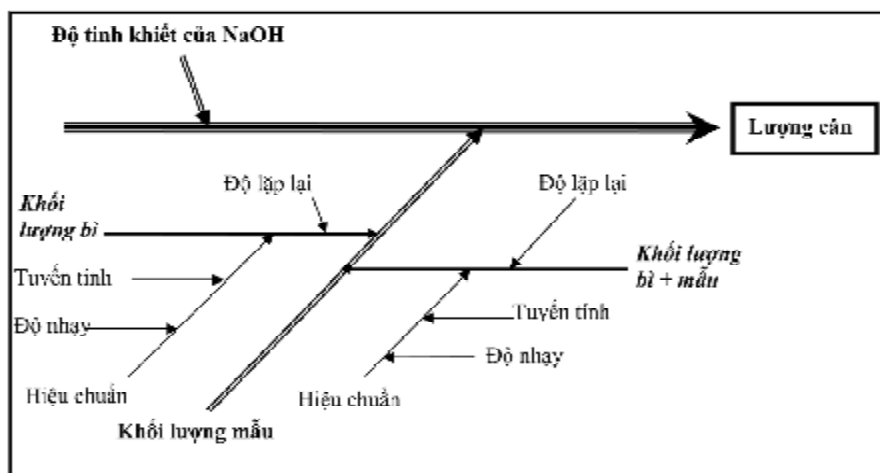
### 3.1.2. Bước 2: Xác định các nguồn gây ra độ không đảm bảo đo

Từ các đại lượng đo cần xác định nguồn gốc có thể gây ra độ không đảm bảo đo của các đại lượng đó. Các nguồn gây ra độ không đảm bảo đo đã được liệt kê trong mục 2. Cách đơn giản là phân thành các nhóm chung và lập sơ đồ xương cá để xác định nguồn gây ra độ không đảm bảo đo.

**Ví dụ:** Xác định nguồn gây ra độ không đảm bảo đo của phép cân 0,5g NaOH

Các đại lượng đo:

- Khối lượng mẫu (đại lượng cuối)
- Khối lượng bì (đại lượng trung gian)
- Khối lượng bì + mẫu (đại lượng trung gian)



### 3.1.3. Bước 3: Tính các thành phần độ không đảm bảo đo

Sau khi đã xác định các nguồn gây ra độ không đảm bảo đo, bước tiếp theo là tính độ không đảm bảo đo từ các nguồn này sau đó kết nối các giá trị này lại với nhau để thu được độ không đảm bảo đo tổng.

Không phải tất cả các nguồn gây ra độ không đảm bảo đo đều ảnh hưởng trực tiếp có ý nghĩa đến độ không đảm bảo đo tổng hợp mà thực tế chỉ có một số lượng ít là có ảnh hưởng trực tiếp. Do đó đầu tiên cần đánh giá sơ bộ sự đóng góp của từng nguồn thành phần đến độ không đảm bảo đo tổng. Thực tế, nên nhóm các thành phần đơn lẻ thành các nhóm riêng biệt để đơn giản hóa việc tính toán.

Các phương pháp cơ bản để tính từng thành phần độ không đảm bảo đo là:

- Tính độ lệch chuẩn của các giá trị bằng cách tiến hành các phép đo lặp lại: Độ không đảm bảo đo chuẩn xuất phát từ các sai số ngẫu nhiên và được tính toán từ độ lệch chuẩn của phép đo lặp lại. Yêu cầu số lần lặp lại tối thiểu phải đạt 6 lần, thông thường 10 lần. Các dữ liệu thu được trong quá trình thẩm định phương pháp rất có ích để tính độ không đảm bảo đo.
- Tiến hành các phép đo trên chất chuẩn: Khái niệm chất chuẩn có nghĩa là một đặc tính nào đó của chất được xác định chính xác, sử dụng để hiệu chuẩn thiết bị hay để thẩm định phương pháp. Chất chuẩn phải có chứng nhận được cung cấp bởi các tổ chức uy tín có đủ năng lực thực hiện.
- Sử dụng dữ liệu và kết quả của các phép đo trước đó, đặc biệt hữu ích là các kết quả từ các chương trình thử nghiệm liên phòng.

- Từ sự suy luận dựa vào kinh nghiệm của người phân tích: Có nhiều trường hợp không thể tiến hành các phép thử nghiệm lặp lại hoặc không có các thông tin cần thiết để tính độ không đảm bảo đo của một thành phần nào đó, trong những trường hợp này thì kinh nghiệm và kiến thức của người làm phân tích cũng là một yếu tố quan trọng đặc biệt trong trường hợp tính độ không đảm bảo đo bằng các phương pháp không phải phân tích thống kê của một dãy các giá trị quan sát (loại B).

a. Tính độ không đảm bảo đo chuẩn theo loại A

Phương pháp này đánh giá độ không đảm bảo đo bằng cách tiến hành phân tích thống kê dãy giá trị, với số lần lặp lại <sup>3</sup> 6 lần (*phân phối chuẩn*). Độ không đảm bảo đo chuẩn có thể được biểu thị bằng độ lệch chuẩn hoặc độ lệch chuẩn tương đối:

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

$$u\% = RSD\% = \frac{SD}{\bar{x}}$$

Trong đó: u: Độ không đảm bảo đo

SD: Độ lệch chuẩn

$x_i$ : Giá trị thứ i

$\bar{x}$ : Giá trị trung bình

n: Số lần làm lặp lại

RSD: Độ lệch chuẩn tương đối

Trong trường hợp không chỉ rõ dạng phân bố, độ không đảm bảo đo được chuyển đổi từ khoảng tin cậy  $x \pm \alpha$ :

- Đối với mẫu nhỏ ( $n < 10$ ):

$$u = \frac{\alpha}{2} \quad \text{với mức ý nghĩa } 0,05 \text{ (độ tin cậy } 95\%)$$

$$u = \frac{\alpha}{3} \quad \text{với mức ý nghĩa } 0,003 \text{ (độ tin cậy } 99,7\%)$$

- Đối với mẫu lớn ( $n \geq 10$ ):

$$u = \frac{\alpha}{Z}$$

trong đó Z có giá trị: 1,96 với mức ý nghĩa 0,05 (độ tin cậy 95%)

2,575 với mức ý nghĩa 0,01 (độ tin cậy 99%)

---

**Ví dụ:** Chứng chỉ hiệu chuẩn cân cho biết tại lượng cân 100 mg sai số là  $\pm 0,2$  mg với mức ý nghĩa 0,05. Độ không đảm bảo đo là  $u = 0,4/1,96 = 0,204$  (mg)

---

- b. Tính độ không đảm bảo đo chuẩn theo loại B: Đánh giá độ không đảm bảo đo không bằng phương pháp thống kê. Tùy thuộc vào xác suất xuất hiện các giá trị mà chọn hàm phân bố phù hợp để tính toán:

- Phân bố hình chữ nhật: Khi các giá trị gây ra độ không đảm bảo đo được phân bố rải rác trong một vùng mà tại đó khả năng xuất hiện của các số liệu ở các vị trí là như nhau. Trong trường hợp

này cần xác định khoảng dao động (độ rộng  $2a$ , dao động  $\pm a$ ) và tính độ không đảm bảo đo theo công thức sau:

$$u = \frac{\alpha}{\sqrt{3}}$$

Trong đó  $\alpha$  là giới hạn thường được ghi trong chứng nhận tiêu chuẩn.

---

---

**Ví dụ:** Sai số bình định mức 10 ml loại A của nhà sản xuất công bố là  $\pm 0,2$  ml ở nhiệt độ 20 °C nhưng không công bố ở độ tin cậy bao nhiêu. Theo phân phối hình chữ nhật, độ không đảm bảo đo được tính:  $u = \frac{0,2}{\sqrt{3}} = 0,12$  ml

---

---

- Phân bố hình tam giác: Khi hầu hết các giá trị gây ra độ không đảm bảo đo được phân bố ở gần trung tâm. Trong trường hợp này cần xác định khoảng dao động (độ rộng  $2a$ , dao động  $\pm a$ ) và tính độ không đảm bảo đo theo công thức sau:

$$u = \frac{\alpha}{\sqrt{6}}$$

Trong đó  $\alpha$  là giới hạn thường được ghi trong chứng nhận tiêu chuẩn.

---

---

**Ví dụ:** Sai số bình định mức 10 ml loại A của nhà sản xuất công bố là  $\pm 0,2$  ml ở nhiệt độ 20 °C nhưng không công bố ở độ tin cậy bao nhiêu. Nhưng các kết quả kiểm tra ở phòng thử nghiệm cho thấy giá trị bất thường không



bao giờ có, các giá trị đều tập trung gần giá trị trung bình. Theo phân phối hình tam giác, độ không đảm bảo đo được tính:  $u = \frac{0,2}{\sqrt{6}} = 0,08 \text{ ml}$

---

---

*3.1.4. Bước 4: Tính độ không đảm bảo đo tổng hợp và mở rộng*

**a. Đối với mô hình liên quan đến phép tính tổng hay hiệu số:  $y = a + b - c \dots$**

Độ không đảm bảo đo tổng hợp được tính:

$$U_{TH} = \sqrt{u_a^2 + u_b^2 + u_c^2 + \dots}$$

$u_a, u_b, u_c$ : Độ không đảm bảo đo của các đầu vào a, b, c

---

---

**Ví dụ:** Cân chính xác khoảng 0,25 g chất chuẩn A trên cân phân tích 4 số. Các số liệu như sau:

- Chứng chỉ hiệu chuẩn cân công bố độ không đảm bảo đo là  $\pm 0,0005 \text{ g}$  ở mức ý nghĩa 0,05.

- Quá trình cân lặp lại cho độ lệch chuẩn là 0,000075

Cách tính độ không đảm bảo đo:

- Độ không đảm bảo quá trình hiệu chuẩn:  $u = 0,0005/1,96 = 0,000255 \text{ g} = 0,255 \text{ mg}$

- Độ không đảm bảo đo quá trình lặp lại:  $u = SD = 0,000075 \text{ g} = 0,075 \text{ mg}$

- Độ không đảm bảo đo tổng:  $U = \sqrt{(0,255)^2 + (0,075)^2} = 0,266 \text{ mg}$

---

---

**b. Đối với mô hình liên quan đến phép tính tích hay thương số:**

Với dạng  $y = a.b.c$  hoặc dạng  $y = (a.b)/c$

$$\frac{U_{TH}}{y} = \sqrt{\left(\frac{u_a}{a}\right)^2 + \left(\frac{u_b}{b}\right)^2 + \left(\frac{u_c}{c}\right)^2}$$

**Ví dụ:** Cân chính xác khoảng 0,25 g chất chuẩn A, pha trong nước cất và định mức đến 100ml bằng nước cất trong bình định mức. Độ tinh khiết của chuẩn A là  $P = 99,9 \pm 0,1\%$ . Độ không đảm bảo đo của bình định mức là 0,1 ml. Tính U của nồng độ ở mức ý nghĩa 0,05.

Nồng độ dung dịch được tính theo công thức sau:  $C = \frac{m \times P}{V} \times 1000 = 2,498 \text{ mg/l}$

Có ba nguồn gây ra độ không đảm bảo đo của nồng độ:

- Quá trình cân:  $u_a = 0,266 \text{ mg}$  (theo tính toán ở ví dụ trước)
- Độ tinh khiết mẫu thử:  $u_b = \frac{0,001}{\sqrt{3}} = 0,00058$
- Thể tích:  $u_c = 0,1 \text{ ml}$

Vậy độ không đảm bảo đo tổng của nồng độ được tính theo dạng  $y = (a.b)/c$ :

$$U_{TH} = \sqrt{\left(\frac{0,266}{250}\right)^2 + \left(\frac{0,00058}{0,999}\right)^2 + \left(\frac{0,1}{100}\right)^2} \times 2,4975 = 0,004 \text{ mg/l}$$

**- Độ không đảm bảo đo mở rộng:** Việc báo cáo độ không đảm bảo đo cuối cùng thường cần quy về độ không đảm bảo đo mở rộng. Tính độ

không đảm bảo đo mở rộng theo công thức sau:

$$U = k \times U_{TH}$$

k là hệ số phủ

Trong đa số trường hợp, k được cho giá trị bằng 2 tương ứng với độ tin cậy 95%. Tuy nhiên trong một số trường hợp cụ thể k còn phụ thuộc vào độ tin cậy mong muốn và số bậc tự do, khi đó k được tính bằng cách tra bảng t-student (theo phụ lục 1)

---

Như ví dụ trên đây, độ không đảm bảo đo mở rộng  $U = 2 \times 0,004 = 0,008$  g/l

Vậy, cách ghi là  $2,498 \pm 0,008$  mg/l ở độ tin cậy 95%.

---

### ***3.2. Cách 2: Ước lượng độ không đảm bảo đo từ dữ liệu phân tích mẫu thực***

Trong đa số trường hợp, việc tính toán độ không đảm bảo đo theo từng bước như trên rất tốn kém thời gian và công sức. Với một phương pháp đã thẩm định, thì việc chỉ bố trí các phép thử nghiệm và tính độ không đảm bảo đo theo phương pháp thống kê là đủ tính khoa học và tiết kiệm.

#### ***3.2.1. Xác định độ không đảm bảo đo trên mẫu cùng nồng độ***

Thực hiện theo các bước sau:

- Phân tích mẫu chuẩn đã biết hàm lượng, hoặc phân tích một mẫu đồng nhất có hàm lượng xác định;
- Phân tích mẫu lặp lại tối thiểu 20 lần, tính kết quả các lần phân tích (các lần phân tích nên được bố trí các ngày khác nhau);

- Tính giá trị trung bình, độ lệch chuẩn và hệ số biến thiên của kết quả phân tích;

- Độ không đảm bảo đo được tính theo công thức sau:

$$U(\%) = t_{\alpha,k} \times CV(\%)$$

Trong đó:  $U$  : Độ không đảm bảo đo tổng (%)

$CV$  : Hệ số biến thiên của kết quả đo (%)

$t_{\alpha,k}$  : Giá trị t tra bảng với mức ý nghĩa  $\alpha = 0,05$ ; bậc tự do  $k = n - 1$

$n$  : Số lần phân tích lặp lại

**Ví dụ:** Để đánh giá độ không đảm bảo đo, người ta thực hiện trên mẫu chuẩn đo lặp lại 20 lần và thu được các giá trị trung bình  $\bar{x} = 39,5 \text{ mg/kg}$  và độ lệch chuẩn  $SD = 2,417 \text{ mg/kg}$ . Tính độ không đảm bảo đo như sau:

$$CV\% = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 = 6,12$$

$$U(\%) = t_{\alpha,k} \times CV(\%) = 1,73 \times 6,12 = 10,6 \%$$

$$U = 10,6\% \times 39,5 = 4,19 \text{ mg/kg}$$

Công bố  $U$  như sau:  $39,5 \text{ mg/kg} \pm 10,6\%$  hoặc  $39,5 \pm 4,19 \text{ mg/kg}$

### 3.2.2. Xác định độ không đảm bảo đo trên các mẫu nồng độ khác nhau

- Thực hiện phân tích trên mẫu thêm chuẩn (với các nồng độ khác nhau).

- Phân tích mẫu lặp lại tối thiểu 20 lần, tính kết quả các lần phân tích

(các lần phân tích nên được bố trí các ngày khác nhau) từ đó xác định độ thu hồi của các lần phân tích.

- Tính giá trị trung bình, độ lệch chuẩn và hệ số biến thiên của độ thu hồi phân tích.

- Độ không đảm bảo đo được tính theo công thức sau:

$$u_R(\%) = t_{\alpha,k} \times CV_R(\%)$$

Trong đó:  $u_R$  : Độ không đảm bảo đo tổng theo thu hồi (%)

$CV_R$  : Hệ số biến thiên của độ thu hồi (%)

$t_{\alpha,k}$  : giá trị t-student tra bảng với mức ý nghĩa  $\alpha = 0,05$

$k$  : Bậc tự do ( $k = n - 1$ )

$n$  : Số lần thử nghiệm

---

**Ví dụ:** Để đánh giá độ không đảm bảo đo, người ta thực hiện trên các mẫu trắng thêm chuẩn trong khoảng nồng độ từ 10 đến 100 mg/kg, tính độ thu hồi và thực hiện lặp lại 20 lần và thu được giá trị độ thu hồi trung bình là 97% và độ lệch chuẩn của độ thu hồi là 7%.

Tính độ không đảm bảo đo như sau:  $CV\% = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 = 6,87$

$$U(\%) = t_{\alpha,n-1} \times CV(\%) = 1,73 \times 6,87 = 11,7 \%$$

Công bố U như sau: từ 10-100 mg/kg  $\pm 11,7\%$

---

#### 4. Công bố độ không đảm bảo đo

Phải thông báo các thông tin sau đây khi trình bày kết quả đó trong các báo cáo thẩm định hoặc khi có yêu cầu.

- a. Kết quả đo.
- b. Độ không đảm bảo đo.
- c. Mức độ tin cậy được sử dụng trong việc xác định khoảng của độ không đảm bảo đo mở rộng.

#### ***4.1. Cách viết độ không đảm bảo đo chuẩn tổng hợp***

Khi sử dụng hệ số phủ  $k = 1$  thì độ không đảm bảo đo chính là độ không đảm bảo đo chuẩn và được viết như sau:

**Kết quả (đơn vị) với độ không đảm bảo đo chuẩn  $U$  (đơn vị)**

Chú ý: Không sử dụng dấu “ $\pm$ ” khi báo cáo độ không đảm bảo đo chuẩn vì dấu này thường gắn với độ tin cậy cao như 95% và 99%.

#### ***4.2. Cách viết độ không đảm bảo đo mở rộng***

Thông thường, độ không đảm bảo đo mở rộng với hệ số phủ  $k = 2$  được viết như sau:

**Kết quả (đơn vị)  $\pm U$  (đơn vị)**



## **Chương V: ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM**

Thẩm định phương pháp phân tích không phải là tất cả để đảm bảo chất lượng kết quả thử nghiệm. Theo yêu cầu của ISO 17025, đảm bảo chất lượng là một quá trình và cần thường xuyên thực hiện. Phòng thử nghiệm được công nhận và duy trì ISO 17025 chính là quá trình đảm bảo chất lượng liên tục, ngược lại các chương trình đảm bảo chất lượng là một yếu tố cực kỳ quan trọng giúp duy trì được ISO 17025. Trong khuôn khổ tài liệu này chúng tôi nêu lên các chương trình và cách tổ chức việc đảm bảo chất lượng tại phòng thử nghiệm.

Có nhiều cách để các phòng thử nghiệm tổ chức các chương trình đảm bảo chất lượng. Theo quy định của ISO 17025 (mục 5.9), phòng thử nghiệm phải có các thủ tục kiểm soát chất lượng để kiểm tra tính hiệu lực của phép thử nghiệm đã thực hiện. Dữ liệu kết quả phải được ghi chép sao cho có thể nhận biết các khuynh hướng diễn biến của các kết quả và nếu có thể cần phải áp dụng kỹ thuật thống kê để xem xét các kết quả. Việc kiểm tra này phải được lên kế hoạch, soát xét lại. Các dữ liệu về kiểm soát chất lượng phải được phân tích và khi những dữ liệu này nằm ngoài chuẩn mực đã định thì phải có hành động khắc phục điều này và ngăn ngừa kết quả sai được thông báo.

Chương này giới thiệu các kỹ thuật và cách tổ chức các chương trình đảm bảo chất lượng phòng thử nghiệm.



### **1. Phép thử nghiệm lặp lại**

Cho cùng một nhân viên thực hiện việc phân tích một chỉ tiêu nào đó xác định trên cùng một mẫu thử đồng nhất, trên cùng một thiết bị, cùng phương pháp trong một khoảng thời gian tương đối ngắn và đánh giá mức độ lặp lại các kết quả kiểm tra.

Trong phân tích hàng ngày, cần thực hiện song song tối thiểu hai lần nhằm tránh được các sai số ngẫu nhiên gặp phải. Đánh giá mức độ chênh lệch giữa hai lần làm với giá trị trung bình, sự chênh lệch này phải thỏa mãn theo yêu cầu của từng phương pháp.

### **2. Phép thử nghiệm tái lập**

Các phòng thử nghiệm nên bố trí cho nhân viên thực hiện các phép thử nghiệm tái lập, bằng cách cho thực hiện trên các thiết bị khác nhau hoặc cho các nhân viên khác nhau thực hiện cùng một phép thử nghiệm (đổi tay nhân viên).

### **3. Phép thử nghiệm trên mẫu lưu**

Có thể bố trí để nhân viên thực hiện các phép thử nghiệm trên mẫu lưu, tuy nhiên để đánh giá được kết quả cần đảm bảo độ ổn định của mẫu theo thời gian và trong điều kiện bảo quản của phòng; đồng thời chỉ nên áp dụng đối với các chất được biết là tương đối bền vững trong điều kiện nhất định nào đó.

### **4. Phép thử nghiệm trên mẫu trắng**

Mẫu trắng là mẫu tương tự như mẫu thử nhưng không có chất phân tích. Việc thực hiện phép thử trên mẫu trắng là yêu cầu cần thiết đối với đa

số phương pháp. Trong một số trường hợp khi không thể có được mẫu trắng thì có thể thực hiện mẫu trắng thuốc thử, tức là thực hiện tương tự như mẫu nhưng không có giai đoạn cân mẫu.

Đối với các phương pháp phân tích vi lượng và phân tích hàm lượng vết, việc sử dụng các mẫu trắng đóng vai trò rất quan trọng để loại trừ nhiễu chéo trong quá trình phân tích. Trong một lô mẫu phân tích (chạy máy) cần chạy mẫu trắng sau một khoảng nhất định (ví dụ sau mỗi 10 mẫu) để kiểm tra lượng quá mẫu còn sót lại trong hệ thống. Số lượng các mẫu trắng cần phải chiếm ít nhất 5% tổng số mẫu phân tích.

## **5. Phép thử nghiệm trên mẫu chuẩn**

Mẫu chuẩn được chứng nhận (CRM) hoặc mẫu chuẩn thứ cấp là bằng chứng quan trọng để khẳng định kết quả phân tích. Việc có được các mẫu chuẩn được chứng nhận thường rất khó khăn do kinh phí, khi đó có thể cân nhắc sử dụng các mẫu chuẩn thứ cấp như là mẫu kiểm tra. Các mẫu này có thể là mẫu thu được từ các chương trình so sánh liên phòng thử nghiệm, mẫu được chuẩn lại từ các mẫu CRM hoặc các mẫu chuẩn do phòng thử nghiệm tự tạo.

## **6. Phép thử nghiệm trên mẫu thêm**

Trong trường hợp không có các mẫu chuẩn, thì sử dụng mẫu thêm chuẩn là một cách phổ biến và cần thiết. Bởi vì chuẩn thêm vào mẫu và bản thân chất phân tích có sự tương tác khác nhau với nền mẫu nên mẫu thêm cần được thực hiện sao cho sự khác biệt này là nhỏ nhất. Chuẩn cần được thêm ngay từ đầu, sau giai đoạn cân đong và đảm bảo thời gian để đồng nhất với nền mẫu. Ví dụ như, đối với các phép phân tích dư lượng trên các nền

mẫu sinh học thường thêm chuẩn vào ngày hôm trước khi phân tích, có thể để qua đêm để đồng nhất.

## 7. Sử dụng các phương pháp khác nhau

Phòng thử nghiệm có thể sử dụng nhiều phương pháp khác nhau để kiểm tra một chỉ tiêu nào đó. Tốt nhất là so sánh kết quả của phương pháp thực hiện với một phương pháp tiêu chuẩn.

## 8. Đánh giá sự phù hợp của hệ thống

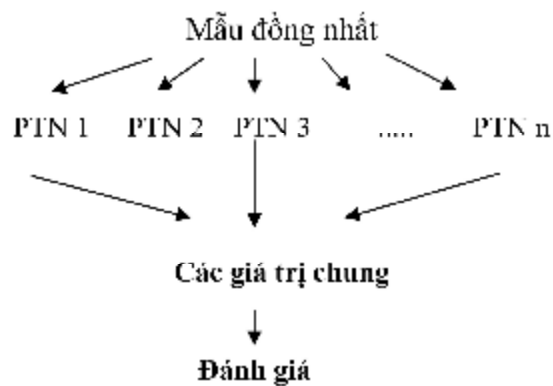
Thông thường các phương pháp phân tích sắc ký hay quang phổ cần có sự đánh giá để đảm bảo hệ thống phù hợp để phân tích. Đánh giá sự phù hợp của hệ thống là các phép thử để chứng minh rằng hệ thống hoạt động đúng theo mục đích sử dụng. Cần đánh giá hàng ngày tùy thuộc vào độ ổn định của hệ thống hoặc số lượng mẫu phân tích hàng ngày.

Phép thử đánh giá sự phù hợp của hệ thống của các phương pháp sắc ký được quy định theo nhiều tổ chức (USP, USFDA) như sau:

- Độ chụm của thời gian lưu, diện tích pic sắc ký: Tiêm trực tiếp dung dịch chuẩn nhiều lần lặp lại vào hệ thống sắc ký và xác định độ lệch chuẩn tương đối (RSD). Số lần bơm tối thiểu 5 lần phải cho RSD nhỏ hơn 2%. Nếu RSD lớn hơn 2% cần sử dụng 6 điểm;
- Độ phân giải giữa hai chất;
- Hệ số kéo đuôi;
- Các thông số khác: như độ trôi đường nền, nhiễu đường nền (khi giới hạn phát hiện đóng vai trò quan trọng trong phương pháp).

### 9. Tham gia các chương trình thử nghiệm liên phòng

Tham gia các chương trình thử nghiệm liên phòng là một yêu cầu bắt buộc nếu phòng thử nghiệm muốn được công nhận ISO 17025. Hàng năm, phòng thử nghiệm cần lập kế hoạch tham gia các chương trình thử nghiệm liên phòng, xem đây là cách tốt nhất để đánh giá năng lực bản thân phòng thử nghiệm của mình. Hiện nay đã có nhiều tổ chức ở Việt Nam và trên thế giới cung cấp các chương trình thử nghiệm liên phòng, các phòng thử nghiệm cần tìm kiếm các chương trình phù hợp với phạm vi của phòng mình để tham gia.



**Hình 10:** So sánh liên phòng thử nghiệm kiểu mẫu

Trừ một số trường hợp đặc biệt, thông thường dựa vào các kết quả thu được từ các chương trình thử nghiệm liên phòng, phòng thử nghiệm cần có hướng xử lý và khắc phục:

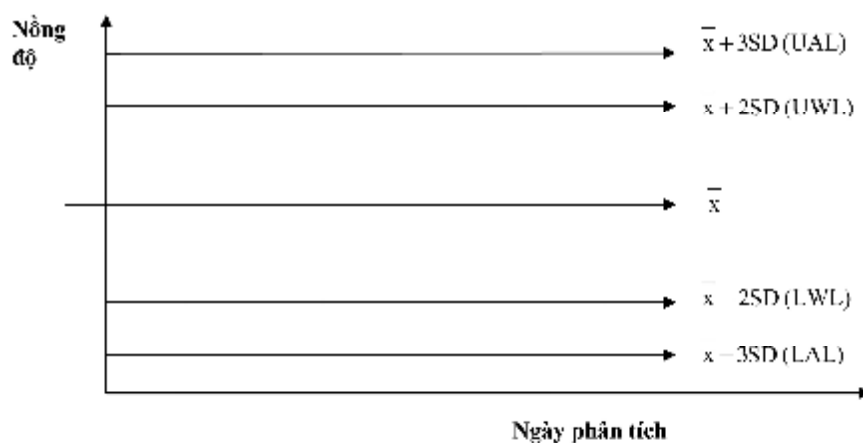
- Nếu  $|Z| \geq 3$ : Có số lệch. Phòng thử nghiệm cần tìm hiểu nguyên nhân gây sai lệch và có hành động khắc phục phù hợp, thông thường kết quả khắc phục cần được gửi cho đơn vị tổ chức.

- Nếu  $2 < |Z| < 3$ : Nghi ngờ. Phòng thử nghiệm không bắt buộc phải thực hiện hành động khắc phục, tuy nhiên phòng cần tìm hiểu các nguyên nhân và có hành động phòng ngừa.

- Nếu  $|Z| \leq 2$ : Không có số lạc.

## 10. Sử dụng biểu đồ kiểm soát

Biểu đồ kiểm soát (Control Chart) là một trong những công cụ thống kê rất hữu ích giúp cho quá trình thực hiện các chương trình đảm bảo chất lượng. Có nhiều dạng biểu đồ kiểm soát khác nhau, trong đó dạng thường được sử dụng trong phòng thử nghiệm là biểu đồ trung bình. Biểu đồ kiểm soát loại này được xây dựng từ giá trị trung bình và độ lệch chuẩn của mẫu kiểm tra (QC), bao gồm giá trị trung tâm và các giá trị giới hạn cảnh báo trên (UWL – Upper Warning Limit), giới hạn cảnh báo dưới (LWL – Lower Warning Limit), giới hạn hành động trên (UAL – Upper Action Limit) và giới hạn hành động dưới (LAL – Lower Action Limit). Thông thường các giới hạn này tương ứng với quy tắc  $\pm 2SD$  và  $\pm 3SD$  (SD là độ lệch chuẩn).



**Hình 11:** Mô hình biểu đồ kiểm soát dạng trung bình

Trong quá trình phân tích, tùy theo giá trị và xu hướng của mẫu QC mà có biện pháp khắc phục. Cần ngừng thực hiện phân tích, kiểm tra các kết quả của các mẫu thực phân tích kèm theo và có hành động phù hợp nếu xảy ra một trong các trường hợp sau:

- Có bất kỳ một mẫu QC vượt ra ngoài khoảng hành động (LAL – UAL)
- Có nhiều hơn hai trong ba mẫu liên tục vượt ra ngoài khoảng cảnh báo (LWL – UWL)
- Các giá trị mẫu QC có xu hướng nằm về một phía của giá trị thực hoặc giá trị được chấp nhận là đúng (trong trường hợp biết nồng độ mẫu QC): Theo ISO 8258, nếu có lớn hơn 9 điểm nằm về một phía thì không chấp nhận.
- Hàm lượng mẫu QC có xu hướng tăng hoặc giảm theo thời gian phân tích: Theo ISO 8285, nếu có 6 điểm liên tục của mẫu QC tăng hoặc giảm (vẫn nằm trong giới hạn) thì cần dừng lại và kiểm tra lại kết quả.

Tất cả các hoạt động nói trên đều là các chương trình nhất định nhằm đảm bảo chất lượng kết quả thử nghiệm. Để hướng tới đảm bảo chất lượng toàn diện, thì áp dụng và thực hiện đúng theo các yêu cầu của ISO 17025 là cách tốt nhất.

**Phụ lục 1:** Bảng phân phối chuẩn Student  
với các mức ý nghĩa từ 0,10 đến 0,001

Bậc tự do	$\alpha$				
	0,10	0,05	0,01	0,005	0,001
1	6,314	12,71	31,82	63,66	318,3
2	2,920	4,303	6,965	9,925	22,33
3	2,353	3,182	4,541	5,841	10,21
4	2,132	2,776	3,747	4,604	7,173
5	2,015	2,571	3,365	4,032	5,893
6	1,943	2,447	3,143	3,707	5,208
7	1,895	2,365	2,998	3,499	4,785
8	1,860	2,306	2,896	3,355	4,501
9	1,833	2,262	2,821	3,250	4,297
10	1,812	2,228	2,764	3,169	4,144
11	1,796	2,201	2,718	3,106	4,025
12	1,782	2,179	2,681	3,055	3,930
13	1,771	2,160	2,650	3,012	3,852
14	1,761	2,145	2,624	2,977	3,787
15	1,753	2,131	2,602	2,947	3,733
16	1,746	2,120	2,583	2,921	3,686
17	1,740	2,110	2,567	2,898	3,646
18	1,734	2,101	2,552	2,878	3,610
19	1,729	2,093	2,539	2,861	3,579
20	1,725	2,086	2,528	2,845	3,552
21	1,721	2,080	2,518	2,831	3,527
22	1,717	2,074	2,508	2,819	3,505
23	1,714	2,069	2,500	2,807	3,485
24	1,711	2,064	2,492	2,797	3,467
25	1,708	2,060	2,485	2,787	3,450
26	1,706	2,056	2,479	2,779	3,435
27	1,703	2,052	2,473	2,771	3,421
28	1,701	2,048	2,467	2,763	3,408
29	1,699	2,045	2,462	2,756	3,396
30	1,697	2,042	2,457	2,750	3,385
$\infty$	1,645	1,960	2,326	2,576	3,090

**Phụ lục 2:** Bảng phân phối chuẩn Fisher với  $k_1$ ,  $k_2$  là các bậc tự do,  $\alpha$  là mức ý nghĩa

$k_2$	$\alpha$	$k_1$																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	15	20	24	30	40	60	120	$\infty$
1	0,10	39,86	49,50	53,59	55,83	57,24	58,20	58,91	59,44	59,86	60,19	60,47	60,71	61,22	61,74	62,00	62,26	62,53	62,79	63,06	63,33
	0,05	161,4	199,5	215,7	224,6	230,2	234,0	236,8	238,9	240,5	241,9	243,0	243,9	245,9	248,0	249,1	250,1	251,1	252,2	253,3	254,3
	0,01	4052	4999	5404	5624	5764	5859	5928	5981	6022	6056	6083	6107	6157	6209	6234	6260	6286	6313	6340	6366
2	0,10	8,53	9,00	9,16	9,24	9,29	9,33	9,35	9,37	9,38	9,39	9,40	9,41	9,42	9,44	9,45	9,46	9,47	9,47	9,48	9,49
	0,05	18,51	19,00	19,16	19,25	19,30	19,33	19,35	19,37	19,38	19,40	19,40	19,41	19,43	19,45	19,45	19,46	19,47	19,48	19,49	19,50
	0,01	98,50	99,00	99,16	99,25	99,30	99,33	99,36	99,38	99,39	99,40	99,41	99,42	99,43	99,45	99,46	99,47	99,48	99,48	99,49	99,50
3	0,10	5,54	5,46	5,39	5,34	5,31	5,28	5,27	5,25	5,24	5,23	5,22	5,22	5,20	5,18	5,18	5,17	5,16	5,15	5,14	5,13
	0,05	10,13	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,89	8,85	8,81	8,79	8,76	8,74	8,70	8,66	8,64	8,62	8,59	8,57	8,55	8,53
	0,01	34,12	30,82	29,46	28,71	28,24	27,91	27,67	27,49	27,34	27,23	27,13	27,05	26,87	26,69	26,60	26,50	26,41	26,32	26,22	26,13
4	0,10	4,54	4,32	4,19	4,11	4,05	4,01	3,98	3,95	3,94	3,92	3,91	3,90	3,87	3,84	3,83	3,82	3,80	3,79	3,78	3,76
	0,05	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,09	6,04	6,00	5,96	5,94	5,91	5,86	5,80	5,77	5,75	5,72	5,69	5,66	5,63
	0,01	21,20	18,00	16,69	15,98	15,52	15,21	14,98	14,80	14,66	14,55	14,45	14,37	14,20	14,02	13,93	13,84	13,75	13,65	13,56	13,46
5	0,10	4,06	3,78	3,62	3,52	3,45	3,40	3,37	3,34	3,32	3,30	3,28	3,27	3,24	3,21	3,19	3,17	3,16	3,14	3,12	3,10
	0,05	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,88	4,82	4,77	4,74	4,70	4,68	4,62	4,56	4,53	4,50	4,46	4,43	4,40	4,36
	0,01	16,26	13,27	12,06	11,39	10,97	10,67	10,46	10,29	10,16	10,05	9,96	9,89	9,72	9,55	9,47	9,38	9,29	9,20	9,11	9,02
6	0,10	3,78	3,46	3,29	3,18	3,11	3,05	3,01	2,98	2,96	2,94	2,92	2,90	2,87	2,84	2,82	2,80	2,78	2,76	2,74	2,72
	0,05	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,21	4,15	4,10	4,06	4,03	4,00	3,94	3,87	3,84	3,81	3,77	3,74	3,70	3,67
	0,01	13,75	10,92	9,78	9,15	8,75	8,47	8,26	8,10	7,98	7,87	7,79	7,72	7,56	7,40	7,31	7,23	7,14	7,06	6,97	6,88
7	0,10	3,59	3,26	3,07	2,96	2,88	2,83	2,78	2,75	2,72	2,70	2,68	2,67	2,63	2,59	2,58	2,56	2,54	2,51	2,49	2,47
	0,05	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,79	3,73	3,68	3,64	3,60	3,57	3,51	3,44	3,41	3,38	3,34	3,30	3,27	3,23
	0,01	12,25	9,55	8,45	7,85	7,46	7,19	6,99	6,84	6,72	6,62	6,54	6,47	6,31	6,16	6,07	5,99	5,91	5,82	5,74	5,65
8	0,10	3,46	3,11	2,92	2,81	2,73	2,67	2,62	2,59	2,56	2,54	2,52	2,50	2,46	2,42	2,40	2,38	2,36	2,34	2,32	2,29
	0,05	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,50	3,44	3,39	3,35	3,31	3,28	3,22	3,15	3,12	3,08	3,04	3,01	2,97	2,93
	0,01	11,26	8,65	7,59	7,01	6,63	6,37	6,18	6,03	5,91	5,81	5,73	5,67	5,52	5,36	5,28	5,20	5,12	5,03	4,95	4,86
9	0,10	3,36	3,01	2,81	2,69	2,61	2,55	2,51	2,47	2,44	2,42	2,40	2,38	2,34	2,30	2,28	2,25	2,23	2,21	2,18	2,16
	0,05	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,29	3,23	3,18	3,14	3,10	3,07	3,01	2,94	2,90	2,86	2,83	2,79	2,75	2,71
	0,01	10,56	8,02	6,99	6,42	6,06	5,80	5,61	5,47	5,35	5,26	5,18	5,11	4,96	4,81	4,73	4,65	4,57	4,48	4,40	4,31



**Phụ lục 2 (tiếp theo)**

$k_2$	$\alpha$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	$k_1$ 10	11	12	15	20	24	30	40	60	120	$\infty$
10	0,10	3,29	2,92	2,73	2,61	2,52	2,46	2,41	2,38	2,35	2,32	2,30	2,28	2,24	2,20	2,18	2,16	2,13	2,11	2,08	2,06
	0,05	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,14	3,07	3,02	2,98	2,94	2,91	2,85	2,77	2,74	2,70	2,66	2,62	2,58	2,54
	0,01	10,04	7,56	6,55	5,99	5,64	5,39	5,20	5,06	4,94	4,85	4,77	4,71	4,56	4,41	4,33	4,25	4,17	4,08	4,00	3,91
11	0,10	3,23	2,86	2,66	2,54	2,45	2,39	2,34	2,30	2,27	2,25	2,23	2,21	2,17	2,12	2,10	2,08	2,05	2,03	2,00	1,97
	0,05	4,84	3,98	3,59	3,36	3,20	3,09	3,01	2,95	2,90	2,85	2,82	2,79	2,72	2,65	2,61	2,57	2,53	2,49	2,45	2,40
	0,01	9,65	7,21	6,22	5,67	5,32	5,07	4,89	4,74	4,63	4,54	4,46	4,40	4,25	4,10	4,02	3,94	3,86	3,78	3,69	3,60
12	0,10	3,18	2,81	2,61	2,48	2,39	2,33	2,28	2,24	2,21	2,19	2,17	2,15	2,10	2,06	2,04	2,01	1,99	1,96	1,93	1,90
	0,05	4,75	3,89	3,49	3,26	3,11	3,00	2,91	2,85	2,80	2,75	2,72	2,69	2,62	2,54	2,51	2,47	2,43	2,38	2,34	2,30
	0,01	9,33	6,93	5,95	5,41	5,06	4,82	4,64	4,50	4,39	4,30	4,22	4,16	4,01	3,86	3,78	3,70	3,62	3,54	3,45	3,36
15	0,10	3,07	2,70	2,49	2,36	2,27	2,21	2,16	2,12	2,09	2,06	2,04	2,02	1,97	1,92	1,90	1,87	1,85	1,82	1,79	1,76
	0,05	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,71	2,64	2,59	2,54	2,51	2,48	2,40	2,33	2,29	2,25	2,20	2,16	2,11	2,07
	0,01	8,68	6,36	5,42	4,89	4,56	4,32	4,14	4,00	3,89	3,80	3,73	3,67	3,52	3,37	3,29	3,21	3,13	3,05	2,96	2,87
20	0,10	2,97	2,59	2,38	2,25	2,16	2,09	2,04	2,00	1,96	1,94	1,91	1,89	1,84	1,79	1,77	1,74	1,71	1,68	1,64	1,61
	0,05	4,35	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,51	2,45	2,39	2,35	2,31	2,28	2,20	2,12	2,08	2,04	1,99	1,95	1,90	1,84
	0,01	8,10	5,85	4,94	4,43	4,10	3,87	3,70	3,56	3,46	3,37	3,29	3,23	3,09	2,94	2,86	2,78	2,69	2,61	2,52	2,42
24	0,10	2,93	2,54	2,33	2,19	2,10	2,04	1,98	1,94	1,91	1,88	1,85	1,83	1,78	1,73	1,70	1,67	1,64	1,61	1,57	1,53
	0,05	4,26	3,40	3,01	2,78	2,62	2,51	2,42	2,36	2,30	2,25	2,22	2,18	2,11	2,03	1,98	1,94	1,89	1,84	1,79	1,73
	0,01	7,82	5,61	4,72	4,22	3,90	3,67	3,50	3,36	3,26	3,17	3,09	3,03	2,89	2,74	2,66	2,58	2,49	2,40	2,31	2,21
30	0,10	2,88	2,49	2,28	2,14	2,05	1,98	1,93	1,88	1,85	1,82	1,79	1,77	1,72	1,67	1,64	1,61	1,57	1,54	1,50	1,46
	0,05	4,17	3,32	2,92	2,69	2,53	2,42	2,33	2,27	2,21	2,16	2,13	2,09	2,01	1,93	1,89	1,84	1,79	1,74	1,68	1,62
	0,01	7,56	5,39	4,51	4,02	3,70	3,47	3,30	3,17	3,07	2,98	2,91	2,84	2,70	2,55	2,47	2,39	2,30	2,21	2,11	2,01
40	0,10	2,84	2,44	2,23	2,09	2,00	1,93	1,87	1,83	1,79	1,76	1,74	1,71	1,66	1,61	1,57	1,54	1,51	1,47	1,42	1,38
	0,05	4,08	3,23	2,84	2,61	2,45	2,34	2,25	2,18	2,12	2,08	2,04	2,00	1,92	1,84	1,79	1,74	1,69	1,64	1,58	1,51
	0,01	7,31	5,18	4,31	3,83	3,51	3,29	3,12	2,99	2,89	2,80	2,73	2,66	2,52	2,37	2,29	2,20	2,11	2,02	1,92	1,80
60	0,10	2,79	2,39	2,18	2,04	1,95	1,87	1,82	1,77	1,74	1,71	1,68	1,66	1,60	1,54	1,51	1,48	1,44	1,40	1,35	1,29
	0,05	4,00	3,15	2,76	2,53	2,37	2,25	2,17	2,10	2,04	1,99	1,95	1,92	1,84	1,75	1,70	1,65	1,59	1,53	1,47	1,39
	0,01	7,08	4,98	4,13	3,65	3,34	3,12	2,95	2,82	2,72	2,63	2,56	2,50	2,35	2,20	2,12	2,03	1,94	1,84	1,73	1,60
120	0,10	2,75	2,35	2,13	1,99	1,90	1,82	1,77	1,72	1,68	1,65	1,63	1,60	1,55	1,48	1,45	1,41	1,37	1,32	1,26	1,19
	0,05	3,92	3,07	2,68	2,45	2,29	2,18	2,09	2,02	1,96	1,91	1,87	1,83	1,75	1,66	1,61	1,55	1,50	1,43	1,35	1,25
	0,01	6,85	4,79	3,95	3,48	3,17	2,96	2,79	2,66	2,56	2,47	2,40	2,34	2,19	2,03	1,95	1,86	1,76	1,66	1,53	1,38
$\infty$	0,10	2,71	2,30	2,08	1,94	1,85	1,77	1,72	1,67	1,63	1,60	1,57	1,55	1,49	1,42	1,38	1,34	1,30	1,24	1,17	1,00
	0,05	3,84	3,00	2,60	2,37	2,21	2,10	2,01	1,94	1,88	1,83	1,79	1,75	1,67	1,57	1,52	1,46	1,39	1,32	1,22	1,00
	0,01	6,63	4,61	3,78	3,32	3,02	2,80	2,64	2,51	2,41	2,32	2,25	2,18	2,04	1,88	1,79	1,70	1,59	1,47	1,32	1,00

### Phụ lục 3: Lựa chọn đối tượng mẫu để thẩm định phương pháp vi sinh

[illegible]

lạnh														
Hun khói			X		X	X					X	X	X	
Khác														
<b>Sản phẩm từ rau quả</b>														
Tươi sống	X		X	X			X	X			X	X	X	
Chế biến												X	X	
Đông lạnh												X	X	
Khô									X	X		X	X	
Lên men										X				
Ướp										X				
Nước ép										X	X			
Độ ẩm thấp				X				X		X				
Khác														

**Phụ lục 3 (tiếp)**

Sản phẩm	Yersinia spp.	Cl. Perfringens	L. monocytogenes	E. coli O157 & VTEC	Staph. aureus	S.aureus enterotoxins	Campylobacter spp.	Salmonella spp.	Bacillus cereus	Men mocc	VK Lactic	Tổng khuẩn lạc	Coliforms	E. coli
<b>Ngũ cốc và sản phẩm</b>														
Tươi sống	X		X	X	X	X	X	X	X			X	X	X
Chế biến									X			X	X	
Đông lạnh			X	X	X	X		X	X			X	X	
Lên men			X	X	X	X		X		X				X
Khô					X	X		X	X			X	X	X
Khác														
<b>Sản phẩm chocola và bánh mỳ</b>														
Độ ẩm thấp								X		X		X	X	
Khô								X				X	X	
Khác									Trứng sữa					
<b>Sản phẩm khác</b>														
Bia										X				
Nước sốt										X	X			
Gia vị		X						X						
Mayonnaise								X		X	X			
Mỳ														
Trứng								X						
Gạo														
Thức ăn chăn nuôi								X		X			X	

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ludwig Huber (2007), *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*, Informa Healthcare, London.
2. TCVN ISO/IEC 17025:2005, *Yêu cầu chung về năng lực của phòng thử nghiệm và hiệu chuẩn*.
3. AOAC International (2007), *How to meet ISO 17025 requirements for method verification*, USA.
4. Văn phòng công nhận chất lượng (2010), *Yêu cầu bổ sung để công nhận các phòng thử nghiệm lĩnh vực Hóa (AGL3)*.
5. Hewlett Packard (HP) (1993), *Peak purity analysis in HPLC and CE using diode-array technology*, Germany.
6. ICH (1996), *Validation of Analytical Procedures: Text and methodology*, ICH Harmonised Tripartite Guideline.
7. Eurachem (1998), *The fitness for purpose of Analytical methods – A laboratory guide for method validation and related topics*, Eurachem guide.
8. Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (2009), *Protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie (DR 12 VMC)*, Canada.
9. Elison S. L. R. & al. (2000), *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, 2 edition, Eurachem/Citac Guide.

10. Standards Council of Canada (2009), *PALCAN Interpretation and Guidance on the Estimation of Uncertainty of Measurement in Testing (APLAC TC 005)*, Canada.
11. Tạ Thị Thảo, *Thống kê trong hóa phân tích*, Giáo trình Trường Đại học Khoa học Tự nhiên.
12. National Public Health Service for Wales (2005), *Uncertainty of Measurement in Testing*.
13. European Communities (2002), *The performance of Analytical Methods and interpretation of results*, (2002-657-EC)
14. SANCO (2007), 3131, *Method validation and quality control procedure for pesticide residues analysis in food and feed*, SANCO 2007/3131.
15. Singapore Accreditation Council (2002), *Method Validation for Microbiological methods*, Guidance Note.
16. ISO 16140 (2003), *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods*.

VIỆN KIỂM NGHIỆM AN TOÀN VỆ SINH THỰC PHẨM QUỐC GIA

# THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP TRONG PHÂN TÍCH HÓA HỌC VÀ VI SINH VẬT

Chịu trách nhiệm xuất bản:	<b>TS. Phạm Văn Diễn</b>
Biên tập:	Nguyễn Kim Dung
Trình bày bìa:	Trịnh Thị Thùy Dương

NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT  
70-TRẦN HƯNG ĐẠO - HÀ NỘI

---

In 1000 cuốn khổ 16x24cm tại

Số đăng ký KHXB số 215-2010/CXB/54.1-17/KHKT, ngày 05/3/2010.

Quyết định XB số 182/QĐXB-NXBKHKT ngày 13 tháng 8 năm 2010.

In xong và nộp lưu chiểu tháng 8 năm 2010.