

## แผนการเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ

### ด้านวัตถุอันตราย ประจำปี 2568

#### 1. วัตถุประสงค์

เพื่อประเมินความสามารถการทดสอบคุณภาพและประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายของห้องปฏิบัติการ ซึ่งเป็นกระบวนการควบคุมคุณภาพการทดสอบภายนอก เพื่อสร้างความมั่นใจในความใช้ได้ของผลทดสอบในการดำเนินการของห้องปฏิบัติการทดสอบตามที่กำหนดไว้ในมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2017 ข้อ 7.7.2 (ข) ที่สามารถประเมินจากการเปรียบเทียบผลทดสอบของห้องปฏิบัติการตั้งแต่ 2 แห่งขึ้นไป โดยใช้ตัวอย่างที่มีความเป็นเนื้อเดียวกัน และมีความคงสภาพ ภายใต้เงื่อนไขที่ได้ตกลงไว้ก่อน

#### 2. ห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมทดสอบ

ห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองระบบบริหารงานคุณภาพ ISO/IEC 17025 ตั้งแต่ 2 ห้องปฏิบัติการขึ้นไป โดยกรอกข้อมูลในแบบตอบรับกิจกรรมการเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการด้านวัตถุอันตราย ประจำปี 2568 ผ่านทางหนังสือตอบรับบนเว็บไซต์ [www.qcontrol.dld.go.th](http://www.qcontrol.dld.go.th)

#### 3. ผู้ประสานงาน

1) นายชูศักดิ์ อาจสูงเนิน ตำแหน่งนายสัตวแพทย์ชำนาญการพิเศษ

2) นางจุฑามาศ ประภาพรณพงศ์ ตำแหน่งนายสัตวแพทย์ชำนาญการ

3) นางสาววราภรณ์ ภูนาเหนือ ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์การแพทย์

สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์

โทรศัพท์ 0 2967 9700 ต่อ 2117

E-mail: [hsvdhd.ilc@gmail.com](mailto:hsvdhd.ilc@gmail.com)

#### 4. ชนิดตัวอย่างทดสอบและการเตรียมตัวอย่าง แบ่งเป็น 7 รายการ ดังนี้

1) ตัวอย่าง glutaraldehyde (รหัส ILC-68-01-XX)

เป็นผลิตภัณฑ์ของเหลว บรรจุในขวดพลาสติกทรงกลมทึบแสงสีขาว ปิดสนิทด้วยฝาเกลียวทึบแสงสีดำ พันทับด้วยพาราฟิล์ม ปริมาตรขวดละ 50 มิลลิลิตร

2) ตัวอย่าง formaldehyde (รหัส ILC-68-02-XX)

เป็นผลิตภัณฑ์ของเหลว บรรจุในขวดพลาสติกทรงกลมทึบแสงสีขาว ปิดสนิทด้วยฝาเกลียวทึบแสงสีดำ พันทับด้วยพาราฟิล์ม ปริมาตรขวดละ 50 มิลลิลิตร

3) ตัวอย่าง glyoxal (รหัส ILC-68-03-XX)

เป็นผลิตภัณฑ์ของเหลว บรรจุในขวดพลาสติกทรงกลมทึบแสงสีขาว ปิดสนิทด้วยฝาเกลียวทึบแสงสีดำ พันทับด้วยพาราฟิล์ม ปริมาตรขวดละ 50 มิลลิลิตร

4) ตัวอย่าง available chlorine (รหัส ILC-68-04-XX)

เป็นผลิตภัณฑ์ของเหลว บรรจุในขวดพลาสติกทรงกลมทึบแสงสีขาว ปิดสนิทด้วยฝาเกลียวทึบแสงสีดำ พันทับด้วยพาราฟิล์ม ปริมาตรขวดละ 50 มิลลิลิตร

5) ตัวอย่าง available iodine (รหัส ILC-68-05-XX)

เป็นผลิตภัณฑ์ของเหลวขุ่นหนืดสีน้ำตาล บรรจุในขวดแก้วทึบแสงสีน้ำตาล ปิดสนิทด้วยฝาเกลียวทึบแสงสีดำ พันหับด้วยพาราฟิล์ม ปริมาตรขวดละ 50 มิลลิลิตร

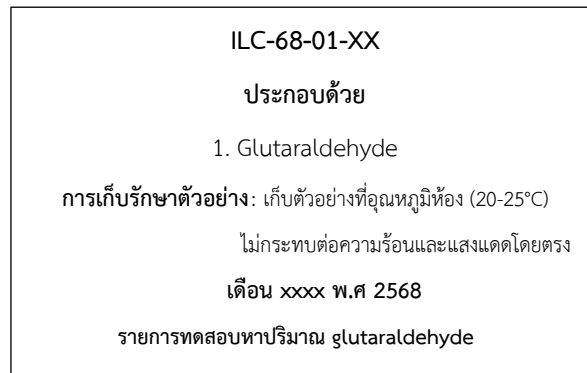
6) ตัวอย่าง quaternary ammonium compounds (รหัส ILC-68-06-XX)

เป็นผลิตภัณฑ์ของเหลว บรรจุในขวดพลาสติกทรงกลมทึบแสงสีขาว ปิดสนิทด้วยฝาเกลียวทึบแสงสีดำ พันหับด้วยพาราฟิล์ม ปริมาตรขวดละ 50 มิลลิลิตร

7) ตัวอย่างทดสอบประสิทธิภาพตัวอย่างวัตถุอันตรายด้วยวิธี use-dilution (รหัส ILC-68-07-XX)

เป็นผลิตภัณฑ์ของเหลว บรรจุในขวดพลาสติกทรงกลมทึบแสงสีขาว ปิดสนิทด้วยฝาเกลียวทึบแสงสีดำ พันหับด้วยพาราฟิล์ม ปริมาตรขวดละ 50 มิลลิลิตร

ทุกตัวอย่างมีการติดฉลากระบุรายละเอียด เช่น รหัสตัวอย่าง ส่วนประกอบของตัวอย่าง คำแนะนำในการเก็บรักษา และเดือนที่แบ่งบรรจุ เป็นต้น ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 ตัวอย่างฉลาก

## 5. การเก็บรักษาตัวอย่าง

การเก็บรักษาตัวอย่าง รายการที่ 1, 2, 3, 5, 6 และ 7 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20 – 25 องศาเซลเซียส และตัวอย่างรายการที่ 4 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 – 8 องศาเซลเซียส และทุกตัวอย่างต้องไม่กระทบต่อความร้อนและแสงแดดโดยตรง

## 6. ระยะเวลาดำเนินการ

กิจกรรม	ระยะเวลาดำเนินการ
ส่งหนังสือเชิญสมัครและรับสมัคร	เดือนสิงหาคม 2568
ส่งตัวอย่างทดสอบ	เดือนกันยายน 2568
ส่งผลทดสอบ	เดือนตุลาคม 2568
ส่งรายงานฉบับร่าง	เดือนพฤศจิกายน 2568
ส่งรายงานฉบับสมบูรณ์	เดือนธันวาคม 2568

## 7. การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน

การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้เกณฑ์ความเหมาะสมของตัวอย่างสำหรับการเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ ตามมาตรฐาน ISO 13528: 2015 (ข้อ 6.1 และ Annex B: homogeneity and stability of proficiency test items)

- 7.1 เตรียมตัวอย่างให้เข้ากันดี แบ่งบรรจุลงภาชนะขนาด 50 มิลลิลิตร ปิดฉลากระบุหมายเลขตัวอย่าง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง (20 – 25 องศาเซลเซียส) แล้วชักตัวอย่างแบบสุ่มโดยใช้ <https://www.random.org> จำนวน 10 ตัวอย่าง เพื่อทดสอบหาปริมาณสารสำคัญทุกรายการ ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ
- 7.2 นำผลทดสอบปริมาณสารสำคัญมาหา outlier ใช้วิธี Cochran's test ตามมาตรฐาน ISO 13528: 2015 (ข้อ 6.6 และ Annex B: homogeneity and stability of proficiency test items) โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel® ค่า  $C_{cal} < C_{95\%}$  ถือว่าไม่มี outlier โดยมีค่า  $C_{95\%}$  ที่  $n = 10$  คือ 0.602 การคำนวณค่า  $C_{cal}$  มีดังนี้

$$C_{cal} = \frac{D^2 \max}{\sum D_i^2}$$

$D_i$  = ผลต่างระหว่างซ้ำ ที่  $i = 1, 2, 3, \dots, 10$

$D_{max}$  = ผลต่างระหว่างซ้ำที่มากที่สุด

- 7.3 หากคำนวณ outlier ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % แล้วพบ outlier ให้คำนวณต่อที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % โดยมีค่า  $C_{99\%}$  ที่  $n = 10$  คือ 0.718 ถ้ามี outlier อีกให้ตัดค่านั้นออก ตามมาตรฐาน ISO 13528: 2015 (ข้อ 6.6.2 Note 2)
- 7.4 จากการเปรียบเทียบค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานระหว่างตัวอย่าง ( $S_s$ ) กับค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเป้าหมาย (SDPA) ซึ่งต้องได้น้อยกว่าหรือเท่ากับ  $0.3SDPA$  ดังสมการ

$$S_s \leq 0.3SDPA$$

$S_s$  = The between-sample standard deviation

SDPA = ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเป้าหมาย

การหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานคำนวณจาก pooled SD as RSD

$$SDPA = (RSD \times \text{ค่ากำหนด}) / 100$$

เมื่อ RSD คือ Target standard deviation as RSD คำนวณจากค่า RSD ของการ

เปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการปีก่อน แล้วนำมาคำนวณ

ด้วย Algorithm S

คำนวณหาค่า  $S_s$  จากสมการ

$$S_s = \sqrt{\frac{(MSB - MSW)}{2}}$$

โดยค่า MSB คือ mean square between groups และค่า MSW คือ mean square within groups ได้จากการคำนวณโดยใช้สถิติ ANOVA: Single Factor ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel® ที่ระดับนัยสำคัญ 95 % กรณี  $S_s > 0.3SDPA$  ให้คำนวณค่า  $c = F_1 \sigma^2_{allow} + F_2 s_w^2$  โดยที่ ค่า  $\sigma^2_{allow} = (0.3SDPA)^2$ ,  $F_1 = 1.88$ ,  $F_2 = 1.01$

เกณฑ์การยอมรับคือ  $S_s \leq \sqrt{c}$  (ISO 13528: 2015. Annex B: homogeneity and stability of proficiency test items. ข้อ B.2.3) กรณีผลการทดสอบของตัวอย่างรายการใดไม่มีความเป็นเนื้อเดียวกัน จะไม่ประเมินผลการทดสอบของรายการตัวอย่างนั้น

## 8. การทดสอบความคงสภาพ

8.1 ชักตัวอย่างแบบสุ่ม โดยใช้ <https://www.random.org> โดยทดสอบตัวอย่าง ตั้งแต่

- ก่อนส่งตัวอย่าง
- ระหว่างส่งตัวอย่าง ส่งตัวอย่างให้ห้องปฏิบัติการที่ใช้เวลาขนส่งตัวอย่างนาน เพิ่มจากตัวอย่างปกติ 2 ตัวอย่าง/รายการทดสอบ เพื่อนำกลับมาทดสอบความคงสภาพระหว่างขนส่ง
- หลังส่งผลทดสอบ

8.2 ทดสอบตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ตามมาตรฐาน ISO 13528: 2015 Annex B: homogeneity and stability of proficiency test items เกณฑ์การยอมรับ กำหนดว่า

$$|\bar{y}_1 - \bar{y}_2| \leq 0.3SDPA$$

ซึ่ง  $\bar{y}_1$  = ค่าเฉลี่ยของชุดข้อมูลที่ได้จากการทดสอบหาความเป็นเนื้อเดียวกัน  
 $\bar{y}_2$  = ค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่ได้จากการทดสอบความคงสภาพ  
SDPA = ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเป้าหมาย

กรณี  $|\bar{y}_1 - \bar{y}_2| > 0.3SDPA$  ใช้เกณฑ์การประเมินดังนี้

$$|\bar{y}_1 - \bar{y}_2| \leq 0.3SDPA + 2\sqrt{u^2\bar{y}_1 + u^2\bar{y}_2}$$

เมื่อ  $u$  = standard uncertainty

หากผลการทดสอบของรายการตัวอย่างใด ความคงสภาพไม่ผ่านเกณฑ์ที่กำหนด จะไม่ประเมินผลการทดสอบของตัวอย่างนั้น

## 9. การหาค่ากำหนด (assigned value)

ตาม ISO 13825: 2015 หากไม่สามารถทำได้จะใช้ค่าเฉลี่ยของผลทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันเป็นค่ากำหนด (assigned value,  $x$ )

## 10. การตอบรับตัวอย่างทดสอบ

เมื่อได้รับตัวอย่างแล้วกรุณาตรวจสอบตัวอย่างการเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ หากข้อมูลและเอกสารไม่ถูกต้องหรือมีสภาพไม่สมบูรณ์ ให้ระบุในแบบบันทึกการรับตัวอย่าง และแจ้งกลับภายใน 2 วัน หลังจากได้รับตัวอย่าง ทาง E-mail: [hsvdhd.ilc@gmail.com](mailto:hsvdhd.ilc@gmail.com)

## 11. การทดสอบตัวอย่าง

ห้องปฏิบัติการดำเนินการทดสอบตัวอย่างการเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการเช่นเดียวกับตัวอย่างปกติที่ห้องปฏิบัติการใช้ทดสอบเป็นงานประจำ กรณีมีหลักการทดสอบแบบเดียวกับเอกสารแนบท้ายนี้ หรือใช้วิธีทดสอบตามเอกสารแนบนี้

- 1) รหัสวิธีทดสอบ ILC-68-TEST-01 การทดสอบหาปริมาณ glutaraldehyde และ formaldehyde ในตัวอย่างวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ โดยเทคนิค UHPLC-DAD หรือ HPLC-DAD
- 2) รหัสวิธีทดสอบ ILC-68-TEST-02 การทดสอบหาปริมาณ glyoxal ในตัวอย่างวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ โดยเทคนิค UHPLC-DAD หรือ HPLC-DAD
- 3) รหัสวิธีทดสอบ ILC-68-TEST-03 การทดสอบหาปริมาณ available chlorine ในตัวอย่างวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ โดยเทคนิค potentiometric titration
- 4) รหัสวิธีทดสอบ ILC-68-TEST-04 การทดสอบหาปริมาณ available iodine ในตัวอย่างวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ โดยเทคนิค potentiometric titration
- 5) รหัสวิธีทดสอบ ILC-68-TEST-05 การทดสอบหาปริมาณ quaternary ammonium compounds ในตัวอย่างวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ โดยเทคนิค potentiometric titration
- 6) รหัสวิธีทดสอบ ILC-68-TEST-06 การทดสอบประสิทธิภาพตัวอย่างวัตถุอันตราย ด้วยวิธี use-dilution (AOAC 955.14, AOAC 955.15, AOAC 964.02)

## 12. การส่งรายงานผลการทดสอบ

### 12.1 ภายในวันที่ 24 ตุลาคม 2568 ส่งแบบบันทึกผลการทดสอบ

- รายงานผลการทดสอบเป็นทศนิยม 3 ตำแหน่ง พร้อมค่าความไม่แน่นอนของการวัดที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ถ้ามี)
- รายงานผลทดสอบเป็นจำนวนหลอดทดสอบที่ฆ่าเชื้อได้/จำนวนหลอดที่ทดสอบทั้งหมด (Negative/total)
- รายงานผลการทดสอบฉบับจริงพร้อมข้อมูลประกอบของการทดสอบ เช่น โครมาโทแกรม กราฟการไทเทรต หรือข้อมูลสารมาตรฐาน E-mail: hsvdhd.ilc@gmail.com หรือทางไปรษณีย์
- รายงานผลที่ได้รับหลังวันที่ 24 ตุลาคม 2568 ผลการทดสอบนั้นจะไม่ได้รับการประเมิน

### ส่งไปรษณีย์ที่

นายชูศักดิ์ อัจสูงเนิน

รักษาราชการแทน หัวหน้ากลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์

91 หมู่ 4 ถนนติวานนท์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000

## 13. การประเมินผล

การประเมินผลทดสอบหาปริมาณสารสำคัญ รหัสวิธีทดสอบ ILC-68-TEST-01, ILC-68-TEST-02, ILC-68-TEST-03, ILC-68-TEST-04 และ ILC-68-TEST-05

ก่อนการประเมินผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการคำนวณหา outlier ก่อน ตามวิธี Cochran's test (ISO 13528: 2015 ข้อ 6.6 และ Annex B: homogeneity and stability of proficiency test items) จากนั้นนำผลทดสอบของห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมการทดสอบมาวิเคราะห์ผลโดยใช้เกณฑ์ ดังนี้

- กรณีมีห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมการทดสอบจำนวน 2 ห้องปฏิบัติการ นำผลทดสอบมาวิเคราะห์ผลโดยใช้สถิติ t ที่ระดับนัยสำคัญ 95% หรือใช้เกณฑ์ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์รวม (pooled SD as RSD)

จากข้อมูลการเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการปี 2559, 2560, 2561, 2563, 2565, 2566 และ 2567 มาปรับใช้ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เกณฑ์การเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ

วิธีทดสอบ	เกณฑ์ (% RSD)
ILC-68-TEST-01 (Glutaraldehyde, formaldehyde)	6
ILC-68-TEST-02 (Glyoxal)	6
ILC-68-TEST-03 (Available chlorine)	5
ILC-68-TEST-04 (Available iodine)	5
ILC-68-TEST-05 (Quaternary ammonium compounds)	5

- กรณีมีห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมการทดสอบจำนวน 3 ห้องปฏิบัติการขึ้นไป แต่ไม่เกิน 12 ห้องปฏิบัติการ นำผลทดสอบมาวิเคราะห์ผลโดยใช้สถิติ ANOVA: Single Factor ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel® ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% หรือสถิติที่เหมาะสม
- กรณีมีห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมการทดสอบจำนวนมากกว่า 12 ห้องปฏิบัติการ นำผลทดสอบมาวิเคราะห์ผลโดยใช้ z scores (ISO 13528: 2015 ข้อ 9.4) ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel®

$$z_i = \frac{(x_i - x)}{SDPA}$$

โดย  $x_i$  = ผลทดสอบจากห้องปฏิบัติการสมาชิก  
 $x$  = ค่ากำหนด (ค่าเฉลี่ยที่ได้จาก การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน)  
 SDPA = ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเป้าหมาย

เกณฑ์การพิจารณา

$$|z| \leq 2.0 = \text{ผลอยู่ในเกณฑ์น่าพอใจ}$$

$$2.0 < |z| < 3.0 = \text{ผลอยู่ในเกณฑ์น่าสงสัย}$$

$$|z| \geq 3.0 = \text{ผลอยู่ในเกณฑ์ไม่น่าพอใจ}$$

ในกรณีที่  $u(x) > 0.3SDPA$  การประเมินผลการทดสอบใช้ค่า z' scores

$$z'_i = \frac{(x_i - x)}{\sqrt{SDPA_x^2 + u^2(x)}}$$

โดย  $x_i$  = ผลทดสอบจากห้องปฏิบัติการสมาชิก  
 $x$  = ค่ากำหนด (ค่าเฉลี่ยที่ได้จาก การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน)  
 $u(x)$  = ค่าความไม่แน่นอนของค่ากำหนด  
 SDPA = ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเป้าหมาย

โดยค่า  $u(x)$  คำนวณจากการประมาณค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของค่ากำหนดตาม Eurachem/CITAC Guide CG4 Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement 2012

เกณฑ์การพิจารณา

$|z'| \leq 2.0$  = ผลอยู่ในเกณฑ์น่าพอใจ

$2.0 < |z'| < 3.0$  = ผลอยู่ในเกณฑ์น่าสงสัย

$|z'| \geq 3.0$  = ผลอยู่ในเกณฑ์ไม่น่าพอใจ

- การประเมินผลทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อ รหัสวิธีทดสอบ ILC-68-TEST-06

พิจารณาจากความสอดคล้องของผลทดสอบแต่ละห้องปฏิบัติการ เมื่อทดสอบตามอัตราส่วนที่ระบุในฉลากต้องฆ่าเชื้อตามที่ระบุได้ไม่น้อยกว่า 59 carriers จาก 60 carriers

#### 14. รายงานการเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ จัดส่งรายงานการเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการฉบับร่างให้ห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมการทดสอบ ภายในเดือนพฤศจิกายน 2568 และจัดส่งรายงานการเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการฉบับสมบูรณ์ให้ห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมการทดสอบ ภายในเดือนธันวาคม 2568 ทางไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ โดยรายงานจะประกอบไปด้วยรายละเอียดของตัวอย่างการเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ ข้อมูลผลทดสอบ และผลการประเมิน โดยไม่เปิดเผยชื่อห้องปฏิบัติการ

แบบตอบรับกิจกรรมการเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ  
ด้านวัตถุอันตราย ประจำปี 2568

ชื่อ..... ตำแหน่ง.....  
เป็นตัวแทนของห้องปฏิบัติการ (หน่วยงาน).....  
ที่อยู่.....

มีความประสงค์เข้าร่วมการเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการด้านวัตถุอันตราย กับห้องปฏิบัติการกลุ่ม  
ตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์ และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์  
รายการทดสอบ ดังต่อไปนี้

- รายการ glutaraldehyde และ formaldehyde (ILC-68-TEST-01)
- รายการ glyoxal (ILC-68-TEST-02)
- รายการ available chlorine (ILC-68-TEST-03)
- รายการ available iodine (ILC-68-TEST-04)
- รายการ quaternary ammonium compounds (ILC-68-TEST-05)
- รายการ ทดสอบประสิทธิภาพตัวอย่างวัตถุอันตราย ด้วยวิธี use-dilution (ILC-68-TEST-06)

ลงชื่อ.....ผู้ประสานงาน

(.....)

วันที่.....

โทรศัพท์.....

หมายเหตุ: โปรดกรอกรายละเอียดและส่งคืนทาง Email: hsvdhd.ilc@gmail.com

## แบบบันทึกการรับตัวอย่าง

เมื่อท่านได้รับตัวอย่างแล้วกรุณาตรวจสอบตัวอย่างการเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ หากข้อมูลและเอกสารไม่ถูกต้องหรือมีสภาพไม่สมบูรณ์ ให้ระบุในแบบบันทึกการรับตัวอย่าง และแจ้งกลับภายใน 2 วัน หลังจากได้รับตัวอย่าง ทาง E-mail: hsvdhd.ilc@gmail.com

ชื่อห้องปฏิบัติการ.....

รหัสห้องปฏิบัติการ.....

### สภาพโดยทั่วไปของตัวอย่างที่ได้รับ

ภาชนะบรรจุ  ปกติ (ขวดปิดสนิทไม่รั่วซึม และมีฉลากปิดที่ชัดเจน)

ตัวอย่าง glutaraldehyde หมายเลขตัวอย่าง.....

ตัวอย่าง formaldehyde หมายเลขตัวอย่าง.....

ตัวอย่าง glyoxal หมายเลขตัวอย่าง.....

ตัวอย่าง available chlorine หมายเลขตัวอย่าง.....

ตัวอย่าง available iodine หมายเลขตัวอย่าง.....

ตัวอย่าง quaternary ammonium compounds หมายเลขตัวอย่าง.....

ตัวอย่างทดสอบประสิทธิภาพ ด้วยวิธี use-dilution หมายเลขตัวอย่าง.....

ไม่ปกติ (โปรดระบุสภาพที่พบ).....

### เอกสารที่ได้รับ

1. แผนการเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ

ด้านวัตถุอันตราย

ได้

ไม่ได้

2. แบบแจ้งรหัสของห้องปฏิบัติการ

ได้

ไม่ได้

3. แบบบันทึกการรับตัวอย่าง

ได้

ไม่ได้

ลงชื่อ.....ผู้ประสานงาน

(.....)

ตำแหน่ง.....

วันที่.....

โทรศัพท์.....

# แบบบันทึกผลการทดสอบ

## แบบบันทึกผลการทดสอบ

### การเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการรายการวิเคราะห์หาปริมาณ glutaraldehyde และ formaldehyde ในตัวอย่างวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์

ชื่อห้องปฏิบัติการ.....รหัสห้องปฏิบัติการ.....

หมายเลขตัวอย่าง..... สภาพตัวอย่าง  ปกติ  ไม่ปกติ.....

วันที่รับตัวอย่าง.....วันที่ทดสอบ.....

วิธีทดสอบ  ILC-68-TEST-01 ( Test method 1  Test method 2)

วิธีตามห้องปฏิบัติการ (ระบุวิธีมาตรฐาน).....

วิธีทดสอบได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO 17025  ได้รับ  ไม่ได้รับ

#### 1. ผลการทดสอบ (W/W, W/V)

Determinations	Glutaraldehyde (%) *		Formaldehyde (%) *
	Main peak	Total peak	
1			
2			
3			
Mean			
RPD/RSD (%)			
Measurement uncertainty**			
Recovery (%)			

\*รายงานผลการทดสอบเป็นทศนิยม 3 ตำแหน่ง \*\* ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ถ้ามี)

#### 2. System suitability test (แนวตัวอย่าง chromatogram)

Analyte	RSD (%) of peak area
Glutaraldehyde: จำนวน พีค	
Formaldehyde	

#### 3. สภาวะการทดสอบ

Instrument  HPLC  UPLC / UHPLC  Other.....

Detector  UV - Vis Detector  DAD / PDA  Other.....

HPLC column (brand, dimension, particle size S/N) .....

Chromatographic condition (กรณีแตกต่างจาก Test method 1 หรือ Test method 2)

Flow rate (mL/min): .....

Detection wavelength (nm): .....

Injection volume (µL): .....

Elution profile  Isocratic  Gradient Run time (min): .....

Standard.....source.....grade.....Lot no.....purity.....Expiry Date.....

Standard.....source.....grade.....Lot no.....purity.....Expiry Date.....

หมายเหตุ/ข้อเสนอแนะ.....

ผู้รายงาน..... ตำแหน่ง.....

วันที่..... E-mail: .....

กรุณาส่ง นายชูศักดิ์ อาจสูงเนิน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์

91 หมู่ 4 ถนนติวานนท์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000

โทรศัพท์ 0-2967-9700 ต่อ 2117, E-mail: [hsvdhd.ilc@gmail.com](mailto:hsvdhd.ilc@gmail.com)

## แบบบันทึกผลการทดสอบ

### การทดสอบหาปริมาณ glyoxal ในตัวอย่างวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์

ชื่อห้องปฏิบัติการ.....รหัสห้องปฏิบัติการ.....

หมายเลขตัวอย่าง..... สภาพตัวอย่าง  ปกติ  ไม่ปกติ.....

วันที่รับตัวอย่าง.....วันที่ทดสอบ.....

วิธีทดสอบ  ILC-68-TEST-02 ( Test method 1  Test method 2)

วิธีตามห้องปฏิบัติการ (ระบุวิธีมาตรฐาน).....

วิธีทดสอบได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO 17025  ได้รับ  ไม่ได้รับ

#### 1. ผลการทดสอบ (W/W, W/V)

Determinations	Glyoxal (%) *
1	
2	
3	
Mean	
RPD/RSD (%)	
Measurement uncertainty**	
Recovery (%)	

\*รายงานผลการทดสอบเป็นทศนิยม 3 ตำแหน่ง \*\* ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ถ้ามี)

#### 2. System suitability test (แนบตัวอย่าง chromatogram)

Analyte	RSD (%) of peak area
Glyoxal	

#### 3. สภาวะการทดสอบ

Instrument  HPLC  UPLC / UHPLC  Other.....

Detector  UV - Vis Detector  DAD / PDA  Other.....

HPLC column (brand, dimension, particle size S/N) .....

Chromatographic condition (กรณีแตกต่างจาก Test method 1 หรือ Test method 2)

Flow rate (mL/min): .....

Detection wavelength (nm): .....

Injection volume (µL): .....

Elution profile  Isocratic  Gradient

Run time (min): .....

Standard.....source.....grade.....Lot no.....purity.....Expiry Date.....

หมายเหตุ/ข้อเสนอแนะ.....

.....

ผู้รายงาน..... ตำแหน่ง.....

วันที่..... E-mail: .....

กรุณาส่ง นายชูศักดิ์ อัจสูงเนิน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์

91 หมู่ 4 ถนนติวานนท์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000

โทรศัพท์ 0-2967-9700 ต่อ 2117, E-mail: [hsvdhd.il@gmail.com](mailto:hsvdhd.il@gmail.com)

**แบบบันทึกผลการทดสอบ**  
**การวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่ม hypochlorite as available chlorine**  
**ในตัวอย่างวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์**

ชื่อห้องปฏิบัติการ.....รหัสห้องปฏิบัติการ.....  
 หมายเลขตัวอย่าง..... สภาพตัวอย่าง  ปกติ  ไม่ปกติ.....  
 วันที่รับตัวอย่าง..... วันที่ทดสอบ.....  
 วิธีทดสอบ  ILC-68-TEST-03  วิธีตามห้องปฏิบัติการ (ระบุวิธีมาตรฐาน).....  
 วิธีทดสอบได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO 17025  ได้รับ  ไม่ได้รับ

**ผลการทดสอบ**

Determinations	% available chlorine* (W/W, W/V)
1	
2	
3	
Mean	
SD	
RSD (%)	
Measurement uncertainty**	
Recovery (%)	
pH ของตัวอย่าง	
pH ของสารละลายหลังเติมกรด	

\* รายงานผลการทดสอบเป็นทศนิยม 3 ตำแหน่ง

\*\* ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ถ้ามี)

Primary standard:.....ยี่ห้อ.....grade.....Lot.....

Titrant concentration.....

หมายเหตุ/ข้อเสนอแนะ.....

.....

ผู้รายงาน.....ตำแหน่ง.....

วันที่..... E-mail: .....

กรุณาส่ง นายชูศักดิ์ อัจสูงเนิน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์

91 หมู่ 4 ถนนติวานนท์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000

โทรศัพท์ 0-2967-9700 ต่อ 2117, E-mail: hsvdhd.ilc@gmail.com

แบบบันทึกผลการทดสอบ

การวิเคราะห์หาปริมาณ available iodine ในตัวอย่างวัตถุดิบด้านารปศุสัตว์

ชื่อห้องปฏิบัติการ.....รหัสห้องปฏิบัติการ.....

หมายเลขตัวอย่าง..... สภาพตัวอย่าง  ปกติ  ไม่ปกติ.....

วันที่รับตัวอย่าง..... วันที่ทดสอบ.....

วิธีทดสอบ  ILC-68-TEST-04  วิธีตามห้องปฏิบัติการ (ระบุวิธีมาตรฐาน).....

วิธีทดสอบได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO 17025  ได้รับ  ไม่ได้รับ

ผลการทดสอบ

Determinations	% available iodine* (W/W, W/V)
1	
2	
3	
Mean	
SD	
RSD (%)	
Measurement uncertainty**	
Recovery (%)	

\* รายงานผลการทดสอบเป็นทศนิยม 3 ตำแหน่ง

\*\* ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ถ้ามี)

Primary standard:.....ยี่ห้อ.....grade.....Lot.....

Titrant concentration.....

หมายเหตุ/ข้อเสนอแนะ.....

.....

ผู้รายงาน.....ตำแหน่ง.....

วันที่..... E-mail: .....

กรุณาส่ง นายชูศักดิ์ อาจสูงเนิน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุดิบด้านารปศุสัตว์

91 หมู่ 4 ถนนติวานนท์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000

โทรศัพท์ 0-2967-9700 ต่อ 2117, E-mail: hsvdhd.ilc@gmail.com

**แบบบันทึกผลการทดสอบ**  
**การวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่ม quaternary ammonium compounds**  
**ในตัวอย่างวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์**

ชื่อห้องปฏิบัติการ.....รหัสห้องปฏิบัติการ.....  
 หมายเลขตัวอย่าง..... สภาพตัวอย่าง  ปกติ  ไม่ปกติ.....  
 วันที่รับตัวอย่าง..... วันที่ทดสอบ.....  
 วิธีทดสอบ  ILC-68-TEST-05  วิธีตามห้องปฏิบัติการ (ระบุวิธีมาตรฐาน).....  
 วิธีทดสอบได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO 17025  ได้รับ  ไม่ได้รับ

**ผลการทดสอบ**

Determinations	% QACs* (W/W, W/V)
1	
2	
3	
Mean	
SD	
RSD (%)	
Measurement uncertainty**	
Recovery (%)	

\* รายงานผลการทดสอบเป็นทศนิยม 3 ตำแหน่ง

\*\* ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ถ้ามี)

Primary standard:.....ยี่ห้อ.....grade.....Lot.....

Titrant concentration.....

หมายเหตุ/ข้อเสนอแนะ.....

.....

.....

ผู้รายงาน.....ตำแหน่ง.....

วันที่..... E-mail: .....

กรุณาส่ง นายชูศักดิ์ อาจสูงเนิน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์

91 หมู่ 4 ถนนติวานนท์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000

โทรศัพท์ 0-2967-9700 ต่อ 2117, E-mail: hsvdhd.ilc@gmail.com

## แบบบันทึกผลการทดสอบ

### การทดสอบประสิทธิภาพตัวอย่างวัตถุอันตรายด้วยวิธี use-dilution

ชื่อห้องปฏิบัติการ.....รหัสห้องปฏิบัติการ.....  
หมายเลขตัวอย่าง..... สภาพตัวอย่าง  ปกติ  ไม่ปกติ.....  
อัตราส่วนที่ใช้ในการทดสอบ.....  
วันที่รับตัวอย่าง..... วันที่ทดสอบ.....  
วิธีทดสอบ  ILC-68-TEST-06  วิธีตามห้องปฏิบัติการ (ระบุวิธีมาตรฐาน).....  
วิธีทดสอบได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO 17025  ได้รับ  ไม่ได้รับ

#### ผลการทดสอบ

รายการทดสอบ	ผลทดสอบ (Negative/Total)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 10708	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	

หมายเหตุ/ข้อเสนอแนะ.....  
.....  
.....

ผู้รายงาน.....ตำแหน่ง.....  
วันที่..... E-mail: .....

กรุณาส่ง นายชูศักดิ์ อาจสูงเนิน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์  
91 หมู่ 4 ถนนติวานนท์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000  
โทรศัพท์ 0-2967-9700 ต่อ 2117, E-mail: hsvdhd.ilc@gmail.com

## วิธีทดสอบ

รายการทดสอบ	รหัสวิธีทดสอบ
1. การทดสอบหาปริมาณ glutaraldehyde และ formaldehyde ในตัวอย่าง วัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ โดยเทคนิค UHPLC-DAD หรือ HPLC-DAD	ILC-68-TEST-01
2. การทดสอบหาปริมาณ glyoxal ในตัวอย่างวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ โดย เทคนิค UHPLC-DAD หรือ HPLC-DAD	ILC-68-TEST-02
3. การทดสอบหาปริมาณ available chlorine ในตัวอย่างวัตถุอันตรายด้าน การปศุสัตว์ โดยเทคนิค potentiometric titration	ILC-68-TEST-03
4. การทดสอบหาปริมาณ available iodine ในตัวอย่างวัตถุอันตรายด้าน การปศุสัตว์ โดยเทคนิค potentiometric titration	ILC-68-TEST-04
5. การทดสอบหาปริมาณ quaternary ammonium compounds ในตัวอย่าง วัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ โดยเทคนิค potentiometric titration	ILC-68-TEST-05
6. การทดสอบประสิทธิภาพตัวอย่างวัตถุอันตราย ด้วยวิธี use-dilution (AOAC 955.14, AOAC 955.15, AOAC 964.02)	ILC-68-TEST-06

การเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการรายการวิเคราะห์หาปริมาณ glutaraldehyde และ formaldehyde ในตัวอย่างวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์

1. สารมาตรฐานและสารเคมี

1.1. สารมาตรฐาน

1.1.1. Glutaraldehyde solution ความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 45% ( $C_5H_8O_2$ ), standard grade

1.1.2. Formaldehyde solution ความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 37% ( $CH_2O$ ), standard grade

1.2. สารเคมี

1.2.1. Acetonitrile ( $CH_3CN$ ), AR grade และ HPLC grade

1.2.2. 2,4-dinitrophenylhydrazine ( $C_6H_6N_4O_4$ , DNPH), AR grade

1.2.3. Ortho – phosphoric acid, AR grade

1.2.4. น้ำบริสุทธิ์ความต้านทานไม่น้อยกว่า 18.2 M $\Omega$ .cm (Deionized water)

2. วิธีการทดสอบ (Test method 1)

2.1. เตรียมสารเคมี

2.1.1. สารละลาย 2,4-dinitrophenylhydrazine ความเข้มข้น 1 mg/mL (DNPH) : ชั่ง 2,4-dinitrophenylhydrazine ปริมาณ 100 mg ลงใน volumetric flask 100 mL เติม ortho – phosphoric acid 85 % ปริมาตร 0.5 mL และปรับให้ได้ปริมาตรด้วย acetonitrile

2.2. เตรียมสารละลายมาตรฐาน

2.2.1. Glutaraldehyde stock standard solution ความเข้มข้น 10 mg/mL: ชั่งสารมาตรฐาน glutaraldehyde solution ให้ทราบค่าแน่นอน ลงใน volumetric flask ขนาด 25 mL ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile, AR grade เตรียมใหม่ทุกครั้ง

2.2.2. Formaldehyde stock standard solution ความเข้มข้น 10 mg/mL: ชั่งสารมาตรฐาน formaldehyde solution ให้ทราบค่าแน่นอน ลงใน volumetric flask ขนาด 25 mL ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile, AR grade เตรียมใหม่ทุกครั้ง

2.2.3. Glutaraldehyde and formaldehyde standard solution ความเข้มข้น 0.5 mg/mL: ปิเปต stock standard solution glutaraldehyde 10 mg/mL (2.2.1) มา 5 mL และ stock standard solution formaldehyde 10 mg/mL (2.2.2) มา 5 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 100 mL ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile, AR grade

2.3. เตรียม calibration curve 5 ระดับความเข้มข้น

2.3.1. เตรียม calibration solution ของ glutaraldehyde และ formaldehyde ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 20 - 60  $\mu$ g/mL (20, 30, 40, 50 และ 60  $\mu$ g/mL) ซึ่งต้องปิเปต glutaraldehyde และ formaldehyde standard solution 0.5 mg/mL (2.2.3) ปริมาตร 2, 3, 4, 5 และ 6 mL ตามลำดับ ลงใน volumetric flask ขนาด 50 mL ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile, AR grade

2.3.2. ปิเปต calibration solution ของ glutaraldehyde และ formaldehyde ในข้อ 2.3.1 มา 2 mL และ 2,4-dinitrophenylhydrazine 1 mg/mL มา 2 mL ลงใน Amber glass vial ตั้งทิ้งไว้เพื่อทำปฏิกิริยา เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะได้สารอนุพันธ์ glutaraldehyde – 2,4-DNPH และ formaldehyde – 2,4-DNPH

#### 2.4. Chromatographic condition A

UHPLC Column	C18 ขนาด 100 mm × 2.1 mm ID (1.7µm particle size)
Column oven	30 °C
Flow rate	0.5 mL/min
Injection Volume	2 µL
Detector wavelength	365 nm
Run time	5 min.
Mobile phase	Acetonitrile: DI water (ตารางที่ 1)

#### ตารางที่ 1 gradient profile

Time (min)	Acetonitrile (v/v)	น้ำ DI (v/v)
0.0	30	70
1.0	70	30
1.5	70	30
1.7	30	70
5.0	30	70

#### 2.5. Chromatographic condition B

HPLC Column	C8 ขนาด 150 mm × 4.6 mm ID (5µm particle size)
Column oven	30 °C
Flow rate	1.0 mL/min
Injection Volume	20 µL
Detector wavelength	365 nm
Run time	15 min.
Mobile phase	Acetonitrile: DI water (ตารางที่ 2)

## ตารางที่ 2 gradient profile

Time (min)	Acetonitrile (v/v)	DI Water (v/v)
0.0	50	50
3.0	50	50
7.0	60	40
9.0	60	40
15.0	50	50

2.6 System suitability test: ฉีดสารมาตรฐาน glutaraldehyde – 2,4-DNPH และ formaldehyde – 2,4-DNPH ความเข้มข้น 0.040 mg/mL ฉีดจำนวน 5 injection ต้องผ่านเกณฑ์การยอมรับดังนี้คือ มี repeatability ของ peak area ไม่เกิน 2 %RSD และค่า tailing อยู่ระหว่าง 0.8 – 1.6

2.7 Recovery test สำหรับทดสอบ glutaraldehyde และ formaldehyde ดังตารางที่ 3

## ตารางที่ 3 แนวทางการเตรียมสารเคมี สำหรับ recovery test ของ glutaraldehyde และ formaldehyde

Sample+Standard solution	Pipette	Final volume	Conc.	Final conc.
sample 0.5 mg/mL (Mix GA, FA)	2.0 mL	50 mL	20 µg/mL	40 µg/mL
standard solution 0.5 mg/mL (GA, FA)	2.0 mL		20 µg/mL	

2.8 การจัดเตรียมตัวอย่าง เพื่อวิเคราะห์สาร glutaraldehyde และ formaldehyde

2.8.1 การเตรียมตัวอย่างที่ความเข้มข้นในช่วง 20 - 60 µg/mL โดยการทำอนุพันธ์เช่นเดียวกับการเตรียมสารมาตรฐาน ทำจำนวน 2 ซ้ำ

### 3. วิธีการทดสอบ (Test method 2)

#### 3.1. เตรียมสารเคมี

3.1.1. สารละลาย 2,4-dinitrophenylhydrazine 1 mg/mL: ชั่ง 2,4-dinitrophenylhydrazine ปริมาณ 100 mg ลงใน volumetric flask 100 mL เติม ortho – phosphoric acid 85% ปริมาตร 0.5 mL และปรับให้ได้ปริมาตรด้วย acetonitrile

#### 3.2. เตรียมสารละลายมาตรฐาน

3.2.1. Glutaraldehyde stock standard solution ความเข้มข้น 10 mg/mL: ชั่งสารมาตรฐาน glutaraldehyde solution ให้ทราบค่าแน่นอน ลงใน volumetric flask ขนาด 25 mL ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile, AR grade เตรียมใหม่ทุกครั้ง

3.2.2. Formaldehyde stock standard solution ความเข้มข้น 10 mg/mL: ชั่งสารมาตรฐาน formaldehyde solution ให้ทราบค่าแน่นอน ลงใน volumetric flask ขนาด 25 mL ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile, AR grade เตรียมใหม่ทุกครั้ง

3.2.3. การเตรียม glutaraldehyde standard solution และ formaldehyde 0.5 mg/mL:  
ปิเปต glutaraldehyde standard solution 10 mg/mL มา 5 mL และ formaldehyde standard solution 10 mg/mL ลงใน volumetric flask ขนาด 100 mL ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile

3.2.4. การเตรียม glutaraldehyde standard solution และ formaldehyde 0.05 mg/mL:  
ปิเปต glutaraldehyde standard solution 10 mg/mL มา 0.5 mL และ formaldehyde standard solution 10 mg/mL มา 0.5 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 100 mL ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile

3.3. เตรียม calibration curve 5 ระดับความเข้มข้น

3.3.1. เตรียม calibration solution ของ glutaraldehyde และ formaldehyde ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 4 - 16 µg/mL (4, 8, 12 และ 16 µg/mL) ซึ่งต้องปิเปต standard solution 0.05 mg/mL ปริมาตร 4, 8, 12 และ 16 mL ตามลำดับ ลงใน volumetric flask ขนาด 50 mL ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile, AR grade

3.3.2. ปิเปต calibration solution ของ glutaraldehyde และ formaldehyde จากข้อ 3.3.1 มา 5 mL และ 2,4-dinitrophenylhydrazine 1 mg/mL มา 10 mL ลงใน volumetric flask 25 mL ตั้งทิ้งไว้เพื่อทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 80 นาที จากนั้นปรับปริมาตรด้วย acetonitrile, AR grade

3.4. Chromatographic condition C

UHPLC Column C18 ขนาด 100 mm × 2.1 mm ID (1.7µm particle size)

Column oven 30 °C

Flow rate 0.5 mL/min

Injection Volume 2 µL

Detector wavelength 360 nm

Run time 5 min.

Mobile phase Acetonitrile: DI water (ตารางที่ 4)

**ตารางที่ 4 gradient profile**

Time (min)	Acetonitrile (v/v)	น้ำ DI (v/v)
0.0	30	70
1.0	70	30
1.5	70	30
1.7	30	70
5.0	30	70

### 3.5 Chromatographic condition D

HPLC Column	C18, 250 cm x 4.6 mm ID หรือเทียบเท่า
Column oven	ambient
Flow rate	1 mL/min
Injection Volume	20 µL
Detector wavelength	360 nm
Run time	15 min.
Mobile phase	Acetonitrile: DI water (65: 35, V/V)

3.6 System suitability test: ฉีดสารมาตรฐาน glutaraldehyde – 2,4-DNPH และ formaldehyde - 2,4-DNPH จำนวน 5 injection ต้องผ่านเกณฑ์การยอมรับดังนี้คือ มี repeatability ของ peak area ไม่เกิน 2 %RSD และค่า tailing ระหว่าง 0.8 – 1.6

3.7 การจัดเตรียมตัวอย่าง เพื่อวิเคราะห์สาร glutaraldehyde และ formaldehyde

3.7.1 การเตรียมตัวอย่างที่ความเข้มข้นในช่วง 4 - 16 µg/mL

## 4. การคำนวณ

4.1. หาปริมาณสารสำคัญในตัวอย่าง

$$\% \text{Glutaraldehyde และ formaldehyde} = (C_0 \times V_s \times D / M_s \times 1000 \times 1000) \times 100$$

$C_0$  = ปริมาณความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง (µg/mL) ได้จากการคำนวณของเครื่องหรือจากสมการของ calibration curve โดยคำนวณจาก main peak

$V_s$  = ปริมาณสารละลายตัวอย่างที่เตรียม (mL)

$D$  = ระดับความเจือจาง

$M_s$  = น้ำหนักหรือปริมาตรที่ใช้เตรียมตัวอย่าง (g หรือ mL)

4.2 การวิเคราะห์หา % recovery

$$\% \text{ recovery} = \frac{C - B}{A} \times 100$$

A = ความเข้มข้นของ analyte สารละลายมาตรฐาน (µg/mL)

B = ความเข้มข้นของ analyte สารละลายตัวอย่าง (µg/mL)

C = ความเข้มข้นของ analyte สารละลาย standard addition (µg/mL)

## 5. เอกสารอ้างอิง

วิธีทดสอบเรื่อง การทดสอบหาปริมาณสารสำคัญ glutaraldehyde, formaldehyde และ glyoxal ในผลิตภัณฑ์  
วัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ โดย UHPLC-DAD รหัส BQCLP\_VDHD\_T09\_13 ออกครั้งที่ 3 ประกาศใช้  
วันที่ 11/09/67

การทดสอบหาปริมาณ glyoxal ในตัวอย่างวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์  
โดยเทคนิค UHPLC-DAD หรือ HPLC-DAD

1. สารมาตรฐานและสารเคมี

1.1 สารมาตรฐาน

1.1.1 Glyoxal solution ความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 40% ( $C_2H_2O_2$ ), standard grade

1.2 สารเคมี

1.2.1 Acetonitrile ( $CH_3CN$ ), AR grade และ HPLC grade

1.2.2 2,4-dinitrophenylhydrazine ( $C_6H_6N_4O_4$ , DNPH), AR grade

1.2.3 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone ( $C_8H_9N_3S \cdot HCl \cdot H_2O$ , MBTH), HPLC grade

1.2.4 Ortho - Phosphoric acid 85% ( $H_3PO_4$ ), AR grade

1.2.5 Glacial acetic acid ( $C_2H_4O_2$ ), AR grade

1.2.6 น้ำบริสุทธิ์ที่มีความต้านทานไม่น้อยกว่า 18.2 M $\Omega$ .cm (Deionized water)

2. วิธีการทดสอบ (Test method 1)

2.1 เตรียมสารเคมี

2.1.1 สารละลาย 2,4-dinitrophenylhydrazine 1 mg/mL: ชั่ง 2,4-dinitrophenylhydrazine ปริมาณ 100 mg ลงใน volumetric flask 100 mL เติม ortho - phosphoric acid 85% ปริมาตร 0.5 mL และปรับให้ได้ปริมาตรด้วย acetonitrile

2.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน

2.2.1 Glyoxal stock standard solution ความเข้มข้น 10 mg/mL: ชั่งสารมาตรฐาน Glyoxal solution ให้ทราบค่าแน่นอน ลงใน volumetric flask ขนาด 25 mL ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile AR grade เตรียมใหม่ทุกครั้ง

2.2.2 การเตรียม glyoxal standard solution 0.5 mg/mL:

ปิเปต glyoxal standard solution 10 mg/mL มา 5 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 100 mL ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile

2.2.3 การเตรียม glyoxal standard solution 0.05 mg/mL: ปิเปต glyoxal standard solution 10 mg/mL มา 0.5 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 100 mL ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile, AR grade

2.3 เตรียม calibration curve 5 ระดับความเข้มข้น

2.3.1 เตรียม calibration solution ของ glyoxal ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 4 - 16  $\mu$ g/mL (4, 8, 12 และ 16  $\mu$ g/mL) ซึ่งต้องปิเปต standard solution 0.05 mg/mL ปริมาตร 4, 8, 12 และ 16 mL ตามลำดับ ลงใน volumetric flask ขนาด 50 mL ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile, AR grade

2.3.2 ปิเปต calibration solution ของ glyoxal จากข้อ 2.3.1 มา 5 mL และ 2,4-dinitrophenylhydrazine 1 mg/mL มา 10 mL ลงใน volumetric flask 25 mL ตั้งทิ้งไว้เพื่อทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 80 นาที จากนั้นปรับปริมาตรด้วย acetonitrile, AR grade

#### 2.4 Chromatographic condition C

UHPLC Column C18 ขนาด 100 mm X 2.1 mm ID (1.7 $\mu$ m particle size)  
 Column oven 30 °C  
 Flow rate 0.5 mL/min  
 Injection Volume 2  $\mu$ L  
 Detector wavelength 360 nm  
 Run time 5 min.  
 Mobile phase Acetonitrile: DI water (ตารางที่ 1)

#### ตารางที่ 1 gradient profile

Time (min)	Acetonitrile (v/v)	น้ำ DI (v/v)
0.0	30	70
1.0	70	30
1.5	70	30
1.7	30	70
5.0	30	70

#### 2.5 Chromatographic condition D

HPLC Column C18, 250 cm x 4.6 mm ID หรือเทียบเท่า  
 Column oven ambient  
 Flow rate 1 mL/min  
 Injection Volume 20  $\mu$ L  
 Detector wavelength 360 nm  
 Run time 15 min.  
 Mobile phase Acetonitrile: DI water (65: 35, V/V)

2.6 System suitability test: ฉีดสารมาตรฐาน glyoxal - 2,4-DNPH ความเข้มข้น 0.040 mg/mL จำนวน 5 injection ต้องผ่านเกณฑ์การยอมรับดังนี้คือ มี repeatability ของ peak area ไม่เกิน 2 %RSD และค่า tailing ระหว่าง 0.8 – 1.6

#### 2.7 การเตรียมตัวอย่าง เพื่อวิเคราะห์สาร glyoxal

2.7.1 การเตรียมตัวอย่างที่ความเข้มข้นในช่วง 4 - 16  $\mu$ g/mL

### 3. วิธีการทดสอบ (Test method 2)

#### 3.1 เตรียมสารเคมี

3.1.1 สารละลาย 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazine (MBTH) ความเข้มข้น 1 mg/mL :  
ชั่ง 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazine 100 mg ลงใน volumetric flask 100 mL  
และปรับให้ได้ปริมาตรด้วย 60% glacial acetic acid

3.1.2 การเตรียม 60% glacial acetic acid : ตวง glacial acetic acid 600 mL ลงใน volumetric  
flask 1000 mL และปรับให้ได้ปริมาตรด้วย deionized water

#### 3.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน

3.2.1 Glyoxal stock standard solution ความเข้มข้น 0.5 mg/mL: ชั่งสารมาตรฐาน glyoxal  
solution ให้ทราบค่าแน่นอน ลงใน volumetric flask ขนาด 100 mL ปรับปริมาตรด้วย 60%  
glacial acetic acid เตรียมใหม่ทุกครั้ง

3.2.2 Glyoxal stock standard solution ความเข้มข้น 0.05 mg/mL: ปิเปต glyoxal stock  
standard solution 0.5 mg/mL มา 5 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 50 mL ปรับ  
ปริมาตรด้วย 60% acetic acid

#### 3.3 เตรียม calibration curve 5 ระดับความเข้มข้น

3.3.1 เตรียม calibration solution ของ glyoxal ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 2 – 6 µg/mL (2, 3, 4,  
5 และ 6 µg/mL) ซึ่งต้องปิเปต glyoxal standard solution 0.05 mg/mL (ข้อ 3.2.2)  
ปริมาตร 2, 3, 4, 5 และ 6 mL ตามลำดับ ลงใน volumetric flask ขนาด 50 mL ปรับ  
ปริมาตรด้วย 60% acetic acid

3.3.2 ปิเปต calibration solution ของ glyoxal ในข้อ 3.3.1 มา 1 mL ใส่ลงในขวด amber glass  
vial ขนาด 4 mL (แยกแต่ละขวด) และทำการปิเปตสารละลาย 3-methyl-2-  
benzothiazolinone hydrazone ปริมาตร 1 mL ลงในขวด amber glass vial ทั้ง 5 ขวด  
ผสมให้เข้ากันในแต่ละขวด ใส่ใน heat box ควบคุมอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา  
110 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

#### 3.4 Chromatographic condition A

UHPLC Column	C18 ขนาด 100 mm × 2.1 mm ID (1.7µm particle size)
Column oven	30°C
Flow rate	0.5 mL/min
Injection Volume	2 µL
Detector wavelength	365 nm
Run time	3 min.
Mobile phase	Acetonitrile: DI water (ตารางที่ 2)

## ตารางที่ 2 gradient profile

Time (min)	Acetonitrile (v/v)	น้ำ DI (v/v)
0.0	30	70
1.0	70	30
1.5	70	30
1.7	30	70
3.0	30	70

3.5 System suitability test: ฉีดสารมาตรฐาน glyoxal ที่ความเข้มข้น 0.004 mg/mL ฉีดจำนวน 5 injection ต้องผ่านเกณฑ์การยอมรับดังนี้คือ มี repeatability ของ peak area ไม่เกิน 2 % RSD และ ค่า tailing อยู่ระหว่าง 0.8 – 1.6

3.6 การจัดเตรียมตัวอย่าง เพื่อวิเคราะห์สาร glyoxal

3.6.1 การเตรียมตัวอย่างที่ความเข้มข้นในช่วง 2 – 6 µg/mL

## 4. การคำนวณ

4.1 หาปริมาณสารสำคัญในตัวอย่าง

$$\% \text{ glyoxal} = (C_0 \times V_s \times D / M_s \times 1000 \times 1000) \times 100$$

$C_0$  = ปริมาณความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง (µg/mL) ได้จากการคำนวณของเครื่องหรือจากสมการของ calibration curve โดยคำนวณจาก main peak

$V_s$  = ปริมาณสารละลายตัวอย่างที่เตรียม (mL)

$D$  = ระดับความเจือจาง

$M_s$  = น้ำหนักหรือปริมาตรที่ใช้เตรียมตัวอย่าง (g หรือ mL)

4.2 การวิเคราะห์หา % recovery

$$\% \text{ recovery} = \frac{C - B}{A} \times 100$$

$A$  = ความเข้มข้นของ analyte สารละลายมาตรฐาน (µg/mL)

$B$  = ความเข้มข้นของ analyte สารละลายตัวอย่าง (µg/mL)

$C$  = ความเข้มข้นของ analyte สารละลาย standard addition (µg/mL)

## 5. เอกสารอ้างอิง

วิธีทดสอบเรื่อง การทดสอบหาปริมาณสารสำคัญ glutaraldehyde, formaldehyde และ glyoxal ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ โดย UHPLC-DAD รหัส BQCLP\_VDHD\_T09\_13 ออกครั้งที่ 3 ประกาศใช้วันที่ 11/09/67

การเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการรายการทดสอบหาปริมาณสารกลุ่ม  
hypochlorite as available chlorine ในตัวอย่างวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์  
โดยเทคนิค potentiometric titration

1. สารมาตรฐานและสารเคมี

1.1 สารมาตรฐาน

1.1.1 Potassium iodate ( $KIO_3$ ), Certified reference material, มีความบริสุทธิ์  
ไม่น้อยกว่า 99.0%

1.2 สารเคมี

1.2.1 Glacial acetic acid, AR grade

1.2.2 Hydrochloric acid, AR grade

1.2.3 Potassium iodide, AR grade

1.2.4 Sodium thiosulfate pentahydrate, ACS grade

1.2.5 Sodium carbonate, AR grade

1.2.6 น้ำบริสุทธิ์ความต้านทานไม่น้อยกว่า 18.2 M $\Omega$ .cm (Deionized water)

2. วิธีทดสอบ ใช้วิธีต่อไปนี้หรือวิธีที่ทางห้องปฏิบัติการใช้ปฏิบัติงานเป็นประจำ

2.1 การเตรียมสารเคมี

2.1.1 0.4 N sodium thiosulfate volumetric solution ( $Na_2S_2O_3$  VS)

ละลายผลึก sodium thiosulfate 100 g และ sodium carbonate 0.8 g ในน้ำที่ต้มเดือดและ  
ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วใน volumetric flask ขนาด 1,000 mL ปรับปริมาตรและผสมให้เข้ากัน

2.1.2 1 N hydrochloric acid (1 N HCl)

ละลาย conc. hydrochloric acid 8.5 mL ลงในน้ำบริสุทธิ์ใน volumetric flask ขนาด 100 mL  
ปรับปริมาตรจนครบ 100 mL

2.1.3 0.4 N potassium iodate ( $KIO_3$ )

อบ potassium iodate ที่อุณหภูมิ 130°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้น ชั่ง potassium iodate  
มา 1.4268 g ละลายด้วยน้ำที่ต้มเดือดและทิ้งไว้ให้เย็น ปรับปริมาตรจนครบ 100 mL

2.1.4 Potassium iodide (KI)

ชั่ง potassium iodide บนกระดาษชั่งสาร ครึ่งละ 2 g ห่อเก็บไว้ใน weighing bottle

2.2 การทดสอบหาปริมาณ available chlorine

2.2.1 วัดค่า pH ของตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ โดยใช้กระดาษวัด pH-indicator หากค่า pH ของตัวอย่างมี  
ค่ามากกว่า 7 ให้ neutralize ด้วย glacial acetic acid และบันทึกค่า pH

2.2.2 เติมน้ำบริสุทธิ์อย่างน้อย 50 mL และ glacial acetic acid 10 mL ลงใน titration vessel

- 2.2.3 ปิเปตตัวอย่างให้มีปริมาณ available chlorine 40 – 200 mg โดยปล่อยตัวอย่างใต้น้ำ ทำ 3 ซ้ำ และวัดค่า pH อีกครั้ง โดยค่า pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 1-2 กรณีสารละลายตัวอย่างมีค่า pH ไม่อยู่ในช่วง ให้ทำการเติม glacial acetic acid จนกว่าสารละลายตัวอย่างจะมีค่า pH อยู่ในช่วง 1-2 และบันทึกค่า pH
- 2.2.3 เติมผลึก KI 2 กรัม และนำไปไทเทรตกับ 0.4 N Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> VS

### 2.3 การทดสอบค่าร้อยละการคืนกลับ (% recovery)

การทดสอบค่าร้อยละการคืนกลับ (% recovery) ที่ระดับความเข้มข้นคือ 80, 120 และ 160 mg ตามลำดับ ทำ 3 ซ้ำ โดยเลือกเพียง 1 ความเข้มข้นต่อชุดการทดสอบ

#### ตารางที่ 1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบค่าการคืนกลับ

ตัวอย่าง 40 mg/mL		สารละลายมาตรฐานตั้งต้น 40 mg/mL		ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาณสาร
ปริมาตรตัวอย่าง	ปริมาณสาร	ปริมาตร	ปริมาณสาร		
1 mL	40 mg	1 mL	40 mg	80 mg	80 mg
1 mL	40 mg	2 mL	80 mg	120 mg	120 mg
1 mL	40 mg	3 mL	120 mg	160 mg	160 mg

2.3.1 เตรียมตัวอย่างให้มีปริมาณ available chlorine 40 mg/mL

2.3.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 40 mg/mL

2.3.3 เติมน้ำบริสุทธิ์อย่างน้อย 50 mL เติม KI 2 g และเติม glacial acetic acid 10 mL ลงใน titration vessel

2.3.4 ปิเปตตัวอย่างดังตารางที่ 1 ปล่อยตัวอย่างใต้น้ำ จากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐานตั้งต้นใส่ titration vessel

2.3.5 นำไปไทเทรตด้วย 0.4 N Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> VS

## 3. การคำนวณ

### 3.1 หาปริมาณสารสำคัญในตัวอย่าง

1 mL of 0.4 N Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> equivalent to 0.014184 g available chlorine

$$\% \text{ available chlorine} = \frac{0.014184 \times \text{VEQ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times \text{N Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 100}{0.4 \text{ N} \times (V_{\text{sample}} \text{ or } W_{\text{sample}})}$$

VEQ Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = ปริมาตรของ 0.4 N Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ที่ใช้ในการไทเทรต (mL)

N Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = ความเข้มข้นที่แท้จริงของ 0.4 N Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (normality)

V<sub>sample</sub> or W<sub>sample</sub> = ปริมาณตัวอย่าง (mL) หรือน้ำหนัก (g)

0.014184 = titer ของปฏิกิริยา; 1 mL ของ 0.4 N Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> VS ทำปฏิกิริยาพอดีกับสาร hypochlorite as available chlorine 0.014184 g

0.4 N = ความเข้มข้นตามทฤษฎีของ Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

100 = เปลี่ยนหน่วยให้เป็น %

### 3.2 การทดสอบ % recovery

$$\% \text{ recovery} = \frac{C - B}{A} \times 100$$

A = ปริมาณ available chlorine ในสารละลายมาตรฐาน (mg)

B = ปริมาณ available chlorine ในตัวอย่าง (mg)

C = ปริมาณ available chlorine ที่ตรวจพบใน spiked sample (mg)

100 = เปลี่ยนหน่วยให้เป็น %

โดย A, B และ C คำนวณจาก 
$$= \frac{\text{VEQ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times N \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 14.184}{0.4 N}$$

VEQ  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  = ปริมาตรของ 0.4 N  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  ที่ใช้ในการไทเทรต (mL)

N  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  = ความเข้มข้นที่แท้จริงของ 0.4 N  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (normality)

14.184 = มิลลิกรัมสมมูลของ chlorine

0.4 N = ความเข้มข้นตามทฤษฎีของ  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

### 4. เอกสารอ้างอิง

วิธีทดสอบเรื่อง การวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่ม hypochlorite as available chlorine ในผลิตภัณฑ์

วัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ ด้วยเทคนิค potentiometric titration รหัส BQCLP\_VDHD\_T09\_15

ออกครั้งที่ 2 ประกาศใช้วันที่ 30/11/63

การเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการรายการทดสอบหาปริมาณ available iodine  
ในตัวอย่างวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ โดยเทคนิค potentiometric titration

## 1. สารมาตรฐานและสารเคมี

### 1.1 สารมาตรฐาน

1.1.1 Potassium iodate ( $KIO_3$ ), Certified reference material, มีความบริสุทธิ์  
ไม่น้อยกว่า 99.0%

### 1.2 สารเคมี

1.2.1 Sodium thiosulfate pentahydrate, ACS grade

1.2.2 Sodium Carbonate, AR grade

1.2.3 Potassium iodide, AR grade

1.2.4 Sulfuric acid, AR grade

1.2.5 Iodine resublimed, AR grade

1.2.6 น้ำบริสุทธิ์ความต้านทานไม่น้อยกว่า 18.2 M $\Omega$ .cm (Deionized water)

## 2. วิธีทดสอบ ใช้วิธีต่อไปนี้หรือวิธีที่ทางห้องปฏิบัติการใช้ปฏิบัติงานเป็นประจำ

### 2.1 การเตรียมสารเคมี

2.1.1 0.1 N sodium thiosulfate volumetric solution ( $Na_2S_2O_3$  VS)

ละลายผลึก sodium thiosulfate 26 g และ sodium carbonate 0.2 g ในน้ำที่ต้มเดือดและทิ้งไว้ให้  
เย็นแล้ว ใน volumetric flask ขนาด 1,000 mL ปรับปริมาตรและผสมให้เข้ากัน

2.1.2 2 N sulfuric acid

ตวง sulfuric acid มา 56 mL ลงในน้ำบริสุทธิ์ ใน volumetric flask ขนาด 1,000 mL และ  
ปรับปริมาตรจนครบ 1,000 mL

2.1.3 0.1 N potassium iodate ( $KIO_3$ )

อบ potassium iodate ที่อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้น ชั่ง potassium iodate  
มา 0.3567 g ละลายด้วยน้ำที่ต้มเดือดและทิ้งไว้ให้เย็น ปรับปริมาตรจนครบ 100 mL

2.1.4 Iodine solution ( $I_2$ ) ความเข้มข้น 35 mg/mL

ชั่ง iodine resublimed 3.5 g ละลายในน้ำบริสุทธิ์ที่มี KI 9 g ละลายอยู่และปรับปริมาตร  
ใน volumetric flask ขนาด 100 mL

### 2.2 การทดสอบหาปริมาณไอโอดีน

5.2.1 เตรียมตัวอย่างให้มีปริมาณไอโอดีนประมาณ 80 – 115 mg ใส่ลงใน titration vessel และเติมน้ำ  
บริสุทธิ์ปริมาณ 50 mL

5.2.2 นำไปไทเทรตกับ 0.1 N  $Na_2S_2O_3$  VS

## 2.3 การทดสอบค่าร้อยละการคืนกลับ (% recovery)

การทดสอบค่าร้อยละการคืนกลับ (% recovery) ที่ระดับความเข้มข้นคือ 80, 135 และ 157 mg ตามลำดับ ทำ 3 ซ้ำ โดยเลือกเพียง 1 ความเข้มข้นต่อชุดการทดสอบ

ตารางที่ 1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบค่าการคืนกลับ

น้ำหนัก ตัวอย่าง	ตัวอย่าง		สารละลายมาตรฐาน		ความ เข้มข้น สุดท้าย	ปริมาณ สาร
	ปริมาณสาร	ปริมาตร	ปริมาตร	ปริมาณสาร		
1.55 g	44.95 mg	1 mL		35 mg	79.95 mg	80 mg
2.25 g	65.25 mg	2 mL		70 mg	135.25 mg	135 mg
3.00 g	87.00 mg	2 mL		70 mg	157.00 mg	157 mg

2.3.1 เตรียมตัวอย่างและสารมาตรฐานตามตารางที่ 1 ใส่ใน titration vessel และเติมน้ำปริสุทธีอย่างน้อย 50 mL

2.3.2 นำไปไทเทรตกับ 0.1 N Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> VS

## 3. การคำนวณ

### 3.1 หาปริมาณสารสำคัญในตัวอย่าง

1 mL of 0.1 N Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> equivalent to 12.69 g available iodine

$$\% \text{ Iodine} = \frac{\text{VEQ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times N \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 12.69 \times 100}{0.1 \text{ N} \times 1000 \times W_{\text{sample}}/V_{\text{sample}}}$$

VEQ Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = ปริมาตรของ Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ที่ใช้ในการไทเทรต (mL)

N Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = ความเข้มข้นที่แท้จริงของ 0.1 N Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (normality)

W<sub>sample</sub>/V<sub>sample</sub> = น้ำหนักหรือปริมาตรของตัวอย่าง ในหน่วย g หรือ mL

100 = เปลี่ยนหน่วยให้เป็น %

0.1 N = ความเข้มข้นตามทฤษฎีของ Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

1000 = ปริมาตรที่คำนวณในหน่วย normality

12.69 = มิลลิกรัมสมมูลของ iodine

### 3.2 การทดสอบ % recovery

$$\% \text{ recovery} = \frac{C - B}{A} \times 100$$

A = ปริมาณ available iodine ในสารละลายมาตรฐาน (mg)

B = ปริมาณ available iodine ในตัวอย่าง (mg)

C = ปริมาณ available iodine ที่ตรวจพบใน spiked sample (mg)

100 = เปลี่ยนหน่วยให้เป็น %

โดย	A, B และ C	คำนวณจาก	=	$VEQ Na_2S_2O_3 \times N Na_2S_2O_3 \times 12.69$
		$VEQ Na_2S_2O_3$	=	ปริมาตรของ $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้ในการไทเทรต (mL)
		$N Na_2S_2O_3$	=	ความเข้มข้นที่แท้จริงของ 0.1 N $Na_2S_2O_3$ (normality)
		12.69	=	มิลลิกรัมสมมูลของ iodine
		0.1 N	=	ความเข้มข้นตามทฤษฎีของ $Na_2S_2O_3$

#### 4. เอกสารอ้างอิง

วิธีทดสอบเรื่อง การวิเคราะห์หาปริมาณ iodine complexes as available iodine ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตราย  
 ด้านการปศุสัตว์ ด้วยเทคนิค potentiometric titration รหัส BQCLP\_VDHD\_T09\_14 ออกครั้งที่ 2  
 ประกาศใช้วันที่ 30/11/63

การเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการรายการทดสอบหาปริมาณสารกลุ่ม  
quaternary ammonium compounds ในตัวอย่างวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์  
โดยเทคนิค potentiometric titration

1. สารเคมีและสารมาตรฐาน

1.1 สารมาตรฐาน

1.1.1 Sodium dodecyl sulfate, ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 95 %

1.2 สารเคมี

1.2.1 Boric acid, AR grade

1.2.2 Isopropanol AR grade

1.2.3 Sodium tetraborate decahydrate, AR grade

1.2.4 Triton X-100, AR grade

1.2.5 1-cetylpyridinium chloride monohydrate, AR grade

1.2.6 น้ำบริสุทธิ์ความต้านทานไม่น้อยกว่า 18.2 MΩ.cm (Deionized water)

2. วิธีทดสอบ ใช้วิธีต่อไปนี้หรือวิธีที่ทางห้องปฏิบัติการใช้ปฏิบัติงานเป็นประจำ

2.1 การเตรียมสารเคมี

2.1.1 สารละลายมาตรฐาน 0.008 M sodium dodecyl sulfate (SDS)

ชั่ง SDS ประมาณ  $2.42 \pm 0.01$  g ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนถึง 0.1 mg ลงใน volumetric flask ขนาด 1,000 mL ละลายด้วยน้ำบริสุทธิ์ ให้เป็นเนื้อเดียวกันและปรับปริมาตร จนครบ 1,000 mL

2.1.2 สารละลาย 1% triton X

ปิเปต triton X-100 ปริมาตร 1 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 100 mL เติมน้ำบริสุทธิ์ 50 mL นำไปละลายให้เข้ากันด้วยเครื่อง hot plate and magnetic stirrer แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 mL

2.1.3 สารละลาย borate buffer, pH 9.5

ชั่ง sodium tetraborate decahydrate 1.5 g และ boric acid 1.0 g เติลงใน erlenmeyer flask ขนาด 1,000 mL เติมน้ำบริสุทธิ์ ประมาณ 800 mL และปรับ pH ให้ได้ 9.5 ด้วย 2 N sodium hydroxide เทใส่ volumetric flask ขนาด 1,000 mL และปรับปริมาตรด้วยน้ำบริสุทธิ์ จนครบ 1,000 mL

2.1.4 สารละลายมาตรฐาน 1-cetylpyridinium chloride monohydrate 100 mg/mL (CPC)

ชั่ง CPC 2.6 g ละลายด้วยน้ำบริสุทธิ์ จนปริมาตรครบ 25 mL เก็บไว้ใน solution bottle ชนิดแก้ว ขนาด 50 mL

2.2 การทดสอบหาปริมาณ quaternary ammonium compounds

2.2.1 ทดสอบ reagent blank โดยเติมน้ำบริสุทธิ์ อย่างน้อย 50 mL เติม borate buffer 10 mL, 1% triton- X solution 2 mL และเติม isopropanol 2 mL ลงไปใน titration vessel ขนาด 100 mL นำไปไทเทรตกับสารละลายมาตรฐาน 0.008 M SDS VS โดยใช้ electrode DX 200 และ DS 500

- 2.2.2 กรณีตัวอย่างเป็น % W/V ให้เตรียมตัวอย่างโดยปิเปตตามตารางที่ 1 ใส่ใน volumetric flask ละลาย และปรับปริมาตรด้วยน้ำบริสุทธิ์ จนครบปริมาตร โดยทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ
- 2.2.3 ปิเปตตัวอย่างจากข้อ 2.2.2 ใส่ titration vessel ขนาด 100 mL ปริมาตร 10 mL เติมน้ำบริสุทธิ์ อย่างน้อย 50 mL เติม borate 10 mL, 1% triton- X solution 2 mL และเติม isopropanol 2 mL ลงไปใน titration vessel ขนาด 100 mL นำไปไทเทรตกับสารละลายมาตรฐาน 0.008 M SDS VS โดยใช้ electrode DX 200 และ DS 500
- 2.2.4 กรณีตัวอย่างเป็น %W/W ให้นำไปหา density โดยใช้เครื่องวัดค่าความหนาแน่นของของเหลว (density meter) แล้วเตรียมตัวอย่างตามข้อ 2.2.2 หรือชั่งตัวอย่างตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงแนวทางการชั่งน้ำหนักตัวอย่าง, ปิเปตตัวอย่าง, ปริมาตรสุดท้าย และ aliquot

ความเข้มข้นตัวอย่าง (%W/W, %W/V)	น้ำหนักตัวอย่าง (g) W	ปริมาตรตัวอย่าง (mL) V	ปริมาตรสุดท้าย d	Aliquot mL a
0.5	4	4	-	-
1	2	2	-	-
2	1	1	-	-
3	7	7	100	10
5	4	3	100	10
10	2	2	100	10
15	2.8	3	200	10
30	2.8	3	200	5
60	1.4	1.5	200	5
>80	1	1	200	5

หมายเหตุ คำนวณที่ mean molar mass 358 g/mol

### 2.3 ขั้นตอนการทดสอบร้อยละการคืนกลับ (% recovery)

การทดสอบร้อยละการคืนกลับ (% recovery) ที่ระดับความเข้มข้นคือ 80, 100, และ 125 % ของระดับที่ตรวจวัด คือ 16, 20, และ 25 mg ตามลำดับ ทำ 3 ซ้ำ โดยทดสอบ % recovery เพียง 1 ความเข้มข้นมาทดสอบต่อชุดการทดสอบ ตามตารางที่ 2

## ตารางที่ 2 การเตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบค่าการคืนกลับ

ตัวอย่าง 100 mg/mL		สารละลาย CPC 100 mg/mL		ปริมาตรสุดท้าย	ความเข้มข้น สุดท้าย	ปริมาตรนำไป ไทเทรต	ปริมาณ สาร
ปริมาตร	ปริมาณสาร	ปริมาตร	ปริมาณสาร				
1 mL	100 mg	3 mL	300 mg	250 mL	1.6 mg/mL	10 mL	16 mg
1 mL	100 mg	1 mL	100 mg	100 mL	2.0 mg/mL	10 mL	20 mg
1 mL	100 mg	4 mL	400 mg	200 mL	2.5 mg/mL	10 mL	25 mg

2.3.1 เตรียมตัวอย่างให้มีปริมาณ 100 mg/mL

2.3.2 เตรียมสารละลาย CPC 100 mg/mL

2.3.3 ปิเปตตัวอย่างและสารมาตรฐานดังตารางที่ 2 ใส่ titration vessel ขนาด 100 mL ปริมาตร 10 mL เติมน้ำบริสุทธิ์อย่างน้อย 50 mL เติม borate 10 mL, 1% triton- X solution 2 mL และเติม isopropanol 2 mL ลงไปใน titration vessel ขนาด 100 mL นำไปไทเทรตกับสารละลายมาตรฐาน 0.008 M SDS VS โดยใช้ electrode DX 200 และ DS 500

### 3. การคำนวณ

3.1 หาปริมาณสารสำคัญในตัวอย่าง

$$QACs = \frac{VEQ_{SDS} - \text{Blank} \times m_{SDS} \times MMM \times d \times 100}{W \times 1,000 \times V_{\text{aliquot}}}$$

$VEQ_{SDS}$  = ปริมาณสารละลายมาตรฐาน SDS ที่ใช้ในการไทเทรตกับตัวอย่าง (mL)

Blank = ปริมาณสารละลายมาตรฐาน SDS ที่ใช้ในการไทเทรตกับ Blank (mL)

$m_{SDS}$  = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน SDS ที่ใช้ไทเทรต

MMM = mean molar mass ของ quaternary ammonium compound

d = ปริมาตรสุดท้ายของสารละลายตัวอย่าง

$V_{\text{aliquot}}$  = ปริมาณสารละลายตัวอย่างที่นำมาทำการไทเทรต

W = weight หรือ volume ของสารตัวอย่างเป็น g หรือ mL

100 = เปลี่ยนหน่วยให้เป็น %

1,000 = ปริมาตรที่คำนวณในหน่วย normality

### 3.2 การทดสอบ % recovery

$$\% \text{ recovery} = \frac{C - B}{A} \times 100$$

A = ปริมาณ CPC ในสารละลาย (mg)

B = ปริมาณ quaternary ammonium compound ใน sample solution (mg)

C = ปริมาณ quaternary ammonium compound ที่ตรวจพบใน spiked solution (mg)

100 = เปลี่ยนหน่วยให้เป็น %

โดย A, B และ C คำนวณจาก =  $VEQ \text{ SDS} \times M \text{ SDS} \times MMM$

VEQ SDS = ปริมาตรของ SDS ที่ใช้ในการไทเทรต (mL)

M SDS = ความเข้มข้นที่แท้จริงของ 0.008 M SDS (molarity)

MMM = Mean molar mass ของตัวอย่างและ CPC

### 4. เอกสารอ้างอิง

วิธีทดสอบเรื่อง การทดสอบหาปริมาณสารกลุ่ม quaternary ammonium compounds ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายด้านปศุสัตว์ ด้วยเทคนิค potentiometric titration รหัส BQCLP\_VDHD\_T09\_16 ออกครั้งที่ 3 ประกาศใช้วันที่ 21/08/66

## การเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ

## รายการทดสอบประสิทธิภาพตัวอย่างวัตถุดิบด้วยวิธี use-dilution

## 1. สารเคมี อาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อมาตรฐาน

## 1.1 สารเคมี

1.1.1 Potassium Dihydrogen phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

1.1.2 Sodium Hydroxide (NaOH)

1.1.3 Phenolphthalein

1.1.4 Ethanol

1.1.5 Hydrochloric acid (HCl)

1.1.6 70% alcohol

1.1.7 สารละลาย phosphate buffer dilution water (PBDW)

1.1.8 สารละลาย 1 M Sodium Hydroxide (NaOH)

1.1.9 สารละลาย 1% Phenolphthalein

## 1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อมาตรฐาน

1.2.1 Lethen broth

1.2.2 Synthetic broth

1.2.3 Tryptic soy agar

1.2.4 Cetrinide agar

1.2.5 Mannitol salts agar

1.2.6 XLD Medium

1.2.7 *Salmonella enterica* ATCC 107081.2.8 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 154421.2.9 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

## 2. วิธีทดสอบ ใช้วิธีต่อไปนี้หรือวิธีที่ทางห้องปฏิบัติการใช้ปฏิบัติงานเป็นประจำ

## 2.1 การเตรียม carriers

2.1.1 นำ carriers ใส่ในขวดพลาสติก ขนาด 500 mL ใส่ 1 M NaOH ให้ท่วม carriers ปิดฝาขวดแช่เย็น ประมาณ 12 ชั่วโมง

2.1.2 ปล่อยน้ำประปาไหลผ่าน 2-3 ครั้ง ในน้ำสุดท้ายทดสอบความเป็นกลางด้วย 1% phenolphthalein โดยแบ่งน้ำสุดท้ายที่ใช้ล้าง carriers ใส่ใน beaker ขนาด 50 mL ปริมาตรประมาณ 5-10 mL หยด 1% phenolphthalein 2-3 หยด ผลที่ได้จะต้องไม่มีสี ถ้าเปลี่ยนเป็นสีชมพูต้องล้างซ้ำ และทดสอบใหม่กับ 1% phenolphthalein จนกว่าจะไม่เปลี่ยนสี แล้วล้างด้วยน้ำไหลผ่าน อีก 2 ครั้ง

2.1.3 นำ carriers ที่สะอาดใส่ bottle solution ขนาด 100 mL จำนวน 37 อัน/ขวด ใส่ RO ให้น้ำ carriers ปิดฝา

2.1.4 นำเข้าเครื่อง autoclave เพื่อฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เวลา 20 นาที ตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

## 2.2 การเตรียม Petri dish สำหรับ Dry carrier

2.2.1 นำกระดาษกรอง Whatman No.2 ขนาด 90 mm 2 แผ่น ใส่ใน Petri dish ขนาด 20x100 mm ปิดฝา Petri dish ใส่ถุงพลาสติกชนิด polypropylene (PP) ขนาด 7x11 mm ถุงละ 4 plate ซ้อนกันในแนวตั้งและมัดปากถุง

2.2.2 นำเข้าเครื่อง autoclave เพื่อฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 °C เวลา 20 นาที dry ให้แห้งโดยใช้โปรแกรมในเครื่อง autoclave หรือ เข้าเครื่อง hot air oven ที่อุณหภูมิประมาณ 60-70 °C เป็นเวลา 1 คืน (ประมาณ 12 ชั่วโมง) เก็บใช้ได้นานประมาณ 2 สัปดาห์

## 2.3 การเตรียมเชื้อทดสอบ (สำหรับ 1 การทดสอบ)

2.3.1 นำเชื้อออกจากตู้เก็บที่อุณหภูมิ -70 °C หรือต่ำกว่า และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเชื้อภายในหลอด cryotube ละลาย จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer ประมาณ 3-4 วินาที ดูดเชื้อ ปริมาตร 10 µL ใส่ในหลอด synthetic broth ที่มีปริมาตร 10 mL จำนวน 5 หลอด ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 36±1 °C เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง

2.3.2 เมื่อครบเวลานำเชื้อที่บ่ม มาเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ synthetic broth ปริมาตร 10 mL ทั้ง 5 หลอด ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 36 ± 1 °C เป็นเวลา 48-54 ชั่วโมง

2.3.3 เมื่อครบ 48-54 ชั่วโมง นำเชื้อจำนวน 5 หลอด ออกจากตู้บ่ม ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer ประมาณ 3-4 วินาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที (เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ไม่ต้องผสมให้เข้ากัน เพราะต้องนำเศษแขวนลอยด้านบนออก และทำการเทรวมใส่ภาชนะอื่นก่อน) แล้วเทสารละลายเชื้อด้านบนลงใน sterile bottle solution ระวังอย่าให้เศษตะกอนเชื้อหลุดลงมา จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยการหมุนขวดเบาๆ นำไปวัดค่า OD ของเชื้อก่อนนำไปทดสอบต่อไป (สามารถทำการ dilute เชื้อทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ synthetic broth เพื่อควบคุมให้ค่า LD อยู่ในช่วงที่ระบุของแต่ละเชื้อทดสอบ)

## 2.4 การเตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อ

เตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ และควรทดสอบภายใน 3 ชั่วโมงหลังเตรียมตัวอย่าง

2.4.1 นำขวดตัวอย่างผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อ เขย่าให้เข้ากันก่อนเปิดขวด ใช้สำลีชุบ 70% alcohol เช็ดรอบ ๆ บริเวณฝาขวด ตั้งไว้ให้แอลกอฮอล์ที่เช็ดแห้ง เปิดฝาขวด โดยไม่ให้มือสัมผัสด้านในฝาขวด ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อ

2.4.2 ผสมอัตราส่วนสำหรับฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ตามที่ระบุในฉลาก

2.4.3 ใช้ volumetric flask แก้ว ในการตวงน้ำ sterile RO จากนั้นนำน้ำ sterile RO ใส่ bottle solution

2.4.4 นำตัวอย่างชนิดน้ำเทแบ่งใส่ sterile beaker ตัวอย่างควรมีปริมาตร ≥ 1 mL ใช้ volumetric pipette ดูดตัวอย่าง ใส่ใน bottle solution ที่มีน้ำตามอัตราส่วนที่เตรียมไว้ (ไม่นำ pipette หรืออุปกรณ์ใด ๆ เข้าไปในภาชนะบรรจุตัวอย่าง เพื่อป้องกันการปนเปื้อนในตัวอย่าง)

- 2.4.5 เขย่า bottle solution ตัวอย่างโดยเขย่า ซ้าย-ขวา หรือหน้า - หลัง สลับไปมา จนตัวอย่างผสมกับน้ำจนเป็นเนื้อเดียวกัน
- 2.4.6 ใช้ graduated pipette ขนาด 10 mL pipette ตัวอย่าง ปริมาตร 10 mL ใส่ใน test tube ขนาด 25x150 mm จำนวน 60 หลอด ปิดฝา นำใส่ water bath ควบคุมอุณหภูมิ  $20 \pm 1$  °C ก่อนการทดสอบอย่างน้อย 10 นาที
- 2.5 การทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อด้วยวิธี use-dilution
- การปฏิบัติงานทุกขั้นตอนต้องใช้ เทคนิคปลอดเชื้อ
- 2.5.1 ใช้ sterile hook เกี่ยว carriers ที่เตรียมไว้ โดยให้น้ำติดที่ carriers น้อยที่สุดใส่ใน bottle solution ขนาด 100 mL จำนวน 37 carriers ต่อขวด จำนวน 2 ขวด
- 2.5.2 ใช้ graduated pipette ดูดเชื้อทดสอบที่เตรียมไว้ ปริมาตรขวดละ 37 mL (อัตราส่วน 1 carrier: เชื้อ 1 mL) จำนวน 1 ขวด แช่ carriers ให้ท่วม ถ้าเชื้อทดสอบไม่ท่วม carriers ให้ทำการเขย่าเบาๆ หรือใช้ sterile hook กด carriers แช่ไว้นาน  $15 \pm 2$  นาที
- 2.5.3 เมื่อครบเวลา ใช้ graduated pipette ดูดเชื้อทิ้งใส่ขวดใบใหม่ และใช้ sterile hook เกี่ยว carriers วางบน petri dish ที่ใส่กระดาษกรอง ปิดฝา petri dish การวาง carriers ต้องวางแนวตั้งและไม่ให้ carriers สัมผัสกัน โดยวาง carriers ไม่เกิน 12 อัน/petri dish กรณีที่ carriers สัมผัสกันห้ามนำมาใช้ทดสอบ
- 2.5.4 นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ  $36 \pm 1$  °C เวลา  $40 \pm 2$  นาที เพื่อ dry ให้แห้ง
- 2.5.5 เมื่อครบเวลา ค่อยๆ นำ petri dish ที่ dry ในตู้อบออกมาวางบนโต๊ะโดยไม่ให้ carriers ล้มก่อนการทดสอบชุดที่ 1 สุ่ม carriers 3 อัน/ชุด เพื่อทำ Enumeration of viable bacteria from carriers
- 2.5.6 หยิบหลอดตัวอย่างออกจาก water bath ปิดฝา ลนไฟบริเวณปากหลอดใช้ sterile hook เกี่ยว carriers ออกจาก petri dish ใส่ในหลอดตัวอย่าง ระวังไม่ให้ carriers สัมผัสข้างในหลอด ลนไฟปากหลอด ปิดฝา เขย่าเบาๆ และวางใน water bath ตามเดิม โดยที่ทุกหลอดให้มีระยะเวลาสัมผัสผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อนาน 10 นาที และระยะห่างระหว่างหลอดไม่เกิน 5 วินาที
- 2.5.7 เมื่อครบเวลา 10 นาที ใช้ sterile hook เกี่ยว carriers จากหลอดตัวอย่างใส่ในหลอด letheen broth ปริมาตร 10 mL ระวังไม่ให้ carriers สัมผัสข้างในหลอด ลนไฟปากหลอด ปิดฝาเขย่าเบาๆ ทำจนครบ 2 ชุด หรือ 60 หลอด
- 2.5.8 นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ  $36 \pm 1$  °C เวลา  $48 \pm 2$  ชั่วโมง
- 2.5.9 หลังการทดสอบชุดที่ 2 สุ่ม carriers 3 อัน/ชุด เพื่อทำ Enumeration of viable bacteria from carriers

## 2.6 การอ่านผลและการแปลผล

นำหลอดทั้งหมดออกจากตู้เพาะเชื้อ อ่านผลโดยดูความขุ่น (turbidity) ดังนี้

Positive (+) คือ เปลี่ยนแปลงอาหารเลี้ยงเชื้อจากใสเป็นขุ่น แสดงว่าไม่สามารถฆ่าเชื้อได้

Negative (-) คือ ไม่เปลี่ยนแปลงอาหารเลี้ยงเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อไม่ขุ่น แสดงว่าสามารถฆ่าเชื้อได้

ผลผ่าน คือ หลอดทดสอบ positive ไม่เกิน 1 หลอด จากการทดสอบทั้งหมด 60 หลอด

โดยที่ผลการควบคุมคุณภาพทั้งหมดผ่านเกณฑ์ยอมรับ

ผลไม่ผ่าน คือ หลอดทดสอบ positive 2 หลอดขึ้นไป จากการทดสอบทั้งหมด 60 หลอด

โดยที่ผลการควบคุมคุณภาพทั้งหมดผ่านเกณฑ์ยอมรับ

อ้างอิงตามประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา พ.ศ. 2553 เรื่อง วิธีการทดสอบและเกณฑ์ตัดสินผลการทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อโรค บนพื้นแข็งที่ไม่มีรูพรุน ของผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อโรค ชนิดของเหลวหรือชนิดผงที่ละลายน้ำได้ ต้องฆ่าเชื้อได้ไม่น้อยกว่า 59 carriers จาก 60 carriers

## 2.7 การควบคุมคุณภาพ

2.7.1 Carriers sterility control เพื่อให้มั่นใจว่า carriers ที่ใช้ทดสอบ ปราศจากเชื้อปนเปื้อน

2.7.1.1 ใช้ sterile hook เกี่ยว carriers ใน bottle solution ขนาด 100 mL 1 - 2 อัน

ใส่ใน letheen broth ปริมาตร 10 mL นำเข้าตู้เพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิ  $36 \pm 1$  °C

เวลา  $48 \pm 2$  ชั่วโมง

2.7.1.2 อ่านผล โดยดูความขุ่น ดังนี้

ผ่าน (✓) คือ ไม่เปลี่ยนแปลงอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงว่า carriers ปราศจากเชื้อปนเปื้อน

ไม่ผ่าน (✗) คือ เปลี่ยนแปลงอาหารเลี้ยงเชื้อ จากใสเป็นขุ่น แสดงว่า carriers

มีเชื้อปนเปื้อน

2.7.1.3 เกณฑ์ ต้องผ่าน (✓) เท่านั้น

2.7.2 Carriers viability control เพื่อให้มั่นใจว่า carriers ที่ dry แล้ว ยังมีเชื้อทดสอบอยู่

2.7.2.1 ใช้ sterile hook เกี่ยว carrier ใน petri dish ที่ dry แล้ว 1 - 2 อัน ใส่ใน letheen

broth ปริมาตร 10 mL นำเข้า ตู้เพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิ  $36 \pm 1$  °C เวลา  $48 \pm 2$  ชั่วโมง

2.7.2.2 อ่านผล โดยดูความขุ่น ดังนี้

ผ่าน (✓) คือ เปลี่ยนแปลงอาหารเลี้ยงเชื้อ จากใสเป็นขุ่น แสดงว่ามีเชื้อใน carriers

ไม่ผ่าน (✗) คือ ไม่เปลี่ยนแปลงอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงว่าไม่มีเชื้อใน carriers

2.7.2.3 เกณฑ์ ต้องผ่าน (✓) เท่านั้น

2.7.3 Enumeration of viable bacteria from carrier (Carrier count)

เพื่อนับจำนวนเชื้อที่อยู่ใน carriers ซึ่งควรอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด

2.7.3.1 ทำการสุ่มเลือก carriers จาก petri dish ที่ dry แล้วในแต่ละชุดการทดสอบ

โดยสุ่มก่อนการทดสอบ 3 carriers และหลังการทดสอบ 3 carriers

2.7.3.2 ใช้ sterile hook เกี่ยว carriers ใน petri dish ที่ dry แล้ว ใส่ในหลอด letheen

broth ปริมาตร 10 mL (ระดับความเจือจางที่  $10^{-1}$ )

- 2.7.3.3 นำเข้าเครื่อง ultrasonic bath เวลา  $60 \pm 5$  วินาที โดยวางหลอด letheen broth ใน beaker ที่มีน้ำบรรจุภายในโดยให้ระดับน้ำในหลอด letheen broth, beaker และใน ultrasonic tank มีระดับที่เท่ากัน หากไม่สามารถทำการ เจือจางเชื้อได้ สามารถเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ  $2 - 5^{\circ}\text{C}$  แต่ควรนับเชื้อภายใน 2 ชั่วโมงหลังจาก sonicate
- 2.7.3.4 ทำการเจือจาง เชื้อ *Stapylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* ทำการเจือจางที่ระดับ  $10^{-2}$  ถึง  $10^{-4}$  เชื้อ *Salmonella enterica* ที่ระดับ  $10^{-1}$  ถึง  $10^{-3}$  และใช้ micropipette คูดเชื้อทดสอบ 3 ระดับความเจือจางสุดท้าย ปริมาตร 100  $\mu\text{L}$  ใส่ petri dish ขนาด 20 x 100 mm ทำ duplicate
- 2.7.3.5 ทำการ pour plate โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA อุณหภูมิประมาณ  $45^{\circ}\text{C}$  เทใส่ petri dish ที่ใส่เชื้อทดสอบแต่ละความเจือจางประมาณ 25 - 30 mL หมุน petri dish ให้เชื้อทดสอบกระจายทั่ว แล้วตั้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว
- 2.7.3.6 ปิดฝา petri dish นำเข้าตู้เพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิ  $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$  เวลา  $48 \pm 2$  ชั่วโมง
- 2.7.3.7 นับจำนวนโคโลนี ด้วยเครื่องนับจำนวนจุลินทรีย์ โดยปริมาณเชื้ออยู่ในช่วง 0 - 300 CFU/mL และคำนวณหาค่า  $\log_{10}$  density (LD) เกณฑ์ ดังนี้
- |                               |            |                            |
|-------------------------------|------------|----------------------------|
| <i>Salmonella enterica</i>    | ATCC 10708 | ค่า LD ควรอยู่ในช่วง 5 - 6 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC 15442 | ค่า LD ควรอยู่ในช่วง 6 - 7 |
| <i>Staphylococcus aureus</i>  | ATCC 6538  | ค่า LD ควรอยู่ในช่วง 6 - 7 |

#### 2.7.4 การควบคุมการปนเปื้อนในตัวอย่าง

- 2.7.4.1 ใช้ micropipette ขนาด 1,000  $\mu\text{L}$  pipette ตัวอย่างที่เจือจางในระดับที่ใช้ สำหรับทดสอบปริมาตร 1,000  $\mu\text{L}$  ใส่ในหลอด letheen broth ปริมาตร 10 mL
- 2.7.4.2 นำเข้าตู้เพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิ  $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$  นาน  $48 \pm 2$  ชั่วโมง
- 2.7.4.3 อ่านผล โดยดูความขุ่นดังนี้
- ผ่าน (✓) คือ ไม่เปลี่ยนแปลงอาหารเลี้ยงเชื้อ
- ไม่ผ่าน (✗) คือ เปลี่ยนแปลงอาหารเลี้ยงเชื้อ จากใสเป็นขุ่น
- 2.7.4.4 เกณฑ์ ต้องผ่าน (✓) เท่านั้น

### 3. การคำนวณ

การคำนวณ CFU/mL (of broth) ทำการปรับระดับความเจือจางที่นับได้ (0.1 mL/petri dish) ให้เป็นปริมาตร mL/petri dish ก่อน โดยการคูณ 10

$$\text{CFU/mL} = \frac{(\text{avg. CFU for } 10^{-x}) + (\text{avg. CFU for } 10^{-y}) + (\text{avg. CFU for } 10^{-z})}{10^{-x} + 10^{-y} + 10^{-z}}$$

$10^{-x}$ ,  $10^{-y}$ ,  $10^{-z}$  หมายถึง ระดับความเจือจางที่ใช้ปริมาตรเชื้อจุลินทรีย์  
การคำนวณ CFU/carrier ของ ค่า Enumeration of viable bacteria from carrier

$$\text{CFU/carrier} = \text{CFU/mL of broth} \times 10 \text{ mL of broth/carrier}$$

นำค่า CFU/carrier คำนวณ  $\log_{10}$  density (LD) ซึ่งค่าเฉลี่ยที่ได้ ควรอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับ หากอยู่นอกช่วง อาจมาจากขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ การเตรียมเชื้อ การเตรียม carriers ฯลฯ

### 4. เอกสารอ้างอิง

AOAC. 2019. Official Methods of Analysis of AOAC International 21<sup>st</sup> Ed.