

การพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ Tetradecyltrimethylammonium Bromide และ Nonylphenol ethoxylates ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์

นางสุนันท์ กิตติจาววัฒนา นายชูศักดิ์ อาจสูงเนิน นายองอาจ บุญบรรลุ นายนิติ รุจิเชาว์

บทคัดย่อ

ทำการพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสารสำคัญ Tetradecyltrimethylammonium Bromide และ Nonylphenol ethoxylates ด้วยเทคนิค Ultra High Performance Liquid Chromatography - Evaporative light scattering detector (UHPLC-ELSD) ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ สภาวะการทดสอบที่ใช้คือ ใช้คอลัมน์ Kinetex ชนิด C18, 1.7 ไมโครเมตร ขนาด 100 มิลลิเมตร และเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 2.1 มิลลิเมตร สารละลายเฟสเคลื่อนที่ระหว่าง 0.15 % trifluoroacetic acid (TFA) และ methanol โดยการใช้ gradient program อัตราการไหล 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้เวลาชะสารทั้งสองออกมาภายในเวลา 5 นาที ศึกษา linearity ที่ระดับความเข้มข้น 40 - 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่า Coefficient of Determination (r^2) เท่ากับ 0.999 และ 0.998 ตามลำดับ ประเมินความแม่นยำ (accuracy) จาก %recovery อยู่ในช่วง 96.0 - 104.4 % และมีค่าความเที่ยง (intermediate precision) อยู่ในช่วง 1.52 – 1.98 %RSD ดังนั้นวิธีดังกล่าวมีความเหมาะสมในการนำไปตรวจหาปริมาณสารสำคัญทั้ง 2 ชนิดพร้อมกันในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ได้ต่อไป โดยเมื่อทำการประเมิน robustness โดยใช้วิธีของ Youden's พบว่าปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการทดสอบมากที่สุดคืออัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่

คำสำคัญ : Tetradecyltrimethylammonium bromide, Nonylphenol ethoxylates, UHPLC-ELSD

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Method Validation for Determination of Tetradecyltrimethylammonium Bromide And Nonylphenol ethoxylates in Hazardous Substances Products for Livestock

Sunan Kittijaruwattana, Chusak Ardsongnearn, Ongart Boonbanlu, Titi Rujichao

Abstract

Method development and validation for the determination of tetradecyltrimethylammonium bromide and nonylphenol ethoxylates in hazardous substances products for livestock were achieved using Ultra - High Performance Liquid Chromatography - Evaporative Light Scattering Detector (UHPLC - ELSD). The chromatographic separation was conducted using a Kinetex C18, 1.7 μ m, 100 x 2.1 mm, id. at the flow rate of 0.3 mL/min, gradient elution between 0.15 % trifluoroacetic acid (TFA) and methanol within 5 minutes run time. The linearity of two compounds were studied at the concentration range of 40 - 120 μ g/mL. The coefficients of determination (r^2) were 0.9958 and 0.9969, respectively. The accuracy (%recovery) and intermediate precision ranged from 96.0 - 104.4 % and 1.52 - 1.98 %RSD, respectively. The result of the method validation showed that the developed method is suitable for the simultaneous determination of two active ingredients in livestock hazardous products. The robustness using Youden's method was evaluated, and the most effective factor was the flow rate of mobile phase.

Keywords : Tetradecyltrimethylammonium bromide, Nonylphenol ethoxylates, UHPLC-ELSD

Veterinary Drugs and Hazardous Substances Assay Division, Bureau of Quality Control of Livestock Products, Department of Livestock Development

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ Tetradecyltrimethylammonium Bromide และ Nonylphenol ethoxylates ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์

นางสุนันท์ กิตติจารุวัฒนา นายชูศักดิ์ อาจสูงเนิน
นายองอาจ บุญบรรลุ นายธิติ รุจิเชาว์

บทนำ

Evaporative light scattering detector (ELSD) อาศัยหลักการกระเจิงแสง (light scattering) ของอนุภาค เครื่องตรวจวัดชนิดนี้สามารถตรวจวัดสารได้เกือบทุกชนิด (quasi-universal detector) เช่น สารที่ไม่ระเหยหรือระเหยได้ยากกว่าเฟสเคลื่อนที่ มีความเหมาะสมสำหรับสารกลุ่ม non-chromophoric และ unconjugated compounds ที่ไม่สามารถดูดกลืนแสงในช่วงคลื่น UV ได้

Tetradecyltrimethylammonium bromide (TTAB) เป็นสาร cationic surfactants ที่ใช้ในการฆ่าเชื้อและทำความสะอาด ที่มีการใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมทั่วไปรวมถึงทางด้านการปศุสัตว์ และเนื่องจากโครงสร้างของสารดังกล่าวไม่มี chromophore จึงจำเป็นต้องใช้เทคนิคที่ทำให้สามารถวิเคราะห์สารที่ไม่มี chromophore ได้

Nonylphenol ethoxylates เป็นสารลดแรงตึงผิวประเภทไม่มีประจุ (Nonionic surfactant) สามารถป้องกันสิ่งสกปรกได้ดี มีการใช้งานที่หลากหลายในอุตสาหกรรมหรือในผลิตภัณฑ์ที่ใช้งานตามบ้านเรือนทั่วไป นอกจากนี้ยังเป็นสาร Emulsifier ในอุตสาหกรรมเกษตร ใช้เป็นสารร่วมในการผลิตยาฆ่าแมลง เป็นต้น ซึ่ง Nonylphenol ethoxylates และ TTAB ที่มักพบอยู่ในทะเบียนตำรับเดียวกันของผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายการปศุสัตว์ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเป็นผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อในการปศุสัตว์ทำให้เกิดการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารทั้งสองในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายด้วยเทคนิค UHPLC-ELSD ในคราวเดียวกัน

ตามวิธีของ Ryu et al. (2007) สามารถวิเคราะห์สาร cationic surfactants 14 ชนิด ที่ใช้ในอุตสาหกรรมโรงงานโดยใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography - Evaporative light scattering detector (HPLC-ELSD) ในงานครั้งนี้จึงได้นำวิธีดังกล่าวมาดัดแปลงและพัฒนาโดยใช้เทคนิค Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) ร่วมกับ ELSD เพื่อให้สามารถตรวจทั้ง TTAB และ nonylphenol ethoxylates ซึ่งเป็นสาร nonionic surfactant

1. วัตถุประสงค์

เพื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ tetradecyltrimethylammonium bromide และ nonylphenol ethoxylates ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์

2. ขอบข่าย

ใช้สำหรับวิเคราะห์สารสำคัญ tetradecyltrimethylammonium bromide และ nonylphenol ethoxylates ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ด้วยเทคนิค UHPLC-ELSD

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีที่มีความเหมาะสมและสามารถตรวจวิเคราะห์ tetradecyltrimethylammonium bromide และ nonylphenol ethoxylates ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์

4. เครื่องมือและวัสดุวิทยาศาสตร์

4.1. เครื่องมือ

4.1.1. ชุดแยกชนิดและปริมาณสารด้วยหลักการ Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น LC-20 พร้อมเครื่องตรวจวัดชนิด ELSD

4.1.2. เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้าทศนิยม 5 ตำแหน่ง

4.1.3. เครื่องทำน้ำบริสุทธิ์พร้อมอุปกรณ์

4.2. สารเคมีและสารมาตรฐาน

4.2.1. Nonylphenol Ethoxylates 90% ($C_{19}H_{32}O_3$) ยี่ห้อ Carlo Erba

4.2.2. Tetradecyltrimethylammonium bromide 98% ($C_{17}H_{35}BrN$) ยี่ห้อ Dr. Ehrenstorfer

4.2.3. Methanol (CH_3OH) AR grade และ HPLC grade

4.2.4. Trifluoroacetic Acid (CF_3COOH) ชนิด Reagent grade

4.2.5. น้ำบริสุทธิ์ความต้านทานไม่น้อยกว่า $18.2\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ Deionized water

4.3. วัสดุวิทยาศาสตร์

4.3.1. Beaker ขนาด 500 mL

4.3.2. Volumetric flask ขนาด 10, 25, 50 และ 100 mL

4.3.3. Volumetric pipette ขนาด 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 mL

- 4.3.4. Micro pipette ยี่ห้อ Eppendorf
- 4.3.5. Micro pipette ยี่ห้อ Finnpiquette
- 4.3.6. Amber glass vial ขนาด 16 mL
- 4.3.7. Vial HPLC ใส่ พร้อมฝา ขนาด 2 mL
- 4.3.8. Syringe filter PTFE 0.22 μ m
- 4.3.9. คอลัมน์ UHPLC Kinetex ชนิด C18 ขนาด 100 mm $\times$ 2.1 mm ID (1.7 μ m particle size) ยี่ห้อ Phenomenex

5. วิธีดำเนินการ

- 5.1. เตรียม stock standard solution (stock std.) ความเข้มข้น 0.50 mg/mL : ชั่งสารมาตรฐาน nonylphenol ethoxylates และ tetradecyltrimethylammonium bromide ให้มีเนื้อสาร 50 mg (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) แยกลงใน volumetric flask ขนาด 100 mL ปรับปริมาตรด้วย 80% methanol, AR grade
- 5.2. การเตรียม 0.15% trifluoroacetic acid (TFA) : ปิเปต TFA 650 μ L ลงใน volumetric flask ขนาด 500 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำ deionized
- 5.3. ทดสอบ condition โดยดัดแปลงจากวิธี Bull. Korean Chem. Soc. (2007)

Condition ที่ใช้ในการทดสอบ

Column	UHPLC Kinetex ชนิด C18 ขนาด 100 mm $\times$ 2.1 mm ID (1.7 μ m particle size) ยี่ห้อ Phenomenex		
Mobile phase	Gradient program (0.15 % TFA : Methanol)		
	Time (min)	0.15 % TFA	Methanol
	0	20	80
	1.0	20	80
	1.1	0	100
	3.0	20	80
	5.0	20	80
Column oven	30 $^{\circ}$ C		
Flow rate	0.3 mL/min		

Injection volume 20 μ L
 Detector ELSD set temp 60 °C
 Run time 5 min

5.4. ทดสอบช่วงของการวิเคราะห์ (range) โดยการเตรียม calibration curve ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 40 – 200 μ g/mL (40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 150 และ 200 μ g/mL) โดยเตรียมตามตารางที่ 1 ซึ่งเตรียมความเข้มข้นละ 1 ซ้ำๆ ละ 3 injection

ตารางที่ 1 การเตรียม mixed calibration curve standard solution เพื่อทดสอบ range ของ tetradecyltrimethylammonium bromide และ nonylphenol ethoxylates

No.	Stock std. (0.5 mg/mL, each)	Final Volume	Final Conc.
1	0.8 mL	10 mL	40 μ g/mL
2	1.0 mL	10 mL	50 μ g/mL
3	1.2 mL	10 mL	60 μ g/mL
4	1.4 mL	10 mL	70 μ g/mL
5	1.6 mL	10 mL	80 μ g/mL
6	1.8 mL	10 mL	90 μ g/mL
7	2.0 mL	10 mL	100 μ g/mL
8	2.4 mL	10 mL	120 μ g/mL
9	3.0 mL	10 mL	150 μ g/mL
10	4.0 mL	10 mL	200 μ g/mL

5.5. ทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) โดยเตรียม calibration curve ให้มีความเข้มข้นอยู่ 60 – 120 μ g/mL (60, 70, 80, 90, 100, 110 และ 120 μ g/mL) ซึ่งเตรียมดังตารางที่ 2 และเตรียมความเข้มข้นละ 1 ซ้ำๆ ละ 2 injection ทำการทดสอบ 3 วัน นำค่าพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานและความเข้มข้นไปสร้างกราฟหาค่า correlation coefficient (r) เกณฑ์การยอมรับ $r > 0.99$ (CIPAC, 2003) ทดสอบความเป็นเส้นตรงโดยใช้ ANOVA Deviation from

Linearity โดยค่า $p\text{-value} > 0.05$ และใช้ Visual inspection ของ residual ($y-y'$) การกระจายแบบ random

ตารางที่ 2 การเตรียม mixed calibration curve standard solution ของ

tetradecyltrimethylammonium bromide และ nonylphenol ethoxylates

No.	Stock std. (0.5 mg/mL, each)	Final Volume	Final Conc.
1	1.2 mL	10 mL	60 $\mu\text{g/mL}$
2	1.4 mL	10 mL	70 $\mu\text{g/mL}$
3	1.6 mL	10 mL	80 $\mu\text{g/mL}$
4	1.8 mL	10 mL	90 $\mu\text{g/mL}$
5	2.0 mL	10 mL	100 $\mu\text{g/mL}$
6	2.2 mL	10 mL	110 $\mu\text{g/mL}$
7	2.4 mL	10 mL	120 $\mu\text{g/mL}$

5.6. การทดสอบ accuracy และ precision

5.6.1. การทำ standard addition ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 80, 90 และ 100 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมตามตารางที่ 3 โดยทดสอบความเข้มข้นละ 7 ซ้ำๆ ละ 2 injection ทดสอบ 3 วัน เหน็จท์การยอมรับ % recovery อยู่ในช่วง 95 – 105 และ %RSD ≤ 2 (AOAC, 2016)

ตารางที่ 3 การเตรียม standard addition ของ tetradecyltrimethylammonium bromide และ nonylphenol ethoxylates

No.	Stock std. (0.5 mg/mL)	สารละลาย ตัวอย่าง (0.5 mg/mL)	Final volume (MeOH)	Total Conc. (Std., สารละลายตัวอย่าง)	Final Conc. (Std. + สารละลาย ตัวอย่าง)
1	0.8 mL	0.8 mL	10 mL	standard solution 40 µg/mL สารละลายตัวอย่าง 40 µg/mL	80 µg/mL
2	1.0 mL	0.8 mL	10 mL	standard solution 50 µg/mL สารละลายตัวอย่าง 40 µg/mL	90 µg/mL
3	1.2 mL	0.8 mL	10 mL	standard solution 60 µg/mL สารละลายตัวอย่าง 40 µg/mL	100 µg/mL

5.6.2 การหาค่าความเข้มข้นที่แน่นอนของตัวอย่าง เซโทรล ที่ความเข้มข้น 40 µg/mL ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมดังตารางที่ 4 โดยทดสอบจำนวน 7 ซ้ำๆ ละ 2 injection ทดสอบ 3 วัน เกณฑ์การยอมรับ %RSD ≤ 2 (AOAC, 2016)

ตารางที่ 4 การหาค่าความเข้มข้นที่แน่นอนของ ตัวอย่างเซโทรล

สารละลายตัวอย่าง (0.5 mg/mL)	Final volume (MeOH)	Final Conc.
0.8 mL	10 mL	40 µg/mL

5.6.3 การหาค่าความเข้มข้นที่แน่นอนของ standard solution ที่ความเข้มข้น 90 µg/mL ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมดังตารางที่ 5 โดยทดสอบจำนวน 2 ซ้ำๆ ละ 2 injection ทดสอบ 1 วัน เกณฑ์การยอมรับ %RPD ≤ 2 (AOAC, 2016)

ตารางที่ 5 การหาค่าความเข้มข้นที่แน่นอนของ standard solution

Stock std. (0.5 mg/mL)	Final volume (MeOH)	Final Conc.
1.8 mL	10 mL	90 µg/mL

5.6.4 การทดสอบ precision

การเตรียมตัวอย่างความเข้มข้น 90 µg/mL : ปิเปตตัวอย่างจำนวน 1 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 100 mL ปรับปริมาตรด้วย 80% methanol, AR grade ปิเปตมา 3 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 10 mL ปรับปริมาตรด้วย 80% methanol, AR grade โดยทดสอบจำนวน 10 ซ้ำๆ ละ 2 Injection ทดสอบ 3 วัน เกณฑ์การยอมรับ %RSD ≤ 2 (AOAC, 2016)

5.7. การทดสอบ selectivity โดยการตรวจสอบความสามารถของการแยก (resolution) ของสารมาตรฐาน nonylphenol ethoxylates และ tetradecyltrimethylammonium bromide

5.8. การทดสอบ robustness โดยการเปลี่ยนแปลงปัจจัยที่คาดว่าจะมีผลต่อการทดสอบตามตารางที่ 6 และวางแผนการทดสอบตามวิธีของ Youden's ตามตารางที่ 7 ทดสอบจำนวน 2 ซ้ำๆ ละ 2 injection

ตารางที่ 6 parameter ที่ใช้ในการทดสอบ robustness

Factor	Units	Limits	Level (-1)	Level (+1)	Nominal value
สีของ vial (A/a)	-	-	สีชา = A	สีใส = a	-
Column temperature (B/b)	°C	±5	25 = B	35 = b	30
Sample temperature (C/c)	°C	±5	20 = C	30 = c	25
เกรดของ Methanol (D/d)	-	-	HPLC = D	AR = d	-
Mobile phase flow rate (E/e)	mL/min	±0.1	0.2 = E	0.4 = e	0.3
Wavelength (F/f)	nm	±5	225 = F	235 = f	230
Injection volume (G/g)	µL	±1	19 = G	21 = g	20

ตารางที่ 7 แผนการทดสอบ robustness ด้วยวิธี Youden's

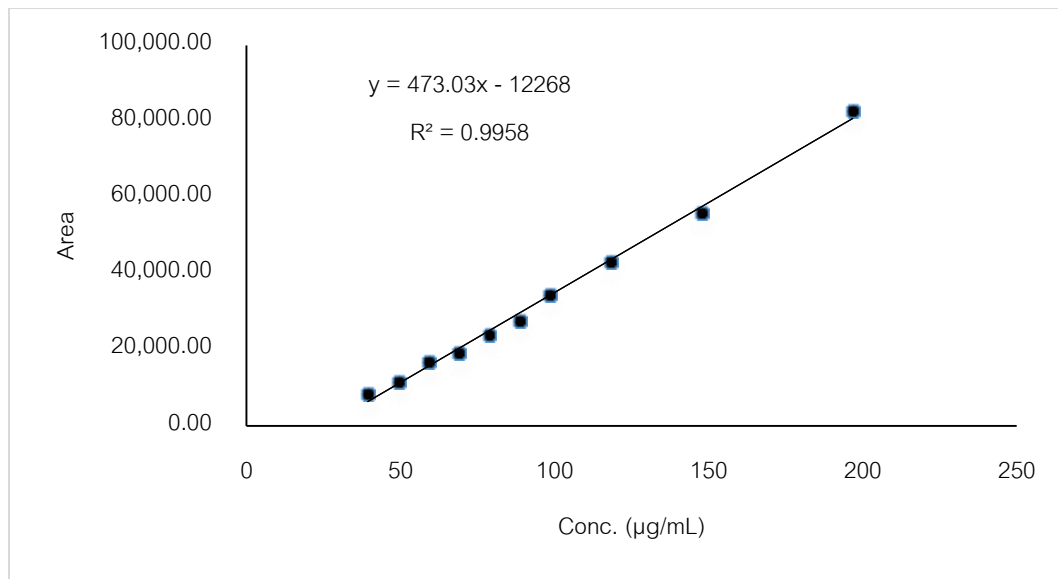
Parameter	จำนวนการทดสอบ							
	1	2	3	4	5	6	7	8
สีของ vial	A	A	A	A	a	a	a	a
Column temperature	B	B	b	b	B	B	b	b
Sample temperature	C	c	C	c	C	c	C	c
ยี่ห้อ mobile phase	D	D	d	d	d	d	D	D
Mobile phase flow rate	E	e	E	e	e	E	e	E
Wavelength	F	f	f	F	F	f	f	F
Injection volume	G	g	g	G	g	G	G	g
ผล	S	T	U	V	W	X	Y	Z

6. ผลการทดลอง

6.1. ผลการวิเคราะห์ range โดยเตรียม calibration curve ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 40 – 200 µg/mL (40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 150 และ 200 µg/mL) ได้ผลดังตารางที่ 8 และรูปที่ 1 และ 2

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบ range ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ TTAB

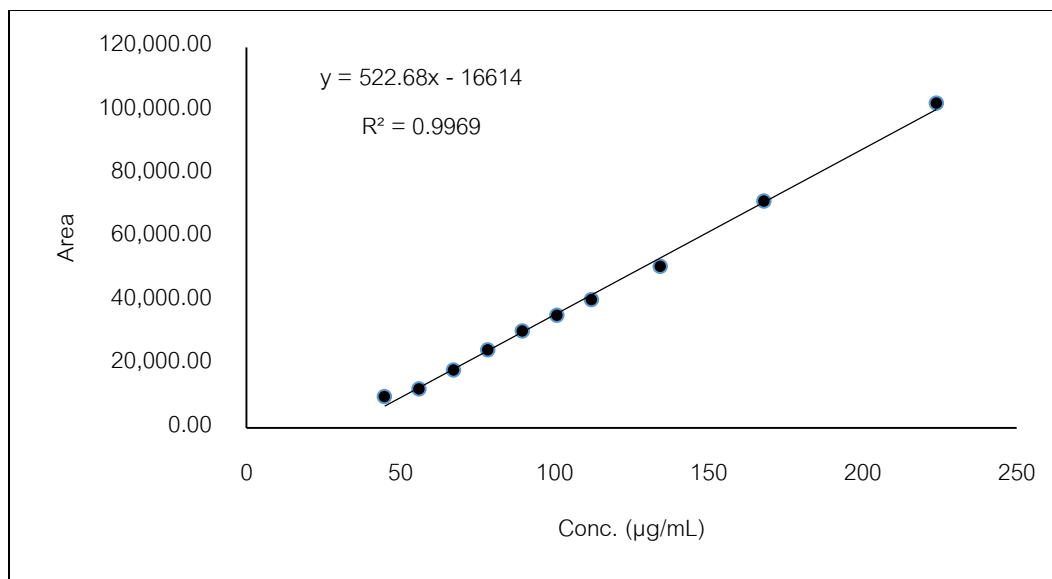
Concentration (µg/mL)	Mean Area
40	8365
50	11713
60	16755
70	19117
80	23966
90	27558
100	34609
120	43187
150	55903
200	82957
Slope	473.03x
Intercept	-12268
r^2	0.9958



รูปที่ 1 แสดง calibration curve ของ TTAB ที่ความเข้มข้น 40 – 200 µg/mL

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบ range ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ nonylphenol ethoxylates

Concentration (µg/mL)		Mean Area
40		9762
50		12225
60		18132
70		24563
80		30477
90		35458
100		40420
120		50862
150		71439
200		102323
Slope		522.68x
Intercept		-16614
r^2		0.9969

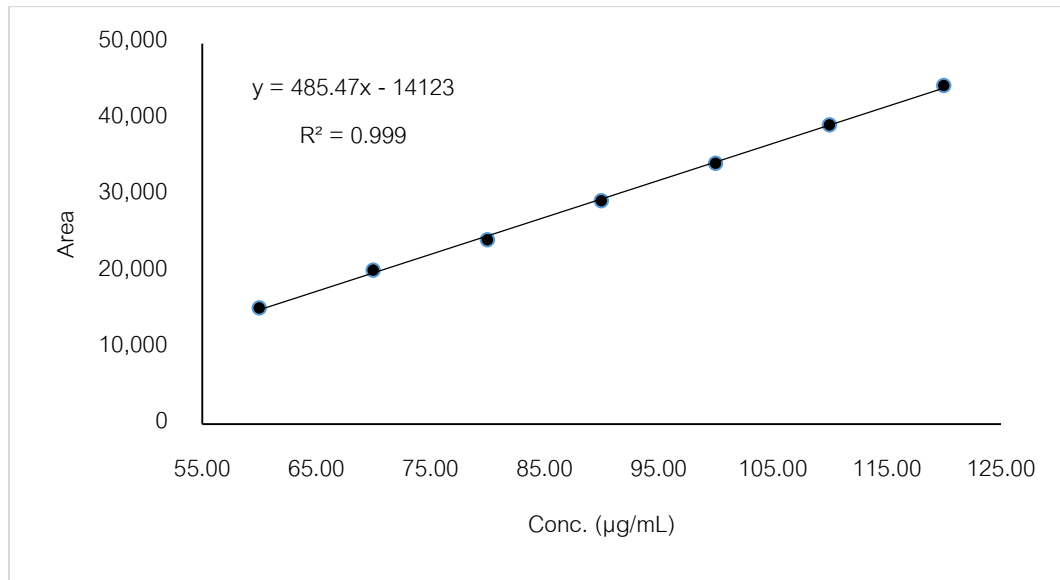


รูปที่ 2 แสดง calibration curve ของ nonylphenol ethoxylates ที่ความเข้มข้น 40 – 200 µg/mL

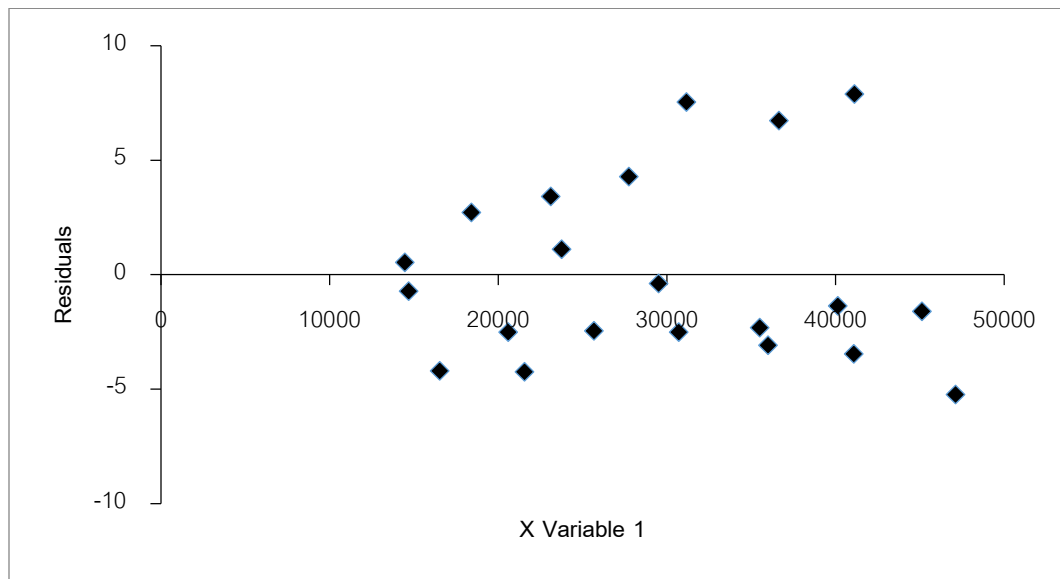
6.2. ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) โดยการเตรียม calibration curve ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 60 – 120 µg/mL (60, 70, 80, 90, 100, 110 และ 120 µg/mL) ได้ผลดังตารางที่ 10 - 13 รูปที่ 3 และ 4

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบ linearity ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ TTAB

Concentration (µg/mL)	Area		
	Day 1	Day 2	Day 3
60	16,545	14,703	14,469
70	21,581	20,611	18,424
80	25,682	23,771	23,136
90	30,718	29,532	27,767
100	36,022	35,511	31,175
110	40,158	41,096	36,651
120	47,141	45,148	41,128
Slope	485.47		
Intercept	-14123		
r^2	0.999		



รูปที่ 3 ผลการทดสอบ linearity ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ TTAB



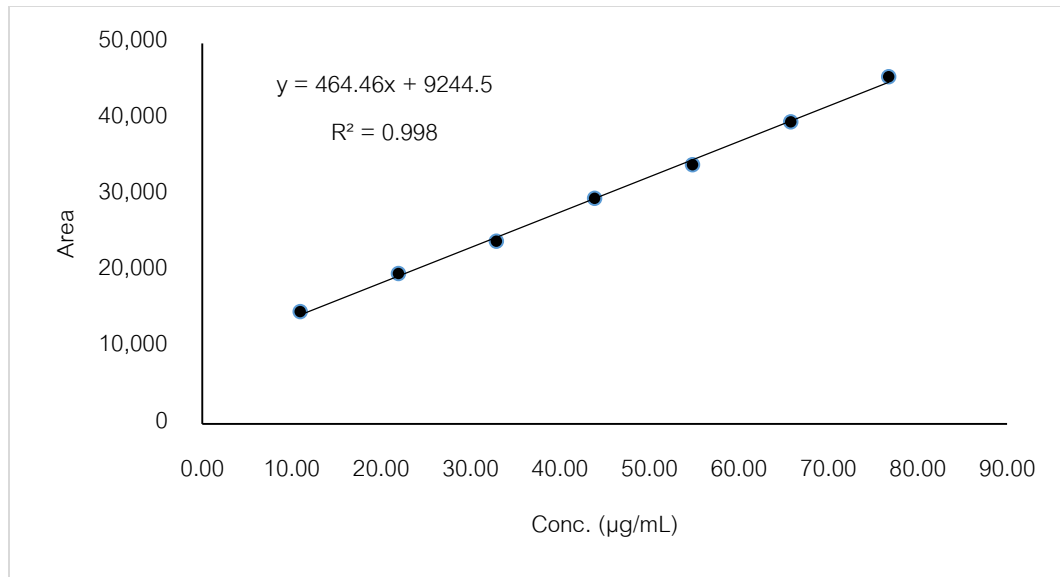
รูปที่ 4 residual plot ของสารสำคัญ TTAB

ตารางที่ 11 ผล ANOVA table ของ TTAB

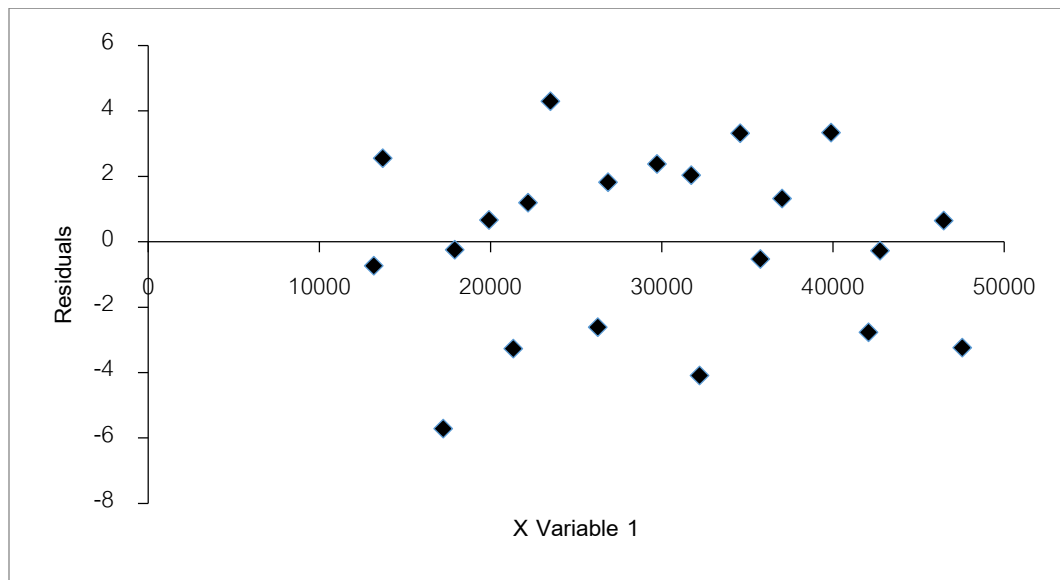
			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Ratio * Conc	Between Groups	(Combined)	3884278295.905	6	647379715.98	139.40	.000
		Linearity	3862938315.006	1	3862938315.01	831.80	.000
		Deviation from Linearity	21339980.899	5	4267996.18	.919	.480
	Within Groups		162543538	35	4644101.09		
	Total		4046821833.905	41			

ตารางที่ 12 ผลการทดสอบ linearity ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ nonylphenol ethoxylates

Concentration (µg/mL)	Area		
	Day 1	Day 2	Day 3
60	13705	13183	17245
70	19915	17918	21329
80	23503	22201	26268
90	29727	26872	32219
100	34592	31736	35775
110	39894	37037	42090
120	46486	42762	47562
Slope	464.46		
Intercept	+9244.5		
r^2	0.998		



รูปที่ 5 ผลการทดสอบ linearity ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ nonylphenol ethoxylates



รูปที่ 6 residual plot ของสารสำคัญ nonylphenol ethoxylates

ตารางที่ 13 ผล ANOVA table ของ nonylphenol ethoxylates

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Ratio * Conc	Between Groups	(Combined)	4367976238.24	6	727996039.71	167.176	.000
		Linearity	4359077654.17	1	4359077654.17	167.176	.000
		Deviation from Linearity	8898584.07	5	1779716.81	.409	.839
	Within Groups		152413738.83	35	4354678.25		
	Total		4520389977.07	41			

6.3. ผลการทดสอบ accuracy และ precision ของ tetradecyltrimethylammonium bromide และ nonylphenol ethoxylates ตามตารางที่ 14– 19

ตารางที่ 14 ผลการทดสอบ accuracy และ precision ของ TTAB

No.	Tetradecyltrimethylammonium bromide								
	Day 1			Day 2			Day 3		
	80 (µg/mL)	90 (µg/mL)	100 (µg/mL)	80 (µg/mL)	90 (µg/mL)	100 (µg/mL)	80 (µg/mL)	90 (µg/mL)	100 (µg/mL)
1	96.66	101.68	107.59	96.36	104.04	112.03	92.34	99.71	108.81
2	95.38	101.14	109.22	96.06	103.57	112.58	92.02	99.45	107.95
3	96.22	100.74	108.71	96.49	103.98	112.35	92.28	100.25	110.20
4	94.85	101.39	110.58	97.33	104.17	112.63	92.52	99.94	109.02
5	96.21	101.57	110.54	96.35	103.94	112.42	92.96	99.63	109.44
6	95.73	101.40	110.27	95.83	104.35	112.58	92.51	100.25	109.79
7	94.19	102.74	111.46	95.55	104.16	112.68	92.78	100.21	109.40
Average	95.6	101.5	109.8	96.3	104.0	112.5	92.5	99.9	109.2
SD	0.9	0.6	1.3	0.6	0.2	0.2	0.3	0.3	0.7
%RSD	0.91	0.61	1.21	0.59	0.23	0.20	0.34	0.33	0.67
%Recovery	101.7	99.3	101.6	96.8	96.0	104.2	101.0	104.3	102.4

ตารางที่ 15 ผลการทดสอบ accuracy และ precision ของ nonylphenol ethoxylates

No.	Nonylphenol ethoxylates								
	Day 1			Day 2			Day 3		
	80	90	100	80	90	100	80	90	100
	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)
1	100.78	109.67	118.93	100.92	110.99	115.15	97.01	106.52	115.65
2	100.70	109.04	119.60	100.12	111.94	114.78	97.43	106.03	114.79
3	100.61	109.70	119.25	100.57	112.06	114.77	97.36	106.71	115.54
4	101.36	110.30	119.12	100.55	109.71	114.95	97.20	106.78	114.65
5	100.44	110.13	119.46	101.92	109.70	115.14	97.64	106.33	114.80
6	100.58	111.04	119.26	101.32	109.72	115.41	98.10	106.70	114.35
7	100.95	111.37	119.24	101.48	110.83	115.46	98.21	106.59	114.83
Average	100.8	110.2	119.3	101.0	110.7	115.1	97.6	106.5	114.9
SD	0.3	0.8	0.2	0.6	1.0	0.3	0.5	0.3	0.5
%RSD	0.30	0.74	0.18	0.62	0.93	0.24	0.46	0.25	0.41
%Recovery	96.2	103.36	101.1	97.5	99.9	101.5	102.4	104.3	101.9

ตารางที่ 16 ผลการทดสอบ precision ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ TTAB

No.	sample 3 %W/V		
	Day 1	Day 2	Day 3
1	3.00	3.11	3.18
2	3.05	3.08	3.15
3	3.02	3.11	3.16
4	3.02	3.12	3.10
5	2.95	3.11	3.17
6	2.99	3.12	3.10
7	3.01	3.13	3.16
8	3.11	3.11	3.21
9	3.09	3.12	3.11
10	3.13	3.11	3.04
Mean	3.04	3.11	3.14
SD	0.056	0.014	0.057
%RSD	1.85	0.46	1.60

ตารางที่ 17 ผลการทดสอบ precision ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ nonylphenol ethoxylates

No.	sample 3 %W/V		
	Day 1	Day 2	Day 3
1	2.83	2.85	2.91
2	2.92	2.89	2.88
3	2.93	2.89	2.85
4	2.92	2.91	2.93
5	2.90	2.86	2.93
6	2.93	2.97	2.93
7	2.93	2.92	2.98
8	2.79	2.92	2.98
9	2.89	2.88	2.90
10	2.87	2.87	2.83
Mean	2.89	2.90	2.91
SD	0.048	0.035	0.049
%RSD	1.67	1.22	1.68

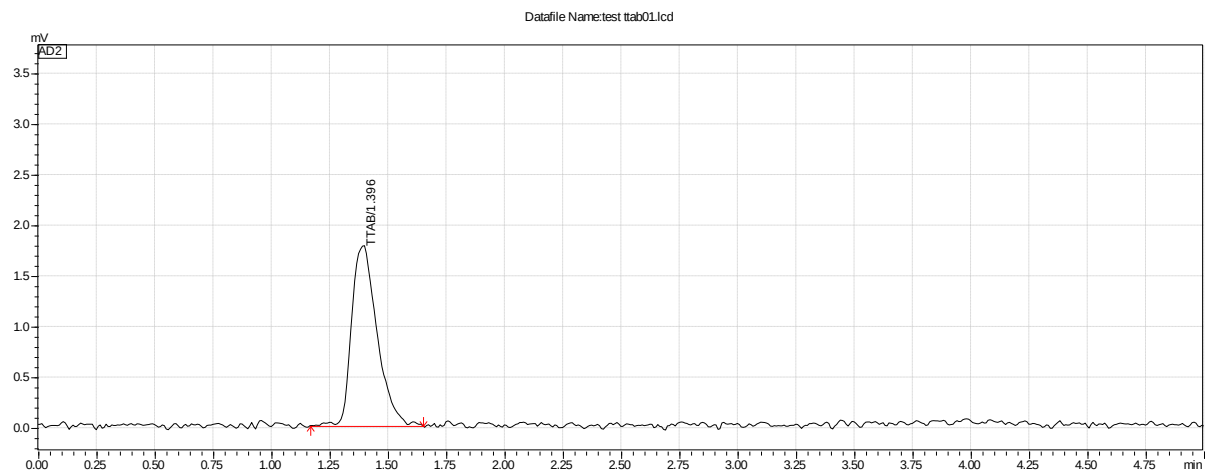
ตารางที่ 18 intermediate precision ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ TTAB

Sample Conc. (%W/V)	Mean conc. (%W/V)	%RSD
3	3.10 (n=30)	1.98

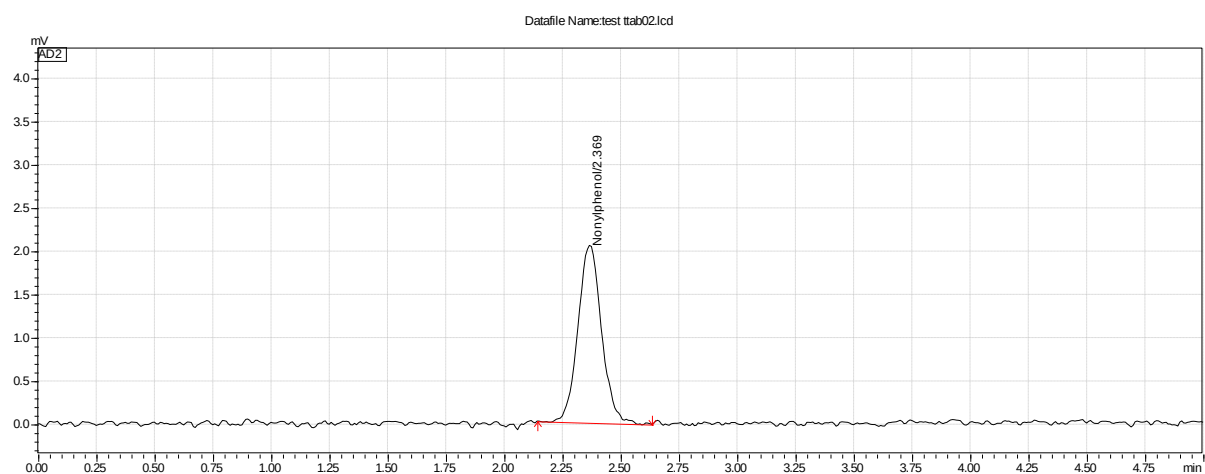
ตารางที่ 19 intermediate precision ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ nonylphenol ethoxylates

Sample Conc. (%W/V)	Mean conc. (%W/V)	%RSD
3	2.90 (n=30)	1.52

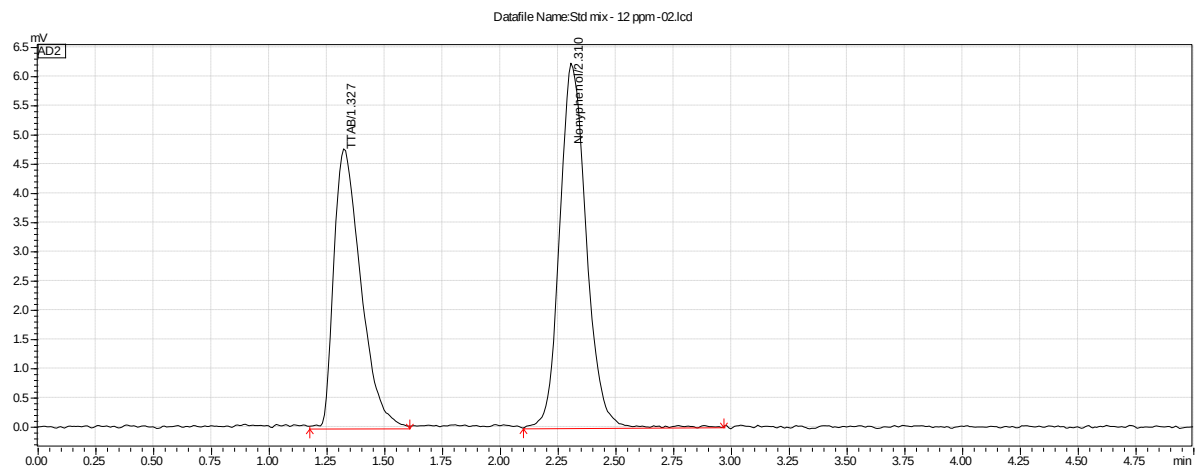
6.4. ผลการทดสอบ selectivity โดยการตรวจสอบความสามารถของการแยก (resolution) สารสำคัญ TTAB และ nonylphenol ethoxylates สามารถแยกออกจากกันได้ โดยมีค่า resolution เท่ากับ 4.44 ตามรูปที่ 7 – 9



รูปที่ 7 แสดง chromatogram ของสารมาตรฐาน TTAB

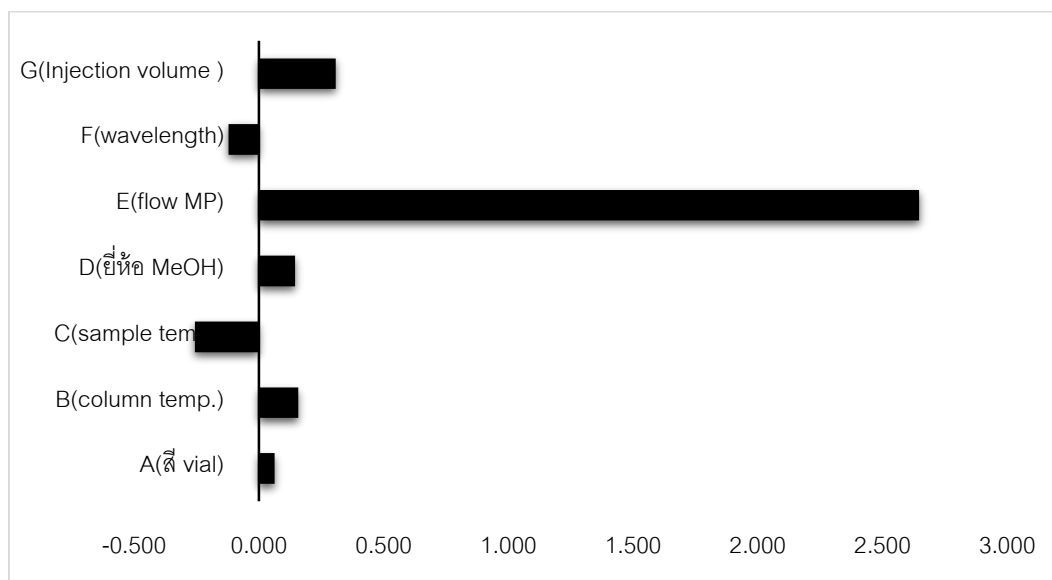


รูปที่ 8 แสดง chromatogram ของสารมาตรฐาน nonylphenol ethoxylates

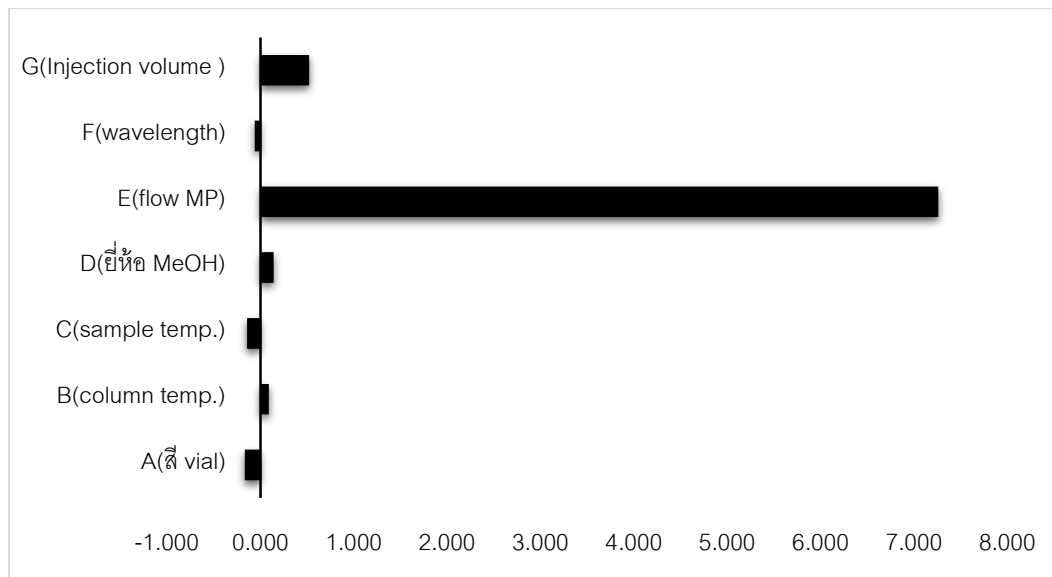


รูปที่ 9 แสดง chromatogram ของสารมาตรฐาน TTAB และ nonylphenol ethoxylates

6.5. ผลการทดสอบ robustness จากรูปที่ 10 และ 11 พบว่าปัจจัยที่มีแนวโน้มส่งผลต่อการทดสอบคือ การเปลี่ยน flow rate ของ mobile phase



รูปที่ 10 แสดงผล Robustness ของสารสำคัญ TTAB



รูปที่ 11 แสดงผล Robustness ของสารสำคัญ nonylphenol ethoxylates

7. สรุปผลการทดลอง

วิธีทดสอบหาปริมาณสารสำคัญ tetradecyltrimethylammonium bromide และ nonylphenol ethoxylates ดัดแปลงตามวิธีของ Ryu et al. (2007) แล้วได้ดำเนินการทดสอบความใช้ได้ของวิธีในหัวข้อ ช่วงของการวิเคราะห์ ความเป็นเส้นตรง accuracy, precision, selectivity และ robustness ทุก parameter ได้ผลการทดสอบเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ ซึ่งสามารถนำวิธีดังกล่าวไปตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ต่อไป

8. ข้อเสนอแนะ

การทดสอบหาปริมาณสารสำคัญ tetradecyltrimethylammonium bromide และ nonylphenol ethoxylates ด้วย UHPLC-ELSD มีความไวต่อการปรับเปลี่ยน flow rate ของ mobile phase เป็นอย่างมาก การปรับเปลี่ยนเพียง ± 0.1 mL/min ก็ส่งผลกระทบต่อการทดสอบ โดยการวิเคราะห์ผลการทดสอบ robustness

9. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ที่พิจารณาให้ดำเนินการในปีงบประมาณ 2561 เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ที่ช่วยเหลือในการปฏิบัติงานให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

10. เอกสารอ้างอิง

AOAC 2016 .AOAC Guidelines for Standard Method Performance Requirements .Appendix F .pp.1-18 .In Official Methods of Analysis .19th eds .Gaithersburg, MD :AOAC INTERNATIONAL .

Im, S.H., Y.H. Jeong and J.J. Ryoo. (2008). Simultaneous analysis of anionic, amphoteric, nonionic and cationic surfactant mixtures in shampoo and hair conditioner by RP-HPLC/ELSD and LC/MS. Anal. Chim. Acta 619, 129 – 136.

Plomley, J.B., P.W. Crozier and V.Y. Taguchi. (1999). Characterization of nonyl phenol ethoxylates in sewage treatment plants by combined precursor ion scanning and multiple reaction monitoring. J. Chromatography A. 854, 245 – 257.

Ryu, H.R., H.S. Park and C.K. Rhee. (2007). Universal LC Method for a Determination of Fourteen Cationic Surfactants Widely Used in Surfactant Industry. Bull. Korean Chem. Soc. 28, 85 – 88.