

**การพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ Cyphenothrin และ
Pyrethrins และการทวนสอบวิธีวิเคราะห์ Fipronil
ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์**

นางสุนันท์ กิตติจาววัฒนา นายชูศักดิ์ อาจสูงเนิน
นายองอาจ บุญบรรลุ นางสาวมลทิพย์ บุญชีวิต นายธิตี รุจิเชาว์

บทคัดย่อ

ทำการพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสารสำคัญ cyphenothrin ด้วยเทคนิค Gas Chromatography-Flame Ionization Detector (GC-FID) และ pyrethrins ด้วยเทคนิค Ultra High-Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector (UHPLC-DAD) และทวนสอบวิธีวิเคราะห์ fipronil ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector (HPLC-DAD) ซึ่งวิธีที่ 1 การพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสารสำคัญ cyphenothrin ศึกษา linearity ที่ระดับความเข้มข้น 0.30 - 0.90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.9995 การทดสอบความแม่นยำ (accuracy) ประเมินจาก %recovery อยู่ในช่วง 96.0 - 103.6 % และมี intermediate precision เท่ากับ 2.72 %RSD วิธีที่ 2 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ pyrethrins ซึ่งประกอบด้วย pyrethrin I และ pyrethrin II ศึกษา linearity ที่ระดับความเข้มข้น 60 -120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่า r เท่ากับ 0.9983 และ 0.9980 ตามลำดับ มีค่า % recovery อยู่ในช่วง 97.9 -102.4 และ 96.9 - 103.3 % ตามลำดับ และมี intermediate precision เท่ากับ 0.37 และ 1.03 ตามลำดับ และวิธีที่ 3 การทวนสอบวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ fipronil ศึกษา linearity ที่ระดับความเข้มข้น 0.10 - 0.40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่า r เท่ากับ 0.9999 มีค่า %recovery อยู่ในช่วง 98.0 - 101.8 % และมี intermediate precision เท่ากับ 0.31 %RSD ดังนั้นวิธีทั้งสามวิธีมีความเหมาะสมในการนำไปตรวจหาปริมาณสารสำคัญทั้ง 3 ชนิด ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ได้ต่อไป

คำสำคัญ : Cyphenothrin, Fipronil, Pyrethrins , GC-FID, HPLC-DAD, UHPLC-DAD

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Method Development and Validation for the Determination of Cyphenothrin and Pyrethrins and Method Verification for Fipronil Determination in Hazardous Substances Products for Livestock

Sunan Kittijaruwattana, Chusak Ardsongnearn,
Ongart Boonbanlu, Molthip Booncheewit, Titi Rujichao

Abstract

Method developments and validation for cyphenothrin using gas chromatography -flame ionization detector (GC-FID), pyrethrins using ultra high performance liquid chromatography - diode array detector (UHPLC-DAD) techniques, and method verification for fipronil using high performance liquid chromatography - diode array detector (HPLC -DAD) technique were conducted separately. The linearity of the first method - cyphenothrin was evaluated at the concentration range of 0.30 – 0.90 mg/mL. The correlation coefficients (r) was 0.9995. The accuracy (%recovery) ranged from 96.0 - 103.6 % and intermediate precision was 2.72 %RSD. The linearity of the second method - pyrethrins (pyrethrin I and pyrethrin II) were studied at the concentration range of 60 – 120 µg/mL. The correlation coefficients (r) of two compounds were 0.9983 and 0.9980, respectively. The accuracy (%recovery) and intermediate precision of both compounds ranged from 96.9 - 103.3 % and 0.37 - 1.03 %RSD, respectively. The third method for fipronil determination was verified. The linearity was evaluated at the concentration range of 0.10 - 0.40 mg/mL. The correlation coefficients (r) was 0.9999. The accuracy (%recovery) ranged from 98.01 - 101.84 % and intermediate precision was 0.31 %RSD. The result of the method validation and verification showed that these methods are suitable for the determination of three active ingredients in livestock hazardous products.

Keywords : Cyphenothrin, Fipronil, Pyrethrins, GC-FID, HPLC-DAD, UHPLC-DAD

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

โครงการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ Cyphenothrin, Fipronil และ Pyrethrins ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์

ผู้ดำเนินงาน

1. นางสุนันท์ กิตติจาววัฒนา
2. นายชูศักดิ์ อาจสูงเนิน
3. นายองอาจ บุญบรรลุ
4. นางสาวมลทิพย์ บุญชีวีต
5. นายธิตติ รุจิเชาว์

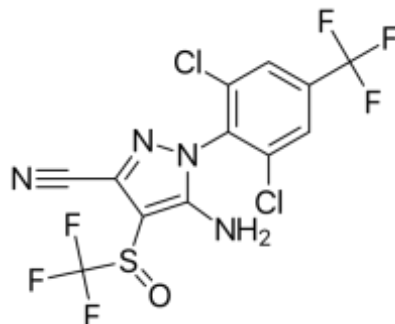
บทนำ

ในปัจจุบันวงการปศุสัตว์พบปัญหาแมลงและสัตว์รบกวนการเลี้ยงสัตว์และการผลิตสินค้าที่แปรรูปจากสัตว์เป็นอย่างมาก โดยเฉพาะในภาวะวิกฤตทางธรรมชาติ เช่น ภาวะน้ำท่วม น้ำแล้ง ยิ่งส่งผลให้เกิดปัญหาการรบกวนจากแมลงต่างๆ ดังนั้นการเลือกใช้ผลิตภัณฑ์กำจัดปรสิต แมลง และสัตว์รบกวน จึงเป็นทางเลือกสำคัญในการแก้ปัญหาดังกล่าว มูลค่าทางการตลาดของผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์จึงมีการเติบโตที่สูงขึ้น เกิดการแข่งขันระหว่างผลิตภัณฑ์ที่มีอยู่เป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องมีการตรวจสอบปริมาณสารสำคัญตามที่ระบุไว้ในฉลากผลิตภัณฑ์ เพื่อให้ผลิตภัณฑ์มีคุณภาพและป้องกันผลกระทบต่อการเลี้ยงสัตว์ที่อาจมีความเสี่ยงในการได้รับอันตรายจากการใช้ หรือหากผลิตภัณฑ์นั้นมีปริมาณมากเกินกว่าระบุไว้ อาจทำให้เกิดการตกค้าง ซึ่งจะก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม

กรมปศุสัตว์ได้รับมอบหมายให้เป็นหน่วยงานรับผิดชอบวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 ตามมติของคณะกรรมการวัตถุอันตรายในการประชุมครั้งที่ 19-5/2546 เมื่อวันที่ 26 ธันวาคม พ.ศ. 2546 และตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่องการขึ้นทะเบียนวัตถุอันตราย ที่กรมปศุสัตว์เป็นผู้รับผิดชอบ พ.ศ. 2549 ลงวันที่ 31 มีนาคม 2549 โดยสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ได้รับมอบหมายให้ดำเนินการพัฒนาห้องปฏิบัติการเพื่อรองรับการตรวจสอบประสิทธิภาพและคุณภาพผลิตภัณฑ์วัตถุอันตราย

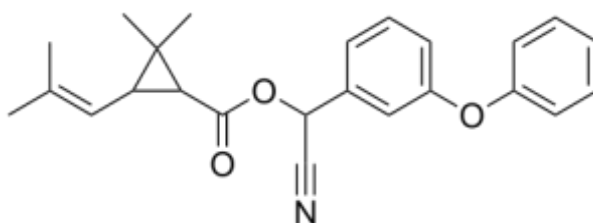
Fipronil เป็นสารฆ่าแมลงในกลุ่มฟีนิลไพราโซล (phenylpyrazole) โดยออกจำหน่ายเป็นครั้งแรกในสหรัฐอเมริกาเมื่อปีพ.ศ. 2539 เพื่อใช้เป็นผลิตภัณฑ์ควบคุมแมลงในบ้านและในสัตว์เลี้ยง

โดยปรากฏในผลิตภัณฑ์รูปแบบต่าง ๆ ได้แก่ กับดักแมลงสาบและมด สเปรย์และยาหยดภายนอก สำหรับสุนัขเพื่อกำจัดเห็บและหมัด



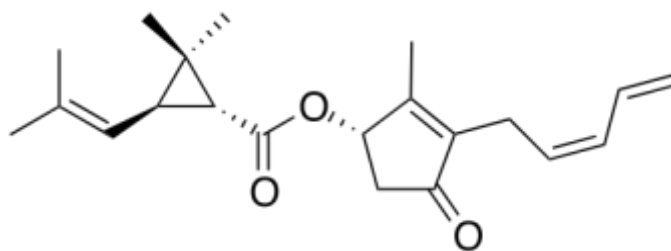
รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ fipronil

Fipronil ออกฤทธิ์ในการกำจัดเห็บและหมัดโดยรบกวนการทำงานของระบบประสาท โดยผ่านทาง GABA-gated chloride channel ขัดขวางการไหลผ่านของคลอไรด์ไอออนในเซลล์ประสาท ทำให้การทำงานของระบบประสาทผิดปกติ มีผลให้แมลงตายในที่สุด ข้อดีของ fipronil คือเป็นพิษต่อระบบประสาทเฉพาะของแมลง เนื่องจาก fipronil จับได้ไม่ดีกับ GABA receptor ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง เมื่อหยดยา fipronil บนผิวหนังของสุนัข ยาจะกระจายตัวไปตามผิวหนัง และมักพบอยู่กับสารถัดหลังจากต่อมไขมัน ยาออกฤทธิ์อยู่นานประมาณหนึ่งเดือน



รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของ cyphenothrin

Cyphenothrin เป็นยาฆ่าแมลงในกลุ่ม synthetic pyrethroid ที่นิยมใช้กำจัดแมลง ได้แก่ แมลงสาบ (Tilak et al., 2005) สารกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ในการกำจัดแมลงโดยเกิดพิษที่ระบบประสาทของแมลง ออกฤทธิ์เร็ว มีความเป็นพิษในสัตว์เลือดอุ่นค่อนข้างต่ำ สลายตัวได้เร็ว นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย



รูปที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของ pyrethrins

Pyrethrin เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีฤทธิ์ฆ่าแมลง โดยการส่งผลกระทบต่อระบบประสาท สามารถสังเคราะห์ได้จากดอกไม้ประเภทเบญจมาศ หรือชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Chrysanthemum cinerariifolium* ซึ่ง pyrethrin จะมีกลุ่มย่อยตามโครงสร้าง 6 ชนิดด้วยกันได้แก่ pyrethrin I, cinerin I, jasmolin I, pyrethrin II, cinerin II, และ jasmolin II สาร pyrethrin ได้รับความนิยมมาอย่างยาวนาน เนื่องจากความง่ายในการสกัดและมีความเป็นพิษต่อมนุษย์ที่ต่ำ ทำให้นิยมใช้ผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ฆ่าแมลงและเชมพูสำหรับคนและสัตว์ แต่ pyrethrin ก็สามารถทำให้เกิดภูมิแพ้ได้ในกรณีคนที่มีร่างกายอ่อนแอ จึงต้องใช้ความระมัดระวังเป็นอย่างมาก ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องมีเทคนิคการวิเคราะห์ที่ดีขึ้น เพื่อให้มั่นใจว่าสามารถตรวจสอบถึงปริมาณ pyrethrins ที่บรรจุผลิตภัณฑ์นั้นได้อย่างแม่นยำ

1. วัตถุประสงค์

- 1.1. เพื่อทวนสอบของวิธีวิเคราะห์ fipronil ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ ตามวิธี CIPAC
- 1.2. เพื่อพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ cyphenothrin และ pyrethrins ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์

2. ขอบข่าย

ใช้สำหรับวิเคราะห์ cyphenothrin, fipronil และ pyrethrins ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์

3. ประโยชน์ที่ได้รับ

ได้วิธีที่ผ่านการทวนสอบและทดสอบความใช้ได้ของวิธี สามารถนำไปตรวจวิเคราะห์ cyphenothrin, fipronil และ pyrethrins ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์

4. วิธีดำเนินการ

4.1. เครื่องมือและอุปกรณ์

- 4.1.1. เครื่อง GC-FID ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น 2010 Plus
- 4.1.2. เครื่อง HPLC ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น LC-20 พร้อมเครื่องตรวจวัดชนิด DAD
- 4.1.3. เครื่อง UHPLC ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น LC-30 พร้อมเครื่องตรวจวัดชนิด DAD

4.2. วัสดุวิทยาศาสตร์

- 4.2.1. Propan-2-ol, AR grade
- 4.2.2. Acetone, HPLC grade และ Pesticide grade
- 4.2.3. Acetonitrile, AR grade และ HPLC grade
- 4.2.4. GC column DB-17, 30 m x 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 μ m ยี่ห้อ Agilent
- 4.2.5. HPLC column C18, 250 x 4.0 mm ID, 5 μ m ยี่ห้อ Vertical
- 4.2.6. UHPLC column Kinetex C18, 1.7 μ m 2.1 x 100 mm ยี่ห้อ Phenomenex
- 4.2.7. สารมาตรฐาน fipronil ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer lot. G126125 ความบริสุทธิ์ 98.7 %
- 4.2.8. สารมาตรฐาน fipronil ยี่ห้อ Chem servicelot lot. 4792400 ความบริสุทธิ์ 99.5%
- 4.2.9. สารมาตรฐาน cyphenothrin ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer lot. G155446 ความบริสุทธิ์ 98.1%
- 4.2.10. สารมาตรฐาน cyphenothrin ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer lot. 31015 ความบริสุทธิ์ 93.5%
- 4.2.11. สารมาตรฐาน triphenyl phosphate ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer lot. 20717 ความบริสุทธิ์ 27.0%
- 4.2.12. สารมาตรฐาน pyrethrin ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer lot. C1789300 ความบริสุทธิ์ 99.4%
- 4.2.13. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุอันตราย ยี่ห้อ แอสการ์ด (fipronil 5% W/V EC)
- 4.2.14. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุอันตราย ยี่ห้อ เพสกาต สเปนซ์ (cyphenothrin 12% W/V)
- 4.2.15. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุอันตราย ยี่ห้อ BAS 39311I (pyrethrin 3.0 % W/V)

4.3. ขั้นตอนการวิเคราะห์

- 4.3.1. การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ cyphenothrin ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายด้านการปลูสดัก ด้วยเทคนิค GC-FID ตามวิธีของ (CIPAC, 2006) ซึ่งมี condition ตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 condition สำหรับทดสอบ cyphenothrin แบบ temperature program

Parameter	วิธีตาม paper		
Column	DB- 17, 30 m x 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 μ m		
Injector mode	Split		
Split flow	100 mL /min		
Injector volume	2 μ L		
Injector temp.	280 $^{\circ}$ C		
Column temp.	temperature program		
	rate ($^{\circ}$ C)	temp. ($^{\circ}$ C)	hold (min)
	-	220	0
	2	245	0
	10	260	4
Detector temp.	280 $^{\circ}$ C		
Detector	FID		

- 4.3.2. เตรียม stock standard solution (stock std.) ความเข้มข้น 10.0 mg/mL :
เนื่องจากสารมาตรฐาน cyphenothrin นั้นมีลักษณะเป็นเจล แต่ไม่สามารถชั่งได้ ดังนั้นจึงเติม acetone ลงไปในขวดสารมาตรฐานประมาณ 2 mL เพื่อให้ละลาย vortex 1 นาที จากนั้นใช้ micropipette ดูดสารละลายลงใน volumetric flask ขนาด 10 mL ทำ 3 ขั้ว หรือจนแน่ใจว่าไม่เหลือสารมาตรฐานในขวดแล้ว และปรับปริมาตรด้วย acetone

- 4.3.3. เตรียม internal standard solution (IS) ความเข้มข้น 10.0 mg/mL: ชั่งสารมาตรฐาน triphenyl phosphate ประมาณ 500 mg (บันทึกน้ำหนักจริง) ลงใน volumetric flask ขนาด 50 mL ปรับปริมาตรด้วย acetone
- 4.3.4. เตรียม sample solution ความเข้มข้น 5.0 mg/mL: ชั่งตัวอย่าง ยี่ห้อ เพส กาด สเปนซ์ ประมาณ 4166 ± 250 mg (บันทึกน้ำหนักจริง) ลงใน volumetric flask ขนาด 100 mL ปรับปริมาตรด้วย acetone
- 4.3.5. การทดสอบช่วงของการวิเคราะห์ (range) โดยเตรียม calibration curve ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.05 – 1.0 mg/mL (0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 และ 1.0 mg/mL) โดยเตรียมตามตารางที่ 2 ซึ่งเตรียมความเข้มข้นละ 1 ซ้ำๆ ละ 2 injection

ตารางที่ 2 การเตรียม solution สำหรับทดสอบ range ของ cyphenothrin

No.	Stock sample (5 mg/mL)	IS (10 mg/mL)	Final volume (acetone)	Final Conc. std	Final Conc. IS
1	50 μ L	250 μ L	5 mL	0.05 mg/mL	0.50 mg/mL
2	100 μ L	250 μ L	5 mL	0.10 mg/mL	0.50 mg/mL
3	200 μ L	250 μ L	5 mL	0.20 mg/mL	0.50 mg/mL
4	300 μ L	250 μ L	5 mL	0.30 mg/mL	0.50 mg/mL
5	400 μ L	250 μ L	5 mL	0.40 mg/mL	0.50 mg/mL
6	500 μ L	250 μ L	5 mL	0.50 mg/mL	0.50 mg/mL
7	600 μ L	250 μ L	5 mL	0.60 mg/mL	0.50 mg/mL
8	700 μ L	250 μ L	5 mL	0.70 mg/mL	0.50 mg/mL
9	800 μ L	250 μ L	5 mL	0.80 mg/mL	0.50 mg/mL
10	1000 μ L	250 μ L	5 mL	1.00 mg/mL	0.50 mg/mL

4.3.6. ทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) โดยเตรียม calibration curve ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.3 – 0.9 mg/mL (0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 และ 0.9 mg/mL) และ internal standard solution ความเข้มข้น 0.5 mg/mL ซึ่งเตรียมตามตารางที่ 3 และเตรียมความเข้มข้นละ 1 ซ้ำๆ ละ 2 injection ทดสอบ 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 3 การเตรียม solution สำหรับทดสอบ linearity ของ cyphenothrin

No.	Stock std. (10 mg/mL)	IS (10 mg/mL)	Final volume (acetone)	Final Conc. std	Final Conc. IS
1	300 μ L	500 μ L	10 mL	0.3 mg/mL	0.5 mg/mL
2	400 μ L	500 μ L	10 mL	0.4 mg/mL	0.5 mg/mL
3	500 μ L	500 μ L	10 mL	0.5 mg/mL	0.5 mg/mL
4	600 μ L	500 μ L	10 mL	0.6 mg/mL	0.5 mg/mL
5	700 μ L	500 μ L	10 mL	0.7 mg/mL	0.5 mg/mL
6	800 μ L	500 μ L	10 mL	0.8 mg/mL	0.5 mg/mL
7	900 μ L	500 μ L	10 mL	0.9 mg/mL	0.5 mg/mL

4.3.7. การทดสอบ accuracy การทำทดสอบ standard addition ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.5, 0.6 และ 0.7 mg/mL ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมตามตารางที่ 4 ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำๆ ละ 2 injection ทดสอบ 3 วัน เกณฑ์การยอมรับ % recovery อยู่ในช่วง 95 – 105 และ %RSD ≤ 3.7 (AOAC, 2016)

ตารางที่ 4 การเตรียม standard addition ของ cyphenothrin

No.	Stock std. (10 mg/mL)	Stock sample (5 mg/mL)	IS (10 mg/mL)	Final Vol. (acetone)	Total Conc.	Final Conc. (Std+Stock sample)
1	100 µL	300 µL	250 µL	5 mL	Stock std. 0.2 mg/mL Stock sample 0.3 mg/mL IS 0.5 mg/mL	0.5 mg/mL
2	150 µL	300 µL	250 µL	5 mL	Stock std. 0.3 mg/mL Stock sample 0.3 mg/mL IS 0.5 mg/mL	0.6 mg/mL
3	200 µL	300 µL	250 µL	5 mL	Stock std. 0.4 mg/mL Stock sample 0.3 mg/mL IS 0.5 mg/mL	0.7 mg/mL

4.3.8. การทดสอบ precision โดยเตรียมตัวอย่าง ความเข้มข้น 0.6 mg/mL : ชั่งตัวอย่าง ประมาณ 50 ± 5 mg (บันทึกน้ำหนักจริง) ลงใน volumetric flask ขนาด 10 mL และเติม internal standard solution ลงไปประมาณ 0.5 mL และปรับปริมาตรด้วย acetone ทดสอบ 10 ซ้ำๆ ละ 2 injection เป็นเวลา 3 วัน เกณฑ์การยอมรับ $\%RSD \leq 3.7$ (AOAC, 2016)

4.3.9. ทดสอบความจำเพาะเจาะจงต่อสารที่ทดสอบ (selectivity) โดยแสดงความสามารถของการแยกของสาร (resolution) ของสารที่คาดว่าจะมีผลกระทบต่อนสารตัวอย่าง ซึ่งใช้สารมาตรฐานในกลุ่ม pyrethroids ที่ความเข้มข้น 0.6 mg/mL

4.3.10. ทดสอบ robustness เป็นการทดสอบความคงทนของวิธีว่าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงปัจจัยที่ใช้ในการทดสอบแล้วจะยังให้ผลการทดสอบเหมือนเดิมหรือไม่ โดยมีปัจจัยต่างๆตามตารางที่ 5 และวางแผนการทดสอบตามวิธีของ Youden's ตามตารางที่ 6 โดยเตรียม standard solution (stock B) ที่ความเข้มข้น 0.6 mg/mL และ internal standard solution ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/mL ซึ่งเตรียมจำนวน 2 ซ้ำๆ ละ 2 injection

ตารางที่ 5 parameter ที่ใช้ในการทดสอบ robustness

Factor	Units	Limits	Level (-1)	Level (+1)	Nominal value
สีของ vial (A/a)	-	-	สีขา = A	สีใส่ = a	-
Injector temp. (B/b)	°C	±4	276 = B	284 = b	280
Detector temp. (C/c)	°C	±4	276 = C	284 = c	280
Initial temp. for temperature program (D/d)	°C	±4	216 = D	224 = d	220
Final temp. for temperature program (E/e)	°C	±4	256 = E	264 = e	260
Split ratio (F/f)	-	±1	49 = F	51 = f	50
Grade of acetone (G/g)	-	-	HPLC = G	pesticide =g	-

ตารางที่ 6 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
Injector temp.	B	B	b	b	B	B	b	b
Detector temp.	C	c	C	c	C	c	C	c
Initial temp. for temp. program	D	D	d	d	d	d	D	D
Final temp. for temp. program	E	e	E	e	e	E	e	E
Split ratio	F	f	f	F	F	f	f	F
Grade of acetone	G	g	g	G	g	G	G	g
ผล	S	T	U	V	W	X	Y	Z

4.4. การทวนสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ fipronil ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายด้านการ
 ปศุสัตว์ ด้วยเทคนิค HPLC-DAD (CIPAC, 2000) ซึ่งมี condition ตามตารางที่ 7
 ตารางที่ 7 condition สำหรับทดสอบ fipronil

Parameter	วิธีตาม paper
Column	C18, 250 x 4.0 mm ID, 5 μ m
Mobile phase	acetonitrile : water (65 : 35, V/V)
Flow rate	1.0 mL/min
Injector volume	5 μ L
Column temp.	40 °C
Detector	UV detector, wavelength 280 nm
Run time	12 นาที

- 4.4.1. การเตรียม stock standard solution (stock std.) ความเข้มข้น 2.50 mg/mL : ชั่งสารมาตรฐาน fipronil ประมาณ 63.32 mg (บันทึกน้ำหนักจริง) ลงใน volumetric flask ขนาด 25 mL เติม propan-2-ol, AR grade ลงไปประมาณ 15 mL sonicate เป็นเวลา 10 นาที และปรับปริมาตรด้วย propan-2-ol, AR grade
- 4.4.2. การเตรียมตัวอย่าง fipronil ความเข้มข้น 2.50 mg/mL : ชั่งตัวอย่างยี่ห้อ แอสการ์ด ประมาณ 2500 ± 250 mg (บันทึกน้ำหนักจริง) ลงใน volumetric flask ขนาด 50 mL เติม propan-2-ol, AR grade ลงไปประมาณ 35 mL sonicate เป็นเวลา 10 นาที และปรับปริมาตรด้วย propan-2-ol, AR grade
- 4.4.3. การทดสอบช่วงของการวิเคราะห์ (range) โดยเตรียม calibration curve ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.01 – 1.00 mg/mL (0.01, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.40, 0.50 และ 1.00 mg/mL) โดยเตรียมตามตารางที่ 8 ซึ่งเตรียมความเข้มข้นละ 2 ซ้ำๆ ละ 2 injection

ตารางที่ 8 การเตรียม solution สำหรับทดสอบ range ของ fipronil

No.	Stock std. (2.5 mg/mL)	Final Volume (mL)	Final Conc. (mg/mL)
1	20 µL	5	0.01
2	100 µL	5	0.05
3	200 µL	5	0.10
4	300 µL	5	0.15
5	400 µL	5	0.20
6	500 µL	5	0.25
7	600 µL	5	0.30
8	800 µL	5	0.40
9	1000 µL	5	0.50
10	2000 µL	5	1.00

4.4.4. ทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) โดยการเตรียม calibration curve ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.10 – 0.40 mg/mL (0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35 และ 0.40 mg/mL) โดยเตรียมตามตารางที่ 9 ซึ่งเตรียมความเข้มข้นละ 1 ขั้วๆละ 3 injection และทำการทดสอบ 3 วัน นำค่าพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานและความเข้มข้นไปสร้างกราฟหาค่า correlation coefficient (r) ซึ่งเกณฑ์การยอมรับ $r > 0.99$ (CIPAC, 2003) และทดสอบความเป็นเส้นตรงโดยใช้ ANOVA Deviation from Linearity โดยค่า p -value > 0.05 และใช้ visual inspection ของ residual ($y - y'$) การกระจายแบบ random

ตารางที่ 9 การเตรียม solution สำหรับทดสอบ linearity ของ fipronil

No.	Stock std. (2.5 mg/mL)	Final Volume	Final Conc.
1	200 µL	5 mL	0.10 mg/mL
2	300 µL	5 mL	0.15 mg/mL
3	400 µL	5 mL	0.20 mg/mL
4	500 µL	5 mL	0.25 mg/mL
5	600 µL	5 mL	0.30 mg/mL
6	700 µL	5 mL	0.35 mg/mL
7	800 µL	5 mL	0.40 mg/mL

4.4.5. การทดสอบ accuracy ทำ standard addition ที่ ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.20, 0.25 และ 0.30 mg/mL ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมตามตารางที่ 10 โดยทำ ความเข้มข้นละ 7 ขั้ว ๆ ละ 2 injection ทำการทดสอบ 3 วัน เกลนซ์การ ยอมรับ % recovery อยู่ในช่วง 95 – 105 และ %RSD $\leq$ 3.7 (AOAC, 2012)

ตารางที่ 10 การเตรียม standard addition ของ fipronil

No.	Stock std. (2.5 mg/mL)	Stock sample (2.5 mg/mL)	Final volume (IPA)	Total Conc.	Final Conc.
1	100 µL	300 µL	5 mL	Stock std. 0.05 mg/mL Stock sample 0.15 mg/mL	0.20 mg/mL
2	200 µL	300 µL	5 mL	Stock std. 0.10 mg/mL Stock sample 0.15 mg/mL	0.25 mg/mL
3	300 µL	300 µL	5 mL	Stock std. 0.15 mg/mL Stock sample 0.15 mg/mL	0.30mg/mL

4.4.6. การทดสอบ precision โดยเตรียมตัวอย่าง ความเข้มข้น 0.25 mg/mL : ชั่งตัวอย่าง ประมาณ 250±25 mg (บันทึกน้ำหนักจริง) ลงใน volumetric flask ขนาด 50 mL เติม propan-2-ol, AR grade ลงไปประมาณ 35 mL sonicate 10 นาที และปรับปริมาตรด้วย propan-2-ol, AR grade ทดสอบ 10 ซ้ำๆ ละ 2 injection เป็นเวลา 3 วัน เกณฑ์การยอมรับ %RSD ≤ 3.7 (AOAC, 2016)

4.5. การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ pyrethrins ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ ด้วยเทคนิค UHPLC-DAD โดยดัดแปลงจากวิธี (Thomas et al., 2015) ซึ่งมี condition ตามตารางที่ 11

ตารางที่ 11 condition สำหรับทดสอบ pyrethrins

Parameter	วิธีตาม paper		
Column	UHPLC ชนิด C18 ขนาด 100 mm X 2.1 mm ID, 1.7µm particle size		
Mobile phase	Gradient program (Acetonitrile : Water)		
	Time(min)	% Acetonitrile	% Water
	0	45	55
	7	80	20
	12	45	55
	15	45	55
Column oven	50 °C		
Flow rate	0.8 mL/min		
Injection volume	0.2 – 0.5 µL		
Detector	DAD 230 nm		
Run time	15 min		

4.5.1. เตรียม stock standard solution ความเข้มข้น 0.50 mg/mL : ชั่งสารมาตรฐาน pyrethrin ประมาณ 185±18.5 mg (บันทึกน้ำหนักจริง) ลงใน volumetric flask ขนาด 100 mL ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile, AR grade

4.5.2. ช่วงของการวิเคราะห์ (range) โดยการเตรียม calibration curve ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 10 – 100 µg/mL (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 µg/mL) โดยเตรียมตามตารางที่ 12 ซึ่งเตรียมความเข้มข้นละ 1 ซ้ำๆ ละ 3 injection

ตารางที่ 12 การเตรียม calibration curve เพื่อทดสอบ range ของ pyrethrins

No.	Stock std. (0.5 mg/mL)	Final Volume	Final Conc.
1	0.2 mL	10 mL	10 µg/mL
2	0.4 mL	10 mL	20 µg/mL
3	0.6 mL	10 mL	30 µg/mL
4	0.8 mL	10 mL	40 µg/mL
5	1.0 mL	10 mL	50 µg/mL
6	1.2 mL	10 mL	60 µg/mL
7	1.4 mL	10 mL	70 µg/mL
8	1.5 mL	10 mL	80 µg/mL
9	1.8 mL	10 mL	90 µg/mL
10	2.0 mL	10 mL	100 µg/mL

4.5.3. การทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) โดยเตรียม calibration curve ให้มีความเข้มข้นอยู่ 10 – 70 µg/mL (10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 µg/mL) ซึ่งเตรียมตามตารางที่ 13 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 13 การเตรียม calibration solution ของ pyrethrins

No.	Stock std. (0.5 mg/mL)	Final Volume	Final Conc.
1	0.2 mL	10 mL	10 µg/mL
2	0.4 mL	10 mL	20 µg/mL
3	0.6 mL	10 mL	30 µg/mL
4	0.8 mL	10 mL	40 µg/mL
5	1.0 mL	10 mL	50 µg/mL
6	1.2 mL	10 mL	60 µg/mL
7	1.4 mL	10 mL	70 g/mL

4.5.4. การทดสอบ accuracy การทำ standard addition ที่ ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 40, 50 และ 60 µg/mL ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมตามตารางที่ 14 ความเข้มข้นละ 7 ขั้วๆละ 2 injection ทดสอบ 3 วัน เกณฑ์การยอมรับ % recovery อยู่ในช่วง 95 – 105 และ %RSD ≤ 2 (AOAC, 2016)

ตารางที่ 14 การเตรียม standard addition ของ pyrethrins

No.	Stock std. (0.5 mg/mL)	Stock sample (0.5 mg/mL)	Final volume (ACN)	Total Conc.	Final Conc.
1	0.2 mL	0.4 mL	10 mL	Stock std. 10 µg/mL Stock sample 20 µg/mL	30 µg/mL
2	0.4 mL	0.4 mL	10 mL	Stock std. 20 µg/mL Stock sample 20 µg/mL	40 µg/mL
3	0.6 mL	0.4 mL	10 mL	Stock std. 30 µg/mL Stock sample 20 µg/mL	50 µg/mL

- 4.5.5. การทดสอบ precision โดยการเตรียมตัวอย่าง ความเข้มข้น 30 µg/mL : ปิเปตตัวอย่างจำนวน 1 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 100 mL ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile, AR grade จากนั้นปิเปตมา 1 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 10 mL ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile AR grade ทดสอบ 10 ซ้ำๆ ละ 2 injection ทำการทดสอบ 3 วัน เกณฑ์การยอมรับ %RSD ≤ 2 (AOAC, 2016)
- 4.5.6. ทดสอบความจำเพาะเจาะจงต่อสารที่ทดสอบ (selectivity) โดยการตรวจสอบ spectrum และ peak purity pyrethrin ของสารมาตรฐานและตัวอย่าง และทดสอบความสามารถของการแยก (resolution) ของสาร 2 ชนิด ที่ปรากฏ peak ใกล้กันมากที่สุด
- 4.5.7. ทดสอบ robustness เป็นการทดสอบความคงทนของวิธีว่าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงปัจจัยที่ใช้ในการทดสอบแล้วจะยังให้ผลการทดสอบเหมือนเดิมหรือไม่ โดยมีปัจจัยต่างๆ ตามตารางที่ 15 และวางแผนการทดสอบตามวิธีของ Youden's ตามตารางที่ 16 โดยเตรียม standard solution ที่ความเข้มข้น 40 µg/mL ซึ่งเตรียมจำนวน 2 ซ้ำๆ ละ 2 injection

ตารางที่ 15 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	45 = B	55 = b	50
Sample temperature (C/c)	°C	±5	20 = C	30 = c	25
เกรดของ acetonitrile (D/d)	-	-	HPLC = D	AR = d	-
Mobile phase flow rate (E/e)	mL/min	±1	0.7 = E	0.9 = e	0.8
Wavelength (F/f)	nm	±5	225 = F	235 = f	230
Injection volume (G/g)	µL	±1	0.3 = G	0.4 = g	0.2

ตารางที่ 16 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

5. ผลการทดลอง

5.1 ผลการทดสอบ cyphenothrin

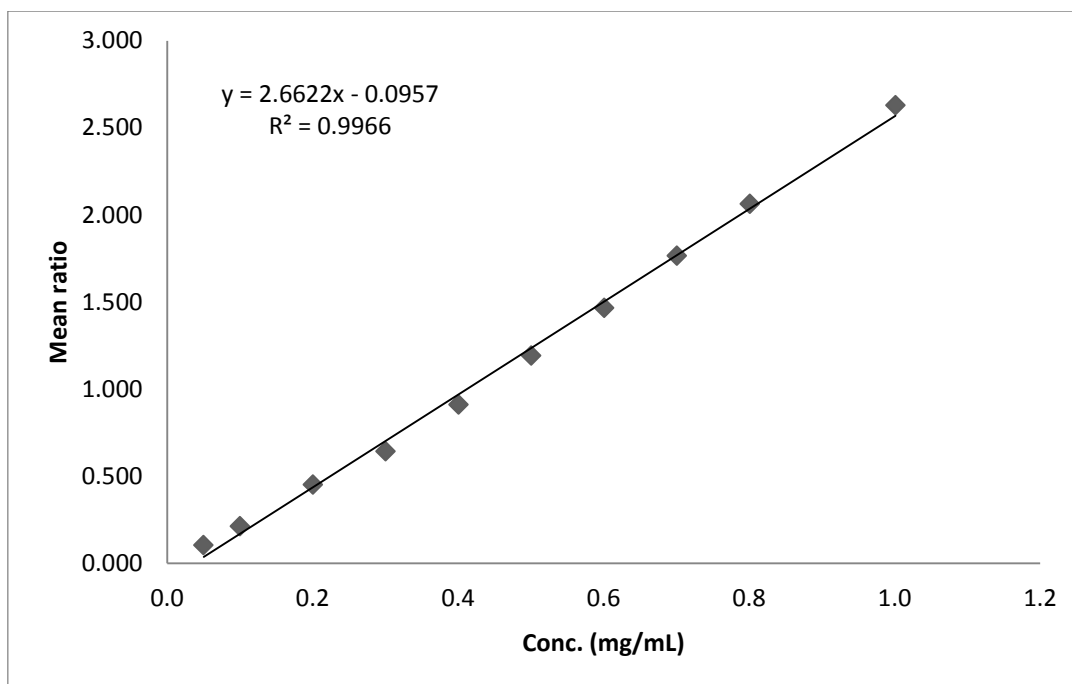
5.1.1 ผลการทดสอบช่วงของการวิเคราะห์ (range) โดยเตรียม calibration curve

ความเข้มข้น 0.05 – 1.0 mg/mL (0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8

และ 1.0 mg/mL) ได้ผลตามตารางที่ 17 และ รูปที่ 4

ตารางที่ 17 ผลการทดสอบ range ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ cyphenothrin

Concentration (mg/mL)	Mean ratio
0.05	0.105
0.10	0.201
0.20	0.452
0.30	0.642
0.40	0.912
0.50	1.192
0.60	1.465
0.70	1.765
0.80	2.063
1.00	2.630
Slope	2.6622
Intercept	-0.0957
r^2	0.9966
r	0.9983

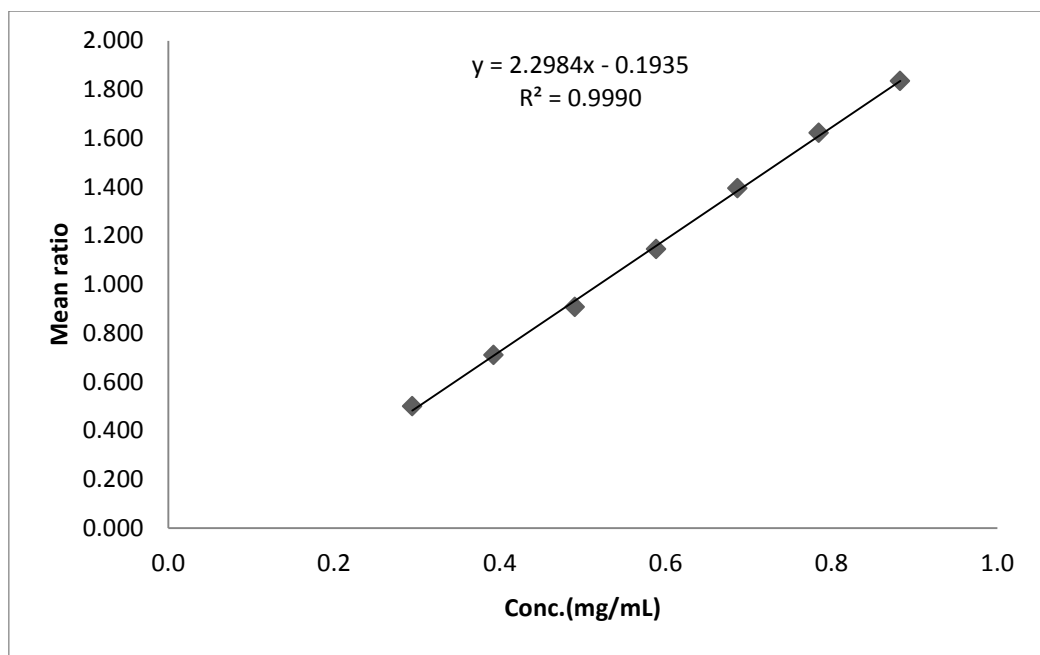


รูปที่ 4 ผลการทดสอบ range ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ cyphenothrin

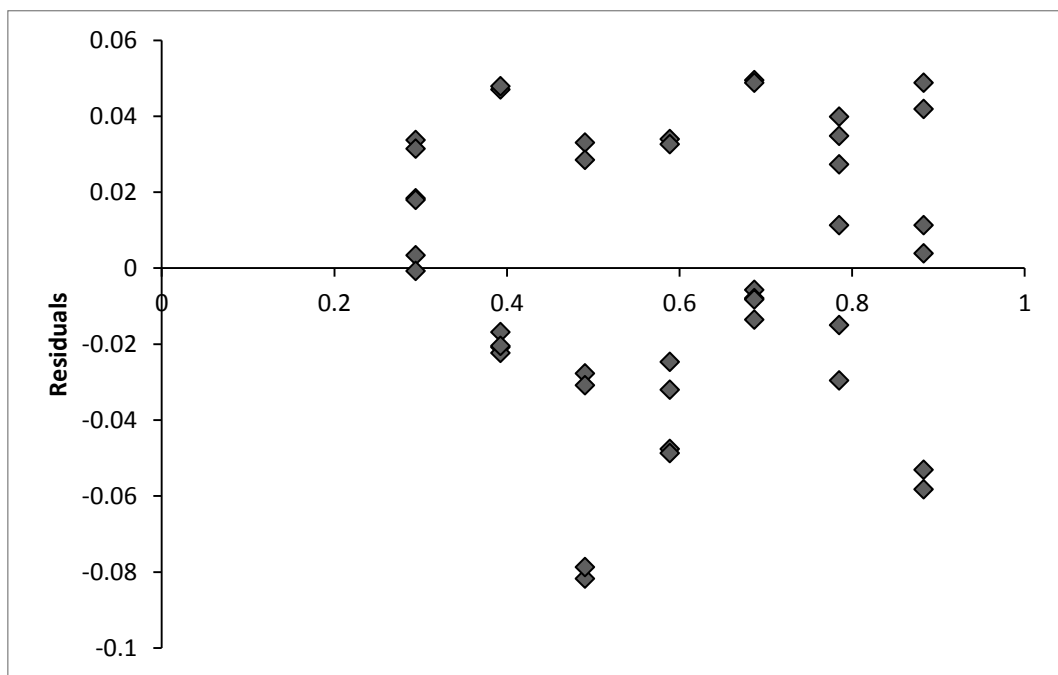
5.1.2 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) โดยการเตรียม calibration curve ความเข้มข้น 0.3 – 0.9 mg/mL (0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 และ 0.9 mg/mL) ได้ผลตามตารางที่ 18, 19 และ รูปที่ 5, 6

ตารางที่ 18 ผลการทดสอบ linearity ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ cyphenothrin

Concentration (mg/mL)	Mean ratio		
	Day 1	Day 2	Day 3
0.2943	0.484	0.501	0.515
0.3924	0.690	0.687	0.756
0.4905	0.905	0.854	0.965
0.5886	1.131	1.111	1.193
0.6867	1.375	1.377	1.434
0.7848	1.648	1.588	1.630
0.8829	1.881	1.780	1.843
Slope	2.2984		
Intercept	-0.1935		
r^2	0.9990		
r	0.9995		



รูปที่ 5 ผลการทดสอบ linearity ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ cyphenothrin



รูปที่ 6 residual plot ของ cyphenothrin

ตารางที่ 19 ผล ANOVA table ของ cyphenothrin

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Ratio *	Between Groups	(Combined)	8.552	6	1.425	1127.659	.000
Conc		Linearity	8.542	1	8.542	6757.885	.000
		Deviation from Linearity	.010	5	.002	1.614	.183
	Within Groups		.043	34	.001		
	Total		8.595	40			

จากตารางที่ 19 พิจารณาค่า Sig ของ Deviation from Linearity พบว่ามีค่า > 0.05 ดังนั้นจึงสรุป
ได้ว่าการทดสอบที่ความเข้มข้น 0.3 – 0.9 mg/mL มีความเป็นเส้นตรง

5.1.3 ผลการทดสอบ accuracy ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.5, 0.6 และ 0.7 mg/mL ได้ผลตามตารางที่ 20

ตารางที่ 20 ผลการทดสอบ accuracy ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ cyphenothrin

No.	Cyphenothrin								
	Day 1			Day 2			Day 3		
	0.50 mg/mL	0.60 mg/mL	0.70 mg/mL	0.50 mg/mL	0.60 mg/mL	0.70 mg/mL	0.50 mg/mL	0.60 mg/mL	0.70 mg/mL
1	0.561	0.672	0.784	0.563	0.596	0.708	0.552	0.655	0.758
2	0.560	0.672	0.784	0.562	0.598	0.706	0.552	0.665	0.755
3	0.558	0.670	0.774	0.561	0.601	0.700	0.556	0.660	0.752
4	0.559	0.673	0.783	0.564	0.604	0.711	0.553	0.651	0.754
5	0.560	0.670	0.783	0.561	0.596	0.699	0.552	0.657	0.770
6	0.560	0.668	0.777	0.564	0.599	0.711	0.557	0.654	0.764
7	0.562	0.669	0.774	0.561	0.598	0.708	0.553	0.652	0.768
Mean	0.560	0.671	0.780	0.562	0.599	0.706	0.554	0.656	0.760
SD	0.0014	0.0019	0.0049	0.0014	0.0029	0.0049	0.0021	0.0048	0.0072
%RSD	0.245	0.279	0.594	0.244	0.489	0.697	0.371	0.738	0.948
%Recovery	97.964	101.968	103.612	96.249	96.779	102.920	95.986	96.935	97.646

5.1.4 ผลการทดสอบ precision ของตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.60 mg/mL ได้ผล
ตามตารางที่ 21, 22

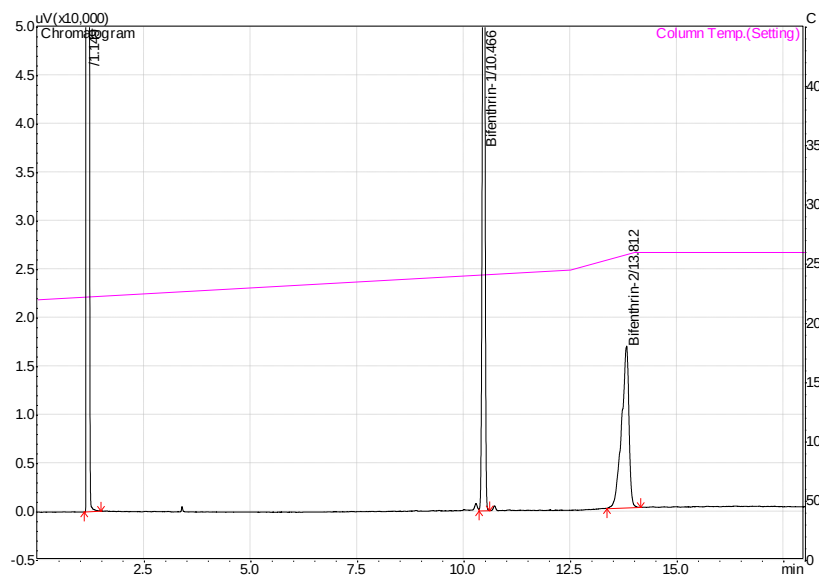
ตารางที่ 21 ผลการทดสอบ precision ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ cyphenothrin

No.	sample 12 %W/V		
	Day 1	Day 2	Day 3
1	12.21	11.37	11.93
2	12.26	11.69	11.91
3	12.29	11.86	12.00
4	12.20	11.33	12.22
5	12.23	11.42	11.91
6	12.23	11.61	12.13
7	12.24	11.36	12.04
8	12.17	11.42	11.96
9	12.19	11.42	12.08
10	12.31	11.46	12.02
Mean	12.23	11.49	12.02
SD	0.044	0.170	0.101
%RSD	0.36	1.48	0.84

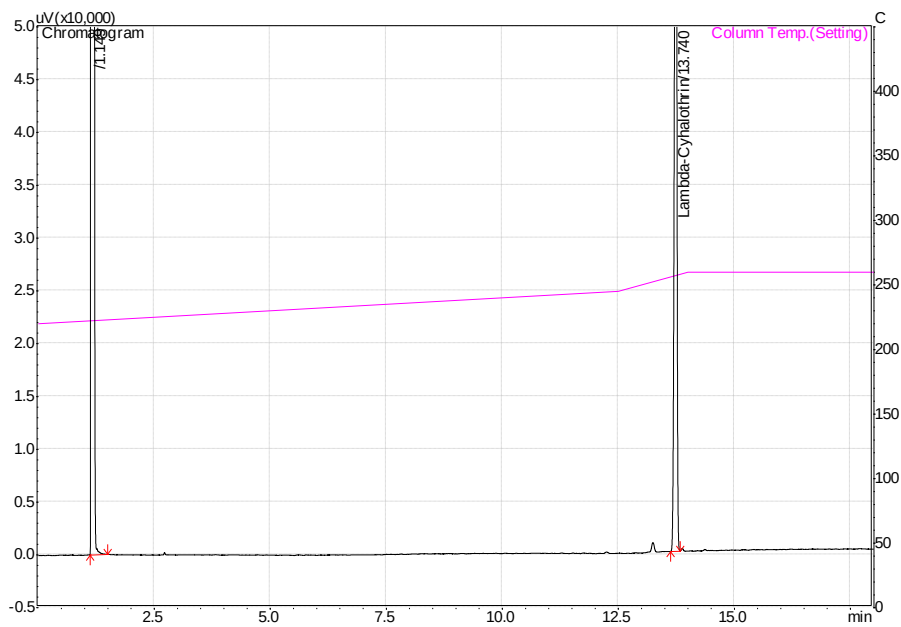
ตารางที่ 22 intermediate precision ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ cyphenothrin

Sample Conc. (%W/V)	Mean conc. (%W/V)	%RSD
12	11.93 (n=30)	2.72

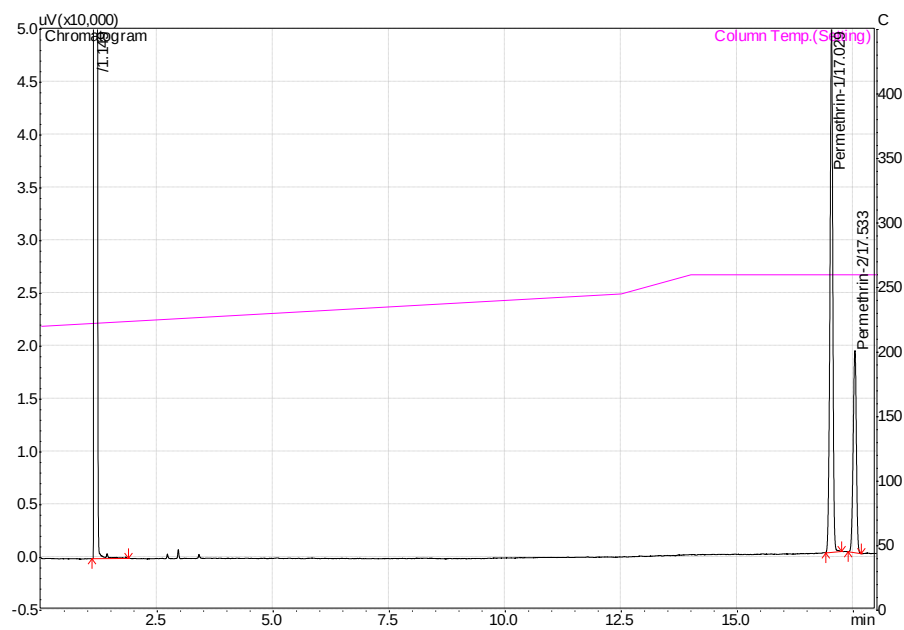
5.1.5 ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงต่อสารที่ทดสอบ (selectivity) โดยเติม
สารที่คาดว่าจะมีผลกระทบต่อนสารตัวอย่าง ได้แก่ bifenthrin, chlorfenapyr
,lambda-cyhalothrin, permethrin, tetramethrin และ S-bioallethrin ที่
ความเข้มข้น 0.60 mg/mL ได้ผลดังรูปที่ 7-13



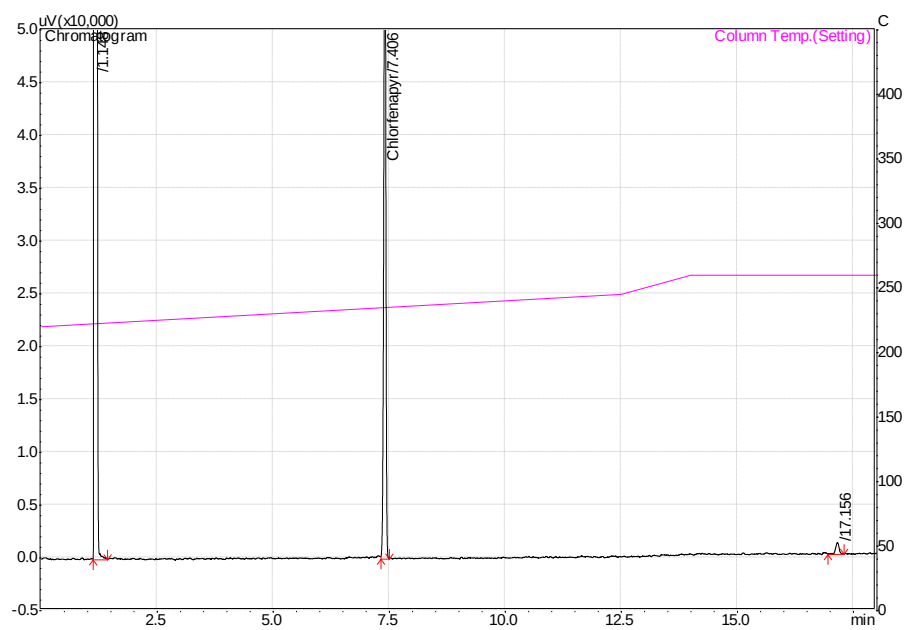
รูปที่ 7 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน bifenthrin



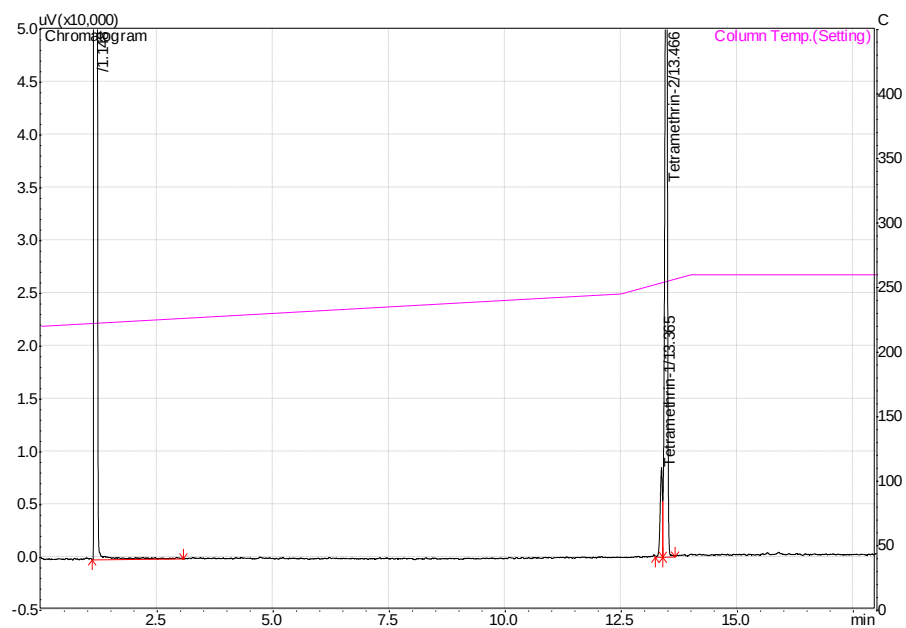
รูปที่ 8 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน lambda-cyhalothrin



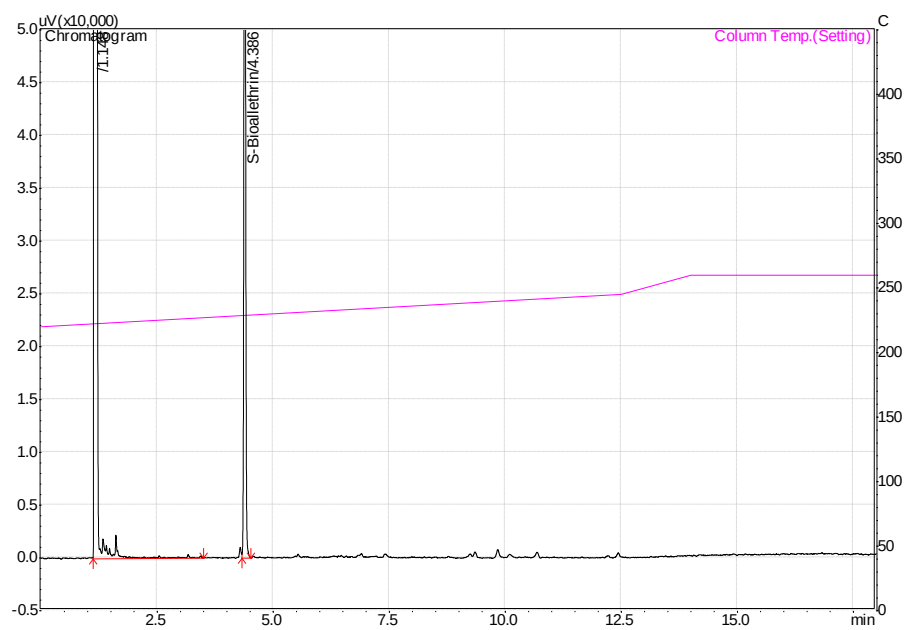
รูปที่ 9 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน permethrin



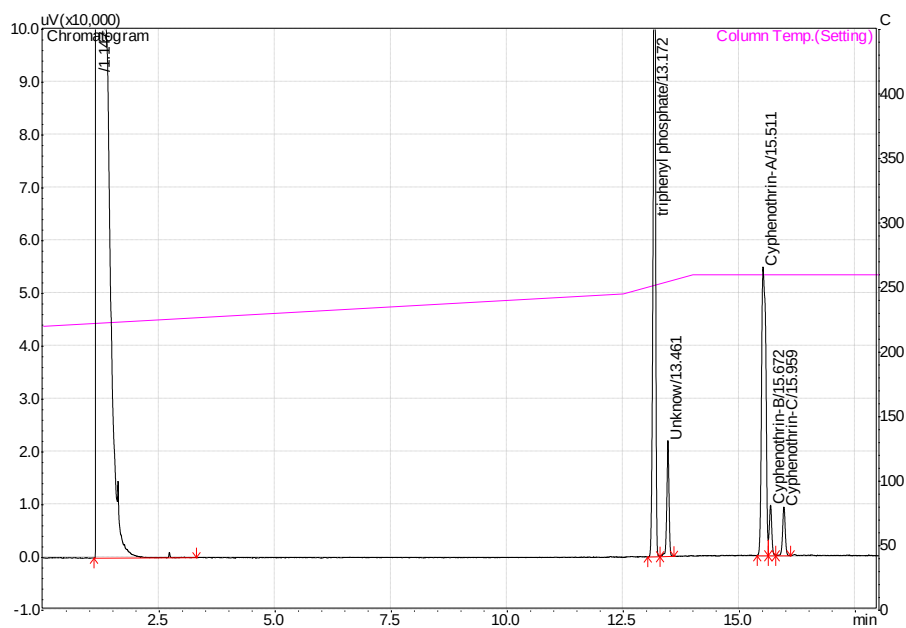
รูปที่ 10 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน chlorfenapyr



รูปที่ 11 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน tetramethrin

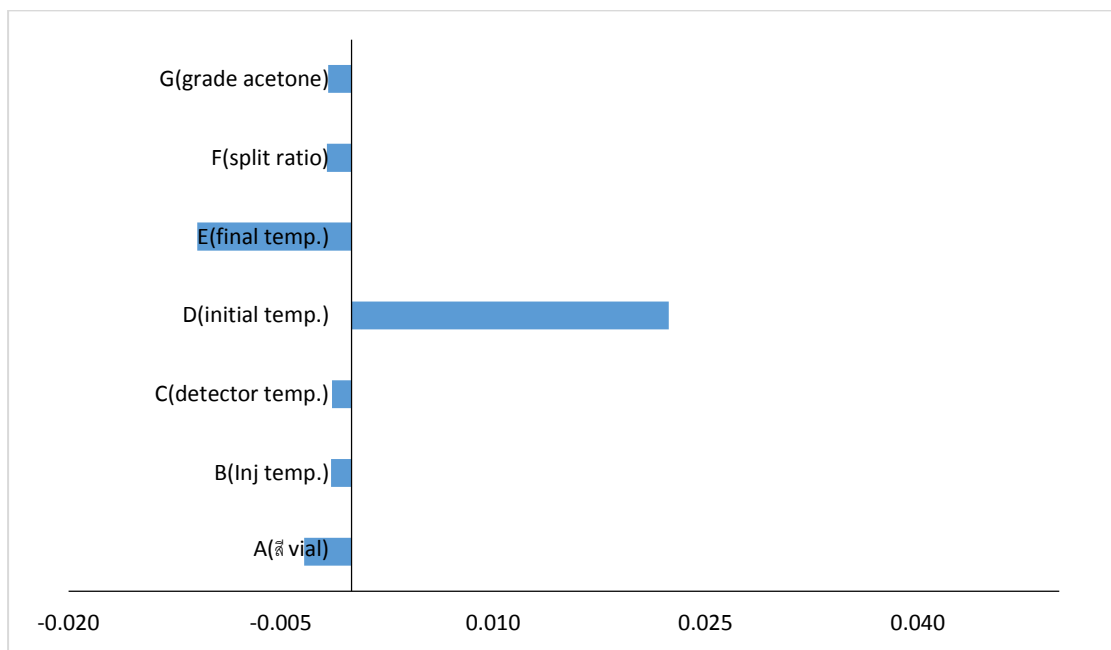


รูปที่ 12 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน S-bioallethrin



รูปที่ 13 โครมาโตแกรมของตัวอย่าง ยี่ห้อ เพสกาดี สเปนซ์

5.1.6 ผลการทดสอบความคงทนของวิธี (robustness) ว่าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงปัจจัยที่ใช้ในการทดสอบได้ผลตามรูปที่ 14 พบว่า initial temp. for temp. program มีผลต่อการทดสอบมากที่สุด รองลงมาคือ final temp. for temp. program



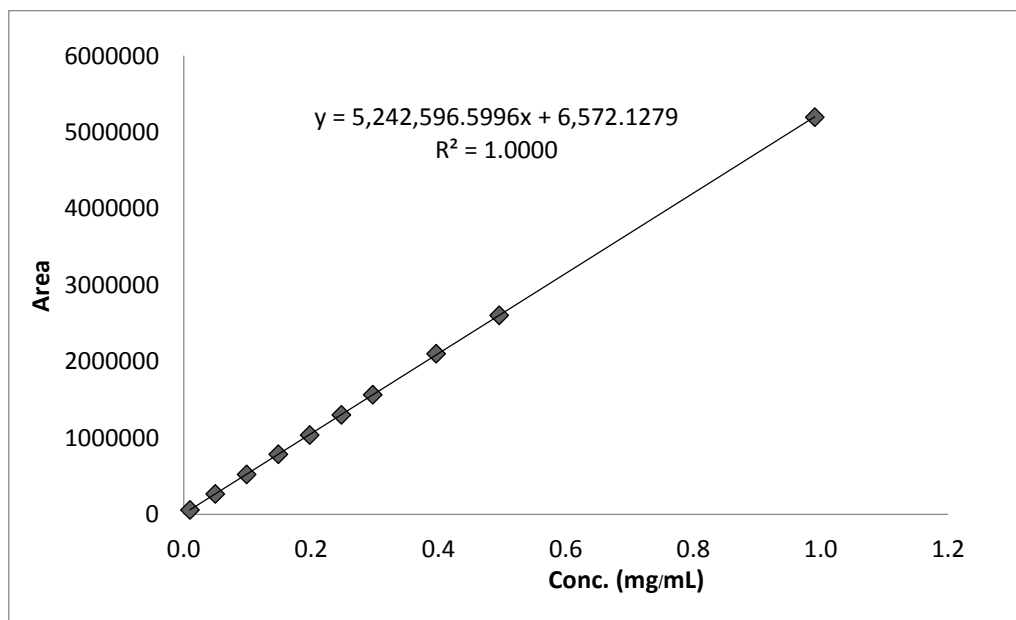
รูปที่ 14 ผลการทดสอบ robustness ของสารสำคัญ cyphenothrin

5.2 ผลการทดสอบ fipronil

5.2.1 ผลการทดสอบช่วงของการวิเคราะห์ (range) โดยเตรียม calibration curve ความเข้มข้น 0.01 – 1.0 mg/mL (0.01, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.4, 0.5 และ 1.0 mg/mL) ได้ผลตามตารางที่ 23 และ รูปที่ 15

ตารางที่ 23 ผลการทดสอบ range ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ fipronil

Concentration (mg/mL)	Area
0.01	55916
0.05	266506
0.10	522712
0.15	785846
0.20	1039399
0.25	1302934
0.30	1567188
0.45	2101945
0.50	2604916
1.00	5195978
Slope	5242596.60
Intercept	6572.13
r^2	1.00
r	1.00

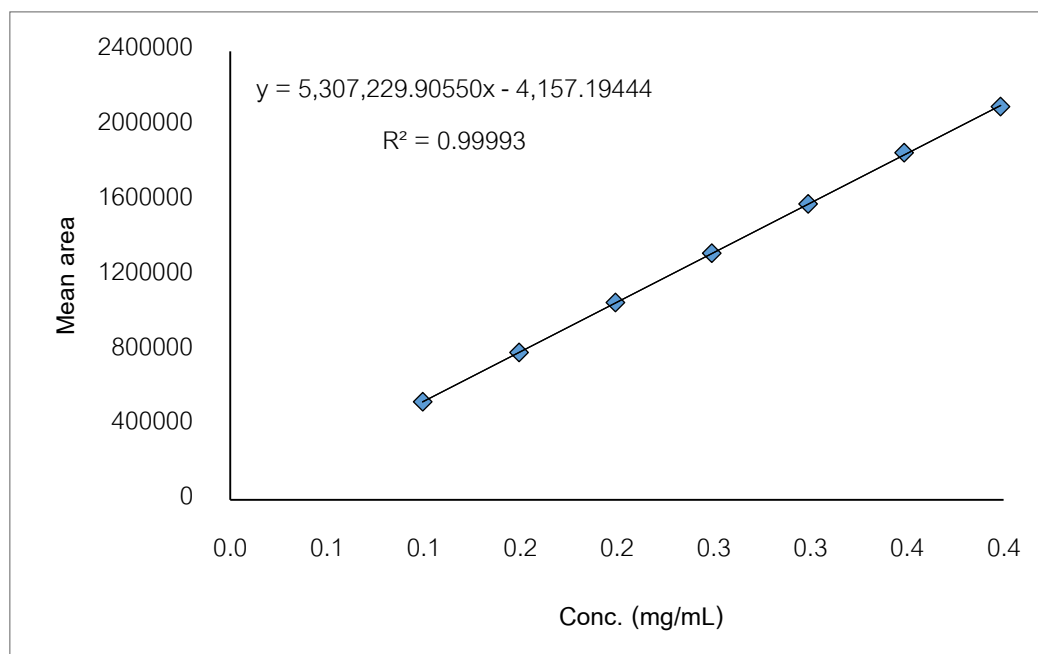


รูปที่ 15 ผลการทดสอบ range ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ fipronil

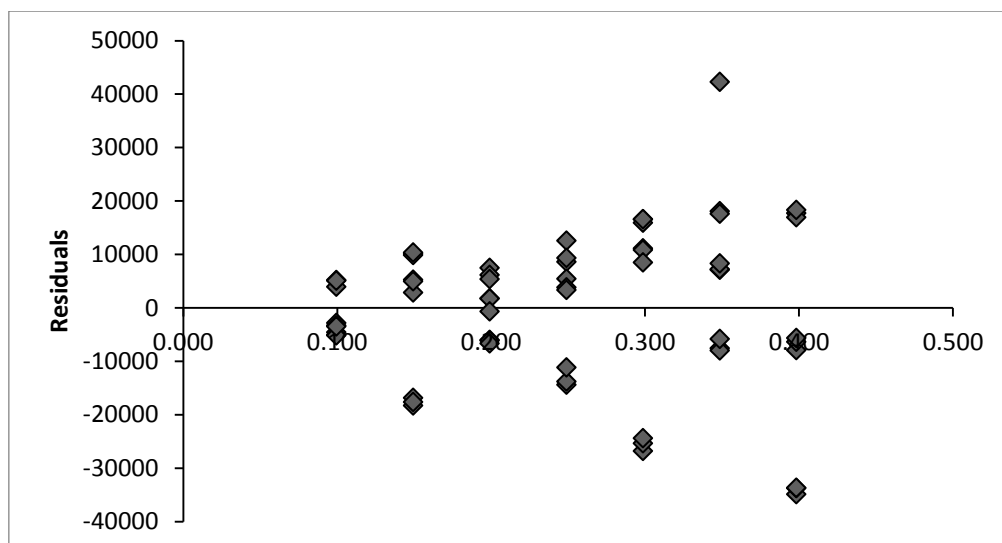
5.2.2 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) โดยการเตรียม calibration curve ให้มีความเข้มข้น อยู่ในช่วง 0.10 – 0.40 mg/mL (0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35 และ 0.40 mg/mL) ได้ผลตามตารางที่ 24, 25 และ รูปที่ 16, 17

ตารางที่ 24 ผลการทดสอบ linearity ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ fipronil

Concentration (mg/mL)	Mean area		
	Day 1	Day 2	Day 3
0.100	519579	521317	529280
0.149	771282	798985	793223
0.199	1054162	1059529	1046949
0.249	1304426	1327708	1321756
0.299	1556378	1592047	1598239
0.349	1839113	1872213	1853787
0.398	2076480	2128245	2103945
Slope	5,307,229.91		
Intercept	-4157.19		
r^2	0.99993		
r	0.99996		



รูปที่ 16 ผลการทดสอบ linearity ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ fipronil



รูปที่ 17 residual plot ของ fipronil

ตารางที่ 25 ผล ANOVA table ของ fipronil

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Area * Conc	Between Groups	(Combined)	17608640706372.1	6	2934773451062.0	14057.6	.000
		Linearity	17607820422203.5	1	17607820422203.5	84341.4	.000
		Deviation from Linearity	820284168.6	5	164056833.7	.786	.564
	Within Groups		11691033745.3	56	208768459.7		
	Total		17620331740117.4	62			

จากตารางที่ 25 พิจารณาค่า Sig ของ Deviation from Linearity พบว่ามีค่า > 0.05 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการทดสอบที่ความเข้มข้น 0.1 – 0.4 mg/mL มีความเป็นเส้นตรง

5.2.3 ผลการทดสอบ accuracy ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.20, 0.25 และ 0.30 mg/mL ได้ผลตามตารางที่ 26

ตารางที่ 26 ผลการทดสอบ accuracy ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ fipronil

No.	Fipronil								
	Day 1			Day 2			Day 3		
	0.20 mg/mL	0.25 mg/mL	0.30 mg/mL	0.20 mg/mL	0.25 mg/mL	0.30 mg/mL	0.20 mg/mL	0.25 mg/mL	0.30 mg/mL
1	0.20	0.24	0.30	0.19	0.24	0.29	0.19	0.24	0.29
2	0.20	0.25	0.29	0.19	0.24	0.29	0.19	0.24	0.29
3	0.20	0.24	0.29	0.19	0.24	0.29	0.19	0.24	0.29
4	0.20	0.24	0.29	0.19	0.24	0.29	0.19	0.24	0.29
5	0.20	0.24	0.29	0.19	0.24	0.29	0.19	0.24	0.29
6	0.20	0.24	0.29	0.19	0.24	0.29	0.19	0.24	0.29
7	0.20	0.24	0.29	0.19	0.24	0.29	0.19	0.24	0.29
Mean	0.20	0.24	0.29	0.19	0.24	0.29	0.19	0.24	0.29
SD	0.0003	0.001	0.002	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
%RSD	0.14	0.31	0.67	0.43	0.49	0.52	0.38	0.50	0.30
%Recovery	101.84	98.90	99.23	98.01	100.55	98.90	99.88	101.21	101.72

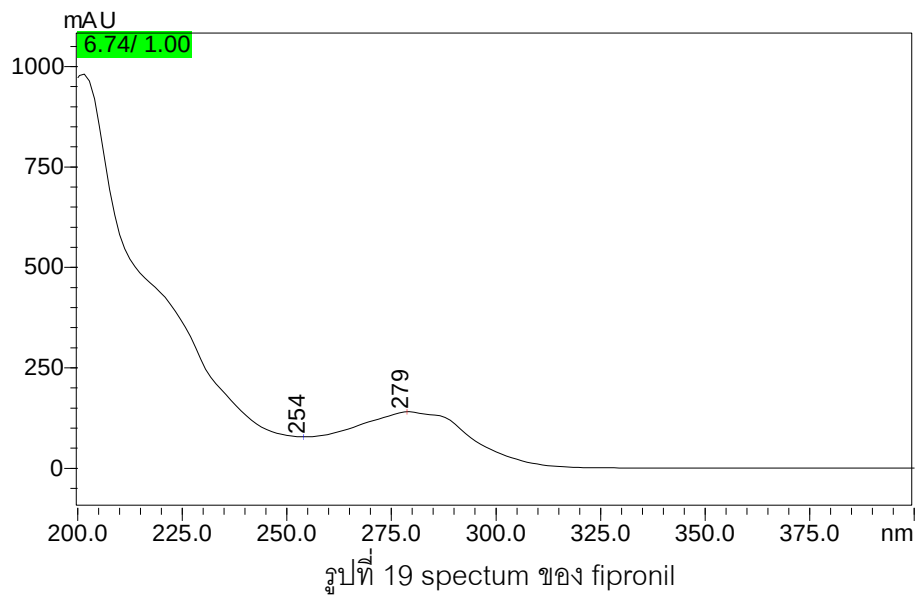
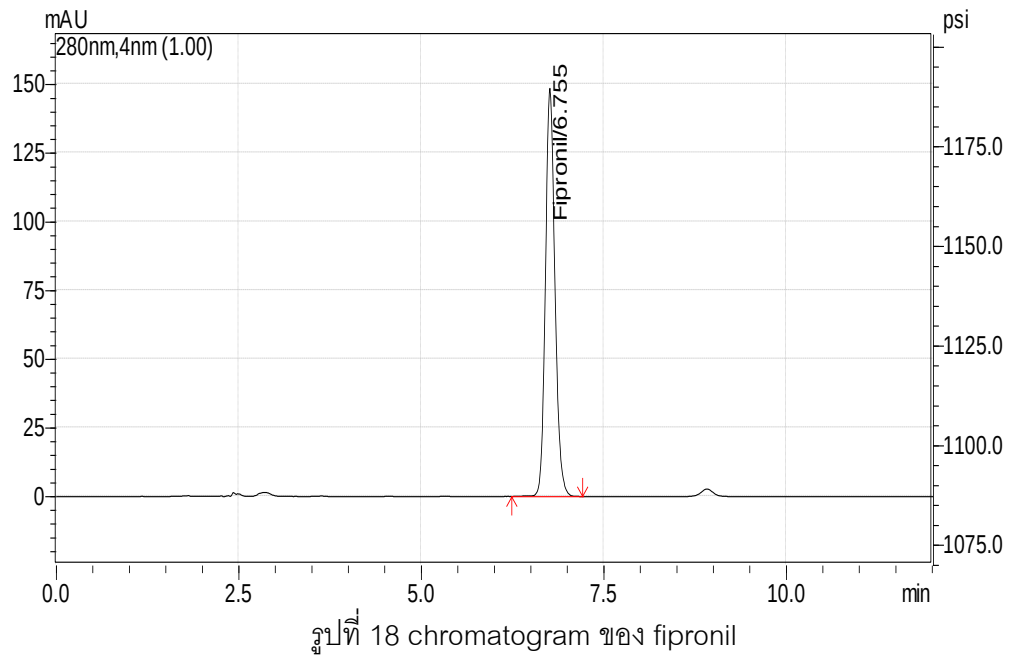
5.2.4 ผลการทดสอบ precision ของตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.25 mg/mL ได้ผลตามตารางที่ 27, 28

ตารางที่ 27 ผลการทดสอบ precision ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ fipronil

No.	sample 5 %W/V		
	Day 1	Day 2	Day 3
1	4.72	4.73	4.69
2	4.71	4.71	4.71
3	4.70	4.73	4.72
4	4.70	4.72	4.75
5	4.72	4.73	4.75
6	4.71	4.73	4.74
7	4.73	4.73	4.73
8	4.73	4.75	4.74
9	4.73	4.74	4.74
10	4.74	4.73	4.71
Mean	4.72	4.73	4.73
SD	0.014	0.009	0.019
%RSD	0.30	0.19	0.39

ตารางที่ 28 intermediate precision ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ fipronil

Sample Conc. (%W/V)	Mean conc. (%W/V)	%RSD
5	4.73 (n=30)	0.31



5.3 ผลการทดสอบ pyrethrins

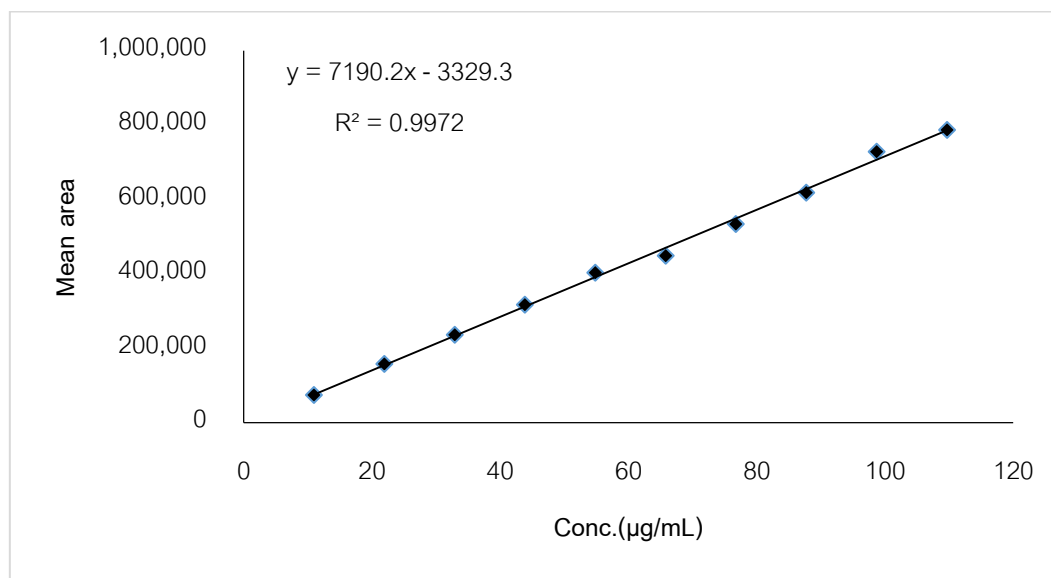
5.3.1 การวิเคราะห์ range โดยเตรียม calibration curve ความเข้มข้น

10 – 100 µg/mL (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 µg/mL)

ได้ผลตามตารางที่ 29, 30 รูปที่ 20, 21

ตารางที่ 29 ผลการทดสอบ range ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ pyrethrin I

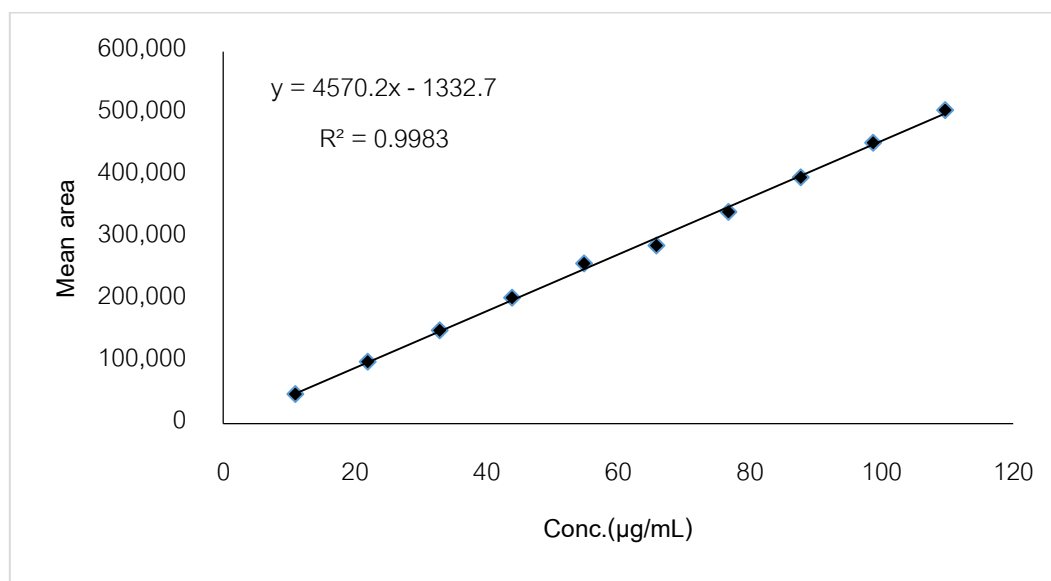
Concentration (µg/mL)	Mean area
10	74860
20	157523
30	236046
40	316874
50	403026
60	448326
70	533588
80	618203
90	728483
100	786909
Slope	7190.2X
Intercept	-3329.3
r^2	0.9972
r	0.9986



รูปที่ 20 แสดง calibration curve ของ pyrethrin I ที่ความเข้มข้น 10 – 100 µg/mL

ตารางที่ 30 ผลการทดสอบ range ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ pyrethrin II

Concentration (µg/mL)	Mean area
10	47633
20	99949
30	150357
40	202958
50	258216
60	287273
70	341592
80	396983
90	452795
100	505656
Slope	4570.2x
Intercept	-1332.7
r^2	0.9983
r	0.9991

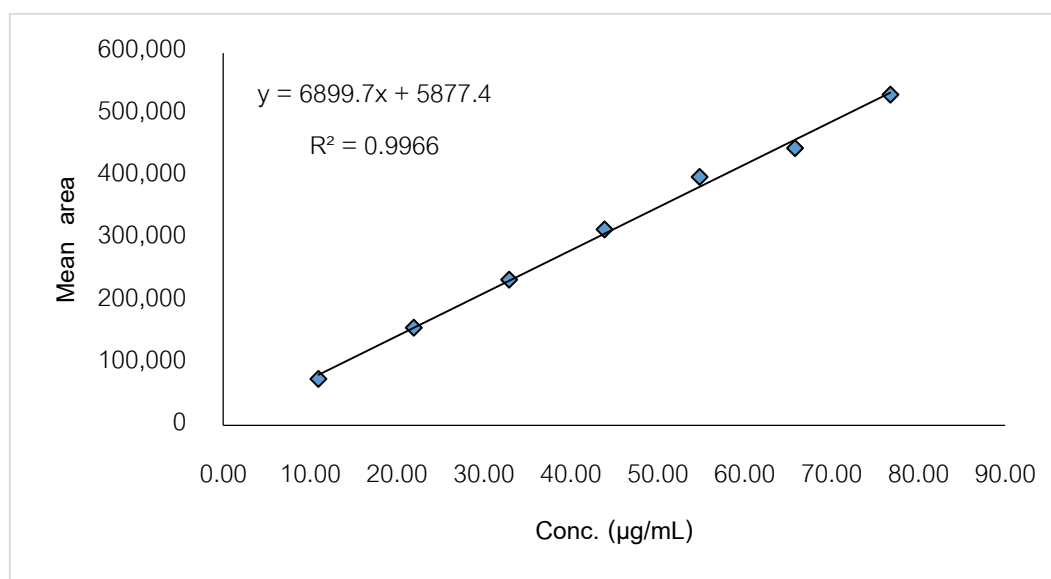


รูปที่ 21 แสดง calibration curve ของ pyrethrin II ที่ความเข้มข้น 10 – 100 µg/mL

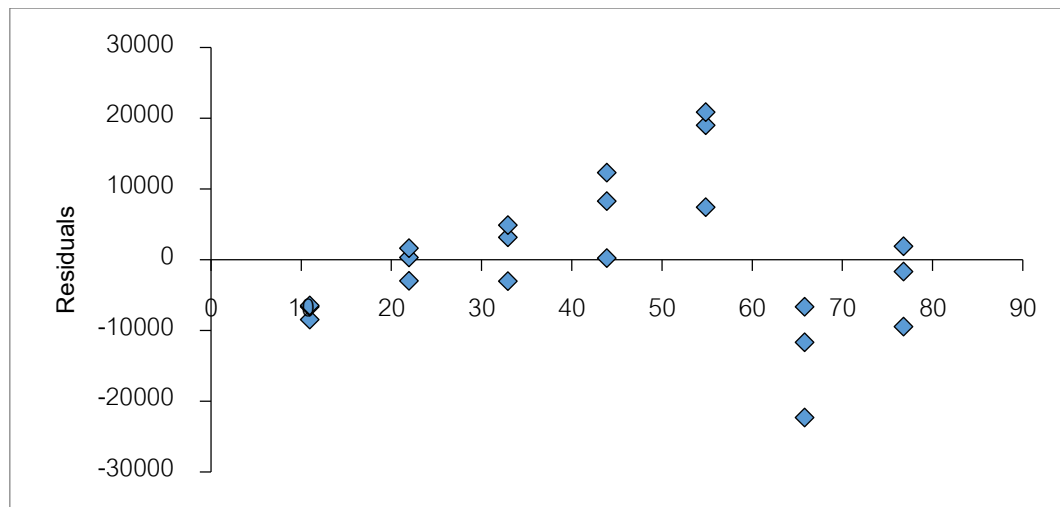
5.3.2 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) โดยการเตรียม calibration curve ความเข้มข้น 60 – 120 µg/mL (60, 70, 80, 90, 100, 110 และ 120 µg/mL) ได้ผลดังตารางที่ 31 - 34 รูปที่ 22 - 26

ตารางที่ 31 ผลการทดสอบ linearity ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ pyrethrin I

Concentration (µg/mL)	Mean area		
	Day 1	Day 2	Day 3
10	73064	74888	75067
20	154208	157510	158802
30	229811	236043	237735
40	308734	316800	320838
50	391631	403200	405050
60	437577	448199	453211
70	526090	533866	537427
Slope	6899.7		
Intercept	5877.4		
r^2	0.9966		
r	0.9983		



รูปที่ 22 ผลการทดสอบ linearity ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ pyrethrin I



รูปที่ 23 residual plot ของสารสำคัญ pyrethrin I

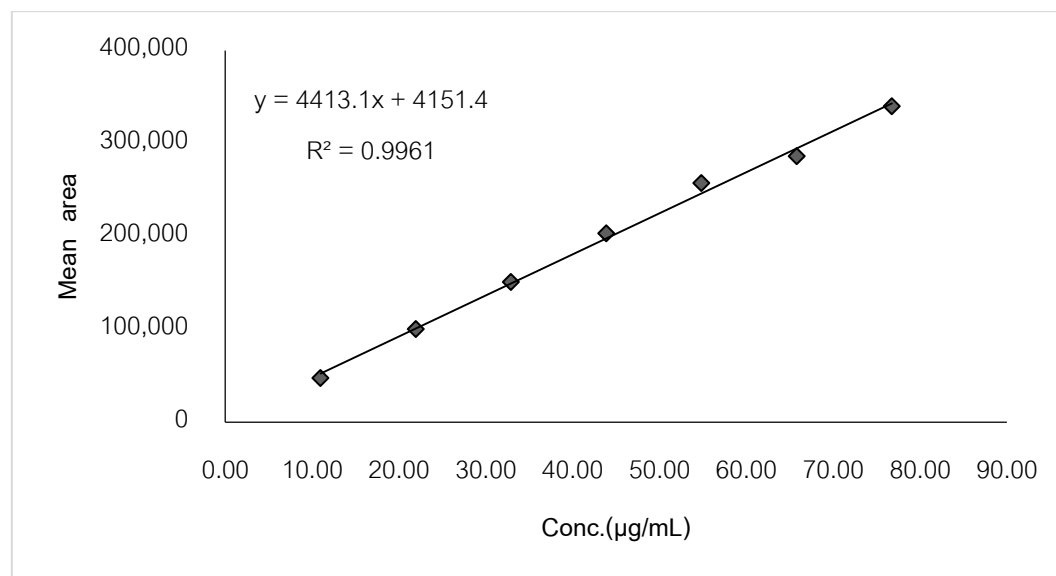
ตารางที่ 32 ผล ANOVA table ของ pyrethrin I

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Area * Conc	Between Groups	(Combined)	995647945732.5	6	165941324288.7	485.54	.000
		Linearity	991544016097.5	1	991544016097.5	2901.248	.000
		Deviation from Linearity	4103929634.975	5	820785926.9951	2.402	.057
	Within Groups		11961763461.17	35	341764670.319		
	Total		1007609709194	41			

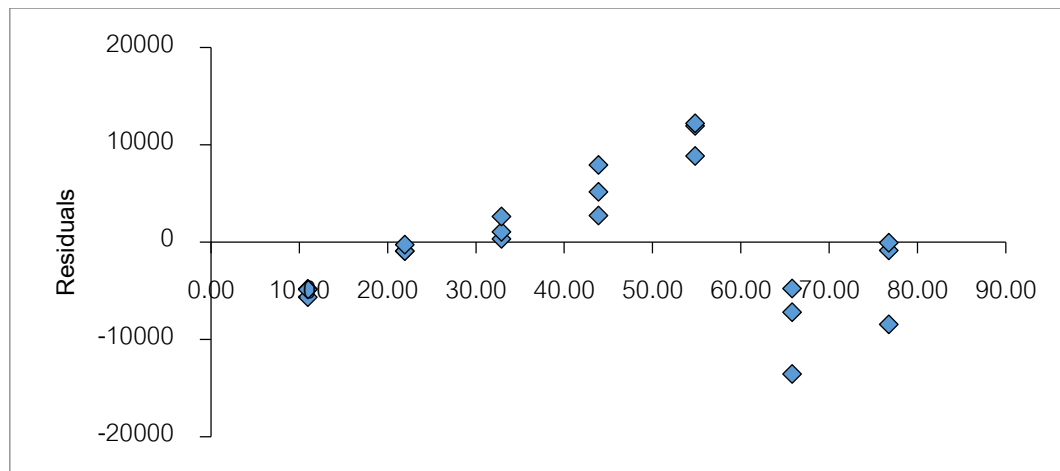
จากตารางที่ 32 พิจารณาค่า Sig ของ Deviation from Linearity พบว่ามีค่า > 0.05 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการทดสอบที่ความเข้มข้น 60 – 120 µg/mL มีความเป็นเส้นตรง

ตารางที่ 33 ผลการทดสอบ linearity ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ pyrethrin II

Concentration (µg/mL)	Mean area		
	Day 1	Day 2	Day 3
10	46872	47713	47659
20	100003	100016	100675
30	149662	150384	151970
40	200447	202877	205662
50	254983	258047	258314
60	280994	287318	289763
70	334484	342065	342857
Slope	4413.1		
Intercept	4151.4		
r^2	0.9961		
r	0.9980		



รูปที่ 24 ผลการทดสอบ linearity ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ pyrethrin II



รูปที่ 25 residual plot ของสารสำคัญ pyrethrin II

ตารางที่ 34 ผล ANOVA table ของ pyrethrin II

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Ratio * Conc	Between Groups	(Combined)	407967622942.2	6	67994603823.71	296.23	.000
		Linearity	405323464077.6	1	405323464077.6	1765.87	.000
		Deviation from Linearity	2644158864.644	5	528831772.9288	2.304	.065
	Within Groups		8033611642.833	35	229531761.2238		
	Total		416001234585.1	41			

จากตารางที่ 34 พิจารณาค่า Sig ของ Deviation from Linearity พบว่ามีค่า > 0.05 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการทดสอบที่ความเข้มข้น 60 – 120 $\mu\text{g/mL}$ มีความเป็นเส้นตรง

5.3.3 ผลการทดสอบ accuracy ของ pyrethrin I และ pyrethrin II ตามตารางที่
35,36

ตารางที่ 35 ผลการทดสอบ accuracy ของ pyrethrin I

No.	Pyrethrin I								
	Day 1			Day 2			Day 3		
	30	40	50	30	40	50	30	40	50
	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)
1	28.21	40.53	50.56	28.63	40.17	52.26	27.95	38.97	50.70
2	28.23	40.57	50.59	28.31	40.21	52.45	27.76	39.23	50.90
3	28.45	40.73	51.70	28.47	40.21	52.41	27.85	39.10	50.75
4	27.84	40.42	52.02	28.28	41.03	52.52	27.78	39.19	50.50
5	28.24	40.33	51.28	28.39	40.66	53.09	27.80	39.80	51.44
6	28.34	40.61	52.06	28.38	40.69	53.13	27.70	39.84	51.40
7	28.18	40.30	51.33	28.39	40.92	53.08	28.10	39.78	51.19
Mean	28.2	40.5	51.4	28.4	40.6	52.7	27.8	39.4	51.0
SD	0.2	0.2	0.6	0.1	0.4	0.4	0.1	0.4	0.4
%RSD	0.67	0.38	1.20	0.41	0.89	0.72	0.49	0.95	0.71
%Recovery	100.5	101.8	100.4	102.0	100.9	102.4	99.8	97.9	99.4

ตารางที่ 36 ผลการทดสอบ accuracy ของ pyrethrin II

No.	Pyrethrin II								
	Day 1			Day 2			Day 3		
	30	40	50	30	40	50	30	40	50
	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)
1	27.63	39.72	52.33	27.58	39.00	51.57	27.47	38.66	50.18
2	27.80	40.15	51.77	27.64	38.81	51.51	27.57	38.99	50.30
3	27.37	40.56	52.29	27.61	39.49	51.84	27.56	38.76	50.40
4	27.83	39.74	52.77	27.66	39.41	51.59	27.45	38.74	50.11
5	27.79	40.31	52.58	27.90	39.17	52.16	27.52	39.55	50.83
6	27.64	40.58	52.58	27.60	39.43	52.30	27.36	39.61	50.93
7	27.52	39.68	51.89	28.07	39.25	52.23	27.70	39.41	50.46
Average	27.7	40.1	52.3	27.7	39.2	51.9	27.5	39.1	50.5
SD	0.2	0.4	0.4	0.2	0.2	0.3	0.1	0.4	0.3
%RSD	0.61	0.99	0.71	0.67	0.63	0.66	0.39	1.05	0.62
%Recovery	101.7	101.6	103.3	98.9	96.9	101.1	97.2	97.4	97.9

5.3.4 ผลการทดสอบ precision ของตัวอย่างที่ความเข้มข้น 30 µg/mL ได้ผลตาม
ตารางที่ 37 - 40

ตารางที่ 37 ผลการทดสอบ precision ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ pyrethrins I

No.	sample 3 %W/V		
	Day 1	Day 2	Day 3
1	3.06	3.07	2.96
2	3.07	3.08	2.97
3	3.07	3.06	2.97
4	3.08	3.07	2.97
5	3.08	3.06	2.96
6	3.06	3.07	2.97
7	3.07	3.07	2.97
8	3.09	3.09	2.98
9	3.09	3.09	2.98
10	3.06	3.05	2.95
Mean	3.07	3.07	2.97
SD	0.012	0.012	0.009
%RSD	0.38	0.39	0.31

ตารางที่ 38 intermediate precision ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ Pyrethrins I

Sample Conc. (%W/V)	Mean conc. (%W/V)	%RSD
3	3.07 (n=30)	0.37

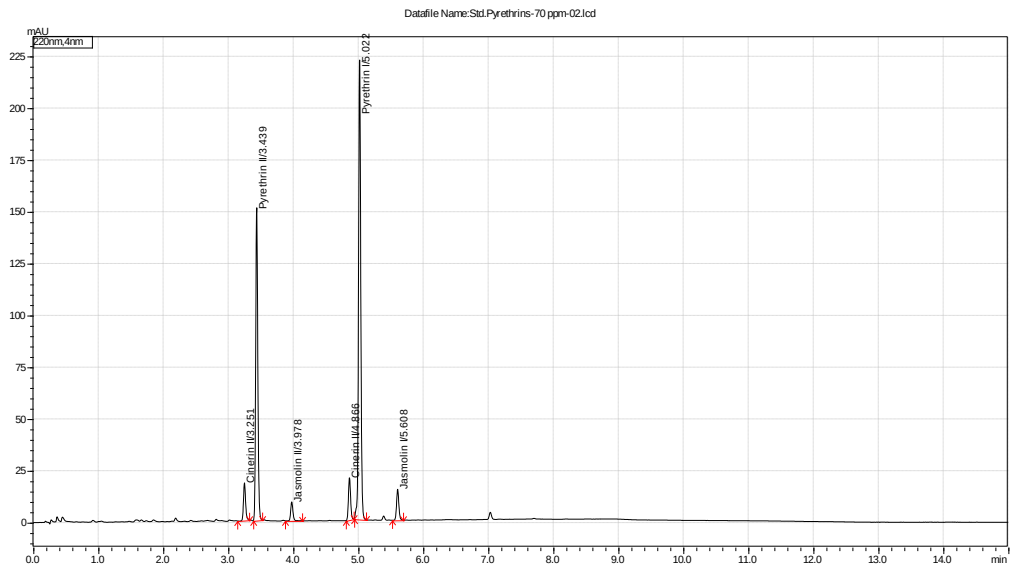
ตารางที่ 39 ผลการทดสอบ precision ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ pyrethrins II

No.	sample 3 %W/V		
	Day 1	Day 2	Day 3
1	2.93	2.94	2.89
2	2.96	2.94	2.90
3	2.93	2.96	2.89
4	2.93	2.96	2.89
5	2.94	2.95	2.89
6	2.94	2.93	2.88
7	2.92	2.94	2.88
8	2.95	2.95	2.91
9	2.97	2.96	2.90
10	2.94	2.91	2.86
Mean	2.94	2.94	2.89
SD	0.014	0.016	0.015
%RSD	0.47	0.54	0.52

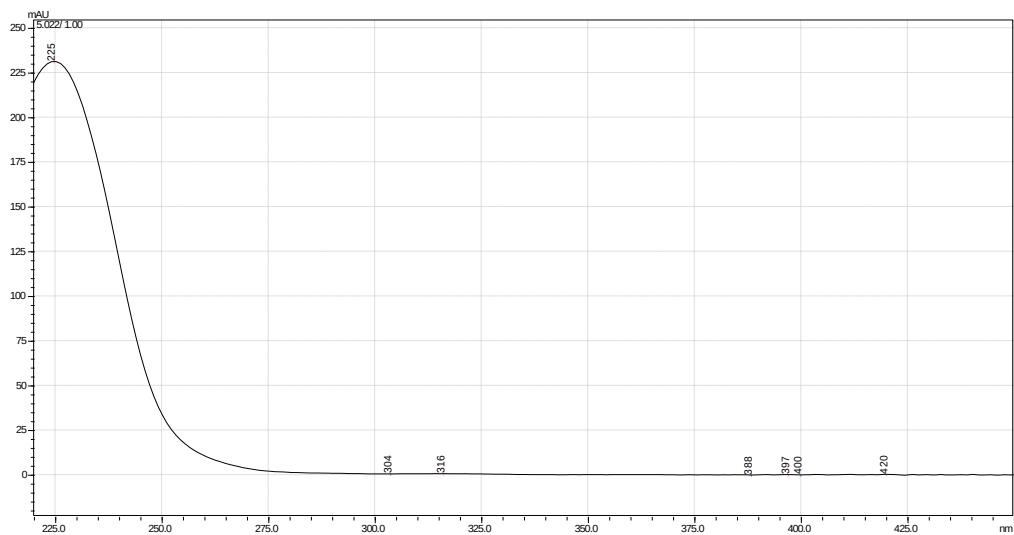
ตารางที่ 40 intermediate precision ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ pyrethrins II

Sample Conc. (%W/V)	Mean conc. (%W/V)	%RSD
3	2.92 (n=30)	1.03

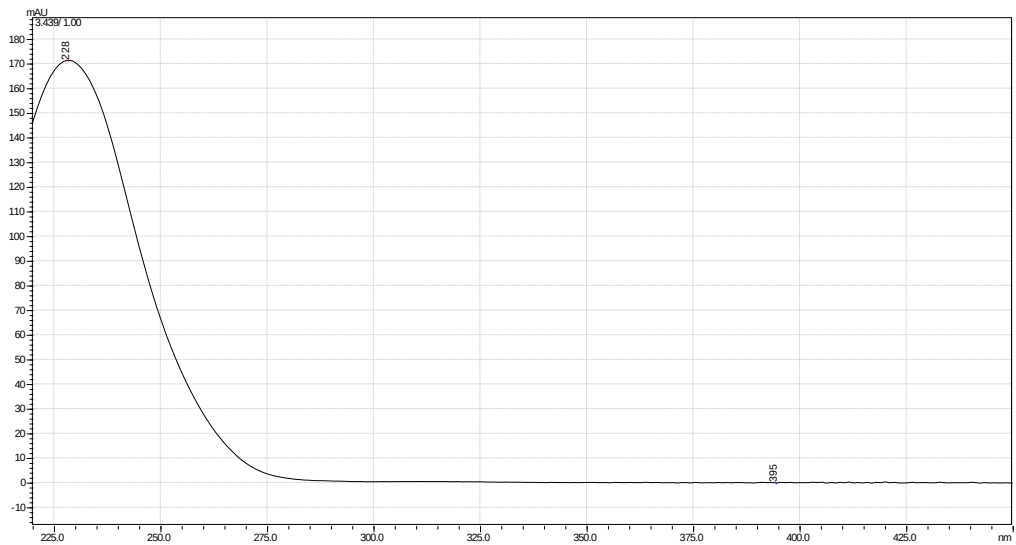
5.3.5 ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงต่อสารที่ทดสอบ (selectivity)



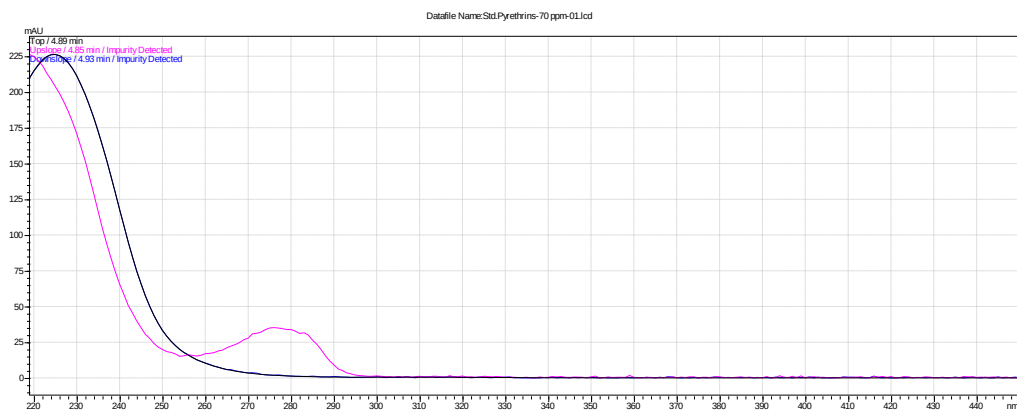
รูปที่ 26 แสดง chromatogram ของสารมาตรฐาน pyrethrin



รูปที่ 27 แสดง spectrum ของสารมาตรฐาน pyrethrin I

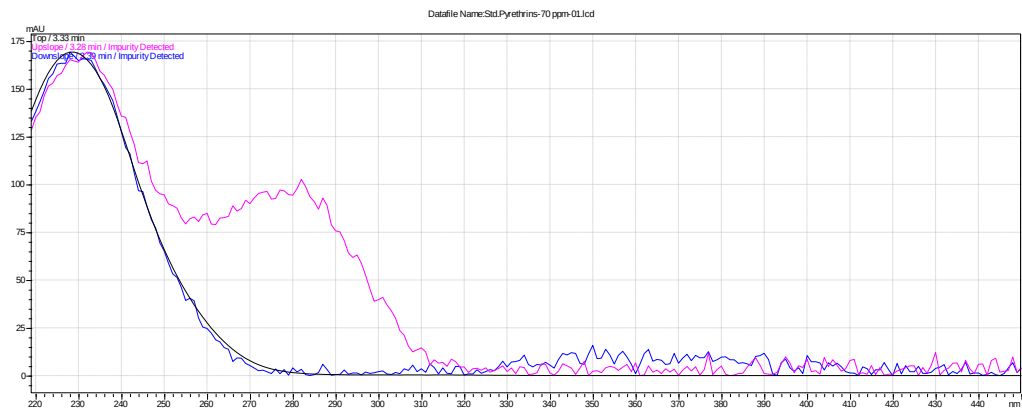


รูปที่ 28 แสดง spectrumของสารมาตรฐาน pyrethrin II



รูปที่ 29 แสดง peak purity ของ pyrethrin I

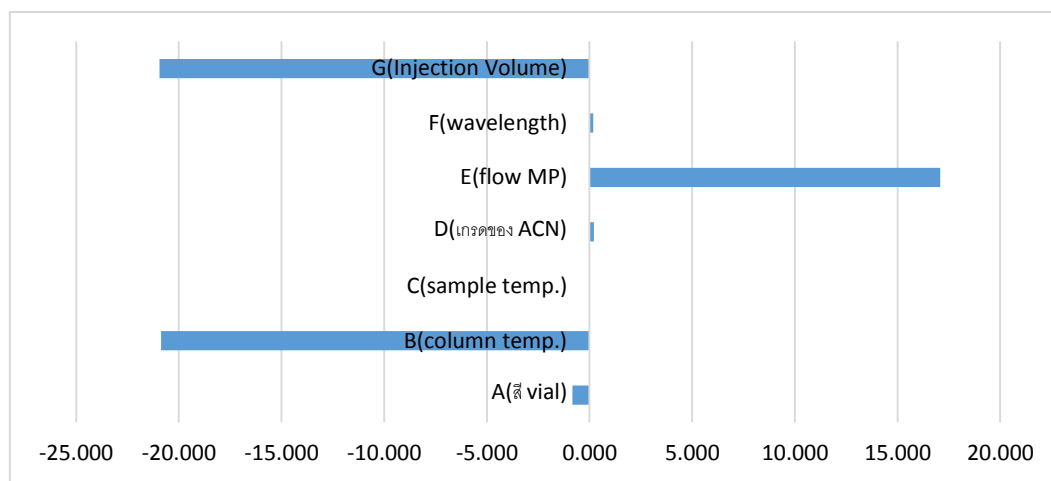
โดยมีค่า 3 point purity เท่ากับ 0.985190



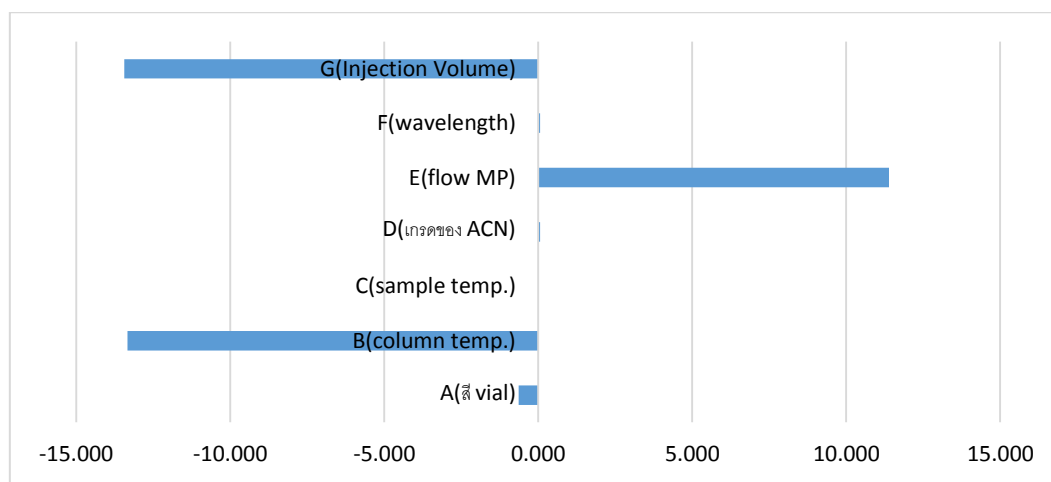
รูปที่ 30 แสดง peak purity ของ pyrethrin II

โดยมีค่า 3 point purity เท่ากับ 0.923114

5.3.6 ผลการทดสอบความคงทนของวิธี (robustness) ว่าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงปัจจัยที่ใช้ในการทดสอบได้ผลตามรูปที่ 31 และ 32 พบว่า injection volume และ column temp. มีผลต่อการทดสอบมากที่สุด รองลงมาคือ flow mobile phase



รูปที่ 31 แสดงผล robustness ของสารสำคัญ pyrethrin I



รูปที่ 32 แสดงผล robustness ของสารสำคัญ pyrethrin II

6. สรุปผลการทดลอง

วิธีการทดสอบหาปริมาณสารสำคัญ cyphenothrin, fipronil และ pyrethrins ตามที่ได้ดัดแปลงจากวิธีของ paper แล้วได้ดำเนินการทดสอบความใช้ได้ของวิธีในหัวข้อ ความเป็นเส้นตรงช่วงของการวิเคราะห์ ความแม่นยำ ความเที่ยง selectivity และ robustness ทั้ง 3 วิธีได้ผลการทดสอบเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ ซึ่งสามารถนำวิธีดังกล่าวไปใช้ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ต่อไปได้

7. ข้อเสนอแนะ

-

8. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่พิจารณาให้ดำเนินการในปีงบประมาณ 2561 เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์ฯ ที่ช่วยเหลือในการปฏิบัติงานให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

9. 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.

AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplement and Botanicals. Available source: https://www.aoac.org/aoac_prod_imis/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf, September 5, 2017

CIPAC method 2000. Prepared by the French Committee (CFAPA). Chairman: B Declercq. Based on a method supplied by Rhône-Poulenc Agro, France.

CIPAC method 2006. Prepared by the Japanese committee (JAPAC). Based on a method supplied by Sumitomo Chemical Co, Japan.

Thomas, D., J.A. Glinski, A. Wong, I.N. Acworth, and D. Mohindra. 2015. Determination of Pyrethrins in Pyrethrum Oil Extracts by UHPLC with Charged Aerosol Detection. Available source: <https://pdfs.semanticscholar.org/d60f/6a4be4a64965f390a1c31556139f6661b8a5.pdf>, July 5, 2018.

- Tilak, R., V.K. Agrawal and J. Dutta. 2005. Field performance of cyphenothrin: An integrated insecticide s. 6. Available source: <http://mrcindia.org/journal/issues/422068.pdf>, July 5, 2018
- Wang, I.H., V. Subramanian, R. Moorman, J. Burleson, and J. Ko. 1997. Direct determination of pyrethrins in pyrethrum extracts by reversed-phase high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *J. Chromatogr. A* 766, 277–281.