

โครงการพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ chlorfenapyr และ thiamethoxam ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์

นางสุนันท์ กิตติจารุวัฒนา นายชูศักดิ์ อาจสูงเนิน
นายองอาจ บุญบรรลุ นางสาวมลทิพย์ บุญชีวีต

บทคัดย่อ

ทำการพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสารสำคัญ chlorfenapyr และ thiamethoxam ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ ด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography - diode array detector (HPLC - DAD) สามารถวิเคราะห์พร้อมกัน โดยใช้ HPLC column C₁₈, 250 x 4.6 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Gemini ใช้ mobile phase คือ acetonitrile: water, gradient elution มีอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ศึกษา linearity ของ chlorfenapyr และ thiamethoxam พบว่ามีความเป็นเส้นตรงที่ระดับความเข้มข้น 0.10 - 0.80 และ 0.05 - 0.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และได้ค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.9973 และ 0.9995 ตามลำดับ การทดสอบความแม่นยำ (accuracy) ประเมินจาก % recovery อยู่ในช่วง 97.56 – 106.65 % และมี intermediate precision เท่ากับ 0.63 และ 0.70 % RSD ตามลำดับ ทดสอบ limit of quantification (LOQ) ของ chlorfenapyr และ thiamethoxam มีค่าเท่ากับ 0.0005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเหมาะสมในการนำไปตรวจหาปริมาณสารสำคัญทั้ง 2 ชนิด ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ได้ต่อไป

คำสำคัญ : Chlorfenapyr, Thiamethoxam, HPLC-DAD, วัตถุอันตราย

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Method Development and Validation for the Determination of Chlorfenapyr and Thiamethoxam in Hazardous Substances Products for Livestock

Sunan Kittijaruwattana, Chusak Ardsongnearn,
Ongart Boonbanlu, Molthip Booncheewit

Abstract

Method developments and validation for the determination of chlorfenapyr and thiamethoxam using high performance liquid chromatography - diode array detector (HPLC- DAD) techniques. The analysis of these compounds can be simultaneously performed using a 5 μ m, 250 x 4.6 mm ID, Gemini C₁₈ HPLC column. The linearities of chlorfenapyr and thiamethoxam were evaluated at the concentration range of 0.10 – 0.80 and 0.05 – 0.50 mg/mL, respectively. The correlation coefficients (*r*) were 0.9973 and 0.9995, respectively. The accuracy (%recovery) and intermediate precision were between from 97.56 – 106.65 % and 0.63 and 0.70 %RSD, respectively. The LOQ of two analytes are 0.0005 mg/mL. The result of the method validation showed that this method is suitable for the determination of two active ingredients in livestock hazardous products.

Keywords : chlorfenapyr, thiamethoxam, HPLC-DAD, hazardous substances

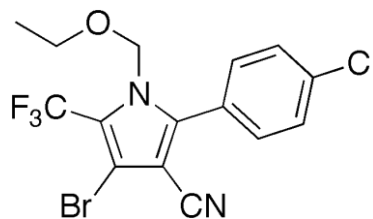
Veterinary Drugs and Hazardous Substances Assay Division, Bureau of Quality Control of Livestock Products, Department of Livestock Development.

โครงการพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ chlorfenapyr และ thiamethoxam ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์

บทนำ

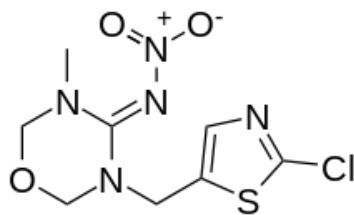
แมลงและสัตว์รบกวนเป็นปัญหาในการเลี้ยงสัตว์มาโดยตลอด และมักเกิดปัญหามากขึ้นในบางสภาวะ โดยเฉพาะในภาวะวิกฤตทางธรรมชาติ เช่น ภาวะน้ำท่วม ภัยแล้ง ยิ่งทวีความรุนแรงมากยิ่งขึ้น ส่งผลให้ผลผลิตในการเลี้ยงสัตว์ลดลง ผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ที่มีส่วนประกอบของสารป้องกันหรือกำจัดแมลง หรือสัตว์รบกวน จึงเป็นหนึ่งในทางเลือกสำคัญในการแก้ไขปัญหา นอกเหนือไปจากการจัดการฟาร์ม หรือสถานที่ประกอบการผลิตสินค้าปศุสัตว์ที่ดี ถูกสุขลักษณะ มูลค่าทางการตลาดของผลิตภัณฑ์กำจัดแมลงรบกวน จึงมีการเติบโตที่สูงขึ้น เกิดการแข่งขันทางการตลาดสูง ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องมีการตรวจสอบคุณภาพโดยเฉพาะปริมาณสารสำคัญตามที่ระบุไว้ในฉลากผลิตภัณฑ์ เพื่อป้องกันผลกระทบต่อการใช้ปศุสัตว์ที่อาจมีความเสี่ยงในการได้รับอันตราย หากผลิตภัณฑ์นั้นมีปริมาณมากเกินกว่าระบุไว้ อาจทำให้เกิดการตกค้าง ซึ่งจะก่อให้เกิดอันตรายต่อ มนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อม หรือหากมีปริมาณน้อยกว่าที่ระบุไว้จะทำให้การใช้ผลิตภัณฑ์ไม่บรรลุวัตถุประสงค์ตามต้องการ

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



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ Chlorfenapyr

Chlorfenapyr เป็นสารฆ่าแมลงในกลุ่ม Pyrroles มีคุณสมบัติเป็นสารกำจัดแมลงและสารกำจัดไร ออกฤทธิ์โดยการกิน และสัมผัส ใช้ควบคุมแมลงหลายกลุ่ม ได้แก่ แมลงหวี่ขาว เพลี้ยไฟ หนอนผีเสื้อหนอนขนใบ เพลี้ยอ่อน และด้วงปีกแข็ง ในพืชหลายชนิด เช่น ฝ้าย ข้าวโพด ถั่วเหลือง ผัก ไม้ผล นอกจากนี้ยังสามารถควบคุมไรศัตรูพืช และมีคุณสมบัติเป็นสารกำจัดไข่ในแมลงบางชนิด



รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของ Thiamethoxam

Thiamethoxam เป็นยาฆ่าแมลงในกลุ่ม neonicotinoids มีกลไกในการออกฤทธิ์ คือ หลังจากที่ยาฆ่าแมลงรับสารเข้าไปด้วยการสัมผัสหรือการกิน สารเคมีจะไปออกฤทธิ์จับกับตัวรับนิโคตินิก อะเซทิลโคลีน (nicotinic acetylcholine receptor) ทำให้มีการสะสมของสารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีนมากยิ่งขึ้น ส่งผลให้ระบบประสาทในแมลง แมลงที่ได้รับสารชนิดนี้เข้าไป จะเฉื่อยชา อ่อนแรง หยุดการกินอาหาร และตายไปในที่สุด ลักษณะเป็นสารประเภทดูดซึม สามารถใช้ได้กับกลุ่มของแมลงปากกัดทั้งหลาย รวมไปถึงเพลี้ยกระโดด เพลี้ยไฟ แมลงหวี่ขาว ปลวก หมัด เป็นต้น

ดังนั้นการตรวจสอบปริมาณสารสำคัญทั้งสองชนิดในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ จึงมีความจำเป็นเพื่อที่เกษตรกรจะได้ใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ จึงดำเนินการพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีสำหรับทดสอบหาปริมาณสารทั้งสองชนิดเพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ในท้องตลาดต่อไป

1. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ chlorfenapyr และ thiamethoxam ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ ด้วยเทคนิค HPLC - DAD

2. ขอบข่าย

ใช้สำหรับวิเคราะห์ chlorfenapyr และ thiamethoxam ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์

3. ประโยชน์ที่ได้รับ

ได้วิธีที่ผ่านการทดสอบความใช้ได้ของวิธี สามารถนำไปตรวจวิเคราะห์ chlorfenapyr และ thiamethoxam ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์

4. เครื่องมือและวัสดุวิทยาศาสตร์

4.1 เครื่องมือและวัสดุวิทยาศาสตร์

4.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

4.1.1.1 เครื่อง HPLC ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น LC - 20 พร้อมเครื่องตรวจวัดชนิด DAD

4.1.1.2 HPLC column C₁₈, 250 x 4.6 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Gemini

4.1.1.3 Micropipette ขนาด 20 - 200 ไมโครลิตร

4.1.1.4 Micropipette ขนาด 200 - 1000 ไมโครลิตร

4.1.1.5 Volumetric flask ขนาด 5, 10 และ 25 มิลลิลิตร

- 4.1.1.6 Beaker ขนาด 5, 50, 250 และ 500 มิลลิลิตร
- 4.1.1.7 Vial HPLC ใส่พร้อมฝาขนาด 2 มิลลิลิตร
- 4.1.1.8 Syringe filter ชนิด nylon ขนาด 0.2 ไมโครเมตร
- 4.1.1.9 Disposable syringe ชนิดไม่มีหัวเข็ม ขนาด 3 มิลลิลิตร
- 4.1.1.10 Reagent bottle ขนาด 1000 มิลลิลิตร
- 4.1.2 วัสดุวิทยาศาสตร์
 - 4.1.2.1 Acetonitrile, HPLC grade
 - 4.1.2.2 Acetonitrile, AR grade
 - 4.1.2.3 สารมาตรฐาน chlorfenapyr ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer ความบริสุทธิ์ 99.9 %
 - 4.1.2.4 สารมาตรฐาน thiamethoxam ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer ความบริสุทธิ์ 98.0 %
 - 4.1.2.5 สารมาตรฐาน cypermethrin ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer ความบริสุทธิ์ 98.2 %
 - 4.1.2.6 สารมาตรฐาน deltamethrin ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer ความบริสุทธิ์ 99.5 %
 - 4.1.2.7 สารมาตรฐาน bifenthrin ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer ความบริสุทธิ์ 99.5 %
 - 4.1.2.8 สารมาตรฐาน lambda-cyhalothrin ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer ความบริสุทธิ์ 98.7%
 - 4.1.2.9 สารมาตรฐาน etofenprox ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer ความบริสุทธิ์ 99.5 %
 - 4.1.2.10 สารมาตรฐาน alpha-cypermethrin ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer ความบริสุทธิ์ 97.5 %
 - 4.1.2.1 สารมาตรฐาน permethrin ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer ความบริสุทธิ์ 98.0 %
 - 4.1.2.2 สารมาตรฐาน cyfluthrin ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer ความบริสุทธิ์ 99.5 %
 - 4.1.2.3 สารมาตรฐาน flumethrin ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer ความบริสุทธิ์ 96.6 %
 - 4.1.2.4 สารมาตรฐาน beta-cyfluthrin ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer ความบริสุทธิ์ 99.0 %
 - 4.1.2.5 สารมาตรฐาน cyphenothrin ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer ความบริสุทธิ์ 95.0 %
 - 4.1.2.6 สารมาตรฐาน tetramethrin ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer ความบริสุทธิ์ 98.0 %
 - 4.1.2.7 สารมาตรฐาน s-bioallethrin ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer ความบริสุทธิ์ 99.0 %
 - 4.1.2.8 สารมาตรฐาน brodifacoum ยี่ห้อ fluka ความบริสุทธิ์ 99.3 %
 - 4.1.2.9 สารมาตรฐาน triflumuron ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer ความบริสุทธิ์ 99.5 %
 - 4.1.2.10 สารมาตรฐาน diflubenzuron ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer ความบริสุทธิ์ 99.5 %
 - 4.1.2.11 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายที่มีสารสำคัญ chlorfenapyr 240g/L SC
 - 4.1.2.12 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายที่มีสารสำคัญ thiamethoxam 10 % W/W WG)

5. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Cao และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษา chlorfenapyr ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างกะหล่ำปลีและดินโดยใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography - UV Detector (HPLC-UV) ใช้ HPLC column ชนิด C₁₈, 250 x 4.6 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร mobile phase คือ methanol : water (80/20, V/V), อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที, ปริมาตรฉีด 20 ไมโครลิตร, ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร, run time ประมาณ 20 นาที ซึ่งได้ทดลองพารามิเตอร์ต่าง ๆ ได้ผลการทดลองของตัวอย่างกะหล่ำปลีและดินดังนี้ ค่า accuracy เท่ากับ 90.6 % และ 93.3 %, ค่า repeatability อยู่ในช่วง 1.7 % - 11.8 % และ 2.8 % - 11.2 % ตามลำดับ ค่า reproducibility อยู่ในช่วง 2.2 % - 12.1 % และ 2.4 % - 11.5 % ตามลำดับ

Zhang และคณะ (2017) ได้ทำการศึกษาวิธี dynamic microwave เทียบกับวิธีการสกัดแบบ dynamic microwave ควบคู่กับการสกัดแบบ solid phase สำหรับการหาปริมาณ chlorfenapyr และ abamectin ในตัวอย่างข้าว 15 ชนิด โดยใช้เทคนิค LC - MS/MS ใช้ HPLC column ชนิด C₁₈, 250 x 4.6 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร, mobile phase คือ methanol : water (98/2, V/V) ซึ่งได้ผลพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของ chlorfenapyr และ abamectin ได้แก่ LOD ได้ค่าเท่ากับ 0.8 นาโนกรัมต่อกรัม และ inter - day ได้ค่า RSDs อยู่ในช่วง 2.7 - 8.1 %, ค่า recovery ของ chlorfenapyr อยู่ในช่วง 92.1 - 96.5 % และ abamectin เท่ากับ 88.6 - 91.0 % ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าการใช้วิธีการสกัดแบบ dynamic microwave ควบคู่กับการสกัดแบบ solid phase นั้น ช่วยลดระยะเวลาในการทดลองและให้ผลการทดลองเป็นที่น่าพอใจสามารถนำไปใช้ในการทดลอง chlorfenapyr และ abamectin ในตัวอย่างข้าวได้

Ying และ Kookana, (2004) ได้ทำการศึกษาหาปริมาณยาฆ่าแมลงในกลุ่ม neonicotinoid 3 ชนิด ได้แก่ imidacloprid, thiacloprid และ thiamethoxam ในตัวอย่างดินและตัวอย่างน้ำ โดยใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography - Diode array Detector (HPLC -DAD) ใช้ HPLC column ชนิด C₁₈, 150 x 2.1 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร, mobile phase คือ acetonitrile : water ซึ่งตัวอย่างดินนั้นสกัดด้วย acetonitrile และตัวอย่างน้ำสกัดด้วย C₁₈ Cartridges ซึ่งได้ผลทดลองพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของตัวอย่างดิน ได้ผลดังนี้ recovery ของ Thiamethoxam, Imidacloprid และ thiacloprid ได้ผลเท่ากับ 82 ± 4.2 %, 90 ± 4.2 % และ 94 ± 1.4 % ตามลำดับ ค่า LOQ (ดิน 5 กรัม) เท่ากับ 0.1, 0.1 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และผลทดลองของตัวอย่างน้ำได้ผลดังนี้ ค่า recovery ของ thiamethoxam, imidacloprid และ thiacloprid ได้ผลเท่ากับ 87 ± 3.4 %, 97 ± 3.9 % และ 97 ± 2.6 % ค่า LOQ (น้ำ 50 มิลลิลิตร) เท่ากับ 2, 2 และ 0.5 ไมโครกรัมต่อลิตร

Jasim และคณะ (2017) ได้ทำการศึกษาหาปริมาณยาฆ่าแมลง abamectin, imidacloprid, indoxacarb และ thiamethoxam โดยใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography - UV - VIS Detector (HPLC-UV) ใช้ HPLC column ชนิด C₁₈, 250 x 4.6 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร, mobile phase คือ acetonitrile : water (65/35, V/V), อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที, ปริมาตรที่ฉีด 20 ไมโครลิตร, อุณหภูมิของ column ที่ 25 องศาเซลเซียส ความยาวคลื่น 258 นาโนเมตร, run time ประมาณ 11 นาที ใช้ gradient program ซึ่งตัวอย่างดินนั้นสกัดด้วย acetonitrile และตัวอย่างน้ำสกัดด้วย C₁₈ Cartridges ซึ่งได้ทดลองพารามิเตอร์ต่าง ๆ ได้แก่ linearity, recovery, LOD, LOQ เป็นต้น

Abrahim, (2014) ได้ทำการศึกษาการปนเปื้อนและการสลายตัวของ thiamethoxam ในตัวอย่างมะเขือเทศ และดิน โดยใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography - Diode array Detector (HPLC - DAD) ใช้ HPLC column ชนิด C₁₈, 250 x 4.6 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร, mobile phase คือ acetonitrile : water (60/40, V/V), อัตราการไหล 0.7 มิลลิลิตรต่อนาที ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร, run time ประมาณ 4.05 นาที ทดลองที่ระดับความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่า recovery ของตัวอย่างมะเขือเทศเท่ากับ 99.4 % และดิน เท่ากับ 88.5 %, % CV น้อยกว่า 4 % และ 11 % ตามลำดับ ค่า repeatability อยู่ในช่วง 1.27 % - 4.77 %, LOD และ LOQ มีค่าเท่ากับ 0.02 และ 0.06 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

6. วิธีดำเนินการ

6.1 การคำนวณและการเตรียมสารเคมี

6.1.1 การคำนวณเพื่อหาปริมาณสารที่จะต้องชั่ง

$$\text{ปริมาณสารที่จะต้องชั่ง} = VF \times \text{Conc.} \times \frac{100}{P}$$

เมื่อ VF = ปริมาตรของ volumetric flask ที่ใช้

Conc. = ความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

P = ความบริสุทธิ์ของสารที่ต้องการชั่ง (%)

หมายเหตุ : เกณฑ์ช่วงความคลาดเคลื่อนในการชั่ง = ± 10 %

6.1.2 เตรียม stock standard solution chlorfenapyr ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร: ชั่งสารมาตรฐาน chlorfenapyr ประมาณ 25 มิลลิกรัม (บันทึกน้ำหนักจริง) ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile (สำหรับ ทดสอบ condition)

6.1.3 เตรียม working standard solution chlorfenapyr ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร: ปิเปต stock standard solution ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile (สำหรับ ทดสอบ condition)

- 6.1.4 เตรียม stock standard solution thiamethoxam ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร: ชั่งสารมาตรฐาน thiamethoxam ประมาณ 25 มิลลิกรัม (บันทึกน้ำหนักจริง) ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile (สำหรับทดสอบ condition)
- 6.1.5 เตรียม working standard solution thiamethoxam ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร: ปิเปต stock standard solution ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile (สำหรับ ทดสอบ condition)
- 6.1.6 เตรียม mix standard solution ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร: ปิเปต stock standard chlorfenapyr solution ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร และปิเปต stock standard Thiamethoxam solution ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile (สำหรับ ทดสอบ condition)
- 6.1.7 การเตรียม standard solution chlorfenapyr (stock A) ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร: ชั่งสารมาตรฐาน ประมาณ 101 ± 10 มิลลิกรัม (บันทึกน้ำหนักจริง) ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติม acetonitrile ลงไปประมาณ 20 มิลลิลิตร นำไป sonicate 10 นาที แล้วปรับให้ได้ปริมาตรด้วย acetonitrile (สำหรับ calibration curve)
- 6.1.8 การเตรียม standard solution chlorfenapyr (stock B) ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร: ชั่งสารมาตรฐาน ประมาณ 51 ± 5 มิลลิกรัม (บันทึกน้ำหนักจริง) ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติม acetonitrile ลงไปประมาณ 20 มิลลิลิตร นำไป sonicate 10 นาที แล้วปรับให้ได้ปริมาตรด้วย acetonitrile (สำหรับทดสอบ accuracy)
- 6.1.9 เตรียม standard solution chlorfenapyr ความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร: ชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายที่มีสารสำคัญ chlorfenapyr 240 กรัมต่อลิตร SC ประมาณ 1042 ± 104 มิลลิกรัม (บันทึกน้ำหนักจริง) ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 80 % acetonitrile (สำหรับทดสอบ range)
- 6.1.10 การเตรียม sample solution chlorfenapyr ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร: ชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายที่มีสารสำคัญ chlorfenapyr 240 กรัมต่อลิตร SC ประมาณ 208 ± 20 มิลลิกรัม (บันทึกน้ำหนักจริง) ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 80 % acetonitrile (สำหรับ accuracy)

- 6.1.11 การเตรียม standard solution thiamethoxam (stock C) ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร: ชั่งสารมาตรฐาน ประมาณ 50 ± 5 มิลลิกรัม (บันทึกน้ำหนักจริง) ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติม acetonitrile ลงไปประมาณ 20 มิลลิลิตรนำไป sonicate 10 นาที แล้วปรับให้ได้ปริมาตรด้วย acetonitrile (สำหรับ calibration curve)
- 6.1.12 การเตรียม standard solution thiamethoxam (stock D) ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร: ชั่งสารมาตรฐาน ประมาณ 25 ± 2.5 มิลลิกรัม (บันทึกน้ำหนักจริง) ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติม acetonitrile ลงไปประมาณ 20 มิลลิลิตร นำไป sonicate 10 นาที แล้วปรับให้ได้ปริมาตรด้วย acetonitrile (สำหรับ accuracy)
- 6.1.13 เตรียม standard solution thiamethoxam ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร: ชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายที่มีสารสำคัญ thiamethoxam 10 % W/W WG ประมาณ 1250 ± 125 มิลลิกรัม (บันทึกน้ำหนักจริง) ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 80 % acetonitrile (ใช้ในการทดสอบ range)
- 6.1.14 การเตรียม sample solution thiamethoxam ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร: ชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายที่มีสารสำคัญ thiamethoxam 10 % W/W WG ประมาณ 250 ± 25 มิลลิกรัม (บันทึกน้ำหนักจริง) ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 80 % acetonitrile (สำหรับ accuracy)

6.2 วิธีการทดสอบ

- 6.2.1 ทดลอง condition ดัดแปลงตามวิธีของ Cao และคณะ (2005) ซึ่งใช้ HPLC column C_{18} , 250 x 4.6 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Kromasil เนื่องจากห้องปฏิบัติการไม่มี HPLC column ดังกล่าว จึงได้ทำการทดลอง HPLC column ที่มีในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ HPLC column C_{18} , 250 x 4.6 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Gemini โดยทำการทดลอง working standard solution ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ condition ตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 Condition ดัดแปลงตามวิธีของ Cao และคณะ (2005)

Parameters	Condition
Mobile phase:	Methanol : water (80 : 20, V/V)
Flow rate:	1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
Injection volume:	20 ไมโครลิตร
Detector:	DAD 260 นาโนเมตร
Run time:	40 นาที

6.2.2 ทดลอง condition ดัดแปลงตามวิธีของ Jasim และคณะ (2017) ซึ่งใช้ HPLC column C₁₈, 250 x 4.6 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร ยี่ห้อ NUCLEODUR® เนื่องจากห้องปฏิบัติการไม่มี HPLC column ดังกล่าว จึงใช้ HPLC column C₁₈, 250 x 4.6 มิลลิเมตร (ID), 5 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Gemini ทำการทดลองกับ working standard solution ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ condition ตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 Condition ดัดแปลงวิธีตาม Jasim และคณะ (2017)

Parameters	Condition
Mobile phase:	Acetonitrile: water (65: 35, V/V)
Flow rate:	1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
Injection volume:	20 ไมโครลิตร
Detector:	DAD 258 นาโนเมตร
Run time:	40 นาที

6.2.3 ทดสอบความสามารถในการละลายของตัวอย่างที่มีสารสำคัญคือ chlorfenapyr 240 กรัมต่อลิตร SC และตัวอย่างที่มีสารสำคัญคือ thiamethoxam 10 % W/W WG โดยใช้ น้ำ , acetonitrile, 20 % acetonitrile และ 80 % acetonitrile ในการละลายตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

6.2.4 ทดสอบช่วงของการวิเคราะห์ (range) โดยเตรียม calibration curve chlorfenapyr ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.01 - 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ calibration curve thiamethoxam ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.005 - 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเตรียมตามตารางที่ 3 โดยฉีดความเข้มข้นละ 2 injection

ตารางที่ 3 การเตรียม solution สำหรับทดสอบ range ของ chlorfenapyr และ thiamethoxam

No.	Stock 10 mg/mL chlorfenapyr (μL)	Stock 5 mg/mL thiamethoxam (μL)	Final volume (80%ACN) (mL)	Final Conc. chlorfenapyr (mg/mL)	Final Conc. thiamethoxam (mg/mL)
1	5	5	5	0.01	0.005
2	10	10	5	0.02	0.01
3	20	20	5	0.04	0.02
4	40	40	5	0.08	0.04
5	50	50	5	0.10	0.05
6	100	100	5	0.20	0.10
7	200	200	5	0.40	0.20
8	400	400	5	0.80	0.40
9	600	600	5	1.20	0.60
10	800	800	5	1.60	0.80
11	1000	1000	5	2.00	1.00
12	2000	2000	5	4.00	2.00
13	2500	2500	5	5.00	2.50

6.2.5 ทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) โดยเตรียม calibration curve chlorfenapyr ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.1 - 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 และ 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และ calibration curve thiamethoxam ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.05 - 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งเตรียมดังตารางที่ 4 โดยฉีดความเข้มข้นละ 2 injection ทำการทดสอบ 3 วัน นำค่าพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานและความเข้มข้นไปสร้างกราฟหาค่า correlation coefficient (r) เกณฑ์การยอมรับ $r > 0.99$ (AOAC, 2016)

ตารางที่ 4 การเตรียม solution สำหรับทดสอบ linearity ของ chlorfenapyr และ thiamethoxam

No.	Std. stock A 4 mg/mL (μ L)	Std. stock C 2 mg/mL (μ L)	Final volume (80%ACN) (mL)	Final Conc. Chlorfenapyr (mg/mL)	Final Conc. Thiamethoxam (mg/mL)
1	125	125	5	0.10	0.05
2	250	250	5	0.20	0.10
3	375	375	5	0.30	0.15
4	500	500	5	0.40	0.20
5	625	750	5	0.50	0.30
6	750	1000	5	0.60	0.40
7	1000	1250	5	0.80	0.50

6.2.6 การทดสอบ accuracy chlorfenapyr และ thiamethoxam

6.2.6.1 การทำ standard addition chlorfenapyr ที่ ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.36, 0.40 และ 0.44 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ Thiamethoxam ที่ 0.18, 0.20 และ 0.22 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมตามตารางที่ 5 โดยทำความเข้าใจความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ ๆ ละ 2 injection ทำการทดสอบ 3 วัน เกณฑ์การยอมรับ % recovery อยู่ในช่วง 90 - 107 และ % RSD ≤ 2 (AOAC, 2016)

ตารางที่ 5 การเตรียม standard addition ของ chlorfenapyr และ thiamethoxam

No.	Chlorfenapyr				Thiamethoxam				Final Vol. (80% ACN) (mL)
	Stock B 2mg/mL (μ L)	Stock sample 2mg/mL (μ L)	Total Conc. (mg/mL)	Final Conc. (Std+Stock sample) (mg/mL)	Stock D 1mg/mL (μ L)	Stock sample 1mg/mL (μ L)	Total Conc. (mg/mL)	Final Conc. (Std+Stock sample) (mg/mL)	
1	400	500	Stock B 0.16 sample 0.20	0.36	400	500	Stock D 0.08 sample 0.10	0.18	5
2	500	500	Stock B 0.20 sample 0.20	0.40	500	500	Stock D 0.10 sample 0.10	0.20	5
3	600	500	Stock B 0.24 sample 0.20	0.44	600	500	Stock D 0.12 sample 0.10	0.22	5

6.2.6.2 การหาค่าความเข้มข้นที่แน่นอนของ stock sample chlorfenapyr และ thiamethoxam ที่ความเข้มข้น 0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมตามตารางที่ 6 โดยทำการความเข้มข้นจำนวน 7 ซ้ำ ๆ ละ 2 injection ทำการทดสอบ 3 วัน เกณฑ์การยอมรับ % RSD $\leq$ 2 (AOAC, 2016)

ตารางที่ 6 การหาค่าความเข้มข้นที่แน่นอนของ ตัวอย่าง chlorfenapyr และ thiamethoxam

No.	Chlorfenapyr		Thiamethoxam		Final Vol. (80% ACN) (mL)
	Stock sample 2 mg/mL (μ L)	Final Conc. (mg/mL)	Stock sample 1 mg/mL (μ L)	Final Conc. (mg/mL)	
1	500	0.20	500	0.10	5

6.2.6.3 การหาค่าความเข้มข้นที่แน่นอนของ standard solution chlorfenapyr (stock B) และ standard solution thiamethoxam (stock D) ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมดังตารางที่ 7 โดยเตรียมจำนวน 3 ซ้ำ ๆ ละ 2 injection และทำการทดสอบ 3 วัน เกณฑ์การยอมรับ % RPD $\leq$ 2 (AOAC, 2016)

ตารางที่ 7 การหาค่าความเข้มข้นที่แน่นอนของ standard solution chlorfenapyr และ thiamethoxam

No.	Chlorfenapyr		Thiamethoxam		Final Vol. (80% ACN) (mL)
	Stock B 2 mg/mL (μ L)	Final Conc. (mg/mL)	Stock D 1 mg/mL (μ L)	Final Conc. (mg/mL)	
1	500	0.20	500	0.10	5

6.2.6.4 การทดสอบ precision ของ chlorfenapyr

การเตรียมตัวอย่างความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร: ซึ่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายที่มีสารสำคัญ chlorfenapyr 240 กรัมต่อลิตร SC ประมาณ 83 ± 8.2 มิลลิกรัม (บันทึกน้ำหนักจริง) ลงใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม 80 % acetonitrile ลงไปประมาณ 40 มิลลิลิตร นำไป sonicate 10 นาที แล้วปรับให้ได้ปริมาตรด้วย 80 % acetonitrile จำนวน 10 ซ้ำ ๆ ละ 2 injection ทำการทดสอบ 3 วัน เกณฑ์การยอมรับ % RSD $\leq$ 2 (AOAC, 2016)

6.2.6.5 การทดสอบ precision ของ thiamethoxam

การเตรียมตัวอย่างความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร: ตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายที่มีสารสำคัญ thiamethoxam 10 % W/W WG ประมาณ 100 ± 10 มิลลิกรัม (บันทึกน้ำหนักจริง) ลงใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำ 80 % acetonitrile ลงไปประมาณ 40 มิลลิลิตร นำไป sonicate 10 นาที แล้วปรับให้ได้ปริมาตรด้วย 80 % acetonitrile จำนวน 10 ซ้ำ ๆ ละ 2 injection ทำการทดสอบ 3 วัน เกณฑ์การยอมรับ % RSD ≤ 2 (AOAC, 2016)

6.2.6.6 การทดสอบ LOQ ของ chlorfenapyr และ thiamethoxam

โดยเตรียม standard solution stock B และ stock D ที่ความเข้มข้น 0.0005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเตรียมจำนวน 7 ซ้ำ ๆ ละ 2 injection เกณฑ์การยอมรับ %RSD ≤ 2 (AOAC, 2016)

6.2.6.7 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงต่อสารที่ทดสอบ (selectivity)

โดยแสดงความสามารถของการแยกของสาร (resolution) ของสารที่คาดว่าจะมีผลกระทบต่อสารตัวอย่าง ได้แก่ cypermethrin, deltamethrin, bifenthrin, lambda-cyhalothrin, etofenprox, alpha-cypermethrin, permethrin, cyfluthrin, flumethrin, beta-cyfluthrin, cyphenothrin, tetramethrin, s-bioallethrin, brodifacoum, triflumuron และ diflubenzuron ที่ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

6.2.6.8 การทดสอบ robustness ของ chlorfenapyr และ thiamethoxam

เป็นการทดสอบความคงทนของวิธีว่าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงปัจจัยที่ใช้ในการทดสอบแล้วจะยังให้ผลการทดสอบเหมือนเดิมหรือไม่ โดยปัจจัยต่าง ๆ มีดังตารางที่ 8 และวางแผนการทดสอบตามวิธีของ Youden's ดังตารางที่ 9 โดยเตรียม standard solution stock B และ stock D ที่ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเตรียมจำนวน 2 ซ้ำ ๆ ละ 2 injection

ตารางที่ 8 parameters ที่ใช้ในการทดสอบ robustness

Factor	Units	Limits	Level (-1)	Level (+1)	Normal value
Vial (A/a)	-	-	amber = A	Clear = a	-
The column temperature (B/b)	°C	±5	20 = B	30 = b	25
Percentage organic solvent (%B) in the mobile phase at start of the gradient (C/c)	%	±1	29 = C	31 = c	30
(%B) in the mobile phase at end of the gradient (D/d)	%	±2	28 = D	32 = d	30
ยี่ห้อ ของ acetonitrile (E/e)	-	-	RCI = E	Daejung = e	-
The flow rate of mobile phase (F/f)	mL/min	±1	0.9 = F	1.1 = f	1.0
The wavelength of detector (G/g)	nm	±5	253 = G	263 = g	258

ตารางที่ 9 แผนการทดสอบ Robustness ด้วยวิธี Youden's

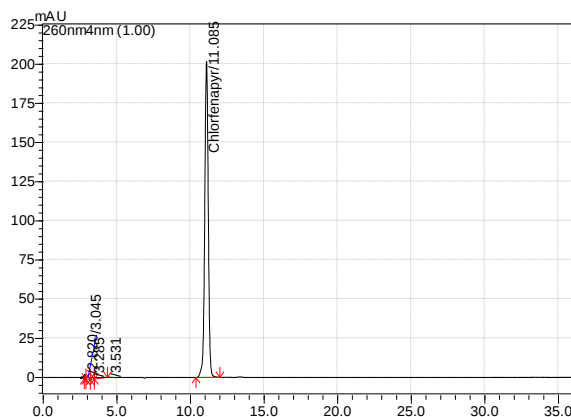
Parameter	จำนวนการทดสอบ							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Vial	A	A	A	A	a	a	a	a
The column temperature	B	B	b	b	B	B	b	b
Percentage organic solvent (%B) in the mobile phase at start of the gradient	C	c	C	c	C	c	C	c
(%B) in the mobile phase at end of the gradient	D	D	d	d	d	d	D	D
ยี่ห้อ ของ acetonitrile	E	e	E	e	e	E	e	E
The flow rate of mobile phase	F	f	f	F	F	f	f	F
The wavelength of detector	G	g	g	G	g	G	G	g
ผล	S	T	U	V	W	X	Y	Z

7. ผลการทดสอบ

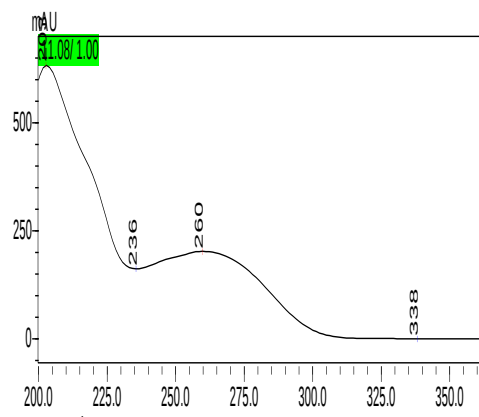
7.1 ผลการทดลองดัดแปลงตามวิธีของ Cao และคณะ (2005) โดยใช้ HPLC column ยี่ห้อ Gemini ได้ผลตามตารางที่ 10 และรูปที่ 3 – 7

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบ chlorfenapyr และ thiamethoxam

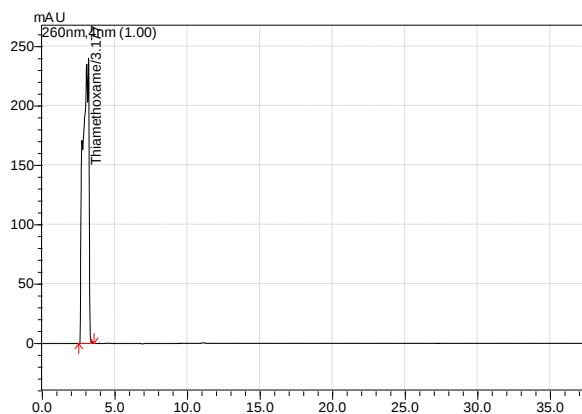
ผลการทดสอบ	Rt (min)	Area	Tailing factor	K Prime	Theoretical plate
สารมาตรฐาน chlorfenapyr	11.1	3366991	1.0	1.5	10300
สารมาตรฐาน thiamethoxam	3.2	6991196	0.6	0.0	354



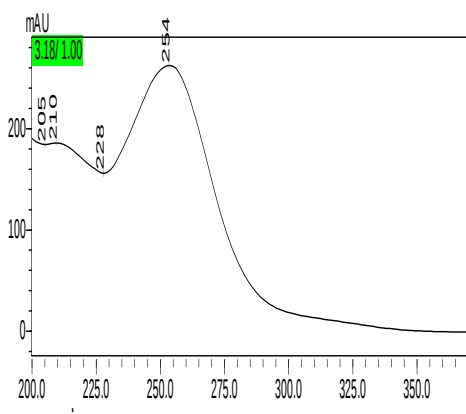
รูปที่ 3 Chromatogram ของสารมาตรฐาน chlorfenapyr



รูปที่ 4 Spectrum ของสารมาตรฐาน chlorfenapyr



รูปที่ 5 Chromatogram ของสารมาตรฐาน thiamethoxam



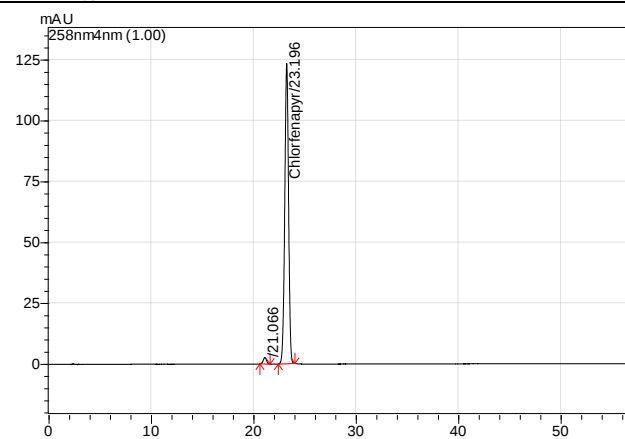
รูปที่ 6 Spectrum ของสารมาตรฐาน thiamethoxam

7.2 ผลการทดลองดัดแปลงตามวิธีของ Jasim และคณะ (2017) โดยใช้ HPLC column

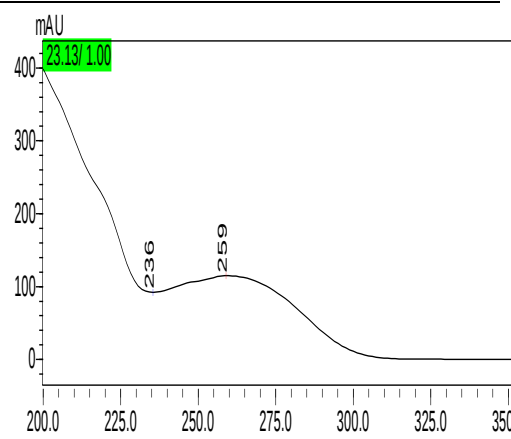
ยี่ห้อ Gemini ได้ผลตามตารางที่ 11 และรูปที่ 7 - 10

ตารางที่ 11 ผลการทดสอบ chlorfenapyr และ thiamethoxam

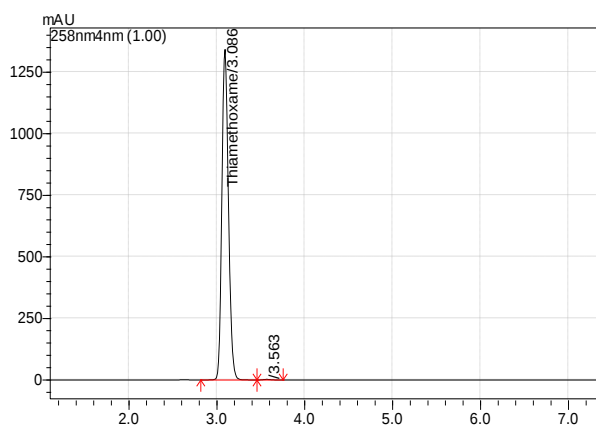
ผลการทดสอบ	Rt (min)	Area	Tailing factor	k Prime	Theoretical plate
สารมาตรฐาน chlorfenapyr	23.2	3187280	1.0	0.1	18368
สารมาตรฐาน thiamethoxam	3.1	6962220	1.3	0.0	6466



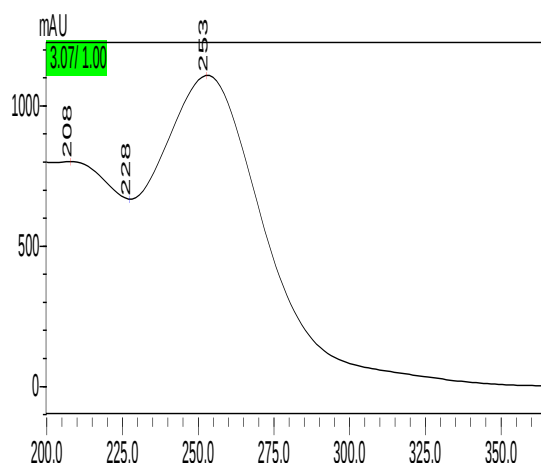
รูปที่ 7 Chromatogram ของสารมาตรฐาน chlorfenapyr



รูปที่ 8 Spectrum ของสารมาตรฐาน chlorfenapyr



รูปที่ 9 Chromatogram ของสารมาตรฐาน thiamethoxam

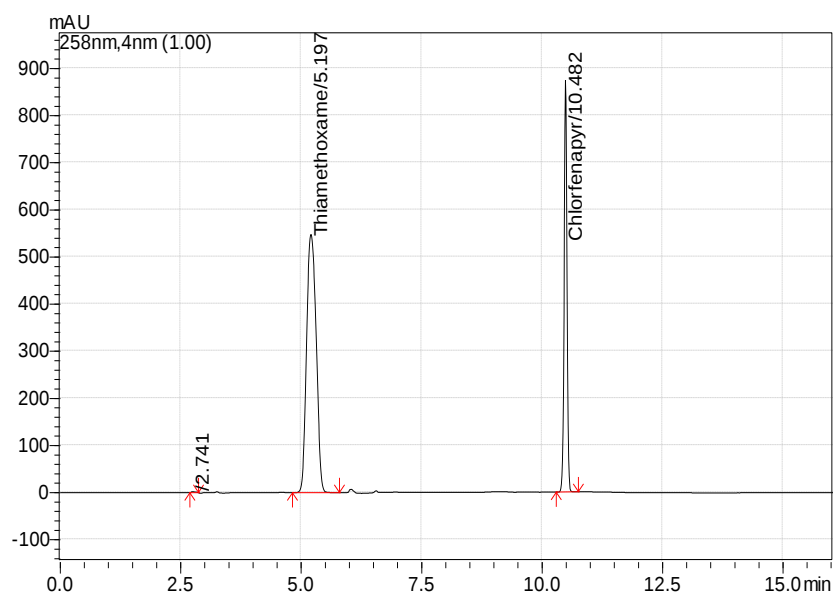


รูปที่ 10 Spectrum ของสารมาตรฐาน thiamethoxam

7.3 ผลปรับเปลี่ยน condition ใหม่ เพื่อให้มีความเหมาะสมที่จะทดสอบสารทั้งชนิดในคราวเดียวกัน ซึ่งใช้วิธีที่ดัดแปลงตามวิธีของ Jasim และคณะ (2017) เพื่อลดระยะเวลาในการทดสอบ ซึ่งได้ condition ดังตารางที่ 12 และผลการทดสอบดังรูปที่ 12

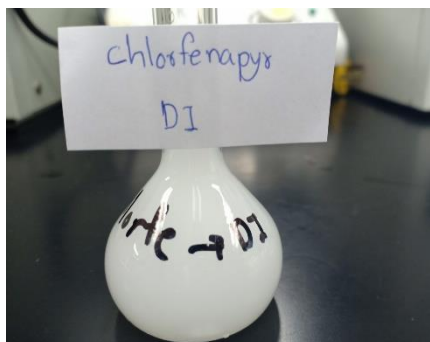
ตารางที่ 12 condition ที่เหมาะสมกับการทดสอบ chlorfenapyr และ thiamethoxam

Parameter	Condition
HPLC column	Gemini C18, 5 ไมโครเมตร, 4.6 x 250 มิลลิเมตร
Mobile phase:	Acetonitrile: water (65: 35, V/V)
Gradient program	Time (นาที) Acetonitrile DI water
	0.01 30 70
	1 80 20
	2 80 20
	5 100 0
	7 30 70
	15 30 70
Flow rate	1.0 มิลลิลิตร/นาที
Injection vol.	10 ไมโครลิตร
Run time	15 นาที

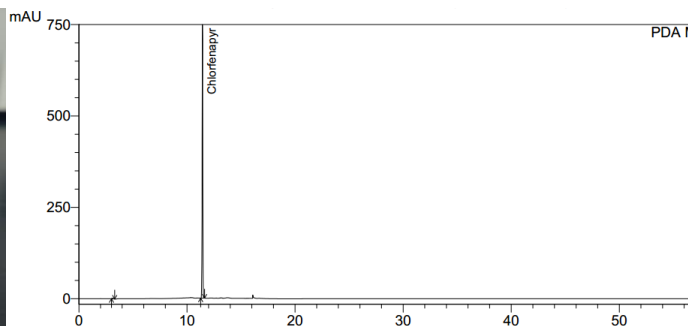


รูปที่ 11 Chromatogram ของ chlorfenapyr และ thiamethoxam

7.4 ผลการทดสอบความสามารถในการละลายของตัวอย่างที่มีสารสำคัญคือ chlorfenapyr 240 g/L SC และตัวอย่างที่มีสารสำคัญคือ thiamethoxam 10 % W/W WG โดยใช้ น้ำ, acetonitrile, 20 % acetonitrile และ 80 % acetonitrile ในการละลาย ให้ผลการทดสอบดังรูปที่ 12 - 27 และตารางที่ 13 - 14 ซึ่งจากการทดสอบแล้วจะเลือกใช้ 80 % acetonitrile ในการละลายตัวอย่างต่อไป



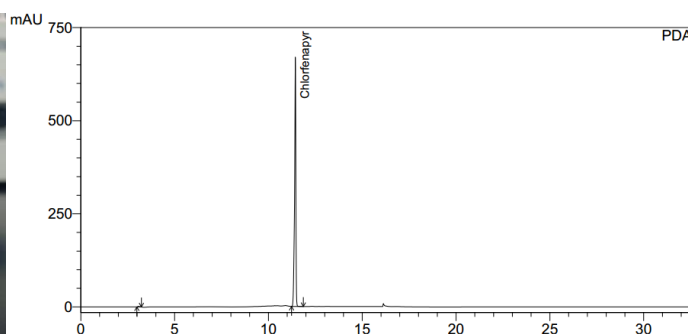
รูปที่ 12 ลักษณะของตัวอย่าง chlorfenapyr ละลายในน้ำ



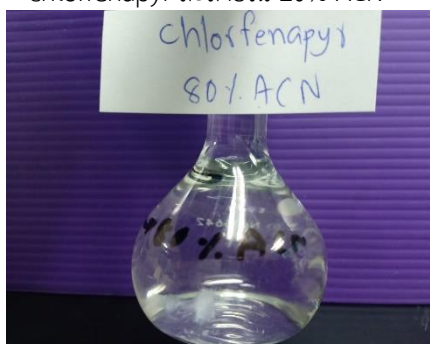
รูปที่ 13 chromatogram ของ chlorfenapyr ละลายในน้ำ



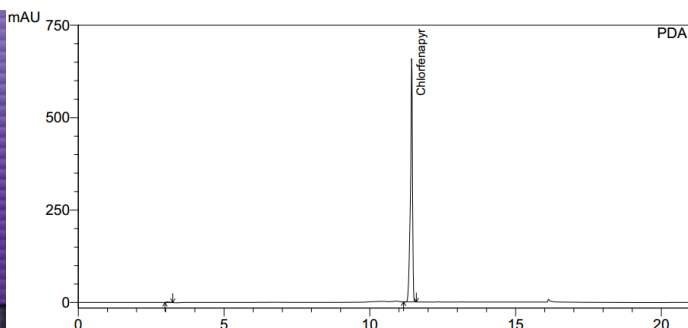
รูปที่ 14 ลักษณะของตัวอย่าง chlorfenapyr ละลายใน 20% ACN



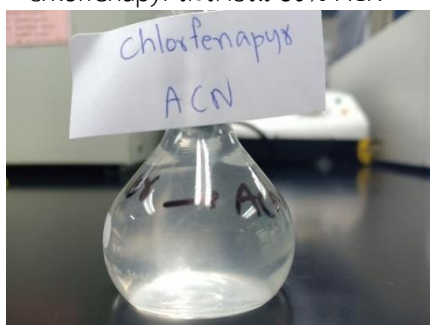
รูปที่ 15 chromatogram ของ chlorfenapyr ละลายใน 20% ACN



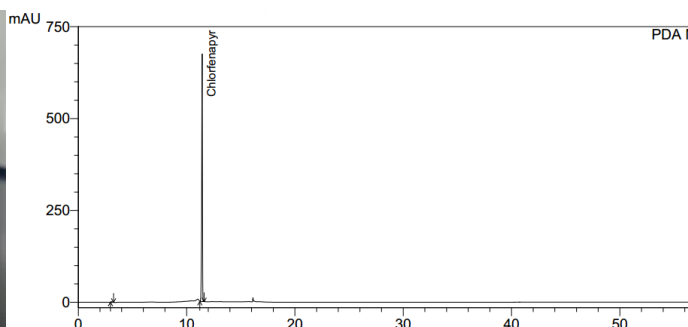
รูปที่ 16 ลักษณะของตัวอย่าง chlorfenapyr ละลายใน 80% ACN



รูปที่ 17 chromatogram ของ chlorfenapyr ละลายใน 80% ACN



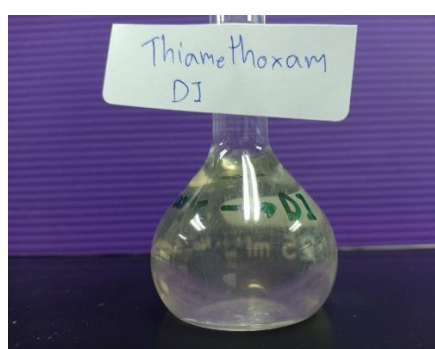
รูปที่ 18 ลักษณะของตัวอย่าง chlorfenapyr ละลายใน ACN



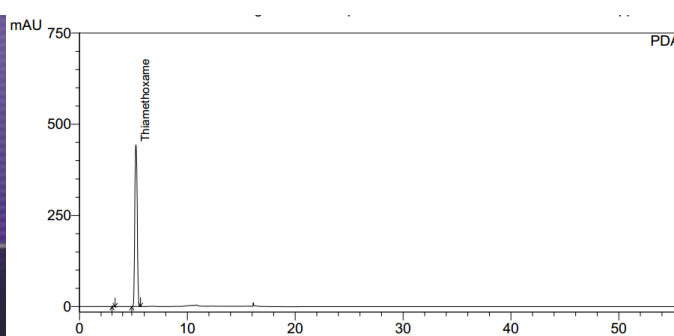
รูปที่ 19 chromatogram ของ chlorfenapyr ละลายใน ACN

ตารางที่ 13 ผลการทดสอบตัวอย่างที่มีสารสำคัญ chlorfenapyr 240 กรัมต่อลิตร SC

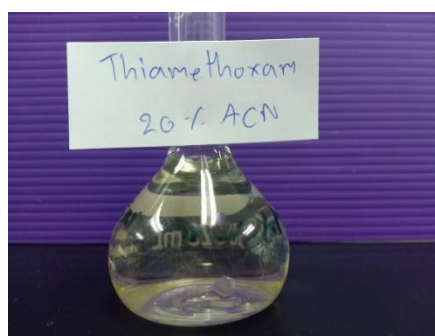
ชื่อสาร	Rt (min)	Area	Tailing factor	k Prime	Theoretical plate
แบบที่ 1 (DI)	5.2	6902017	1.1	0.7	2701
แบบที่ 2 (ACN)	5.2	3926807	1.0	0.7	2223
แบบที่ 3 (20%ACN)	5.2	6788932	1.1	0.7	2612
แบบที่ 4 (80%ACN)	5.2	6852101	1.1	0.7	2316



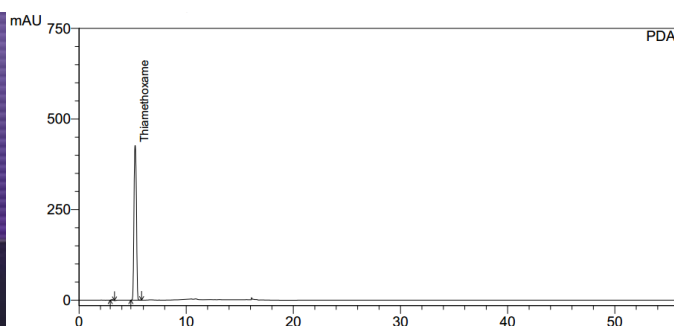
รูปที่ 20 ลักษณะของตัวอย่าง thiamethoxam ละลายในน้ำ



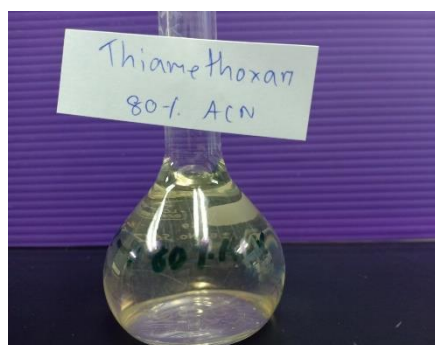
รูปที่ 21 Chromatogram ของ thiamethoxam ละลายในน้ำ



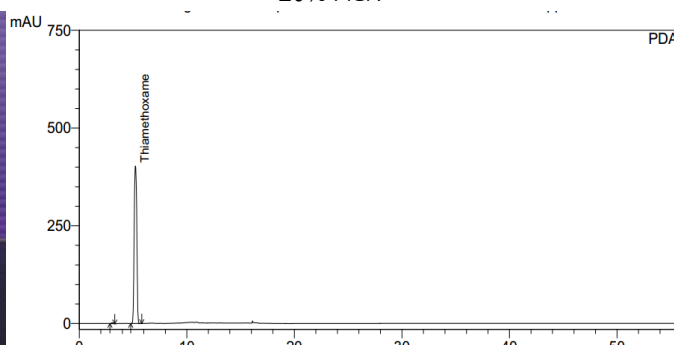
รูปที่ 22 ลักษณะของตัวอย่าง thiamethoxam ละลายใน 20% ACN



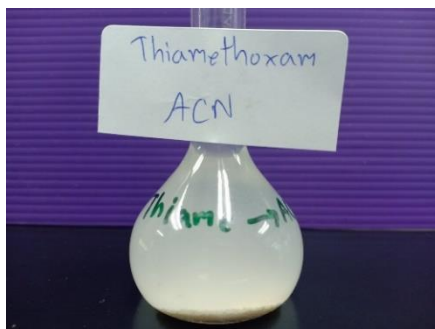
รูปที่ 23 Chromatogram ของ thiamethoxam ละลายใน 20% ACN



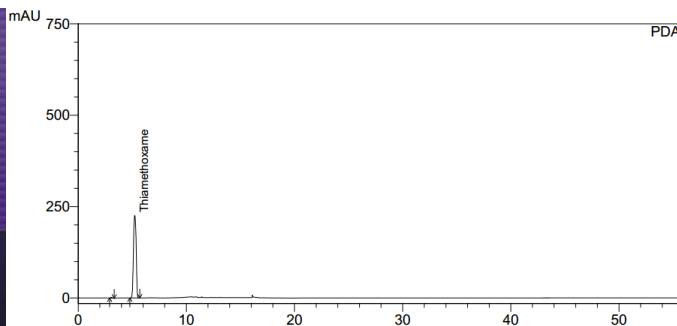
รูปที่ 24 ลักษณะของตัวอย่าง thiamethoxam ละลายใน 80% ACN



รูปที่ 25 Chromatogram ของ thiamethoxam ละลายใน 80% ACN



รูปที่ 26 ลักษณะของตัวอย่าง
thiamethoxam ละลายใน ACN



รูปที่ 27 Chromatogram ของ thiamethoxam ละลายใน ACN

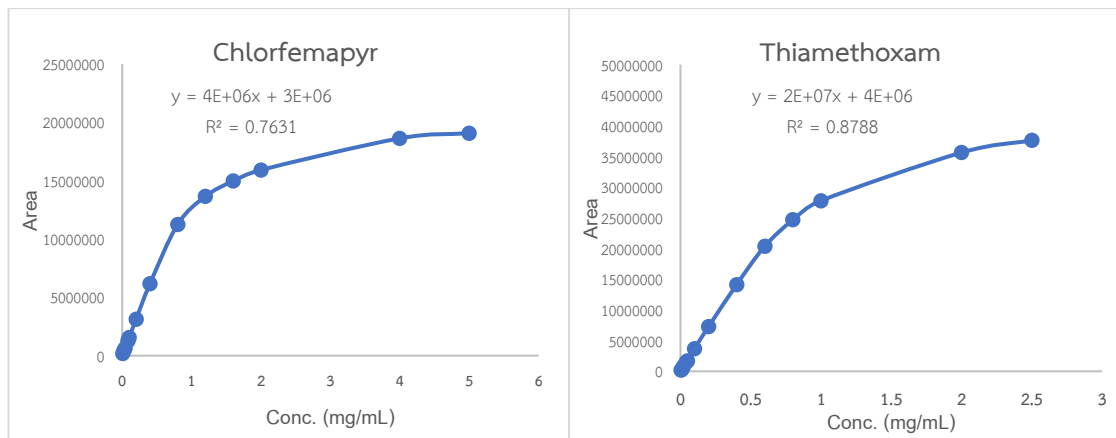
ตารางที่ 14 ผลการทดสอบตัวอย่างที่มีสารสำคัญ thiamethoxam 10 % W/W WG

ชื่อสาร	Rt (min)	Area	Tailing factor	k Prime	Theoretical plate
แบบที่ 1 (DI)	11.4	3146840	1.0	2.7	145133
แบบที่ 2 (ACN)	11.4	3118265	0.8	2.8	128059
แบบที่ 3 (20%ACN)	11.4	3164251	0.8	2.7	122679
แบบที่ 4 (80%ACN)	11.4	3186354	0.8	2.8	120642

7.5 ผลการทดสอบ range ของ chlorfenapyr และ thiamethoxam โดยเตรียม calibration curve chlorfenapyr ที่ความเข้มข้นในช่วง 0.01 – 5.0 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร และ calibration curve thiamethoxam ให้มีความเข้มข้นในช่วง 0.005 – 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรให้ผลตามรูปที่ 28 – 29

ตารางที่ 15 ผลการทดสอบ range ของ chlorfenapyr และ thiamethoxam

Chlorfenapyr		Thiamethoxam	
Concentration (mg/mL)	Area	Concentration (mg/mL)	Area
0.01	171560	0.005	178618
0.02	414775	0.010	364209
0.04	631140	0.020	733978
0.08	1260477	0.040	1462859
0.10	1557991	0.050	1682940
0.20	3113325	0.100	3692831
0.40	6161946	0.200	7274090
0.80	11250026	0.400	14138976
1.20	13656238	0.600	20379333
1.60	14971228	0.800	24687777
2.00	15913364	1.000	27810081
4.00	18623608	2.000	35654839
5.00	19063075	2.500	37645888
Slope	4046225.13	Slope	16311985.12
Intercept	3405.74	Intercept	3822794.78
r^2	0.76312	r^2	0.87885
r	0.87357	r	0.93747



รูปที่ 28 calibration curve ที่ได้จากการทดสอบ range ของ Chlorfenapyr

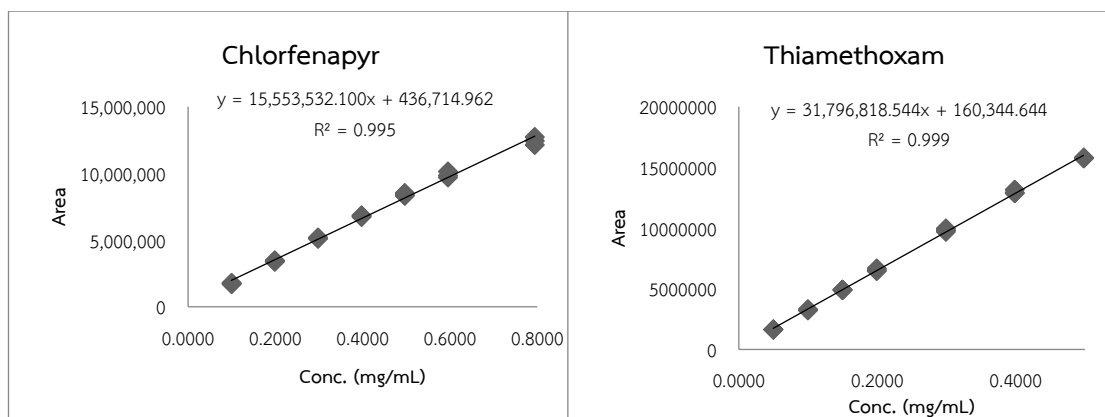
รูปที่ 29 calibration curve ที่ได้จากการทดสอบ range ของ Thiamethoxam

เนื่องจากระดับที่ทดสอบ range พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของ chlorfenapyr 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ ที่ระดับความเข้มข้นของ thiamethoxam 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขึ้นไปมีความไม่เป็นเส้นตรง จึงปรับลดช่วงการวิเคราะห์เป็น 0.1-0.8 และ 0.05-0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

7.6 ผลการทดสอบ linearity ของ chlorfenapyr และ thiamethoxam โดยเตรียม calibration curve chlorfenapyr ที่ความเข้มข้นในช่วง 0.1 – 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ calibration curve thiamethoxam ให้มีความเข้มข้นในช่วง 0.005 – 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ผลตามตารางที่ 16 และรูปที่ 30 – 31

ตารางที่ 16 ผลการทดสอบ linearity ของ chlorfenapyr และ thiamethoxam

Chlorfenapyr				Thiamethoxam			
Conc. (mg/mL)	Day 1	Day 2	Day 3	Conc. (mg/mL)	Day 1	Day 2	Day 3
0.0993	1687653	1793757	1756744	0.0498	1629548	1659313	1645763
0.1986	3453236	3453235	3370409	0.0996	3227105	3283626	3287795
0.2979	5104424	5168480	5167447	0.1494	4889347	4909192	4935937
0.3972	6728673	6793719	6852300	0.1992	6458945	6542291	6660214
0.4964	8315580	8403422	8523037	0.2988	9767824	9785253	9965181
0.5957	9695356	9837019	10142191	0.3984	12872344	12907121	13162176
0.7943	12429593	12122898	12724778	0.4980	15747287	15738322	15807779
Slope	15553532.10			Slope	31796818.54		
Intercept	436714.96			Intercept	160344.64		
r^2	0.99464			r^2	0.99901		
r	0.9973			r	0.9995		



รูปที่ 30 calibration curve ที่ได้จากการทดสอบ
linearity ของ chlorfenapyr

รูปที่ 31 calibration curve ที่ได้จากการทดสอบ
linearity ของ thiamethoxam

จากตารางที่ 10 พิจารณาค่า r พบว่ามีค่า > 0.99 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการ
ทดสอบ linearity ของ chlorfenapyr และ thiamethoxam นั้นมีความเป็นเส้นตรง

7.7 ผลการทดสอบ accuracy ของ chlorfenapyr และ thiamethoxam ได้ผลทดสอบอยู่
ในเกณฑ์ 90 - 107 % ดังตารางที่ 17 - 18

ตารางที่ 17 ผลการทดสอบ accuracy ของ chlorfenapyr

No.	Chlorfenapyr								
	Day 1			Day 2			Day 3		
	0.36 mg/mL	0.40 mg/mL	0.44 mg/mL	0.36 mg/mL	0.40 mg/mL	0.44 mg/mL	0.36 mg/mL	0.40 mg/mL	0.44 mg/mL
1	0.36	0.41	0.46	0.35	0.38	0.43	0.34	0.38	0.42
2	0.36	0.40	0.46	0.35	0.39	0.43	0.34	0.38	0.43
3	0.35	0.41	0.45	0.35	0.39	0.43	0.34	0.38	0.43
4	0.35	0.41	0.46	0.35	0.38	0.43	0.34	0.38	0.43
5	0.35	0.41	0.46	0.36	0.39	0.43	0.34	0.38	0.43
6	0.36	0.41	0.45	0.35	0.38	0.43	0.34	0.38	0.43
7	0.36	0.41	0.45	0.35	0.38	0.43	0.33	0.38	0.42
Mean	0.36	0.41	0.45	0.35	0.39	0.43	0.34	0.38	0.43
SD	0.003	0.003	0.004	0.002	0.004	0.002	0.001	0.002	0.001
%RSD	0.75	0.70	0.78	0.48	0.91	0.43	0.30	0.56	0.30
%Recovery	97.56	103.85	106.07	105.66	100.90	102.99	102.34	104.39	106.65

ตารางที่ 18 ผลการทดสอบ accuracy ของ chlorfenapyr

No.	Thiamethoxam								
	Day 1			Day 2			Day 3		
	0.18 mg/mL	0.20 mg/mL	0.22 mg/mL	0.18 mg/mL	0.20 mg/mL	0.22 mg/mL	0.18 mg/mL	0.20 mg/mL	0.22 mg/mL
1	0.18	0.21	0.23	0.19	0.21	0.23	0.18	0.20	0.22
2	0.18	0.21	0.23	0.19	0.21	0.23	0.18	0.20	0.22
3	0.18	0.21	0.23	0.19	0.20	0.22	0.18	0.20	0.22
4	0.18	0.21	0.23	0.19	0.20	0.23	0.18	0.20	0.22
5	0.18	0.21	0.23	0.19	0.21	0.23	0.18	0.20	0.22
6	0.19	0.21	0.23	0.18	0.20	0.23	0.18	0.20	0.22
7	0.18	0.21	0.23	0.18	0.20	0.22	0.18	0.20	0.22
Mean	0.18	0.21	0.23	0.19	0.20	0.23	0.18	0.20	0.22
SD	0.001	0.001	0.002	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
%RSD	0.44	0.54	0.77	0.57	0.45	0.61	0.32	0.53	0.38
%Recovery	100.30	104.79	104.94	105.84	103.89	104.18	101.60	104.71	106.27

7.8 ผลการทดสอบ precision ของ chlorfenapyr และ thiamethoxam ได้ผลตามตารางที่ 27 และ 28

7.8.1 ผลการทดสอบ precision ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ chlorfenapyr ตารางที่ 19 ผลการทดสอบ precision ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ chlorfenapyr

No.	240 g/L sample SC		
	Day 1	Day 2	Day 3
1	218.33	219.38	217.54
2	218.94	220.33	215.80
3	217.56	220.31	216.63
4	218.55	219.28	216.89
5	219.63	220.08	219.08
6	218.15	219.48	216.22
7	218.71	219.32	216.24
8	218.99	220.29	217.09
9	217.74	219.25	215.27
10	218.24	220.59	215.67
Mean	218.46	219.83	216.64
SD	0.63	0.53	1.10
%RSD	0.29	0.24	0.51

*SC = suspension concentrate

ตารางที่ 20 intermediate precision ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ chlorfenapyr

Sample Conc. (g/L)	Mean conc. (g/L)	%RSD
7	218.31 (n=30)	0.63

7.8.2 ผลการทดสอบของตัวอย่าง Thiamethoxam ที่ความเข้มข้น 0.25 mg/mL
 ตารางที่ 21 ผลการทดสอบ precision ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ thiamethoxam

No.	10 %W/W sample WG		
	Day 1	Day 2	Day 3
1	10.12	10.10	9.96
2	10.10	10.10	9.94
3	10.12	10.14	10.06
4	10.05	10.11	9.96
5	10.13	10.11	10.00
6	10.14	10.10	9.93
7	10.06	10.10	9.99
8	10.16	10.10	9.99
9	10.06	10.12	10.04
10	10.19	10.03	9.89
Mean	10.11	10.10	9.98
SD	0.05	0.03	0.05
%RSD	0.45	0.29	0.51

*WG = water dispersible granules

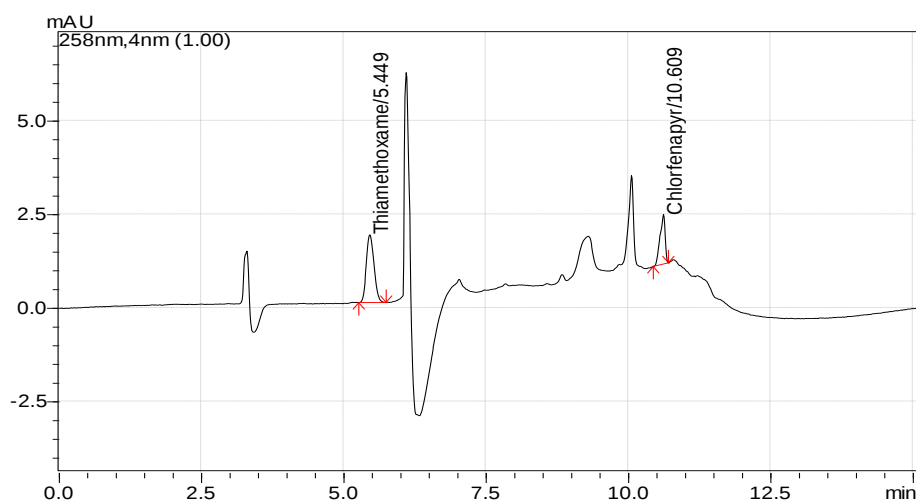
ตารางที่ 22 intermediate precision ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ thiamethoxam

Sample Conc. (g/L)	Mean conc. (%W/W WG)	%RSD
7	10.06 (n=30)	0.70

7.9 ผลการทดสอบ LOQ ได้ผลดังรูปที่ 32

ตารางที่ 23 LOQ ของ chlorfenapyr และ thiamethoxam

Compounds	LOQ (mg/mL)
chlorfenapyr	0.0005
thiamethoxam	0.0005

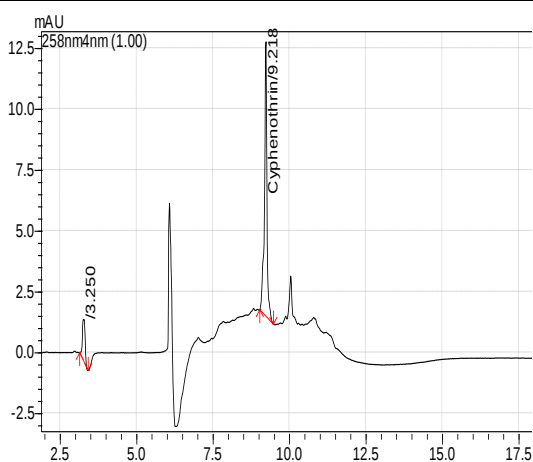


รูปที่ 32 chromatogram ของ chlorfenapyr และ thiamethoxam

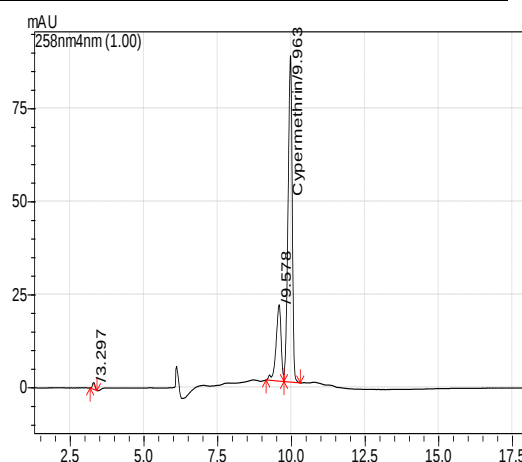
7.10 ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงต่อสารที่ทดสอบ (selectivity) พบว่าเมื่อทดสอบด้วย condition เดียวกับ chlorfenapyr และ thiamethoxam แล้วสามารถแยก cyphenothrin, cypermethrin, deltamethrin, tetramethrin, cyfluthrin, beta-cyfluthrin, diflubenzuron และ triflumuron แต่ไม่มีสารตัวใดที่มี Rt เดียวกับ chlorfenapyr และ thiamethoxam ได้ผลดังตารางที่ 24 และรูปที่ 33 – 40

ตารางที่ 24 แสดงความจำเพาะเจาะจงต่อสารที่ทดสอบ (selectivity)

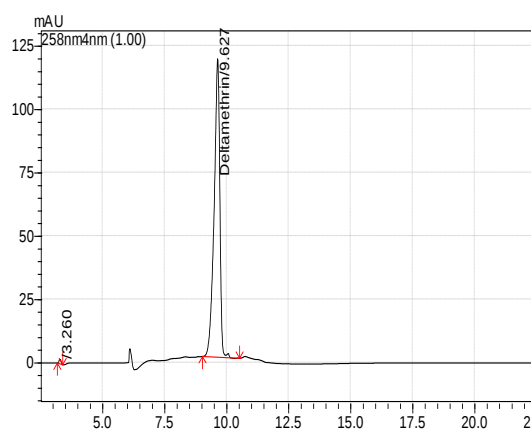
Compounds	Rt (min)
chlorfenapyr	10.5
thiamethoxam	5.5
cyphenothrin	9.21
cypermethrin	9.96
deltamethrin	9.62
tetramethrin	9.67
cyfluthrin	8.96
beta-cyfluthrin	8.54
diflubenzuron	8.99
triflumuron	9.48



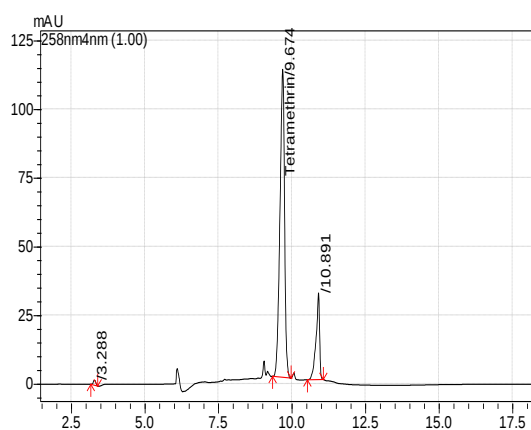
รูปที่ 33 Chromatogram ของ cyphenothrin



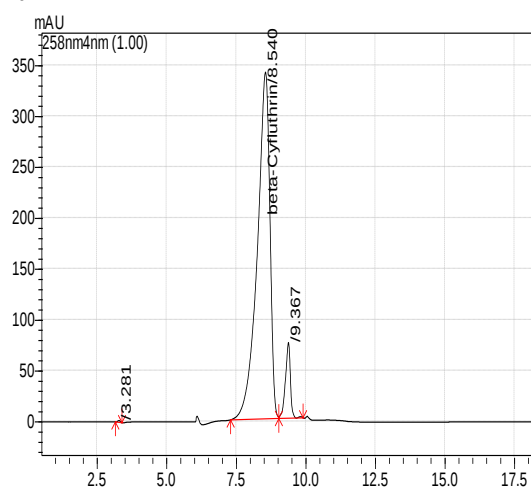
รูปที่ 34 Chromatogram ของ cypermethrin



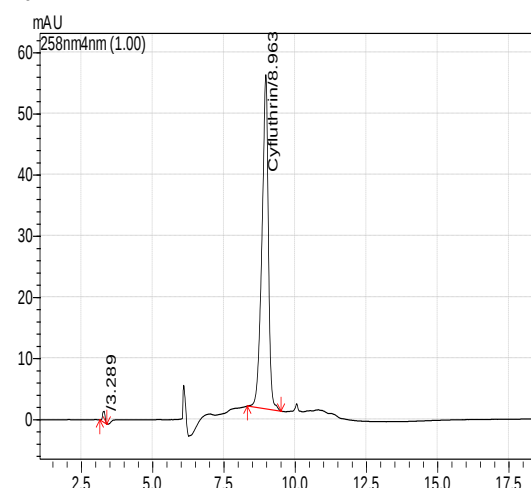
รูปที่ 35 Chromatogram ของ deltamethrin



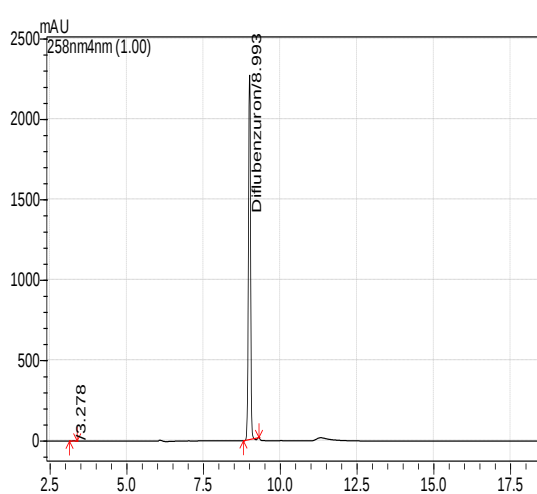
รูปที่ 36 Chromatogram ของ tetramethrin



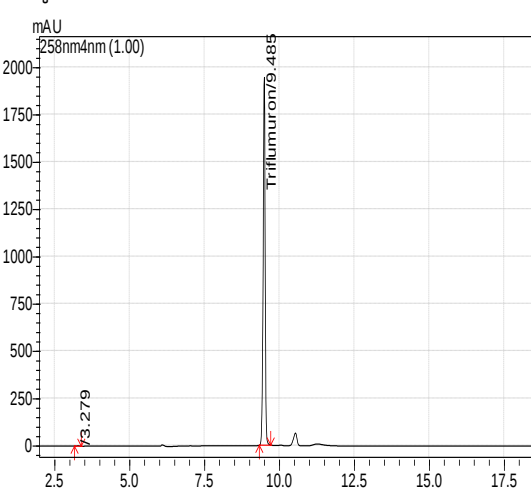
รูปที่ 37 Chromatogram ของ beta-cyfluthrin



รูปที่ 38 Chromatogram ของ cyfluthrin



รูปที่ 39 Chromatogram ของ diflubenzuron

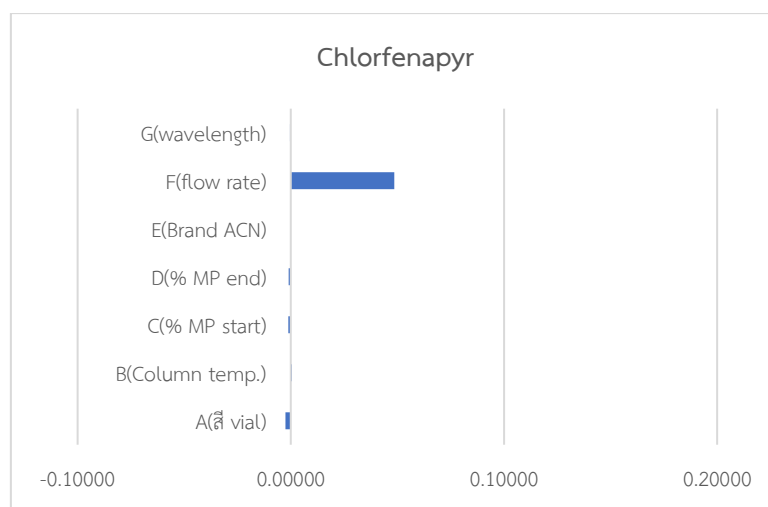


รูปที่ 40 Chromatogram ของ triflumuron

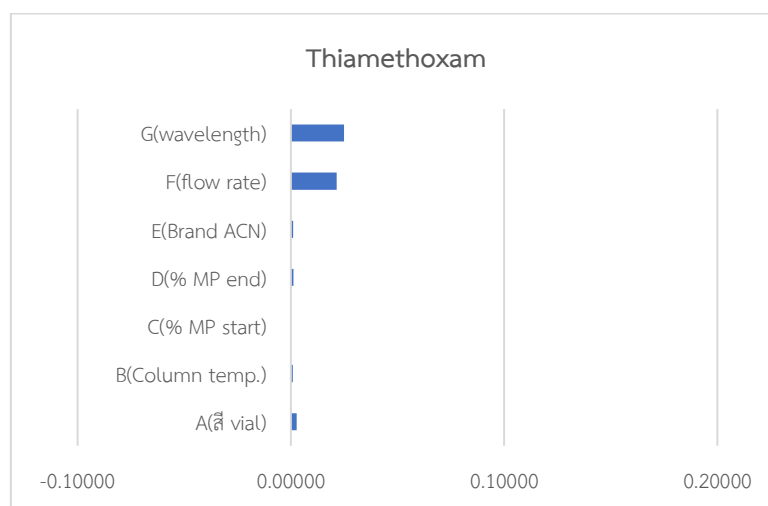
7.11 ผลการทดสอบความคงทนของวิธี (robustness) ว่าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงปัจจัยที่ใช้ในการทดสอบพบว่า การเปลี่ยนแปลง flow rate มีผลต่อการทดสอบ chlorfenapyr มากที่สุด และการเปลี่ยนแปลง wavelength ผลต่อการทดสอบ thiamethoxam มากที่สุด รองลงมาคือ flow rate ได้ผลตามตารางที่ 25 และรูปที่ 41 - 42

ตารางที่ 25 effect ของสารสำคัญ chlorfenapyr และ thiamethoxam

สารสำคัญ	A	B	C	D	E	F	G
chlorfenapyr	-0.00253	0.00045	-0.00113	-0.00102	-0.00023	0.48500	-0.00040
thiamethoxam	0.00273	0.00089	-0.00033	-0.00117	0.0011	0.02148	0.02497



รูปที่ 41 Effect ของสารสำคัญ chlorfenapyr



รูปที่ 42 Effect ของสารสำคัญ thiamethoxam

8. สรุปผลการทดลอง

จากการทดสอบสารสำคัญ chlorfenapyr และ thiamethoxam ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ ได้ผลการทดสอบ linearity ที่ช่วง 0.01 – 0.8 และ 0.005 – 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่า r เท่ากับ 0.9973 และ 0.9995 ตามลำดับ การทดสอบความแม่นยำ (accuracy) ประเมินจาก % recovery อยู่ในช่วง 97.56 – 106.65 % และมี intermediate precision เท่ากับ 0.63 และ 0.70 % RSD ตามลำดับ ค่า LOQ ของสารทั้งสองชนิดเท่ากับ 0.0005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การทดสอบ selectivity พบว่าสามารถแยกสารที่ทดสอบออกจากสารที่คาดว่าจะมีผลกระทบต่อการทดสอบ ดังนั้นวิธีดังกล่าวมีความเหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ chlorfenapyr (SC) และ thiamethoxam (WG) ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ ในวิธีเดียวกันได้

9. ข้อเสนอแนะ

-

10. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่พิจารณาให้ดำเนินการในปีงบประมาณ 2562 เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์ฯ ที่ช่วยเหลือในการปฏิบัติงานให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

11. เอกสารอ้างอิง

- AOAC 2012. AOAC Guidelines for Standard Method Performance Requirements. Appendix F. pp.1-17. 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. [cited 2017 september 5]. [Online] Available: https://www.aoac.org/aoac_prod_imis/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SL_V_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf
- Abd-Alrahman, S.H. (2014). Residue and dissipation kinetics of Thiamethoxam in a vegetable-field ecosystem using QuEChERS methodology combined with HPLC-DAD. Food Chem. 159, 1–4.
- Cao, Y., J. Chen, Y. Wang, J. Liang, L. Chen, and Y. Lu (2005). HPLC/UV analysis of Chlorfenapyr residues in cabbage and soil to study the dynamics of different formulations. Sci. Total Environ. 350, 38–46.
- Ying, G.-G., and R.S. Kookana (2004). Simultaneous Determination of Imidacloprid, Thiocloprid, and Thiamethoxam in Soil and Water by High-performance Liquid Chromatography with Diode-array Detection. J. Environ. Sci. Health Part B 39, 737–746.

Zhang, P., J. Ding, J. Hou, L. Zhao, Y. Chen, and L. Ding (2017). Dynamic microwave assisted extraction coupled with matrix solid phase dispersion for the determination of Chlorfenapyr and abamectin in rice by LC-MS/MS. *Microchem. J.* 133, 404–411.

Determination of insecticides in different commercial formulations by Gradient HPLC. [cited 2017 december 18]. [Online] Available: [https://www. researchgate.net/ publication/317155836_Determination_of_insecticides_in_different_commercial_formulations_by_Gradient_HPLC](https://www.researchgate.net/publication/317155836_Determination_of_insecticides_in_different_commercial_formulations_by_Gradient_HPLC)