

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบหาปริมาณ hydrogen peroxide, peracetic acid และ acetic acid ในผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อด้านการปศุสัตว์ด้วยเทคนิค potentiometric titration

นฤเบศ เนินทอง¹

สุนันท์ กิตติจาววัฒนา¹

ชูศักดิ์ อางสูงเนิน¹

บทคัดย่อ

ผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อที่มีสารสำคัญ hydrogen peroxide, peracetic acid และ acetic acid จัดอยู่ในประเภทที่มีประสิทธิภาพระดับสูงและนิยมใช้ในด้านปศุสัตว์ จึงมีการตรวจหาปริมาณสารสำคัญเพื่อควบคุมคุณภาพ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบหาปริมาณ hydrogen peroxide, peracetic acid และ acetic acid ในผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อด้านการปศุสัตว์ด้วยเทคนิค potentiometric titration

พัฒนาวิธีทดสอบด้วยเทคนิค potentiometric titration โดยไทเทรต hydrogen peroxide ด้วย 0.1 N cerium(IV) sulfate (redox titration) และ peracetic acid/acetic acid ด้วย 0.5 N sodium hydroxide (acid-base titration) จากนั้นตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบตามแนวทางของตำรายาสหรัฐอเมริกา (USP, 2022) พบว่ามีช่วงความเป็นเชิงเส้นและพิสัยของ hydrogen peroxide ตั้งแต่ 3 – 14 mg peracetic acid 20 – 80 mg และ acetic acid 50 – 250 mg โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 1, 0.9992 และ 0.9999 ตามลำดับ การศึกษาความแม่นยำจากการคืนกลับของ hydrogen peroxide ที่ปริมาณ 3, 7, 10, 12, 14 mg มีค่าร้อยละ 98.43 – 101.27 peracetic acid ที่ปริมาณ 20, 40, 50, 60, 80 mg มีค่าร้อยละ 98.22 – 101.39 acetic acid ที่ปริมาณ 50, 100, 150, 200, 250 mg มีค่าร้อยละ 98.56 – 101.56 ส่วนความเที่ยงแบบทวนซ้ำได้ในรูป RSD ของ hydrogen peroxide มีค่าร้อยละ 0.09 – 1.40 peracetic acid มีค่าร้อยละ 0.10 – 1.69 acetic acid มีค่าร้อยละ 0.13 – 1.16 และความเที่ยงระหว่างกลาง (ระหว่างวัน) ในรูป RSD ของ hydrogen peroxide มีค่าร้อยละ 0.49 – 1.30 peracetic acid ร้อยละ 0.75 – 1.42 และ acetic acid ร้อยละ 0.50 – 1.50 การทดสอบความจำเพาะของวิธีด้วย forced degradation study รวมทั้งสถานะที่มี excipient ไม่พบสัญญาณรบกวนการตรวจวัดจุดสมมูลของปฏิกิริยา วิธีทดสอบมีความคงทนต่อการเปลี่ยนยี่ห้อหรือความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน การเปลี่ยนเครื่องมือทดสอบ (titrator) และอิเล็กโทรด การทดสอบชี้แจงจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณของ hydrogen peroxide, peracetic acid และ acetic acid พบว่ามีค่าร้อยละ 2.6 , 0.6 และ 2.0 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ดังนั้นวิธีทดสอบนี้มีสมรรถนะความเป็นเชิงเส้น ความจำเพาะ ความแม่นยำ ความเที่ยงและความคงทนของวิธี สอดคล้องกับข้อกำหนดของตำรายาสหรัฐอเมริกา จึงเหมาะสมในการนำไปใช้ทดสอบตัวอย่างผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อด้านการปศุสัตว์ที่มีสารสำคัญชนิด hydrogen peroxide, peracetic acid และ acetic acid

คำสำคัญ : การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี potentiometric titration, hydrogen peroxide, peracetic acid, acetic acid

เลขทะเบียนวิชาการ : 65(2)-0304-052

¹สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

91 หมู่ที่ 4 ถนนติวานนท์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000

Development and validation of a quantitation method of hydrogen peroxide, peracetic acid and acetic acid in disinfectants for livestock production using potentiometric titration technique

Naruebeth Noentong¹ Sunan Kittijaruwattana¹ Chusak Ardsongnearn¹

Abstract

Biocide products containing hydrogen peroxide, peracetic acid and acetic acid classified as high-level disinfectants are widely used in livestock production. For the quality control purpose, a method for determination of their active ingredients was conducted. The objective of this study was to develop and validate the method for quantitation of hydrogen peroxide, peracetic acid and acetic acid in disinfectants for livestock production using the potentiometric titration technique.

Potentiometric titration of hydrogen peroxide was done against 0.1 N cerium(IV) sulfate (redox titration) and peracetic acid/acetic acid was titrated against 0.5 N sodium hydroxide (acid-base titration). The proposed method was validated according to the United States Pharmacopoeia (USP, 2022) guideline. The method demonstrated the linearity and range of hydrogen peroxide from 3 – 14 mg, peracetic acid 20 – 80 mg and acetic acid 50 - 250 mg, with correlation coefficient (r) of 1, 0.9992 and 0.9999, respectively. The accuracy from mean recovery study of hydrogen peroxide 3, 7, 10, 12, 14 mg was 98.43 – 101.27 %, peracetic acid 20, 40, 50, 60, 80 mg was 98.22 – 101.39 %, and acetic acid 50, 100, 150, 200, 250 mg was 98.56 – 101.56 %. The precision (repeatability) as RSD of hydrogen peroxide was 0.09 – 1.40 %, peracetic acid was 0.10 - 1.69 % and acetic acid was 0.13 – 1.16 %. In addition, the intermediate precision as RSD of hydrogen peroxide was 0.49 – 1.30 %, peracetic acid was 0.75 – 1.42 % and acetic acid was 0.50 – 1.50 %. The specificity test showed that the equivalence point detection was not affected by forced degradation conditions and excipient. The method was robust when variations existed in titrant sources or concentration, titrators and electrodes. The quantitation limit (QL) of hydrogen peroxide, peracetic acid and acetic acid were 2.5 %, 0.6 % and 2.0 %, W/W, respectively. In conclusion the validated method is linear, specific, accurate, precise and robust according to USP requirements and suitable for use as the method for determination of hydrogen peroxide, peracetic acid and acetic acid in disinfectants for livestock production.

Keywords : method validation, potentiometric titration, hydrogen peroxide, peracetic acid, acetic acid

Registered No. : 65(2)-0304-052

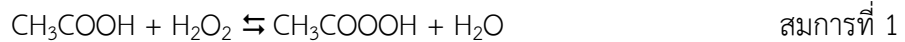
¹Bureau of Quality Control of Livestock Products, Department of Livestock Development

91 Moo 4 Tiwanont Road, Bangkadi Sub-district, Mueang, Pathumthani 12000

บทนำ

ผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อด้านการปศุสัตว์ใช้สำหรับทำลายเชื้อโรค ลดปริมาณเชื้อโรคให้อยู่ในระดับที่ไม่ก่อโรค โดยใช้กับสิ่งไม่มีชีวิต เช่น บ่อจุ่มเท้า โรงเรือนเลี้ยงสัตว์ ยานพาหนะ โรงงานผลิตอาหารสัตว์ โรงฆ่าสัตว์ เป็นต้น ผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อชนิดที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ สารกลุ่ม quaternary ammonium compounds, aldehydes และ oxidizing agents เป็นต้น

สารกลุ่ม oxidizing agents หรือ peroxygens ที่สำคัญ ได้แก่ hydrogen peroxide (H_2O_2) และ peracetic acid (CH_3COOOH) ซึ่งมักมี acetic acid (CH_3COOH) ที่เป็นสารตั้งต้นผสมอยู่ด้วย เพื่อรักษาสมดุลปฏิกิริยาของผลิตภัณฑ์ (ECETOC, 2001) ดังสมการที่ 1



Peroxygens ออกฤทธิ์โดยออกซิไดส์โปรตีน ลิพิดและกรดนิวคลีอิกของเซลล์ (Finnegan et al., 2010) จึงสามารถทำลายเชื้อโรคได้เกือบทุกชนิด รวมทั้งสปอร์ด้วย จัดเป็นผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพระดับสูง มักใช้ในสถานที่ซึ่งมีความเสี่ยงสูงต่อการปนเปื้อนเชื้อโรค (คณินิจ, 2550)

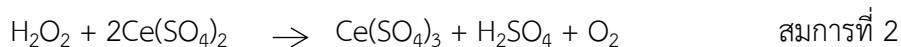
hydrogen peroxide, peracetic acid และ acetic acid จัดเป็นวัตถุอันตรายที่อยู่ในความควบคุม กำกับดูแลของกรมปศุสัตว์ คือ การผลิต นำเข้า ส่งออกหรือครอบครองต้องแจ้งให้พนักงานเจ้าหน้าที่ทราบก่อนตามหลักเกณฑ์ที่กำหนดหรือต้องได้รับใบอนุญาต จากข้อมูลในปี 2560 พบว่ามีผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อด้านการปศุสัตว์ที่มี hydrogen peroxide เป็นสารสำคัญขึ้นทะเบียนกับกรมปศุสัตว์มากกว่า 50 ทะเบียน ในจำนวนนี้มีส่วนผสมของ peracetic acid และ acetic acid มากกว่า 40 ทะเบียน (ศคิ, 2560) โดยมีช่วงความเข้มข้นที่ขึ้นทะเบียน ดังนี้ hydrogen peroxide ความเข้มข้นร้อยละ 10 – 26.53 peracetic acid ความเข้มข้นร้อยละ 1.2 – 15 และ acetic acid ความเข้มข้นร้อยละ 5 – 36 (กองควบคุมอาหารและยาสัตว์, 2563)

การกำกับดูแลวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ เช่น การขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อและการเฝ้าระวังคุณภาพผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด จำเป็นต้องใช้ผลทดสอบในการดำเนินการ ห้องปฏิบัติการกลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ จึงจำเป็นต้องมีวิธีทดสอบที่สามารถตรวจสอบผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อได้อย่างน่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับของผู้ใช้ผลทดสอบ โดยเป็นไปตามขั้นตอนการขอใบสำคัญขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อที่จำเป็นต้องมีผลทดสอบปริมาณสารสำคัญ เพื่อแสดงว่ากระบวนการผลิตได้ผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณตรงตามปริมาณที่แจ้งไว้ตามประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่อง การกำหนดข้อมูล เอกสารและหลักฐานการขึ้นทะเบียนวัตถุอันตราย พ.ศ. 2563 โดยยอมให้มีค่าความคลาดเคลื่อนจากปริมาณที่แจ้งได้ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดเกณฑ์ค่าคลาดเคลื่อนจากปริมาณที่กำหนดไว้ของสารสำคัญในวัตถุอันตรายที่กรมปศุสัตว์รับผิดชอบ พ.ศ. 2560 (กองควบคุมอาหารและยาสัตว์, 2563)

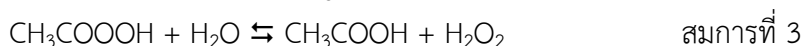
กรณีไม่ได้ทดสอบด้วยวิธีมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2017 ข้อ 7.2.2.1 กำหนดให้ห้องปฏิบัติการต้องตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่ไม่เป็นมาตรฐาน วิธีที่ห้องปฏิบัติการพัฒนาขึ้นเองหรือการดัดแปลงวิธีมาตรฐาน

ตำราของสหรัฐอเมริกา (USP, 2022a) และตำราของอังกฤษ (BP, 2022a) กำหนดให้ไทเทรต hydrogen peroxide ด้วย potassium permanganate ($KMnO_4$) ซึ่งเป็นอินดิเคเตอร์ของปฏิกิริยาได้ในตัวเอง อย่างไรก็ตามวิธีมาตรฐานนี้ใช้ได้กับผลิตภัณฑ์ที่มี hydrogen peroxide เป็นสารสำคัญชนิดเดียวเท่านั้น ส่วนผลิตภัณฑ์ที่มี peracetic และ acetic acid เป็นส่วนประกอบไม่สามารถใช้วิธีทดสอบนี้ได้ เนื่องจาก hydrogen peroxide สามารถเกิดปฏิกิริยากับ potassium iodide ซึ่งใช้ในการทดสอบหาปริมาณ peracetic acid ได้ (Putt and Pugh, 2013) ในขณะที่ acetic acid ไม่เกิดปฏิกิริยากับ potassium permanganate (Cheng et al., 2020)

ในปี 1948 มีการนำ cerium(IV) sulfate ซึ่งเป็น strong oxidizing agent ที่เกิดปฏิกิริยากับ hydrogen peroxide ดังสมการที่ 2 แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับ peracetic acid มาใช้เพื่อไทเทรต hydrogen peroxide จนถึงจุดยุติ แล้วไทเทรตต่อเพื่อตรวจหา peracetic acid ด้วยวิธี potassium iodide-thiosulfate titration หรือ iodometry จึงสามารถตรวจหาสารสำคัญทั้งสองชนิดได้ นับเป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย (Reichert et al., 1939)



นอกจากนี้ยังสามารถไทเทรต hydrogen peroxide ด้วย KMnO_4 จนปฏิกิริยาสมบูรณ์ แล้วไทเทรตหา peracetic acid ด้วย potassium iodide-thiosulfate titration (iodometry) ได้เช่นกัน เนื่องจาก hydrogen peroxide ถูกไทเทรตจนหมด จึงไม่รบกวนปฏิกิริยาการไทเทรตหาปริมาณ peracetic acid (ECETOC, 2001) อย่างไรก็ตาม การทดสอบนี้ทำในสภาวะกรดที่ pH ลดต่ำลงและไม่มี hydrogen peroxide แล้ว ทำให้สมดุลปฏิกิริยาเลื่อนไป โดยมีการสลาย peracetic acid กลับไปเป็น hydrogen peroxide และ acetic acid ส่งผลให้ปริมาณ peracetic acid ลดต่ำลง นอกจากนี้ peracetic acid ยังสามารถสลายตัวเป็น acetic acid กับ oxygen ส่วน hydrogen peroxide นั้น ก็สามารถสลายตัวเป็นน้ำและออกซิเจนได้เช่นกัน ดังสมการที่ 3 – 5 (Cheng et al., 2020) จึงมักมีการเติมสารช่วยคงสภาพลงในผลิตภัณฑ์ เช่น 1-hydroxyethylidene-1,1-diphosphonic acid หรือ HEDP สูงสุดไม่เกินร้อยละ 1 เพื่อลดการสลายตัวของสารสำคัญ (ECETOC, 2001 และ WTO, 2016)



สำหรับ acetic acid ตำรายากำหนดวิธีมาตรฐานคือการไทเทรตด้วย sodium hydroxide โดยใช้ phenolphthalein เป็นอินดิเคเตอร์ (BP, 2022b และ USP, 2022b)

Sode (2014) พัฒนาริวิธีทดสอบ peracetic acid และ acetic acid โดยไทเทรตด้วย sodium hydroxide ความเข้มข้น 0.5 N พบว่าสามารถทดสอบสารทั้งสองชนิดได้พร้อมกันในคราวเดียว ดังสมการที่ 6 และ 7 เนื่องจาก pKa ของสารทั้งสองชนิดแตกต่างกันมากพอที่จะตรวจวัดได้ด้วย automatic titration (potentiometry)



ในปี 2016 กระทรวงสาธารณสุข แรงงานและสวัสดิการของประเทศไทยออกมาตรฐานสารเคมีตกค้าง และสารปรุงแต่งอาหารตามพระราชบัญญัติสุขอนามัยอาหารญี่ปุ่น โดยกำหนดให้ตรวจ hydrogen peroxide ด้วย cerium(IV) sulfate ตรวจวัดจุดยุติด้วย ferroin indicator ส่วน peracetic acid และ acetic acid ให้สกัดตัวอย่างผ่าน octadecyl silanol minicolumn ขนาด 500 mg แล้วไทเทรตกับ 0.1 N sodium hydroxide แบบ potentiometric titration (WTO, 2016) ซึ่งขั้นตอนการทดสอบแบ่งออกเป็น 2 ปฏิกิริยาอิสระจากกัน ไม่ทำให้สมดุลปฏิกิริยาของสารสำคัญในผลิตภัณฑ์เลื่อน จึงใช้เป็นวิธีต้นแบบของการศึกษา

สำหรับ cerium(IV) sulfate แม้มีความจำเพาะกับ hydrogen peroxide แต่การใช้ ferroin indicator จะรบกวนสมดุลของปฏิกิริยาและอาจรบกวนการวัดจุดยุติในขั้นตอน iodometry ได้ (Sode, 2014) การศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้เทคนิค potentiometric titration ซึ่งวัดจุดสมมูลของปฏิกิริยาไทเทรตจากการเปลี่ยนแปลงของศักย์ไฟฟ้า แทนการใช้อินดิเคเตอร์ (manual titration) เพื่อลดความผิดพลาดจากการการวัดจุดยุติด้วยสายตา และไทเทรต peracetic acid และ acetic acid ด้วย sodium hydroxide โดยใช้เทคนิค potentiometric titration เช่นกัน ซึ่งต้องมีการดัดแปลงวิธีทดสอบ ได้แก่ เปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน sodium hydroxide จาก 0.1 N เป็น 0.5 N ลดขั้นตอนการสกัดตัวอย่างผ่าน minicolumn และปรับปริมาณตัวอย่างให้เหมาะสมกับเครื่องมือที่มีในห้องปฏิบัติการ จึงจำเป็นต้องตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (ISO/IEC 17025, 2017)

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบตามหัวข้อ <1225> Validation of compendial procedures ของตำรายาสหรัฐอเมริกา (USP, 2022c) ประกอบด้วย การทดสอบความแม่นยำ ความเที่ยง ความจำเพาะ ความเป็นเชิงเส้น พิสัย ขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณและความคงทนของวิธีทดสอบ

การศึกษาค้างนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบหาปริมาณ hydrogen peroxide, peracetic acid และ acetic acid ในผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อด้านการปศุสัตว์ด้วยเทคนิค potentiometric titration

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์

- 1.1 เครื่อง automatic titrator ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น T7 และ T9 พร้อมบิวเรตต์ขนาด 10 mL
- 1.2 Ion selective electrode ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น DMi 140 SC S/N 5313081 และ 9508220
- 1.3 Combined glass pH electrode ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น DGi 111 SC S/N 0074079 และ DGi 115 SC S/N 0486004
- 1.4 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 5 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น AX 205DR
- 1.5 เครื่องแก้ววัดปริมาตร คลาส A
- 1.6 ไมโครปิเปตขนาด 10 - 100 μ L, 100 - 1,000 μ L และ 1 - 5 mL
- 1.7 เครื่องวัดความหนาแน่นอัตโนมัติ ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น DM45
- 1.8 เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น Seven Excellence
- 1.9 Ultrasonic bath ยี่ห้อ Branson รุ่น B5510E-DTH
- 1.10 ตู้อบระบบสุญญากาศ ยี่ห้อ Binder รุ่น VD23
- 1.11 เครื่องทำน้ำบริสุทธิ์ ยี่ห้อ Thermo Scientific รุ่น Genpure Pro UV TOC
- 1.12 ตู้ดูดไอระเหยสารเคมี ยี่ห้อ EasyLab รุ่น FHS50-15
- 1.13 Hot plate stirrer ยี่ห้อ IKA รุ่น C-MAG HS 7
- 1.14 Titration vessel ขนาด 100 และ 250 mL
- 1.15 Thermometer
- 1.16 Glass microfiber filter GF 3 ขนาด 110 mm
- 1.17 Cellulose filter paper No. 1

2. สารมาตรฐาน

- 2.1 สารมาตรฐานปฐมภูมิ potassium hydrogen phthalate, certified reference material (CRM), Supelco Certipur® lot 192400D ความบริสุทธิ์ 99.92 ± 0.07 %
- 2.2 สารมาตรฐานปฐมภูมิ sodium oxalate, certified reference material (CRM), Sigma-Aldrich® lot BCBX0200 ความบริสุทธิ์ 99.83 ± 0.09 %
- 2.3 Cerium(IV) sulfate volumetric solution 0.1 N Loba® lot LM01742102 ความเข้มข้น 0.1001 ± 0.0001 N

3. สารเคมี

- 3.1 Cerium(IV) sulfate, Sigma-Aldrich®
- 3.2 Potassium permanganate, AR grade
- 3.3 Sodium hydroxide, AR grade
- 3.4 Hydrogen peroxide 30 %, AR grade, QRëC® lot 210487-0125
- 3.5 Glacial acetic acid, HPLC grade, Scharlau® lot 18731708
- 3.6 Sulfuric acid, AR grade
- 3.7 Potassium hydroxide, AR grade
- 3.8 Ferrous sulfate heptahydrate, ACS grade
- 3.9 น้ำบริสุทธิ์ ความต้านทานไม่น้อยกว่า 18.2 MΩ-cm
- 3.10 Ferric chloride anhydrous
- 3.11 Copper(II) sulfate pentahydrate, AR grade
- 3.12 1-hydroxyethylidene-1,1-diphosphonic acid (HEDP) 60 % solution
- 3.13 น้ำแข็ง

4. ตัวอย่างที่ศึกษา

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อที่ส่งตรวจ ณ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ยี่ห้อ Multi-5 ประกอบด้วย hydrogen peroxide 25 % W/W peracetic acid 5 % W/W และ acetic acid 9 % W/W

5. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

5.1 Cerium(IV) sulfate volumetric solution 0.1 N ยี่ห้อ Loba® สามารถแบ่งจากบรรจุภัณฑ์ตั้งต้นมาใช้ได้โดยตรง หากเปิดใช้งานนานกว่า 14 วัน ต้องหาความเข้มข้นที่แท้จริง (standardization) ด้วยสารมาตรฐานปฐมภูมิ sodium oxalate CRM (USP, 2022d) อีกครั้ง ก่อนใช้งาน

5.2 สารละลายมาตรฐาน 0.1 N cerium(IV) sulfate ที่เตรียมภายในห้องปฏิบัติการ ซึ่ง cerium(IV) sulfate 33.2 g เติมน้ำกรด ปริมาตร 50 mL เติมน้ำครั้งละ 20 mL จนครบ 900 mL โดยกวนสารละลายบน hot plate stirrer ระงับความร้อนที่เกิดขึ้น แล้วตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง กรองด้วย glass microfiber filter และปรับให้ครบปริมาตร 1,000 mL แล้วหาความเข้มข้นที่แท้จริงด้วยสารมาตรฐานปฐมภูมิ sodium oxalate CRM (USP, 2022d) ก่อนใช้งาน หากเกิน 14 วัน ต้องหาค่าความเข้มข้นที่แท้จริงใหม่อีกครั้ง

5.3 สารละลายมาตรฐาน 0.5 N sodium hydroxide ซึ่ง sodium hydroxide 20 g ใส่ beaker พลาสติก ขนาด 250 mL ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำบริสุทธิ์ต้มเดือดที่ทิ้งไว้ให้เย็นแล้ว เทสารละลายลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 1,000 mL ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 mL เก็บใส่ขวดบรรจุสารละลายพลาสติก กรณีเตรียม 0.4 N และ 0.55 N ให้ชั่ง 16 และ 22 g ตามลำดับ แล้วหาความเข้มข้นที่แท้จริงด้วยสารมาตรฐานปฐมภูมิ potassium hydrogen phthalate CRM (USP, 2022e) ก่อนใช้งาน หากเกิน 7 วัน ต้องหาค่าความเข้มข้นที่แท้จริงใหม่อีกครั้ง

5.4 สารละลายมาตรฐาน 0.1 N potassium permanganate ซึ่ง potassium permanganate 3.3 g ละลาย และปรับปริมาตรด้วยน้ำบริสุทธิ์ เทสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 mL ทิ้งไว้ในที่มืด 14 วัน นำไปกรองด้วย cellulose filter paper และปรับให้ครบปริมาตร 1,000 mL แล้วหาความเข้มข้นที่แท้จริงด้วยสารมาตรฐานปฐมภูมิ sodium oxalate CRM (USP, 2022f) ก่อนใช้งาน หากเกิน 14 วัน ต้องหาค่าความเข้มข้นที่แท้จริงใหม่อีกครั้ง

5.5 สารละลายมาตรฐาน hydrogen peroxide เตรียมโดยใช้ 30 % hydrogen peroxide, AR grade มาหาความเข้มข้นที่แท้จริงด้วย 0.1 M potassium permanganate ตามวิธีใน USP (2022a) ก่อนนำไปใช้งานทุกครั้ง

5.6 สารละลายมาตรฐาน peracetic acid ได้จากการเตรียมโดยผสม 30 % hydrogen peroxide ปริมาตร 70 mL กับ glacial acetic acid ปริมาตร 60 mL และ sulfuric acid ปริมาตร 1 mL (Zhao et al., 2008 และ Sode, 2014) ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 - 7 วัน แล้วหาความเข้มข้นที่แท้จริงด้วยวิธีของ Sode (2014) ก่อนนำมาใช้งานทุกครั้ง

5.7 สารละลายมาตรฐาน acetic acid เตรียมโดยใช้ glacial acetic acid, AR grade มาหาความเข้มข้นที่แท้จริงด้วย sodium hydroxide ตามวิธีใน USP (2022b) ก่อนนำไปใช้งานทุกครั้ง

6. การเตรียมสารเคมี

6.1 สารละลาย 0.5 M sulfuric acid ตวง sulfuric acid ปริมาตร 30 mL ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 mL ที่มีน้ำอยู่ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

6.2 สารละลาย 0.1 M potassium hydroxide ชั่ง potassium hydroxide ปริมาณ 6 g ละลายในน้ำ และปรับให้ครบปริมาตร 1,000 mL

6.3 สารละลาย 0.05 M ferrous sulfate heptahydrate ชั่ง ferrous sulfate heptahydrate ปริมาณ 14 g ละลายในน้ำและปรับให้ครบปริมาตร 1,000 mL

6.4 สารละลาย 0.05 M ferric chloride hexahydrate ชั่ง ferric chloride hexahydrate ปริมาณ 13.5 g ละลายในน้ำและปรับให้ครบปริมาตร 1,000 mL

6.5 สารละลาย 0.01 M copper (II) sulfate ชั่ง copper(II) sulfate ปริมาณ 2.5 g ละลายในน้ำและปรับให้ครบปริมาตร 1,000 mL

7. การเตรียมตัวอย่าง

7.1 การทดสอบ hydrogen peroxide เตรียมตัวอย่างโดยการชั่งน้ำหนักหรือปิเปตตัวอย่าง แล้วละลายด้วยน้ำบริสุทธิ์ ปิเปตสารละลายตัวอย่าง โดยคำนวณให้มีปริมาณสาร 1.7 – 17 mg ลงใน titration vessel ขนาด 100 mL ที่มี 0.5 M sulfuric acid ปริมาตร 75 mL ที่ควบคุมอุณหภูมิให้ไม่เกิน 10 °C โดยการแช่ titration vessel ในน้ำแข็ง

7.2 การทดสอบ peracetic acid และ acetic acid เตรียมตัวอย่างโดยการชั่งน้ำหนักหรือปิเปตตัวอย่าง โดยคำนวณให้มีปริมาณ peracetic acid 20 - 330 mg acetic acid 30 - 300 mg ลงใน titration vessel ขนาด 250 mL เติมน้ำบริสุทธิ์ 100 mL

8. การพัฒนาวิธีทดสอบ

8.1 ทดสอบ hydrogen peroxide ด้วยวิธีไทเทรตด้วย 0.1 N cerium(IV) sulfate volumetric solution โดยดัดแปลงสภาวะการทดสอบจากวิธีเดิม คือเปลี่ยนการตรวจวัดจุดยุติของปฏิกิริยาด้วย ferroin indicator เป็นวัดจุดสมมูลจากจุดที่มีการเปลี่ยนแปลงศักย์ไฟฟ้าสูงสุดด้วย potentiometer (Mettler Toledo รุ่น T7) และอิเล็กโทรด DMI 140 SC ซึ่งมีการปรับปริมาณตัวอย่างให้มีปริมาตรการไทเทรตอยู่ในช่วงร้อยละ 20 - 90 ของปริมาตรบิวเรตต์ขนาด 10 mL (EDQM, 2015) เพื่อหาปริมาณตัวอย่างที่เหมาะสม สำหรับนำไปตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบต่อไป

8.2 ทดสอบ peracetic acid และ acetic acid เตรียมตัวอย่างและทดสอบได้โดยไม่ต้องสกัดตัวอย่างและมีการเปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานจาก 0.1 N เป็น 0.5 N sodium hydroxide ใช้เครื่อง titrator ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น T9 และอิเล็กโทรด DGI 111 SC ซึ่งมีการปรับปริมาณตัวอย่างให้มีปริมาตรการไทเทรตอยู่ในช่วงร้อยละ 20 - 90 ของปริมาตรบิวเรตต์ขนาด 10 mL (EDQM, 2015) เพื่อหาปริมาณตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับนำไปตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบต่อไป

8.3 การคำนวณผลปริมาณสารสำคัญในหน่วยร้อยละโดยน้ำหนัก (% W/W) และ mg

$$\text{ปริมาณ hydrogen peroxide} = \frac{V \times N \times 1.7 \times 100}{0.1 \times W \times 1,000} \quad \text{สมการที่ 8}$$

$$\text{ปริมาณ peracetic acid} = \frac{(V_2 - V_1) \times N \times 38.025 \times 100}{0.5 \times W \times 1,000} \quad \text{สมการที่ 9}$$

$$\text{ปริมาณ acetic acid} = \frac{V_1 \times N \times 30.025 \times 100}{0.5 \times W \times 1,000} \quad \text{สมการที่ 10}$$

โดยที่ V คือ ปริมาตรที่จุดสมมูลของ hydrogen peroxide ในหน่วย mL (ตามรูปที่ 1)

N คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (Normality)

1.7 คือน้ำหนัก hydrogen peroxide (mg) ที่สมมูลกับ 1 mL ของ 0.1 N cerium(IV) sulfate 100 สำหรับการคำนวณให้อยู่หน่วยร้อยละ

1,000 ค่าสำหรับเปลี่ยนหน่วยจาก mg เป็น g (1,000 mg เท่ากับ 1 g)

V₁ คือ ปริมาตรที่จุดสมมูลของ acetic acid ในหน่วย mL (ตามรูปที่ 2)

V₂ คือ ปริมาตรที่จุดสมมูลของ peracetic acid ในหน่วย mL (ตามรูปที่ 2)

38.025 คือน้ำหนัก peracetic acid (mg) ที่สมมูลกับ 1 mL ของ 0.5 N sodium hydroxide

30.025 คือน้ำหนัก acetic acid (mg) ที่สมมูลกับ 1 mL ของ 0.5 N sodium hydroxide

W คือ น้ำหนักของตัวอย่าง (g)

กรณีเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีปิเปต คำนวณน้ำหนักตัวอย่าง (W) จากผลคูณระหว่างปริมาตรที่ปิเปต (mL) กับความหนาแน่นของตัวอย่าง (g/mL)

$$\text{ปริมาณสารสำคัญในหน่วย mg} = V \times N \times W_{eq}$$

โดยที่ W_{eq} คือ น้ำหนักสมมูลของสารสำคัญ ในหน่วย g ดังนี้ hydrogen peroxide 17 g

peracetic acid 76.05 g และ acetic acid 60.05 g

9. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

9.1 การทดสอบความเป็นเชิงเส้นและพิสัย ทดสอบโดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างที่ปริมาณ 5 ระดับ ระดับละ 3 ซ้ำ ดังนี้ hydrogen peroxide 3, 7, 10, 12, 14 mg peracetic acid 20, 40, 50, 60, 80 mg และ acetic acid 50, 100, 150, 200, 250 mg จากนั้นไทเทรตหาปริมาณสารสำคัญด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น แล้วสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาตรที่จุดสมมูล (y) และปริมาณสารสำคัญในหน่วย mg (x) ของสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง หาสมการเส้นตรง ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel หาก r มีค่าเข้าใกล้ 1 หรือ $r > 0.99$ (APVMA, 2014) และ $r^2 \geq 0.995$ (U.S. FDA, 2020) แสดงว่ามีความสัมพันธ์เป็นเชิงเส้นและสมการเส้นตรงสามารถพยากรณ์ได้ดี สำหรับพิสัยพิจารณาจากปริมาณต่ำสุดถึงสูงสุดที่มีค่าความแม่นยำและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (USP, 2022c)

9.2 การทดสอบ matrix effect

การทดสอบ matrix effect ทดสอบโดยใช้ผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อมาเติม peracetic acid และ acetic acid ให้มีปริมาณสารสำคัญ peracetic acid 20, 40, 50, 60, 80 mg และ acetic acid 50, 100, 150, 200, 250 mg ทดสอบที่ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ จากนั้นนำผลทดสอบที่ได้ (แกน y) ไปหาความสัมพันธ์กับค่าจากกราฟของสารละลายมาตรฐาน (แกน x) โดยการวิเคราะห์ความถดถอยอย่างง่ายที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel หากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เข้าใกล้ 1 และช่วงความเชื่อมั่นของความชันครอบคลุม 1 แสดงว่ามีความสัมพันธ์กันสูงและไม่มี matrix effect

9.3 การทดสอบความจำเพาะของวิธี

9.3.1 เตรียมตัวอย่างให้มีปริมาณสารสำคัญแต่ละชนิดเข้มข้น 1 mg/mL ปริมาตร 50 mL ไปทดสอบในสถานะต่อไปนี้ โดยทำ 2 ซ้ำ แล้วทดสอบหาปริมาณสารสำคัญ

9.3.1.1 Acid hydrolysis เติม 1 M sulfuric acid ปริมาตร 1 mL ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที

9.3.1.2 Alkaline hydrolysis เติม 0.1 M potassium hydroxide ปริมาตร 1 mL ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง

9.3.1.3 Oxidation hydrolysis ทดสอบในสถานะที่มี Fe^{3+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} โดยการเติม 0.05 M ferrous sulfate, 0.05 M ferric chloride และ 0.01 M copper(II) sulfate ปริมาตร 1 mL แยกอิสระจากการกัน ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง

9.3.1.4 Thermal hydrolysis เติมน้ำ 2 mL แล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

9.3.1.5 Photolysis ตั้งตัวอย่างทิ้งไว้กลางแสงแดด 1 ชั่วโมง

9.3.2 ปิเปตอย่างสารละลายมาตรฐาน peracetic acid 28 mL เติม 60 % HEDP 0.5 mL ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 72 ชั่วโมง แล้วทดสอบหาปริมาณสารสำคัญ

สารละลายตัวที่เกิดขึ้นหรือ excipient ต้องไม่รบกวนการตรวจวัดจุดสมมูลของปฏิกิริยา (Marques et al., 2021) คือ ปริมาตรที่จุดสมมูลเบี่ยงเบนไม่เกินร้อยละ 0.5 (EDQM, 2015) ถือว่าวิธีทดสอบมีความจำเพาะ

9.4 การทดสอบความแม่นยำจากการคืนกลับที่ปริมาณสาร 5 ระดับ ดังนี้ hydrogen peroxide 3, 7, 10, 12, 14 mg peracetic acid 20, 40, 50, 60, 80 mg acetic acid 50, 100, 150, 200, 250 mg โดยทดสอบความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ จำนวน 3 วัน เกณฑ์การยอมรับค่าการคืนกลับเฉลี่ยอยู่ในช่วงร้อยละ 98 - 102 (AOAC, 2019)

9.5 การทดสอบความเที่ยง

9.5.1 ความเที่ยงแบบทวนซ้ำได้ (repeatability) ใช้ข้อมูลจากการศึกษาความแม่นยำภายในวันเดียวกัน โดยคำนวณความเที่ยงในรูปส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD) เกณฑ์การยอมรับต้องไม่เกินร้อยละ 2 (AOAC, 2019)

9.5.2 ความเที่ยงระหว่างกลาง (intermediate precision) ใช้ข้อมูลจากการศึกษาความแม่นยำจำนวน 3 วัน โดยคำนวณในรูปส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD) เกณฑ์การยอมรับต้องไม่เกินร้อยละ 2 (AOAC, 2019)

9.6 การทดสอบความคงทนของวิธี

9.6.1 การทดสอบหาปริมาณ hydrogen peroxide ทดสอบโดยเปลี่ยนแหล่งของสารละลายมาตรฐาน cerium(IV) sulfate (Loba® lot LM01742102 และสารละลายมาตรฐาน cerium(IV) sulfate ที่เตรียมภายในห้องปฏิบัติการ) เปลี่ยนเครื่องไทเทรต (Mettler Toledo รุ่น T7 และ T9) เปลี่ยนอิเล็กทรอนิกส์ (DMi 140 SC S/N 5313081 และ S/N 9508220) วิเคราะห์ข้อมูลผลทดสอบจากการเปลี่ยนแปลงปัจจัยต่าง ๆ ด้วย Student's t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel หากไม่แตกต่างกันทางสถิติ แสดงถึงวิธีทดสอบมีความคงทน

9.6.2 การทดสอบหาปริมาณ peracetic acid และ acetic acid ทดสอบโดยเปลี่ยนความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน sodium hydroxide (0.4, 0.5, 0.55 N) เปลี่ยนเครื่องไทเทรต (Mettler Toledo รุ่น T7 และ T9) เปลี่ยนอิเล็กโทรด (DG 111 S/N 0074079 และ DG 115 S/N 0486004) วิเคราะห์ข้อมูลผลทดสอบจากการเปลี่ยนความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) วิเคราะห์ข้อมูลผลทดสอบการเปลี่ยนเครื่องไทเทรตและอิเล็กโทรดด้วย Student's t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel หากผลการวิเคราะห์ข้อมูลผลทดสอบไม่แตกต่างกันทางสถิติ แสดงถึงวิธีทดสอบมีความคงทน

9.7 การทดสอบขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (quantitation limit: QL)

9.7.1 เตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อให้มีความเข้มข้นดังนี้ hydrogen peroxide 2.6 % peracetic acid 0.6 % และ acetic acid 2 % จำนวนอย่างละ 7 ขวด แล้วทดสอบหาปริมาณสารสำคัญและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ หากค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ไม่เกินร้อยละ 2 จะใช้ความเข้มข้นเหล่านี้ ไปตรวจยืนยันขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณต่อไป

9.7.2 การตรวจยืนยันขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ โดยการเตรียมตัวอย่างให้มีปริมาณสารสำคัญเท่ากับข้อ 9.7.1 จำนวน 10 ขวด ทดสอบหาปริมาณสารสำคัญและค่าการคืนกลับ (Eurachem, 2014) ด้วยวิธีในข้อ 9.4 แล้วหาค่าความแม่นยำและความเที่ยง หากค่าผ่านเกณฑ์การยอมรับตามข้อ 9.4 และ 9.5 คือค่าการคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 98 – 102 และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ไม่เกินร้อยละ 2 ถือว่าความเข้มข้นนี้เป็นขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณของวิธีทดสอบ

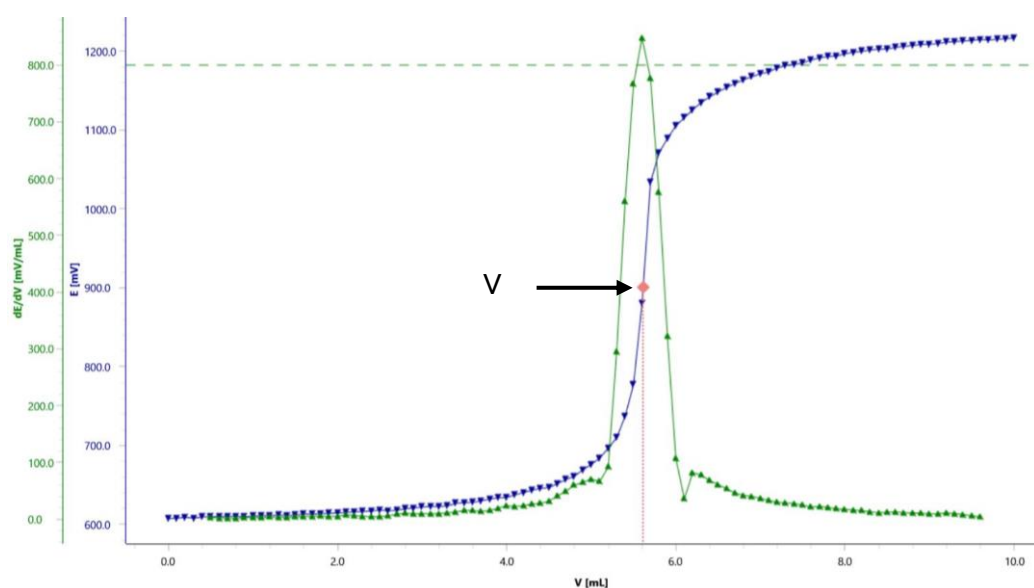
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การพัฒนาวิธีทดสอบ

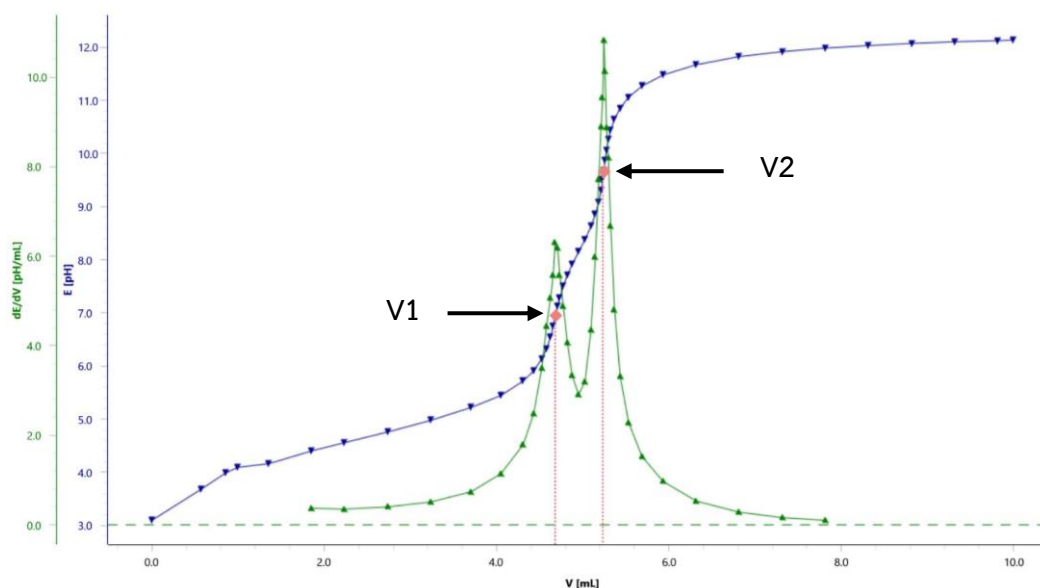
สารละลายมาตรฐานที่นำมาศึกษาต้องผ่านการหาความเข้มข้นที่แท้จริง โดยค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานต้องอยู่ในช่วงร้อยละ ± 10 ของ nominal concentration และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ไม่เกินร้อยละ 0.2 (BP, 2022c) การหาความเข้มข้นที่แท้จริงของสารละลายมาตรฐานนอกจากจะทำให้ผลทดสอบมีความถูกต้องแล้ว ยังเป็นการทดสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability test) หรือวิธีที่ใช้ทดสอบด้วย (Miller, 2005)

1.1 การทดสอบ hydrogen peroxide โดยการไทเทรตกับ 0.1 N cerium(IV) sulfate ได้กราฟการไทเทรตเป็นโค้งตัว S และตรวจวัดจุดสมมูลของปฏิกิริยาจากจุดที่มีการเปลี่ยนแปลงศักย์ไฟฟ้าสูงสุด (dE/dV , mV/mL) ดังจุด V ตามรูปที่ 1 ปริมาณตัวอย่างที่ให้ปริมาตรการไทเทรตตั้งแต่ 1 mL ถึง 10 mL ตามสมการที่ 2 อยู่ในช่วง 1.7 – 17 mg (1 mL ของ 0.1 N cerium(IV) sulfate สมมูลกับ hydrogen peroxide 1.7 mg) จึงคัดเลือกปริมาณตัวอย่างตั้งแต่ 3 - 14 mg เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี เนื่องจากให้ปริมาตรการไทเทรตอยู่ในช่วงร้อยละ 20 – 90 ของปริมาตรบิวเรตต์ ซึ่งเป็นช่วงที่มีความเที่ยงและความแม่นยำดี รวมทั้งใช้สารละลายมาตรฐานในการไทเทรตไม่เกินปริมาตรบิวเรตต์ (10 mL) จึงหลีกเลี่ยงความผิดพลาดจากการเติมสารละลายมาตรฐานลงบิวเรตต์หลายครั้งได้ (EDQM, 2015)

1.2 การไทเทรต peracetic acid และ acetic acid ด้วย 0.5 N sodium hydroxide โดยไม่มีการสกัดตัวอย่างผ่าน octadecyl silanol minicolumn ได้กราฟการไทเทรตที่มีจุดสมมูลของปฏิกิริยา 2 จุด สอดคล้องกับการศึกษาของ Sode (2014) คือ V1 เป็นปริมาตรที่จุดสมมูลของ acetic acid และ V2 เป็นปริมาตรที่จุดสมมูลของ peracetic acid ตามรูปที่ 2 ปริมาณตัวอย่างที่ให้ปริมาตรการไทเทรตตั้งแต่ 1 mL จนถึง 10 mL มีดังนี้ ตามสมการที่ 3 peracetic acid 38.025 – 380.25 mg (1 mL ของ 0.5 N sodium hydroxide สมมูลกับ peracetic acid 38.025 mg) และตามสมการที่ 4 acetic acid 30.025 – 300.25 mg (1 mL ของ 0.5 N sodium hydroxide สมมูลกับ acetic acid 30.025 mg) จึงคัดเลือกปริมาณตัวอย่างโดยใช้เกณฑ์เดียวกับ hydrogen peroxide อย่างไรก็ตามจุดสมมูลของ peracetic acid (V2) เกิดหลัง acetic acid (V1) ดังนั้น ในการทดสอบจึงใช้สภาวะที่จุดสมมูลของ peracetic acid มีปริมาตรไม่เกินร้อยละ 90 ของปริมาตรบิวเรตต์ จึงตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ acetic acid ที่ 50 – 250 mg และ peracetic acid ที่ 20 - 80 mg

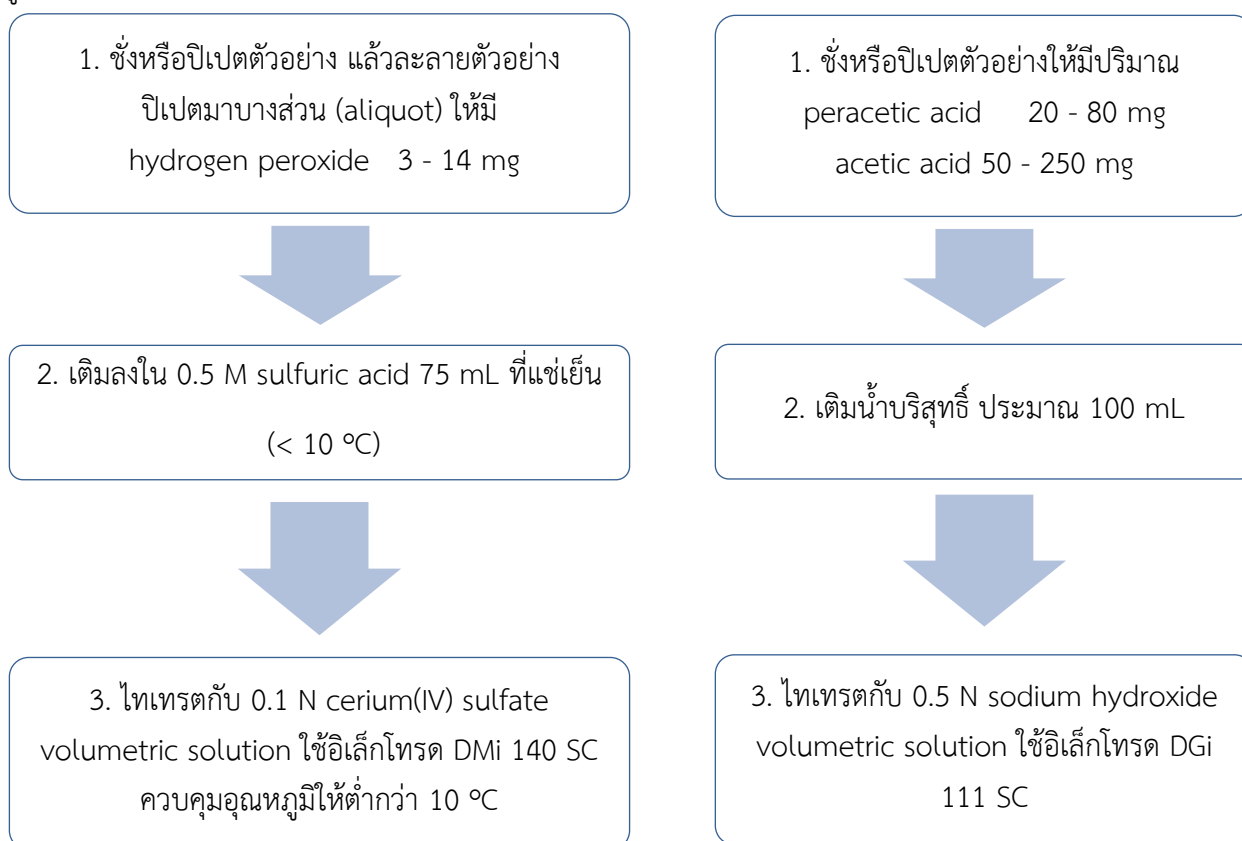


รูปที่ 1 กราฟการไทเทรต hydrogen peroxide และจุดสมมูลของปฏิกิริยา (V)



รูปที่ 2 กราฟการไทเทรต peracetic acid และ acetic acid จุดสมมูลที่ 1 (V1 คือจุดสมมูลของ acetic acid) และจุดสมมูลที่ 2 (V2 คือจุดสมมูลของ peracetic acid)

จากการพัฒนาวิธี สามารถสรุปสภาวะการทดสอบตัวอย่าง สำหรับตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ตามรูปที่ 3



รูปที่ 3 ขั้นตอนการทดสอบตัวอย่าง hydrogen peroxide (ซ้าย) peracetic acid และ acetic acid (ขวา)

2. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

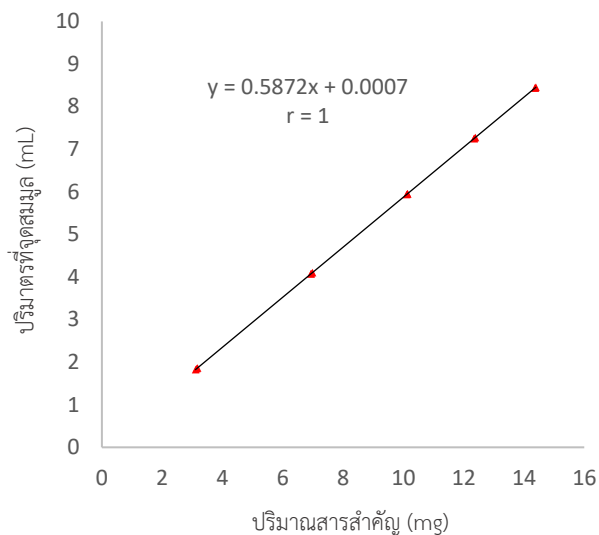
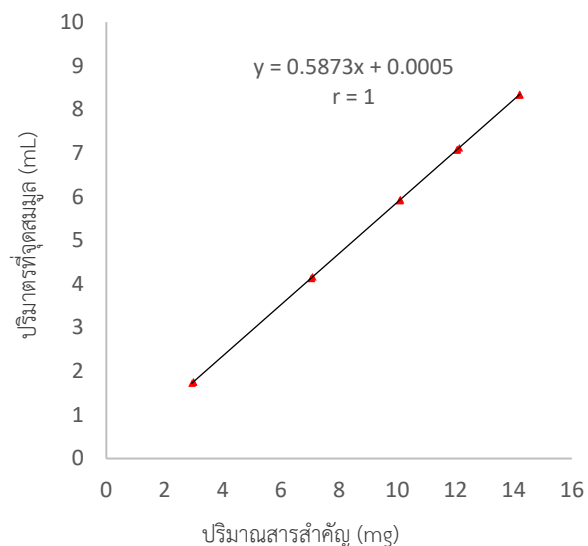
2.1 การทดสอบความเป็นเชิงเส้น

การทดสอบความเป็นเชิงเส้นของสารสำคัญทั้ง 3 ชนิด ได้สมการเส้นตรง สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์และสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ดังตารางที่ 1 โดยมีกราฟความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงของ hydrogen peroxide ที่ 3, 7, 10, 12, 14 mg (รูปที่ 4) peracetic acid 20, 40, 50, 60, 80 mg (รูปที่ 5) และ acetic acid 50, 100, 150, 200, 250 mg (รูปที่ 6) ซึ่งแสดงว่ามีความเป็นเชิงเส้นทั้งการทดสอบสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง

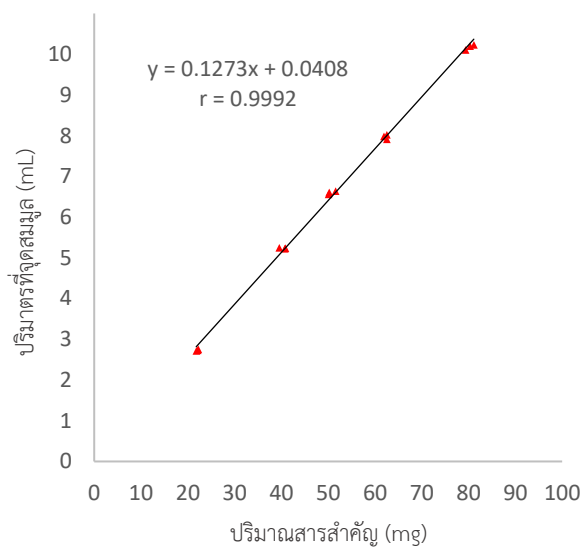
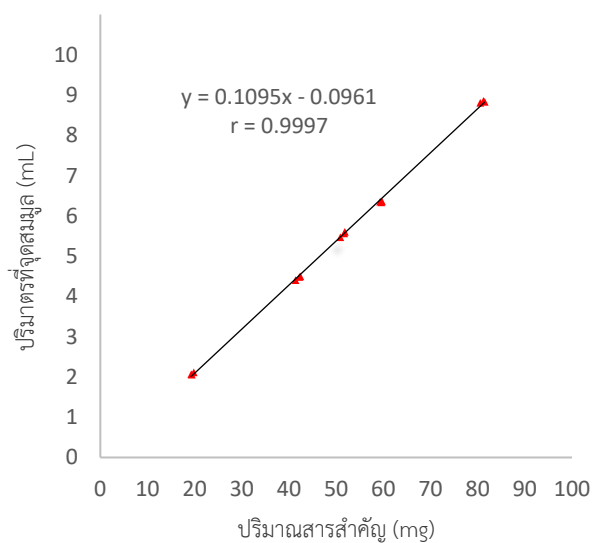
ตารางที่ 1 การทดสอบความเป็นเชิงเส้นของวิธีทดสอบ hydrogen peroxide, peracetic acid และ acetic acid

สารสำคัญ		สมการเส้นตรง	สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r)	สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r ²)
สารละลายมาตรฐาน	hydrogen peroxide	$y = 0.5873x + 0.0005$	1	1
	peracetic acid	$y = 0.1095x - 0.0961$	0.9997	0.9995
	acetic acid	$y = 0.0345x - 0.0001$	1	1
ตัวอย่าง	hydrogen peroxide	$y = 0.5872x + 0.0007$	1	1
	peracetic acid	$y = 0.1273x + 0.0408$	0.9992	0.9983
	acetic acid	$y = 0.0345x + 0.0015$	0.9999	0.9999

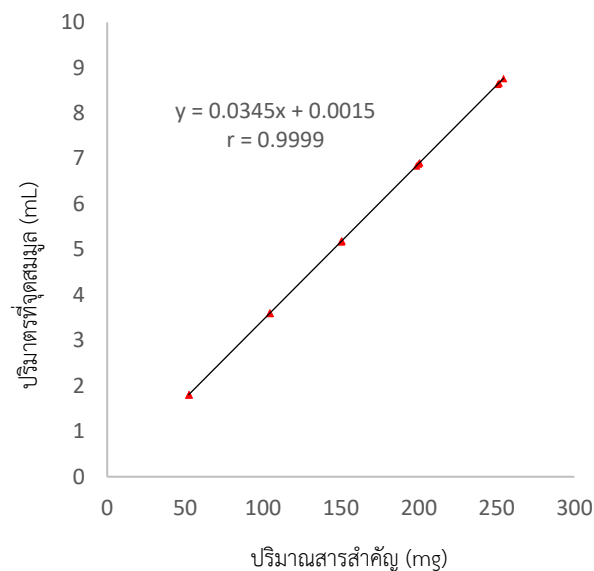
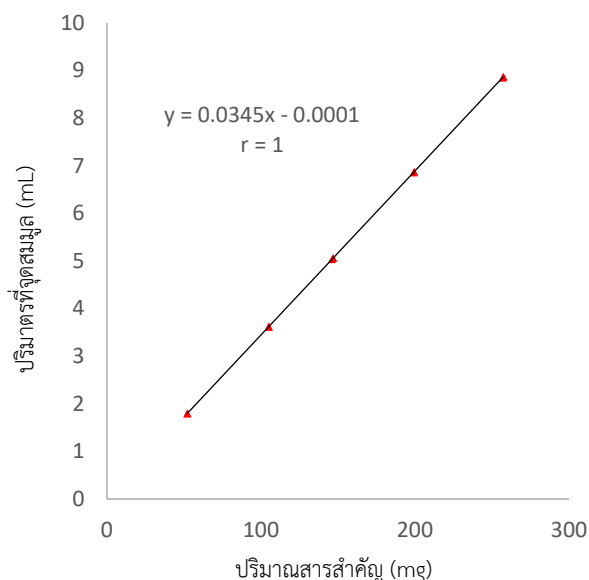
เกณฑ์การยอมรับ: $r > 0.99$ และ $r^2 \geq 0.995$



รูปที่ 4 ความเป็นเชิงเส้นการทดสอบ hydrogen peroxide ในสารละลายมาตรฐาน (ซ้าย) สารละลายตัวอย่าง (ขวา)



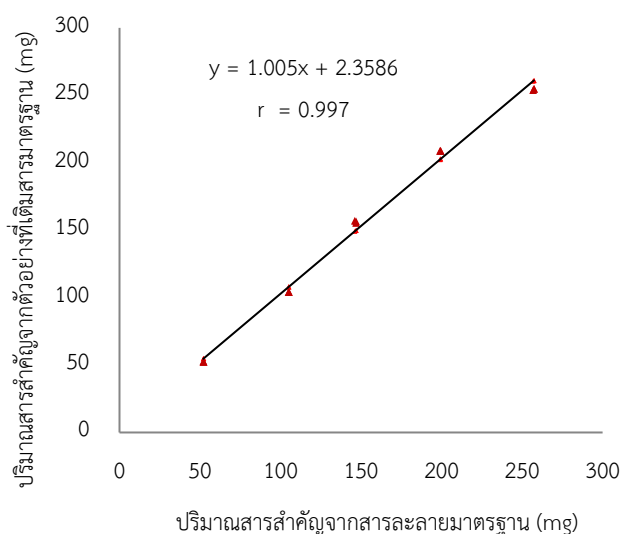
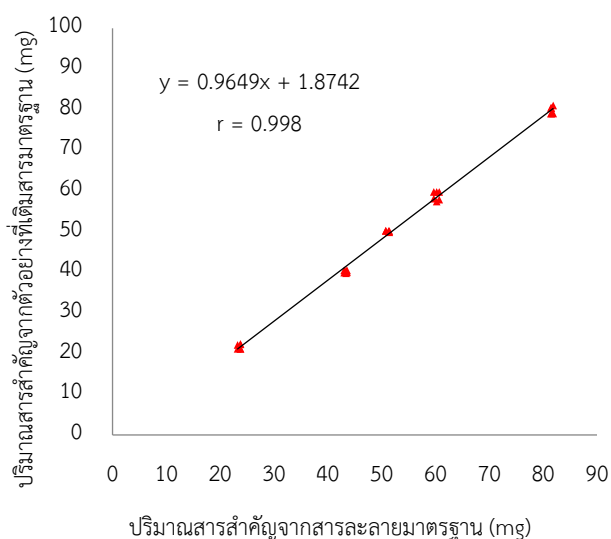
รูปที่ 5 ความเป็นเชิงเส้นของการทดสอบ peracetic acid ในสารละลายมาตรฐาน (ซ้าย) สารละลายตัวอย่าง (ขวา)



รูปที่ 6 ความเป็นเชิงเส้นของการทดสอบ acetic acid ในสารละลายมาตรฐาน (ซ้าย) สารละลายตัวอย่าง (ขวา)

2.2 การทดสอบ matrix effect

การทดสอบหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารสำคัญจากตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (แกน y) และปริมาณสารสำคัญจากสารละลายมาตรฐาน (แกน x) พบว่า peracetic acid มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ 0.998 (รูปที่ 7) มีช่วงความเชื่อมั่นของความชันตั้งแต่ 0.927 – 1.003 และ acetic acid มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ 0.997 (รูปที่ 7) มีช่วงความเชื่อมั่นของความชันตั้งแต่ 0.960 – 1.050 แสดงว่าไม่มี matrix effect สามารถเตรียมตัวอย่างและทดสอบ peracetic acid และ acetic acid ได้โดยตรง สามารถลดขั้นตอนการสกัดตัวอย่างด้วย octadecyl silanol minicolumn จากวิธีตั้งต้นได้



รูปที่ 7 การทดสอบ matrix effect ของวิธีทดสอบ peracetic acid (ซ้าย) และ acetic acid (ขวา)

2.3 การทดสอบความจำเพาะ

ทดสอบความจำเพาะของวิธีในสภาวะที่ทำให้เกิดสารสลายตัวและสภาวะที่มีการเติม 60 % HEDP (excipient) พบว่า hydrogen peroxide มีความจำเพาะในสภาวะ acid hydrolysis และในสภาวะที่มี HEDP สำหรับ peracetic acid มีความจำเพาะในสภาวะ thermal hydrolysis, photolysis และในสภาวะที่มี HEDP ส่วน acetic acid มีความจำเพาะในสภาวะที่มี HEDP (ตารางที่ 2)

HEDP มีคุณสมบัติเป็นกรดอ่อนที่สามารถแตกตัวได้และอาจทำปฏิกิริยากับสารละลายมาตรฐาน sodium hydroxide ได้เช่นกัน (Sode, 2014) การศึกษาครั้งนี้ พบว่า 60 % HEDP ไม่รบกวนการตรวจวัดจุดสมมูลของปฏิกิริยา ส่วนการทดสอบในสภาวะ oxidation โดยปกตินิยมใช้ hydrogen peroxide แต่การศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถทำได้ เนื่องจาก hydrogen peroxide เป็นสารสำคัญและเป็นสารตั้งต้นของ peracetic acid จึงต้องใช้สารที่มีคุณสมบัติเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ได้ ได้แก่ Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} มาทดสอบแทน (Boccardi, 2005 และ Farias et al., 2021) ซึ่งพบว่าสารดังกล่าวมีศักยภาพในการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์และรบกวนการตรวจวัดจุดสมมูลของปฏิกิริยา ดังนั้นในการทดสอบจึงต้องหลีกเลี่ยงสภาวะต่าง ๆ ที่รบกวนการตรวจวัดจุดสมมูล (ตารางที่ 2) และควรเก็บรักษาดตัวอย่างตามคำแนะนำของผู้ผลิตเพื่อป้องกันการสลายตัวของสารสำคัญด้วย

ตารางที่ 2 การทดสอบความจำเพาะของวิธีในสภาวะที่ทำให้เกิดสารสลายตัวและสภาวะที่มี excipient

สารสำคัญ	สภาวะทดสอบ	ปริมาตรที่จุดสมมูล (mL)				
		ควบคุม (mL)	ทดสอบ 1 (mL)	ทดสอบ 2 (mL)	ทดสอบเฉลี่ย (mL)	เบี่ยงเบน (%)
Hydrogen peroxide	acid hydrolysis	5.1556	5.1174	5.1603	5.1389	0.3
	alkaline hydrolysis	5.4276	5.3312	5.2708	5.3010	2.3
	oxidation (Fe^{2+})	5.6132	4.4702	4.4315	4.4508	20.7
	oxidation (Fe^{3+})	5.6132	0.6161	0.6433	0.6297	88.8
	oxidation (Cu^{2+})	5.6132	5.5793	5.5655	5.5724	0.73
	thermal hydrolysis	5.6132	5.6638	5.6574	5.6606	0.84
	photolysis	5.6132	5.5194	5.5369	5.5281	1.5
	HEDP	4.350	4.322	4.343	4.333	0.4
Peracetic acid	acid hydrolysis	5.9211	8.0117	8.1476	8.0796	36.5
	alkaline hydrolysis	7.6055	5.7878	5.7827	5.7852	23.9
	oxidation (Fe^{2+})	6.0330	6.3723	6.3763	6.3743	5.7
	oxidation (Fe^{3+})	6.0330	6.2100	6.2165	6.2132	3.0
	oxidation (Cu^{2+})	4.9202	4.7871	4.7377	4.7624	3.2
	thermal hydrolysis	5.9211	5.9268	5.8929	5.9098	0.2
	photolysis	5.9211	5.9028	5.9023	5.9026	0.3
	HEDP	5.5386	5.5725	5.5469	5.5597	0.4

สารสำคัญ	สภาวะทดสอบ	ปริมาตรที่จุดสมมูล (mL)				
		ควบคุม (mL)	ทดสอบ 1 (mL)	ทดสอบ 2 (mL)	ทดสอบเฉลี่ย (mL)	เบี่ยงเบน (%)
Acetic acid	acid hydrolysis	1.7794	3.8956	4.0115	3.9536	122.2
	alkaline hydrolysis	1.7695	1.7805	1.4174	1.4130	20.5
	oxidation (Fe ²⁺)	1.7794	2.4745	2.4873	2.4809	39.4
	oxidation (Fe ³⁺)	1.7794	2.2179	2.2712	2.2446	26.1
	oxidation (Cu ²⁺)	1.7794	2.0478	2.0668	2.0573	15.6
	thermal hydrolysis	1.7794	1.7795	1.7989	1.7892	0.6
	photolysis	1.7794	1.8406	1.8107	1.8256	2.6
	HEDP	4.9233	4.9478	4.9237	4.9356	0.3

เกณฑ์การยอมรับ: ปริมาตรที่จุดสมมูลเบี่ยงเบนน้อยกว่า 0.5 %

2.4 ความแม่นยำ (accuracy)

ทดสอบความแม่นยำจากค่าการคืนกลับของ hydrogen peroxide ที่ปริมาณ 5 ระดับ คือ 3, 7, 10, 12, 14 mg พบว่ามีค่าตั้งแต่ร้อยละ 98.43 – 101.27 (ตารางที่ 3) peracetic acid ที่ปริมาณ 20, 40, 50, 60, 80 mg มีค่าตั้งแต่ร้อยละ 98.22 – 101.39 (ตารางที่ 4) และ acetic acid ที่ปริมาณ 50, 100, 150, 200, 250 mg มีค่าตั้งแต่ร้อยละ 98.56 – 101.56 (ตารางที่ 5) ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับตามระดับความเข้มข้นของสารคือร้อยละ 98 -102 (AOAC, 2019) แสดงว่าวิธีทดสอบมีความแม่นยำ

ตารางที่ 3 การทดสอบความแม่นยำจากค่าการคืนกลับของ hydrogen peroxide

วันที่ทดสอบ	ปริมาณสารที่เติม (mg)	ปริมาณที่ทดสอบ (mg)	ค่าการคืนกลับ (%) ของ hydrogen peroxide			
			ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย (n=3)
1	2.3	3	101.68	99.51	100.95	100.71
	2.3	7	99.98	100.59	99.46	100.01
	5.4	10	101.71	99.54	99.09	100.11
	5.4	12	99.43	100.82	99.06	99.77
	5.4	14	99.40	99.90	100.46	99.92
2	2.2	3	100.94	99.71	100.82	100.49
	2.4	7	100.32	100.45	99.92	100.23
	5.4	10	101.73	101.28	100.81	101.27
	5.4	12	100.50	98.34	98.16	99.00
	5.4	14	99.44	98.24	99.20	98.96
3	2.4	3	99.06	98.14	98.10	98.43
	2.4	7	101.09	100.02	100.73	100.61
	5.5	10	101.37	100.17	100.15	100.56
	5.5	12	98.73	98.50	99.41	98.88
	5.5	14	99.17	99.27	99.35	99.26
ต่ำสุด – สูงสุด						98.43 - 101.27

เกณฑ์การยอมรับ: ค่าการคืนกลับ 98 -102 %

ตารางที่ 4 การทดสอบความแม่นยำจากค่าการคืนกลับของ peracetic acid

วันที่ ทดสอบ	ปริมาณสาร ที่เติม (mg)	ปริมาณที่ ทดสอบ (mg)	ค่าการคืนกลับ (%) ของ peracetic acid			
			ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย (n=3)
1	9.7	20	99.78	96.93	97.96	98.22
	20.2	40	98.46	100.46	99.75	99.56
	19.4	50	100.77	98.92	99.87	99.85
	30.2	60	101.46	101.29	100.85	101.20
	40.4	80	98.65	99.65	97.52	98.61
2	10.9	20	99.73	101.24	98.80	99.92
	19.5	40	100.11	98.00	101.33	99.81
	19.5	50	100.45	99.87	99.70	100.01
	30.0	60	101.23	101.25	101.41	101.30
	43.0	80	98.37	99.03	98.71	98.70
3	11.2	20	100.95	99.97	98.37	99.76
	20.5	40	100.64	101.61	101.91	101.39
	20.5	50	101.09	98.91	99.66	99.89
	28.3	60	100.17	98.44	100.90	99.84
	39.6	80	100.67	99.23	99.21	99.70
ต่ำสุด - สูงสุด						98.22 – 101.39

เกณฑ์การยอมรับ: ค่าการคืนกลับ 98 -102 %

ตารางที่ 5 การทดสอบความแม่นยำจากค่าการคืนกลับของ acetic acid

วันที่ ทดสอบ	ปริมาณสาร ที่เติม (mg)	ปริมาณที่ทดสอบ (mg)	ค่าการคืนกลับ (%) ของ acetic acid			
			ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย (n=3)
1	26.4	50	99.18	99.52	99.96	99.55
	51.5	100	99.06	99.41	99.12	99.20
	100.6	150	99.28	98.36	98.05	98.56
	98.8	200	101.79	100.59	101.58	101.32
	122.9	250	99.50	99.81	100.28	99.87
2	25.8	50	99.16	99.50	99.96	99.54
	53.5	100	99.17	98.41	99.06	99.88
	106.2	150	101.39	100.40	100.18	100.66
	102.5	200	102.89	101.19	100.62	101.56
	106.2	250	99.08	99.17	100.04	99.43

วันที่ ทดสอบ	ปริมาณสาร ที่เติม (mg)	ปริมาณที่ทดสอบ (mg)	ค่าการคืนกลับ (%) ของ acetic acid			
			ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย (n=3)
3	26.4	50	101.15	99.53	99.37	100.02
	51.8	100	101.29	101.74	101.46	101.50
	105.7	150	99.26	98.12	99.81	99.06
	105.7	200	98.67	98.71	98.91	98.77
	105.7	250	100.33	99.33	100.29	99.98
ต่ำสุด - สูงสุด						98.56 – 101.56

เกณฑ์การยอมรับ: ค่าการคืนกลับ 98 -102 %

2.5 ความเที่ยง (precision)

2.5.1 ความเที่ยงแบบทวนซ้ำได้ (repeatability) จากค่าความเที่ยงภายในวันเดียวกัน (intraday precision) ในรูปส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของค่าการคืนกลับของ hydrogen peroxide มีค่าร้อยละ 0.09 – 1.40 peracetic acid มีค่าร้อยละ 0.10 - 1.69 และ acetic acid มีค่าร้อยละ 0.13 – 1.16 และ ความเที่ยงระหว่างกลาง (ระหว่างวัน) ในรูปส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของค่าการคืนกลับของ hydrogen peroxide มีค่าร้อยละ 0.49 – 1.30 peracetic acid มีค่าร้อยละ 0.75 – 1.42 และ acetic acid ร้อยละ 0.50 – 1.50 ดังตารางที่ 6 แสดงให้เห็นถึงวิธีมีความเที่ยงอยู่เกณฑ์ยอมรับ (AOAC, 2019)

ตารางที่ 6 การทดสอบความเที่ยงแบบทวนซ้ำได้และความเที่ยงระหว่างกลาง

สารสำคัญ	ปริมาณที่ ทดสอบ (mg)	ความเที่ยงในรูปส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ RSD (%)			
		ความเที่ยงแบบทวนซ้ำได้			ความเที่ยงระหว่างกลาง
		วันที่ 1 (n = 3)	วันที่ 2 (n = 3)	วันที่ 3 (n = 3)	ระหว่างวัน (n = 9)
Hydrogen peroxide	3	1.10	0.67	0.55	1.30
	7	0.57	0.28	0.54	0.49
	10	1.40	0.45	0.69	0.95
	12	0.93	1.31	0.48	0.94
	14	0.53	0.64	0.09	0.60
Peracetic acid	10	1.47	1.23	1.31	1.42
	20	1.02	1.69	0.65	1.34
	40	0.93	0.39	1.11	0.75
	60	0.31	0.10	1.27	0.95
	80	1.08	0.33	0.84	0.88

สารสำคัญ	ปริมาณที่ทดสอบ (mg)	ความเที่ยงในรูปส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ RSD (%)			
		ความเที่ยงแบบทวนซ้ำได้		ความเที่ยงระหว่างกลาง	
		วันที่ 1 (n = 3)	วันที่ 2 (n = 3)	วันที่ 3 (n = 3)	ระหว่างวัน (n = 9)
Acetic acid	50	0.39	0.4	0.98	0.62
	100	0.19	0.42	0.22	1.26
	150	0.65	0.64	0.87	1.14
	200	0.63	1.16	0.13	1.50
	250	0.39	0.53	0.57	0.50

เกณฑ์การยอมรับ: ความเที่ยงแบบทวนซ้ำได้และความเที่ยงระหว่างกลางในรูป RSD < 2 %

2.6 พิสูจน์

จากการทดสอบความเป็นเชิงเส้น ความแม่นยำและความเที่ยงของวิธี พบว่า ช่วงปริมาณที่ศึกษามีความเป็นเชิงเส้น โดยมีความแม่นยำจากการคืนกลับตั้งแต่ร้อยละ 98.22 - 101.56 และค่าความเที่ยงในรูปส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ร้อยละ 0.09 -1.69 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (ตารางที่ 7) แสดงว่าพิสูจน์ของวิธีทดสอบ hydrogen peroxide อยู่ที่ 3 – 14 mg peracetic acid 20 – 80 mg และ acetic acid 50 – 250 mg

ตารางที่ 7 พิสูจน์ของวิธีทดสอบ

สมรรถนะของวิธี	เกณฑ์การยอมรับ	Hydrogen peroxide	Peracetic acid	Acetic acid
ช่วงปริมาณที่ศึกษา (mg)	ตามการใช้งาน	3 - 14	20 - 80	50 - 250
ความเป็นเชิงเส้น				
- สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r)	> 0.99	1	0.9992	0.9999
- สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2)	≥ 0.995	1	0.9983	0.9999
ความแม่นยำ (recovery, %)	98 - 102	98.43 – 101.27	98.22 – 101.39	98.56 – 101.56
ความเที่ยง				
- ความเที่ยงแบบทวนซ้ำได้ (RSD _r , %) < 2		0.09 – 1.40	0.10 – 1.69	0.13 – 1.16
- ความเที่ยงระหว่างกลาง (RSD _d , %) < 2		0.49 – 1.30	0.75 – 1.42	0.50 – 1.50

2.7 การทดสอบความคงทนของวิธี

ทดสอบความคงทนของวิธีทดสอบ hydrogen peroxide โดยเปลี่ยนแหล่งที่มาของสารละลายมาตรฐาน cerium(IV) sulfate จาก Loba® lot LM01742102 เป็นสารละลายมาตรฐานที่เตรียมขึ้นเองภายในห้องปฏิบัติการ การเปลี่ยนเครื่องไทเทรตและเปลี่ยนอิเล็กโทรดที่ใช้พบว่าให้ผลไม่แตกต่างทางสถิติ ($t_{cal} < t_{crit}$) ดังตารางที่ 8 สำหรับ peracetic acid และ acetic acid พบว่าการเปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน sodium hydroxide การเปลี่ยนเครื่องไทเทรตและเปลี่ยนอิเล็กโทรดที่ใช้พบว่าให้ผลไม่แตกต่างทางสถิติเช่นกัน ($F_{cal} < F_{crit}$ และ $t_{cal} < t_{crit}$) ดังตารางที่ 9 และ 10 แสดงว่าวิธีทดสอบมีความคงทน แม้เปลี่ยนสภาวะทดสอบเล็กน้อยแล้ว ก็ยังสามารถให้ผลทดสอบไม่แตกต่างจากสภาวะเดิม

ตารางที่ 8 การทดสอบความคงทนของวิธีทดสอบ hydrogen peroxide

สภาวะทดสอบ		ปริมาณสารสำคัญ (% W/W)				RSD (%)	ค่าสถิติ	
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ค่าเฉลี่ย			
Ce(SO ₄) ₂	Loba [®]	24.468	24.564	24.641	24.558	0.03	t _{cal}	t _{crit}
	เตรียมเอง	24.708	24.441	24.621	24.590	0.08	0.35	2.78
DMi 140 SC (9508220)	Titratort รุ่น T7	24.229	24.263	24.517	24.336	0.65	t _{cal}	t _{crit}
	Titratort รุ่น T9	24.303	24.512	24.495	24.437	0.47	0.89	2.78
Titratort T9	DMi 140 SC (5313081)	24.507	24.502	24.386	24.465	0.28	t _{cal}	t _{crit}
	DMi 140 SC (9508220)	24.303	24.512	24.495	24.437	0.47	0.36	2.78

เกณฑ์การยอมรับ: t_{cal} < t_{crit}

ตารางที่ 9 การทดสอบความคงทนของวิธีทดสอบ peracetic acid

สภาวะทดสอบ		ปริมาณสารสำคัญ (% W/W)				RSD (%)	ค่าสถิติ	
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ค่าเฉลี่ย			
Sodium hydroxide	0.5 (0.4972 N)	5.004	4.940	4.853	4.930	1.54	F _{cal}	F _{crit}
	0.4 (0.4244 N)	5.073	4.961	5.027	5.020	1.12	3.83	5.14
	0.55 (0.5555 N)	5.044	5.110	5.037	5.064	0.80		
DG 111	Titratort รุ่น T7	5.004	4.940	4.853	4.932	1.54	t _{cal}	t _{crit}
	Titratort รุ่น T9	5.014	5.104	5.023	5.047	0.98	2.19	2.78
Titratort รุ่น T9	DGi 111 SC	5.014	5.104	5.023	5.047	0.98	t _{cal}	t _{crit}
	DGi 115 SC	5.128	4.949	5.005	5.027	1.82	0.32	2.78

เกณฑ์การยอมรับ: F_{cal} < F_{crit} และ t_{cal} < t_{crit}

ตารางที่ 10 การทดสอบความคงทนของวิธีทดสอบ acetic acid

สภาวะทดสอบ		ปริมาณสารสำคัญ (% W/W)				RSD (%)	ค่าสถิติ	
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ค่าเฉลี่ย			
Sodium hydroxide	0.5 (0.4972 N)	10.381	10.263	10.208	10.280	0.86	F _{cal}	F _{crit}
	0.4 (0.4244 N)	10.369	10.193	10.189	10.250	1.00	0.21	5.14
	0.55 (0.5555 N)	10.257	10.288	10.179	10.240	0.55		
DG 111	Titratort รุ่น T7	10.381	10.263	10.208	10.331	0.80	t _{cal}	t _{crit}
	Titratort รุ่น T9	10.112	10.341	10.170	10.207	1.17	0.89	2.78
Titratort รุ่น T9	DGi 111 SC	10.112	10.341	10.170	10.207	1.17	t _{cal}	t _{crit}
	DGi 115 SC	10.307	10.423	10.263	10.331	0.80	1.47	2.78

เกณฑ์การยอมรับ: F_{cal} < F_{crit} และ t_{cal} < t_{crit}

2.8 การทดสอบขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (quantitation limit: QL)

การหาขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ โดยเตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อให้มีความเข้มข้นต่ำกว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ขึ้นทะเบียนไว้กรมปศุสัตว์ดังนี้ hydrogen peroxide 2.6 % (ขึ้นทะเบียน 10 – 26.53 %) peracetic acid 0.6 % (ขึ้นทะเบียน 1.2 – 15 %) และ acetic acid 2.0 % (ขึ้นทะเบียน 5 - 36 %) ผลการทดสอบพบว่าวิธีมีขีดจำกัดการตรวจวัดที่ความเข้มข้นดังกล่าว (ตารางที่ 11) การตรวจยืนยันขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ พบว่าวิธีมีความแม่นยำจากค่าการคืนกลับเฉลี่ยของ hydrogen peroxide ร้อยละ 100.57 (99.17 – 101.37) ความเที่ยงชนิดทวนซ้ำได้ในรูปส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ร้อยละ 0.71 peracetic acid มีความแม่นยำจากค่าการคืนกลับเฉลี่ยร้อยละ 100.61 (99.25 – 101.85) ความเที่ยงชนิดทวนซ้ำได้ในรูปส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ร้อยละ 0.87 และ acetic acid มีความแม่นยำจากค่าการคืนกลับเฉลี่ย ร้อยละ 99.78 (99.08 – 100.32) ความเที่ยงชนิดทวนซ้ำได้ในรูปส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ร้อยละ 0.40 (ตารางที่ 12) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับเรื่องความแม่นยำและความเที่ยงของวิธี ดังนั้น ขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณของวิธีทดสอบ hydrogen peroxide, peracetic acid และ acetic acid มีค่า 2.6 %, 0.6 % และ 2.0 % W/W ตามลำดับ

ตารางที่ 11 การทดสอบขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (QL)

พารามิเตอร์	ความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้ (% W/W)		
	Hydrogen peroxide	Peracetic acid	Acetic acid
	2.6 %	0.6 %	2 %
ค่าเฉลี่ย (n=7)	2.605	0.605	2.072
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)	0.0033	0.004	0.012
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD, %)	0.13	0.73	0.58

เกณฑ์การยอมรับ: RSD < 2 %

ตารางที่ 12 การตรวจยืนยันขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (QL)

ตัวอย่างที่	Hydrogen peroxide		Peracetic acid		Acetic acid	
	2.6 % W/W		0.6 % W/W		2.0 % W/W	
	ความเข้มข้น (% W/W)	ค่าการคืนกลับ (%)	ความเข้มข้น (% W/W)	ค่าการคืนกลับ (%)	ความเข้มข้น (% W/W)	ค่าการคืนกลับ (%)
1	2.640	100.86	0.606	101.39	2.062	100.01
2	2.637	101.09	0.606	99.88	2.088	99.39
3	2.639	101.11	0.603	100.77	2.025	100.32
4	2.639	100.83	0.608	100.17	2.066	99.56
5	2.638	99.48	0.601	101.10	2.065	99.92
6	2.638	100.73	0.604	100.24	2.045	99.08
7	2.634	101.06	0.604	99.25	2.077	100.19
8	2.639	101.37	0.603	99.58	2.069	99.29
9	2.639	100.03	0.603	101.85	2.073	100.12
10	2.643	99.17	0.601	101.85	2.087	99.91
ค่าเฉลี่ย	2.639	100.57	0.604	100.61	2.066	99.78
SD	0.003	0.71	0.002	0.88	0.02	0.40
RSD (%)	0.09	0.71	0.37	0.87	0.92	0.40

เกณฑ์การยอมรับ: ค่าการคืนกลับ 98 – 102 %, RSD ของความเข้มข้น < 2 %

สรุปผลการศึกษา

ผลการพัฒนาวิธีทดสอบ hydrogen peroxide โดยการไทเทรตด้วย 0.1 N cerium(IV) sulfate, peracetic acid และ acetic acid โดยการไทเทรตด้วย 0.5 N sodium hydroxide ด้วยเทคนิค potentiometric titration โดยไม่ต้องสกัดตัวอย่าง สามารถวัดจุดสมมูลจากจุดที่มีการเปลี่ยนศักย์ไฟฟ้าสูงสุดได้ทั้ง 2 ปฏิกริยา การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบตามแนวทางของตำรายาสหรัฐอเมริกา พบว่ามีความเป็นเชิงเส้น โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ $r \geq 0.9992$ และพิสัยของ hydrogen peroxide ตั้งแต่ 3 – 14 mg peracetic acid 20 - 80 mg และ acetic acid 50 - 250 mg วิธีมีความแม่นยำจากการศึกษาค่าการคืนกลับของสารสำคัญทั้ง 3 ชนิด เฉลี่ยร้อยละ 98.22 – 101.56 ผ่านเกณฑ์การยอมรับ มีความเที่ยงแบบทวนซ้ำได้และความเที่ยงระหว่างกลาง ในรูปค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์สูงสุดร้อยละ 1.69 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับเช่นกัน การทดสอบความจำเพาะของวิธีด้วย forced degradation study และสถานะที่มี HEDP (excipient) พบว่ามีความจำเพาะคือไม่พบสัญญาณรบกวนการตรวจวัดจุดสมมูลของปฏิกริยา วิธีทดสอบมีความคงทนต่อการเปลี่ยนยี่ห้อหรือความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน การเปลี่ยนเครื่องมือทดสอบ (titrator) และการเปลี่ยนอิเล็กโทรด การทดสอบขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณของ hydrogen peroxide, peracetic acid และ acetic acid พบว่ามีค่า 2.6 %, 0.6 % และ 2.0 % โดยน้ำหนัก ตามลำดับ จึงสามารถใช้ตรวจตรวจตัวอย่างผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อด้านการปศุสัตว์ที่ขึ้นทะเบียนไว้และตัวอย่างที่มีความเข้มข้นน้อย ๆ ได้ ดังนั้นวิธีทดสอบหาปริมาณ hydrogen peroxide, peracetic acid และ acetic acid ด้วยเทคนิค potentiometric titration มีความแม่นยำ ความเที่ยง ความจำเพาะ ความเป็นเชิงเส้นและความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยของสถานะทดสอบตามข้อกำหนดของตำรายาสหรัฐอเมริกา ดังแสดงในตารางที่ 13 จึงเหมาะสมในการนำไปใช้ทดสอบตัวอย่างผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อด้านการปศุสัตว์ที่มีสารสำคัญ hydrogen peroxide, peracetic acid และ acetic acid ตรงตามวัตถุประสงค์การศึกษา

ตารางที่ 13 สรุปผลสมรรถนะของวิธีทดสอบ

สมรรถนะของวิธีทดสอบ	Hydrogen peroxide	Peracetic acid	Acetic acid	เกณฑ์การยอมรับ
การทดสอบความเป็นเชิงเส้น				
- สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r)	1	0.9992	0.9999	> 0.99
- สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2)	1	0.9983	0.9999	≥ 0.995
พิสัย (mg)	3 - 14	20 - 80	50 - 250	ตามการใช้งาน
ความจำเพาะ	มี	มี	มี	มี
ความแม่นยำ (recovery, %)	98.43 – 101.27	98.22 – 101.39	98.56 – 101.56	98 – 102
ความเที่ยง				
- ความเที่ยงแบบทวนซ้ำได้ (RSD _r , %)	0.09 – 1.40	0.10 – 1.69	0.13 – 1.16	< 2
- ความเที่ยงระหว่างกลาง (RSD _b , %)	0.49 – 1.30	0.75 – 1.42	0.50 – 1.50	< 2
ขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (% W/W)	2.6	0.6	2.0	ตามการใช้งาน

ข้อเสนอแนะ

ผลการศึกษานี้ สามารถนำวิธีทดสอบที่พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้แล้วไปใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อด้านการปศุสัตว์ เปรียบเทียบผลกับห้องปฏิบัติการอื่นและขอรับการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 อีกทั้งเป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อกลุ่มอื่น เช่น available chlorine และ available oxygen เป็นต้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นายสัตวแพทย์เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่ให้ความสนับสนุน นายสัตวแพทย์สมชาย วงศ์สมุทร ผู้เชี่ยวชาญด้านการตรวจสอบคุณภาพน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมที่ปรึกษา นางสาวพรรณราย สิงห์เถื่อน นางสาวฉัตรชนก รัชชัยมงคล นางสาวจุฑาทพร หงส์ผาทอง นางสาวอนุสราทองบุญรัตน์ และเจ้าหน้าที่กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุดิบตรายด้านการปศุสัตว์ ที่ช่วยให้การศึกษานี้สำเร็จได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- กองควบคุมอาหารและยาสัตว์. 2563. กฎหมายที่เกี่ยวข้องกับกองควบคุมอาหารและยาสัตว์. [Online]. Available: <http://afvc.dld.go.th/webnew/index.php/th/lawdld-menu/2018-10-31-08-11-45>.
- คณินิจ ก่อธรรมฤทธิ์. 2550. วัตถุดิบตรายด้านการปศุสัตว์. สำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์. 18-32.
- ศศิ เจริญพจน์. 2560. การพัฒนาระบบควบคุมยาสัตว์ วัตถุดิบตราย (ผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อ) และเชื้อดื้อยาในการเลี้ยงสัตว์. นนทบุรี: ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. 132-172.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2019. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. In: Official Methods of Analysis of AOAC International. 21st ed. G.W. Latimer (ed.). Maryland: AOAC International. 1-18.
- Australian Pesticides and Veterinary Medicine Authority (APVMA). 2014. Validation of analytical methods for active constituents and agricultural products. [Online]. Available: <https://apvma.gov.au/node/1048>.
- Boccardi, G. 2005. Oxidative Susceptibility testing. In: Pharmaceutical Stress Testing Predicting Drug Degradation. S.W. Baertschi (ed.). New York : Taylor & Francis. 205-230.
- British Pharmacopoeia (BP). 2022a. Hydrogen peroxide solution. London: Medicines and Healthcare products Regulatory Agency. 1267-1268.
- British Pharmacopoeia (BP). 2022b. Acetic acid. London: Medicines and Healthcare products Regulatory Agency. 60-61.
- British Pharmacopoeia (BP). 2022c. Appendix I B. Volumetric Reagents and Solutions. London: Medicines and Healthcare products Regulatory Agency. V-A161-VA168.

- Cheng, C., H. Li, J. Wang, H. Wang and X. Yang. 2020. A review of measurement methods for peracetic acid (PAA). *Front. Environ. Sci. Eng.* 14(5): article number 87. [Online]. Available: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11783-020-1266-5>.
- Eurachem. 2014. The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 2nd ed. B. Magnusson and U. Örnemark (eds.) [Online]. Available: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf.
- European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC). 2001. ECETOC JACC No. 40 Peracetic acid (CAS No. 79-21-0) and its equilibrium solutions. [Online]. Available: <https://www.ecetoc.org/wp-content/uploads/2014/08/JACC-040.pdf>.
- European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). 2015. Technical guide for the elaboration of monograph European Pharmacopoeia 7th ed. [Online]. Available: https://www.edqm.eu/sites/default/files/technical_guide_for_the_elaboration_of_Monographs_7th_edition_2015.pdf.
- Farias, F.F, V.A.P. Martins, H.M. Yano, L.M. Trujillo and E. Pinto. 2021. Forced degradation studies to identify organic impurities in pharmaceuticals: a Brazilian perspective. *Rev ciênc Farm Básica Apl.* 42:e729. [Online]. Available: <https://doi.org/10.4322/2179-443x.0729>.
- Finnegan, M., E. Linley, S. P. Denyer, G. McDonnell, C. Simon and J-Y Maillard. 2010. Mode of action of hydrogen peroxide and other oxidizing agents: differences between liquid and gas form. *J. Antimicrob. Chemother.* 65(10): 2108-2115.
- ISO/IEC 17025: 2017 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva: International Organization for Standardization. 30 pp.
- Marques, M. R. C., H. Pappa, M. Chang, L. Spafford, M. Klein and L. Meier. 2021. Recommendations for titration methods validation. [Online]. Available: https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/resources/titration_met_val_feb_10_2021.pdf.
- Miller, J. H. M. 2005. System suitability tests. In: *Method validation in pharmaceutical analysis a guide to best practice*. J. Ermer and J. H. M. Miller (eds.). Darmstadt: Wiley-VCH. 170-194.
- Putt, K. S. and R. B. Pugh. 2013. A high throughput microtiter plate based method for the determination of peracetic acid and hydrogen peroxide. *PLoS ONE*. 8(11): e79218.doi:10.1371/journal.pone.0079218.
- Reichert, J. S., S. A. McNeight and H. W. Rudel. 1939. Determination of hydrogen peroxide and some related peroxy compounds. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 11(4): 194-197.

- Sode, F. 2014. Simultaneous determination of peracetic acid and acetic acid by titration with NaOH. *Anal. Methods*. 6(7): 2406-2409.
- The United States Food and Drug Administration (U.S. FDA). 2020. Methods, method verification and validation ORA-LAB.5.4.5. In: Office of regulatory affairs laboratory manual vol II. [Online]. Available: <https://www.fda.gov/media/73920/download>.
- United States Pharmacopoeia. 2022a. Reagents. Hydrogen peroxide concentrate. In: USP-NF. Rockville. MD: USP. DOI: https://doi.org/10.31003/USPNF_M38580_03_01.
- United States Pharmacopoeia. 2022b. Reagents. Acetic acid irrigation. In: USP-NF. Rockville. MD: USP. DOI: https://doi.org/10.31003/USPNF_M450_03_01.
- United States Pharmacopoeia. 2022c. General Chapter. <1225> Validation of compendial procedures. In: USP-NF. Rockville. MD: USP. DOI: https://doi.org/10.31003/USPNF_M99945_04_01.
- United States Pharmacopoeia. 2022d. Reagents. 0.1 N Ceric Sulfate VS. In: USP-NF. Rockville. MD: USP. DOI: https://doi.org/10.31003/USPNF_R3367_05_01.
- United States Pharmacopoeia. 2022e. Reagents. 0.5 N Sodium Hydroxide VS. In: USP-NF. Rockville. MD: USP. DOI: https://doi.org/10.31003/USPNF_R7134_04_01.
- United States Pharmacopoeia. 2022f. Reagents. 0.02 M Potassium Permanganate VS. In: USP-NF. Rockville. MD: USP. DOI: https://doi.org/10.31003/USPNF_X2R3391_01_01.
- World Trade Organization (WTO). 2016. G/SPS/N/JPN/472. Committee on Sanitary and Phytosanitary Measures Notification: Amendment to the Enforcement Ordinance of the Food Sanitation Law and the Standards and Specifications for Foods and Food Additives. [Online]. Available: <https://docs.wto.org/dol2fe/Pages/SS/directdoc.aspx?filename=q:/G/SPS/NJPN472.pdf&Open=True>
- Zhao, X., T. Zhang, Y. Zhou and D. Liu. 2008. Preparation of peracetic acid from acetic acid and hydrogen peroxide: experimentation and modeling. *Chin. J. Process. Eng.* 8(1): 35-41.