

วิธีวิเคราะห์ปริมาณสารไล่แมลงโดยวิธี HPLC

วงเดือน นาคนิม

สำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ วิธีวิเคราะห์สารไล่แมลง ได้แก่ ethyl butylacetylaminopropionate, dimethyl phthalate (DMP) และ N, N-diethyl-m-toluamide (DEET) ในผลิตภัณฑ์ทาไล่แมลง สามารถวิเคราะห์สารทั้ง 3 ชนิดได้ในคราวเดียวกัน ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ในระบบ reversed phase โดยใช้คอลัมน์ชนิด XTerra RP C8 ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร สารละลายตัวพาประกอบด้วย ส่วนผสมของ acetonitrile และน้ำกลั่นในอัตราส่วน 25:75 อัตราการไหลของสารละลายตัวพา 1 มิลลิเมตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร ปริมาตรที่ฉีดสารละลาย 5 ไมโครลิตร ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีซึ่งดำเนินการในผลิตภัณฑ์ทาไล่แมลงชนิดโลชั่นและครีมชั้น พบว่า พีคของสาร ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET แยกออกจากกันได้ดีและไม่ถูกรบกวนจากสารอื่นในตัวอย่าง โดยมีค่า retention time เท่ากับ 8.86, 11.6 และ 14.2 นาที ตามลำดับ พบว่า มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารและพื้นที่ใต้พีคตลอดช่วงความเข้มข้น 0.1 - 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.99995, 0.99998 และ 0.99998 ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์สารทั้ง 3 ชนิด ในตัวอย่างทั้ง 2 ประเภท วิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน มีค่า RSD อยู่ในช่วงร้อยละ 0.06 - 0.12, 0.04 และ 0.03 - 0.14 ตามลำดับ พบว่า ไม่มีความแตกต่างของผลวิเคราะห์ซ้ำระหว่างวัน 5 วัน โดยผลวิเคราะห์สารทั้ง 3 ชนิดในตัวอย่างทั้ง 2 ประเภท มีค่า p-value อยู่ในช่วง 0.35 - 0.80, 0.06 และ 0.13 - 0.996 ตามลำดับ และไม่มีความแตกต่างระหว่างผลวิเคราะห์ของนักวิเคราะห์ 3 คน โดยมีค่า p-value อยู่ในช่วง 0.22, 0.40 และ 0.18 - 0.92 ตามลำดับ ซึ่งแสดงถึงความเที่ยง (precision) ของวิธี ผลวิเคราะห์ spiked sample ได้ค่า recovery ของการวิเคราะห์ ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET อยู่ในช่วงร้อยละ 99.7 - 104.6, 94.6 - 98.9 และ 97.5 - 101.6 ตามลำดับ ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) เท่ากับร้อยละ 0.08, 0.05 และ 0.05 โดยน้ำหนักตามลำดับ ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ) เท่ากับร้อยละ 0.30, 0.20 และ 0.20 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ค่าความไม่แน่นอนขยายสัมพัทธ์ของวิธีวิเคราะห์ ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET เท่ากับ 0.027, 0.041 และ 0.024 ตามลำดับ ซึ่งผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีอยู่ในเกณฑ์ยอมรับสามารถนำไปใช้วิเคราะห์สาร ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET ในผลิตภัณฑ์ทาไล่แมลงได้

บทนำ

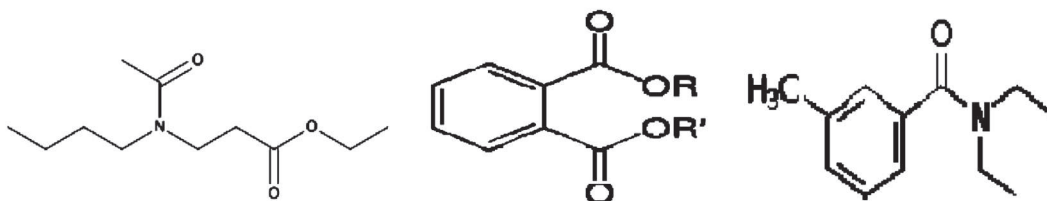
ยุงเป็นพาหะของโรคหลายชนิด เช่น โรคไข้เลือดออก โรคมาลาเรีย เป็นต้น การป้องกันตนเองไม่ให้ยุงกัดทำได้หลายวิธี เช่น การนอนกางมุ้ง การสวมเสื้อปกปิดร่างกายให้มิดชิด การใช้ยาจุดกันยุง และผลิตภัณฑ์ทาไล่ยุง ปัจจุบันผลิตภัณฑ์ทาไล่แมลงมีรูปแบบหลากหลาย เช่น ครีม โลชั่น แป้งโรยตัว ผ้า/กระดาษชุบของเหลว โรลออน สเปรย์ฉีดพ่น และเจล เป็นต้น⁽¹⁾

สารออกฤทธิ์ที่ใช้ในผลิตภัณฑ์ทาไล่แมลงที่สกัดจากพืช เช่น citronella oil, lemon eucalyptus oil, cinnamon oil, castor oil, rosemary oil, lemongrass oil, cedar oil, peppermint oil, clove oil และ geranium oil เป็นต้น มีระยะเวลาในการป้องกันยุงขึ้นกับความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ เช่น citronella oil ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก มีระยะเวลาในการป้องกันประมาณ 7 - 60 นาที ทำให้ต้องทาซ้ำบ่อยขึ้น จึงไม่ค่อยเป็นที่นิยมใช้ แต่ข้อดีคือ มีความปลอดภัย ลดการระคายเคือง สามารถใช้กับเด็กได้ และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม⁽²⁾ ส่วนสารเคมีที่นิยมใช้เป็นสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์ทาไล่แมลง เช่น ethyl butylacetylaminopropionate, dimethyl phthalate (DMP) และ N, N-diethyl-m-toluamide (DEET) ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการไล่แมลง แต่ในขณะเดียวกันสารเคมีสามารถทำให้เกิดอันตรายต่อการใช้อย่างกว้างขวางกว่าสารธรรมชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสาร DEET ซึ่งมีคำแนะนำการใช้เช่น สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ประเทศสหรัฐอเมริกาได้แนะนำว่าไม่ควรใช้กับเด็กที่อายุต่ำกว่า 2 เดือน⁽³⁾ ส่วนสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของประเทศไทยให้ระบุที่ฉลากผลิตภัณฑ์เตือนการใช้กับเด็กอายุต่ำกว่า 4 ปี⁽⁴⁾

Ethyl butylacetylaminopropionate หรือรู้จักกันในชื่อการค้าว่า IR3535® เป็นสารที่ยังไม่มีรายงานการเกิดพิษต่อคนและไม่ระคายเคืองต่อผิวหนัง ผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณสารนี้ ร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก สามารถป้องกันยุงได้ยาวนานกว่า 7 ชั่วโมง สามารถใช้กับเด็กอายุตั้งแต่ 2 ปีและสตรีมีครรภ์ได้ นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพในการไล่เห็บหมัด และแมลงอื่นๆ⁽⁵⁾

Dimethyl phthalate (DMP) ทำให้เกิดการระคายเคืองได้เช่นเดียวกัน โดยสามารถดูดซึมผ่านผิวหนังได้ทันที สารนี้ไม่ก่อให้เกิดมะเร็ง แต่การได้รับสารนี้อย่างต่อเนื่องอาจก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ มีอันตรายต่อระบบสืบพันธุ์และมีผลต่อทารกในครรภ์ ก่อระบบประสาทส่วนกลางและทำอันตรายต่อไต⁽⁶⁾

N, N-diethyl-m-toluamide (DEET) เป็นสารออกฤทธิ์ที่นิยมใช้มากกว่าสารอื่น โดยทั่วไปในผลิตภัณฑ์จะมีความเข้มข้นของ DEET อยู่ระหว่างร้อยละ 5 - 25 โดยน้ำหนัก การสัมผัสสารนี้ก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังและดวงตา การสูดดมอาจทำให้เกิดการระคายเคืองที่แผ่นเยื่อเมือกและบริเวณทางเดินหายใจส่วนบน การได้รับสารเป็นเวลานานหรือซ้ำหลายครั้งอาจเกิดอาการแพ้ จากการทดลองในหนูการได้รับสารแบบเรื้อรังก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ มีอันตรายต่อระบบสืบพันธุ์และมีผลต่อทารกในครรภ์⁽⁷⁾ ผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณ DEET สูงจะป้องกันยุงได้นานขึ้น เช่น ผลิตภัณฑ์ที่มี DEET ร้อยละ 20, 7 และ 5 โดยน้ำหนัก สามารถป้องกันได้ 4, 2 และ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ สำหรับผู้ใหญ่ควรใช้ผลิตภัณฑ์ที่มี DEET อยู่ระหว่างร้อยละ 15 - 20 โดยน้ำหนัก ส่วนเด็กไม่ควรใช้ผลิตภัณฑ์ที่มี DEET สูงกว่าร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้าง ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET

ผลิตภัณฑ์ที่ใช้สารเคมีดังกล่าวจัดเป็นวัตถุอันตรายชนิดที่ 3 ตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 ซึ่งต้องขึ้นทะเบียนและขออนุญาตในการผลิต นำเข้า ส่งออก หรือมีไว้ในครอบครองจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา⁽⁸⁾ ผลิตภัณฑ์จะต้องแสดงฉลากตามที่กฎหมายกำหนด และมีความเข้มข้นของสารสำคัญตามที่ฉลากระบุ โดยมีเกณฑ์การยอมรับให้คลาดเคลื่อนจากที่ระบุในฉลาก เป็นไปตามกฎหมาย⁽⁹⁾ ตามประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา พ.ศ. 2538 เรื่อง การแสดงฉลากของผลิตภัณฑ์ไล่แมลงประเภทสำเร็จรูปที่ประกอบด้วย DEET หรือ DMP หรือสารผสมกัน ให้ระบุค่าเตือนที่ฉลากผลิตภัณฑ์ว่า ห้ามใช้กับเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 4 ปี⁽⁴⁾ และประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา พ.ศ. 2545 เรื่อง การแสดงฉลากของผลิตภัณฑ์ไล่แมลงประเภทสำเร็จรูปที่ประกอบด้วย ethyl butylacetylaminopropionate ให้ระบุค่าเตือนที่ฉลากผลิตภัณฑ์ว่า ผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วย ethyl butylacetylaminopropionate ความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 12.5 ห้ามใช้กับเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 4 ปี และความเข้มข้นเท่ากับหรือน้อยกว่าร้อยละ 12.5 ห้ามใช้กับเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 2 ปี⁽¹⁰⁾ การตรวจวิเคราะห์สารไล่แมลงในผลิตภัณฑ์ไล่แมลงมีวิธีวิเคราะห์สำหรับสารแต่ละชนิด โดยใช้เทคนิค Gas chromatography ใช้ capillary column ชนิด HP-5 หรือ HP-50 +⁽¹¹⁾ ซึ่งวิธีวิเคราะห์นี้เป็นวิธีเฉพาะของสารแต่ละชนิด ไม่สามารถที่จะแยกสารทั้ง 3 ชนิดได้พร้อมกันในคราวเดียว เมื่อมีตัวอย่างที่ไม่ทราบสารสำคัญทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ได้หรือต้องใช้เวลาและสารเคมีมากขึ้น

ผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่สามารถวิเคราะห์สาร ethyl butylacetylaminopropionate, dimethyl phthalate (DMP) และ N, N-diethyl-m-toluamide (DEET) ได้พร้อมกันในคราวเดียว และทดสอบความถูกต้องของวิธีเพื่อให้ได้วิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการที่ใช้ในการให้บริการตรวจวิเคราะห์และการเฝ้าระวังคุณภาพผลิตภัณฑ์ทางกฎหมาย โดยลดระยะเวลาการวิเคราะห์กรณีที่มีสารไล่แมลงหลายชนิดในตัวอย่างเดียวกัน

วัสดุและวิธีการ

สารมาตรฐานและสารเคมี

สารมาตรฐาน : N, N-diethyl-m-toluamide (DEET), dimethyl phthalate (DMP) ผลิตภัณฑ์ของ ChemService ความบริสุทธิ์มากกว่า 95%, ethyl butylacetylaminopropionate ผลิตภัณฑ์ของ Merck ความบริสุทธิ์มากกว่า 95%

สารเคมี : acetonitrile (HPLC grade), methanol (HPLC grade) ผลิตภัณฑ์ของ Merck และน้ำบริสุทธิ์

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง (HPLC) ผลิตภัณฑ์ของ Waters รุ่น DetaPrep ประกอบด้วย pump รุ่น 600 เครื่องตรวจวัดชนิด Photo Diode Array รุ่น 2996 ระบบฉีดสารอัตโนมัติ รุ่น 717 plus คอลัมน์ XTerra RP C8 ขนาด 4.6 มิลลิเมตร × 150 มิลลิเมตร บรรจุอนุภาคขนาด 5 ไมโครเมตร, เครื่องชั่งความละเอียด 0.1 มิลลิกรัม ผลิตภัณฑ์ของ Sartorius, แผ่นกรองชนิด nylon ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

สภาวะเครื่อง HPLC

Column	: XTerra RP C8 ขนาด 4.6 มิลลิเมตร × 150 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร
Mobile phase	: acetonitrile : water ในอัตราส่วน 25:75 โดยปริมาตร
Flow rate	: 1 มิลลิลิตรต่อนาที
Detector	: UV 220 นาโนเมตร
Injection volume	: 5 ไมโครลิตร

ตัวอย่าง

ทดสอบความถูกต้องของวิธีโดยใช้ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทาโล่งชนิดโลชั่นใสและครีมข้น มีสารออกฤทธิ์ ethyl butylacetylaminopropionate ผลิตภัณฑ์ทาโล่งชนิดโลชั่นใส มีสารออกฤทธิ์ DEET และ DMP ผลิตภัณฑ์ทาโล่งชนิดครีมข้น มีสารออกฤทธิ์ DEET และผลิตภัณฑ์ทาโล่งชนิดโลชั่นใสและครีมข้นที่ไม่มีสารทั้ง 3 ชนิด เพื่อศึกษาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

สารละลายมาตรฐาน stock standard solution

ชั่งสารมาตรฐาน ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET ชนิดละประมาณ 0.63 กรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร แต่ละใบ ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิด 63 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารละลายมาตรฐาน mixed stock standard solution

ปิเปต stock standard solution ของสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิดปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิด 12.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารละลายมาตรฐาน mixed working standard solution

โดยเจือจางจาก mixed stock standard solution ให้ได้ความเข้มข้นของสารแต่ละชนิด 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารละลายมาตรฐาน DEET

ชั่งสารมาตรฐาน DEET ประมาณ 5 กรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 200 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน DEET 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารละลายมาตรฐานผสมของ ethyl butylacetylaminopropionate และ DMP

ชั่งสารมาตรฐาน ethyl butylacetylaminopropionate ประมาณ 1.2 กรัม และ DMP ประมาณ 3.2 กรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน ethyl butylacetylaminopropionate และ DMP 12 และ 32 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร เจือจางสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วงของกราฟมาตรฐาน

การเตรียมสารละลาย spiked sample

เติมสารมาตรฐานที่ต้องการทดสอบลงในตัวอย่างชนิดโลชั่นใสและครีมข้นที่ไม่มีสารที่ต้องการทดสอบ โดยเติมในระดับความเข้มข้นร้อยละ 50, 100 และ 150 ของปริมาณที่ใช้ในผลิตภัณฑ์ วิเคราะห์ซ้ำระดับละ 3 ครั้ง

ชั่งตัวอย่างชนิดโลชั่นใสและครีมข้น 1 กรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐานผสมของ ethyl butylacetylaminopropionate ความเข้มข้น 12 และ DMP ความเข้มข้น 32 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5.0, 10.0 และ 15.0 มิลลิลิตร ให้ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน ethyl butylacetylaminopropionate ในตัวอย่างร้อยละ 6, 12 และ 18 โดยน้ำหนัก และความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน DMP ในตัวอย่าง

ร้อยละ 16, 32 และ 48 โดยน้ำหนักตามลำดับ แล้วเจือจางสารละลายอีก 10 เท่า และ 20 เท่า เพื่อให้อยู่ในช่วงความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน

ซึ่งตัวอย่างชนิดโลชั่นใส 1 กรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นมาตรฐาน DEET ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5.0, 10.0 และ 15.0 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานในตัวอย่างร้อยละ 12.5, 25 และ 37.5 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และเจือจางสารละลาย spiked sample อีก 10 เท่า

ซึ่งตัวอย่างชนิดครีมขุ่น 1 กรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นมาตรฐาน DEET ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3.0, 6.0 และ 9.0 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานในตัวอย่างร้อยละ 7.5, 15 และ 22.5 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และเจือจางสารละลาย spiked sample อีก 10 เท่า

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์⁽¹²⁾

การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity/Selectivity)

ฉีดสารละลาย mixed working standard solution ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายตัวอย่างชนิดโลชั่นใสและครีมขุ่น เข้าเครื่อง HPLC ภายใต้สภาวะที่กำหนดเพื่อตรวจสอบการแยกของสารทั้ง 3 ชนิด ออกจากการรบกวนของสารอื่นในตัวอย่าง สารทั้ง 3 ชนิดต้องมีค่า retention time แยกจากกันชัดเจน

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and range)

การทดสอบความเป็นเส้นตรงของระบบ (System linearity)

ฉีดสารละลายมาตรฐาน mixed working standard solution ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เข้าเครื่อง HPLC โดยฉีดความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ แล้วสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นสารมาตรฐาน ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ควรใกล้ 1

การทดสอบความเที่ยง (Precision)

การทดสอบความเที่ยงของการวิเคราะห์ทั้งการวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน การวิเคราะห์ซ้ำระหว่างวัน และการวิเคราะห์ซ้ำโดยนักวิเคราะห์อื่น

Repeatability

วิเคราะห์ปริมาณสารทั้ง 3 ชนิดในตัวอย่าง ซ้ำ 7 ครั้ง ในวันเดียวกัน คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) ต้องไม่เกินร้อยละ 3

Intermediate precision: between days

วิเคราะห์ปริมาณสารทั้ง 3 ชนิดในตัวอย่าง ซ้ำ เป็นเวลา 5 วัน ประเมินความแตกต่างของผลวิเคราะห์ทั้ง 5 วัน ด้วยสถิติ ANOVA ค่า p-value ต้องมากกว่า 0.05

Intermediate precision: between analysts

นักวิเคราะห์จำนวน 3 คน วิเคราะห์ปริมาณสารทั้ง 3 ชนิดในตัวอย่าง ประเมินความแตกต่างของผลวิเคราะห์ของนักวิเคราะห์ทั้ง 3 คน ด้วยสถิติ ANOVA ค่า p-value ต้องมากกว่า 0.05

การทดสอบร้อยละของการคืนกลับ (Percent recovery)

วิเคราะห์ปริมาณสารทั้ง 3 ชนิดในตัวอย่าง spiked sample คำนวณร้อยละของการคืนกลับ (percent recovery) ต้องอยู่ในช่วงร้อยละ 95-105

การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

คำนวณค่าประมาณของ LOD จากการสร้างกราฟมาตรฐาน ดังนี้

$$\text{LOD (mg/mL)} = 3 \times \text{standard error} / \text{slope}$$

$$\text{LOD (\%w/w), estimated} = \frac{\text{LOD (mg/mL)} \times \text{ปริมาตรที่เตรียม (mL)} \times \text{ระดับเจือจาง} \times 100\%}{1000 \times \text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)}}$$

เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมและสารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด ให้มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับค่าประมาณของ LOD แล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC สัญญาณจากเครื่องตรวจวัดจะต้องสังเกตเห็นได้

การทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

คำนวณค่าประมาณของ LOQ จากการสร้างกราฟมาตรฐาน ดังนี้

$$\text{LOQ (mg/mL)} = 10 \times \text{standard error} / \text{slope}$$

$$\text{LOQ (\%w/w), estimated} = \frac{\text{LOQ (mg/mL)} \times \text{ปริมาตรที่เตรียม (mL)} \times \text{ระดับเจือจาง} \times 100\%}{1000 \times \text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)}}$$

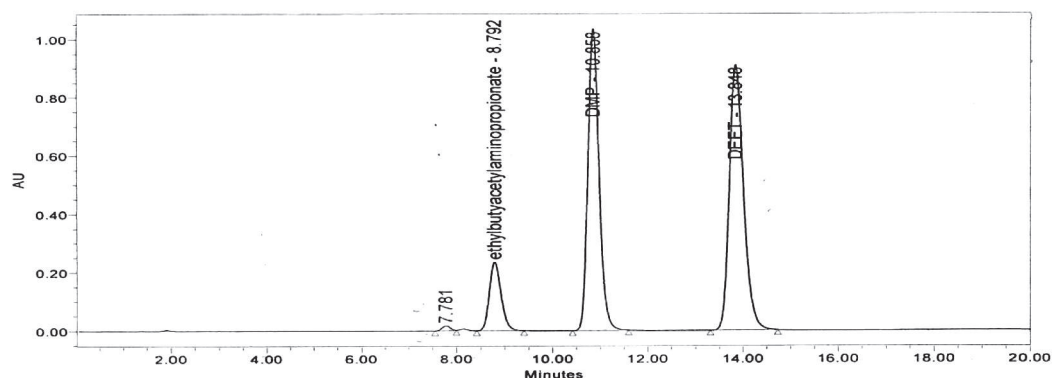
เตรียมสารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด ให้มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับค่าประมาณของ LOQ แล้วตรวจวิเคราะห์ปริมาณ ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET ในตัวอย่าง โดยวิเคราะห์ซ้ำ 7 ครั้ง คำนวณค่า % RSD ต้องไม่เกิน 3 และค่าร้อยละของการคืนกลับ ต้องอยู่ในช่วงร้อยละ 95 - 105

ค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Measurement uncertainty)⁽¹³⁾

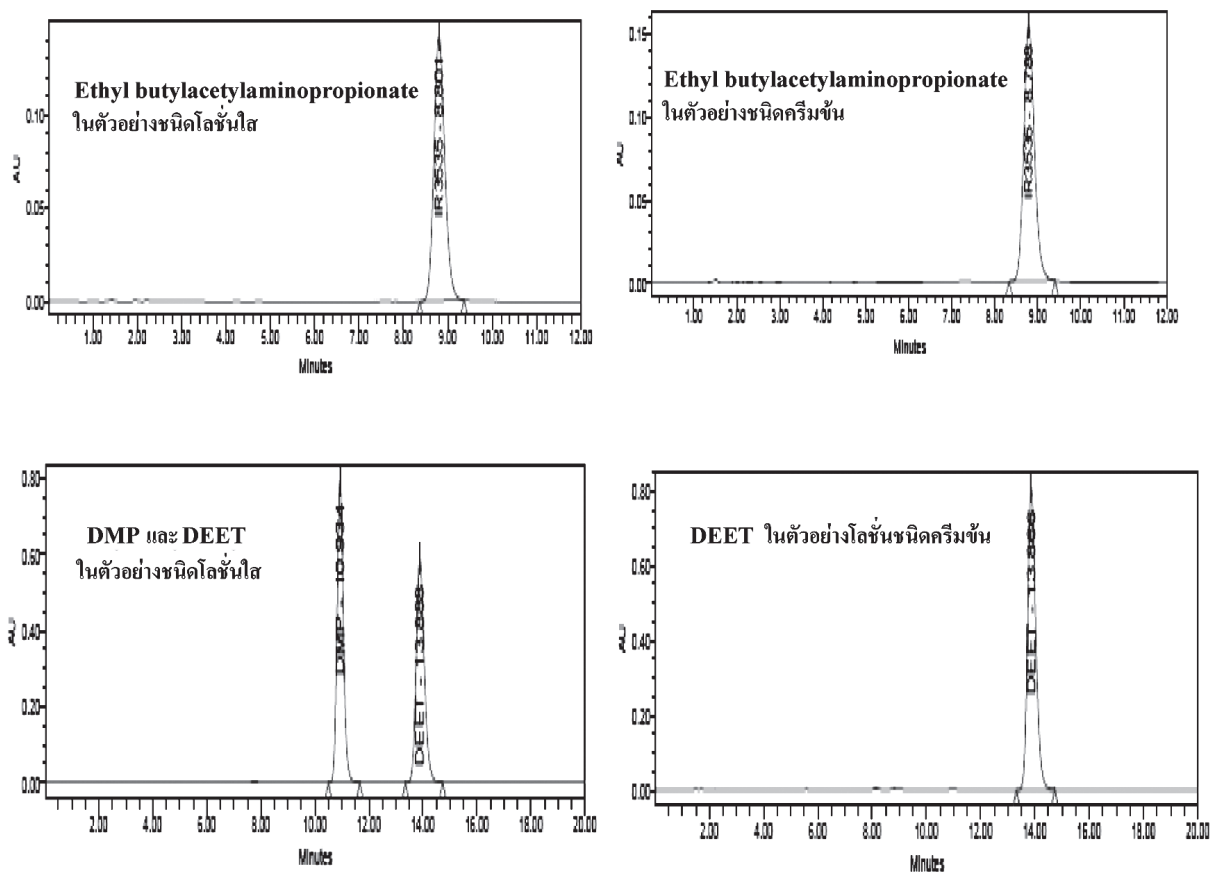
แหล่งที่มาของความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ปริมาณ ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET ในตัวอย่าง โดยวิธี HPLC เช่น ความไม่แน่นอนจากความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน การสอบเทียบเครื่องชั่ง เครื่องแก้วที่ใช้เตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง ความเข้มข้นของสารทั้ง 3 ชนิดในสารละลายตัวอย่างที่อ่านได้จากเครื่อง HPLC การวิเคราะห์ซ้ำ (precision) และจากค่าร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) ของการทดสอบความถูกต้องของวิธีนำมาคำนวณค่าความไม่แน่นอนรวม (combined uncertainty, u_c) แล้วคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยาย (expanded uncertainty, U) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ค่า coverage factor (k) เท่ากับ 2

ผล**การทดสอบความจำเพาะเจาะจง**

จากการฉีดสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างชนิดไลชั่นไฮและครีมข้น พบว่า ภายใตสภาวะของเครื่อง HPLC สามารถแยกสาร ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET ออกจากกันได้และไม่มีมารบกวนของสารอื่นในตัวอย่าง โดยมีค่า retention time เท่ากับ 8.86, 11.6 และ 14.2 นาที ตามลำดับ (ภาพที่ 2 และ 3)



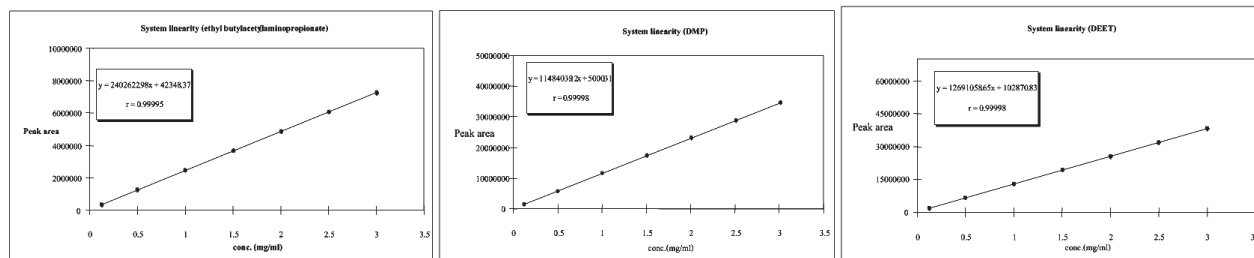
ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET



ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมของ ethyl butylacetylaminopropionate DMP และ DEET ในตัวอย่าง

ความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์

ความเป็นเส้นตรงของระบบ จากกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานและพื้นที่ใต้พีค พบว่าความเข้มข้นของสาร ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET ในช่วงความเข้มข้น 0.1 – 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับพื้นที่ใต้พีค โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.99995, 0.99998 และ 0.99998 ตามลำดับ (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 ความสัมพันธ์ความเป็นเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET และพื้นที่ใต้พีค

การทดสอบความเที่ยง

จากการวิเคราะห์ปริมาณ ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET ซ้ำในวันเดียวกัน ได้ค่า % RSD ในตัวอย่างชนิดโลชั่นสีเท่ากับร้อยละ 0.12, 0.04 และ 0.03 ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างชนิดครีมชั้นได้ค่า % RSD ของผลการวิเคราะห์ ethyl butylacetylaminopropionate, และ DEET เท่ากับร้อยละ 0.06 และ 0.19 ตามลำดับ และพบว่าไม่มีความแตกต่างของผลวิเคราะห์จากการวิเคราะห์ซ้ำ 5 วัน โดยการเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET ในตัวอย่างชนิดโลชั่นสี ให้ค่า p-value เท่ากับ 0.80, 0.06 และ 0.13 ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างชนิดครีมชั้นค่า p-value ของการเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ ethyl butylacetylaminopropionate และ DEET เท่ากับ 0.35 และ 0.996 ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าไม่มีความแตกต่างของผลวิเคราะห์ที่ได้จากนักวิเคราะห์ 3 คนโดยผลวิเคราะห์ ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET ในตัวอย่างชนิดโลชั่นสี มีค่า p-value เท่ากับ 0.22, 0.40 และ 0.92 ตามลำดับ และผลวิเคราะห์ DEET ในตัวอย่างชนิดครีมชั้นมีค่า p-value เท่ากับ 0.18 (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์สาร ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET

สารไล่แมลง	ตัวอย่าง	การวิเคราะห์ซ้ำ		
		ในวันเดียวกัน % RSD, n=7	ระหว่าง 5 วัน p-value	ระหว่าง นักวิเคราะห์ 3 คน p-value
ethyl butylacetylaminopropionate	ชนิดโลชั่นสี	0.12	0.80	0.22
	ชนิดครีมชั้น	0.06	0.35	–
DMP	ชนิดโลชั่นสี	0.04	0.06	0.40
	ชนิดครีมชั้น	–	–	–
DEET	ชนิดโลชั่นสี	0.03	0.13	0.92
	ชนิดครีมชั้น	0.19	0.996	0.18

การทดสอบร้อยละของการคืนกลับ

จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง spiked sample ชนิดโลชั่นใสและครีมชั้น พบว่า ร้อยละของการคืนกลับของสาร ethyl butylacetylaminopropionate อยู่ในช่วงร้อยละ 99.7–103.5 และ 102.2–104.6 , ร้อยละของการคืนกลับของสาร DMP อยู่ในช่วงร้อยละ 94.6–98.1 และ 96.2–98.9 และร้อยละของการคืนกลับของ DEET อยู่ในช่วงร้อยละ 97.6–99.3 และ 98.4–101.6 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ร้อยละของการคืนกลับ (percent recovery) ของวิธีวิเคราะห์สาร ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET

สารไล่แมลง	ตัวอย่าง	% recovery	% RSD
ethyl butylacetylaminopropionate	ชนิดโลชั่นใส	99.7–103.5	1.27
	ชนิดครีมชั้น	102.2–104.6	0.82
DMP	ชนิดโลชั่นใส	94.6–98.1	1.15
	ชนิดครีมชั้น	96.2–98.9	0.86
DEET	ชนิดโลชั่นใส	97.5–99.3	0.50
	ชนิดครีมชั้น	98.4–101.6	1.02

ขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ

พบว่า LOD ของการวิเคราะห์ ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET เท่ากับ ร้อยละ 0.08, 0.05 และ 0.05 โดยน้ำหนัก ค่า LOQ เท่ากับ ร้อยละ 0.30, 0.20 และ 0.20 โดยน้ำหนัก โดยมีค่า %RSD เท่ากับ ร้อยละ 1.66, 1.76, 1.5 และร้อยละของการคืนกลับ อยู่ในช่วงร้อยละ 95.6–101.2, 95.4–98.5 และ 97.2–104.6 ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ร้อยละของการคืนกลับ (percent recovery) และ %RSD ของวิธีวิเคราะห์สาร ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET ที่ระดับ LOQ

สารไล่แมลง	ตัวอย่าง	ปริมาณที่เติม (%w/w)	% recovery	% RSD
ethyl butylacetylaminopropionate	ชนิดโลชั่นใส	0.3	96.5–101.2	0.78
	ชนิดครีมชั้น	0.3	95.6–98.2	1.66
DMP	ชนิดโลชั่นใส	0.2	95.4–98.5	1.76
	ชนิดครีมชั้น	–	–	–
DEET	ชนิดโลชั่นใส	0.2	97.2–104.6	1.51
	ชนิดครีมชั้น	0.2	102.1–104.4	1.43

ค่าความไม่แน่นอนของการวัด

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของวิธีวิเคราะห์ ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และค่า k เท่ากับ 2 พบว่า ในตัวอย่างชนิดโลชั่นโลชั่นโลชั่นค่าความไม่แน่นอนขยายสัมพัทธ์ (relative expanded uncertainty) เท่ากับ 0.027, 0.041 และ 0.024 ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างชนิดครีมชั้นค่าความไม่แน่นอนขยายสัมพัทธ์สำหรับผลวิเคราะห์ ethyl butylacetylaminopropionate และ DEET เท่ากับ 0.025 และ 0.024 ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET ในตัวอย่าง

สารไล่แมลง	ตัวอย่างชนิดโลชั่นใส			ตัวอย่างชนิดครีมข้น		
	ปริมาณ	relative	expanded	ปริมาณสาร	relative	expanded
	สารไล่แมลง	expanded	uncertainty	สารไล่แมลง	expanded	uncertainty
	(% w/w)	uncertainty k=2	(% w/w)	(% w/w)	uncertainty k=2	(% w/w)
ethyl butylacetylaminopropionate	12.10	0.0268	0.32	11.94	0.0248	0.30
DMP	30.08	0.0412	1.24	-	-	-
DEET	25.43	0.0242	0.61	14.65	0.0242	0.35

วิจารณ์

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารไล่แมลง ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET โดยวิธี HPLC ในระบบ reversed phase ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ สามารถแยกสารทั้ง 3 ชนิดออกจากกันโดยไม่ถูกรบกวนจากสารอื่นในตัวอย่างและสามารถตรวจวิเคราะห์สารทั้ง 3 ชนิดนี้ได้พร้อมกัน ในการวิเคราะห์คร่าวเดียว เป็นการประหยัดเวลา ค่าใช้จ่ายและลดปริมาณการใช้สารเคมี ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจวิเคราะห์โดยวิธี Gas chromatography โดยเลือกใช้ capillary column ชนิด HP-5 หรือ HP-50 +⁽¹¹⁾ พบว่า วิธี GC ไม่สามารถแยกแยะระหว่างพีคของ ethyl butylacetylaminopropionate กับ DEET และไม่สามารถ ตรวจเอกลักษณ์สารที่กำลังวิเคราะห์ว่าเป็น ethyl butylacetylaminopropionate หรือ DEET ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่มี การใส่สาร 2 ชนิดนี้ร่วมกัน หรือการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ระบุสารสำคัญ การเลือกใช้วิธี HPLC ในระบบ reversed phase ในการตรวจวิเคราะห์จึงเหมาะสมกว่า

สรุป

วิธีตรวจวิเคราะห์สาร ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET ในผลิตภัณฑ์ทาโลแมลง โดยวิธี HPLC ในระบบ reversed phase ที่ได้พัฒนาขึ้น มีการทดสอบความถูกต้องของวิธีในคุณสมบัติต่าง ๆ ซึ่งผ่านเกณฑ์ที่กำหนดทั้งหมด และสามารถวิเคราะห์พร้อมกันในคราวเดียว ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธี พบว่าความเข้มข้นในช่วง 0.1 - 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) มากกว่า 0.999 การวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกันให้ค่า % RSD น้อยกว่า 1 ส่วนการวิเคราะห์ซ้ำระหว่างวัน และการวิเคราะห์โดยเปลี่ยนนักวิเคราะห์ให้ค่า p-value มากกว่า 0.05 ค่าร้อยละของการคืนกลับ อยู่ในช่วงร้อยละ 95 - 105 ซึ่งสามารถวิเคราะห์หาปริมาณ

ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET ได้ตั้งแต้อยู่ 0.3, 0.2 และ 0.2 โดยน้ำหนักตามลำดับ ความไม่แน่นอนขยายสัมพัทธ์ (relative expanded uncertainty) ของผลการวิเคราะห์ น้อยกว่า 0.05 และสามารถวิเคราะห์พร้อมกันในคราวเดียวโดยมีค่า retention time เท่ากับ 8.86, 11.6 และ 14.2 นาที ตามลำดับ ดังนั้นจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับตรวจวิเคราะห์สาร ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET ที่อยู่ในผลิตภัณฑ์เดียวกัน และได้จัดทำเป็นคู่มือปฏิบัติการสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการเพื่อให้บริการตรวจวิเคราะห์และการเฝ้าระวังคุณภาพผลิตภัณฑ์ทางกฎหมาย

เอกสารอ้างอิง

1. Mosquito prevention & control (deet information). [online]. 2015; [cited 2015 Apr 29]; [3 screens]. Available from: URL: <http://www.brevardcounty.us/MosquitoControl/Prevention>.
2. Insect-repellent. [online]. [cited 2015 Apr 29]; [6 screens]. Available from: URL: <http://en.wikipedia.org/wiki/Insect-repellent>.
3. U.S. Food and Drug Administration. Insect repellent use and safety in children. [online]. [cited 2015 Apr 29]; [3 screens]. Available from: URL: <http://www.fda.gov/Drugs/EmergencyPreparedness/ucm085277.htm>.
4. ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง การแสดงฉลากของผลิตภัณฑ์ไล่แมลงประเภทสำเร็จรูปที่ประกอบด้วย DEET หรือ Dimethyl phthalate หรือ Diethyl phthalate หรือ Dibutyl phthalate หรือ Ethohexadiol หรือสารเหล่านี้ผสมกัน. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 112 ตอนที่ 93 ง (วันที่ 21 พฤศจิกายน 2538).
5. สารทากันยุง (Repellents). [ออนไลน์]. [สืบค้น 29 เม.ย. 2558]; [3 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL: <http://www.wongkarnpat.com/viewya.php?id=834>.
6. Sigma-Aldrich. Dimethyl Phthalate, standard for GC. [ออนไลน์]. 2547; [สืบค้น 29 เม.ย. 2558]; [7 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL: <http://www.chemtrack.org/MSDSSG/Trf/msdst/msdst131-11-3.html>.
7. Sigma-Aldrich. N,N-Diethyl-M-Toluamide, 97%. [ออนไลน์]. 2547; [สืบค้น 29 เม.ย. 2558]; [6 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL: <http://www.chemtrack.org/MSDSSG/Trf/msdst/msdst134-62-3.html>.
8. พระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 109 ตอนที่ 39 (วันที่ 6 เมษายน 2535).
9. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2555 เรื่อง กำหนดเกณฑ์ค่าตลาดเคลื่อนจากปริมาณที่กำหนดไว้ของสารสำคัญในวัตถุอันตรายที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาได้รับผิดชอบ. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 129 ตอนที่พิเศษ 107 ง (วันที่ 6 กรกฎาคม 2555).
10. ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง การแสดงฉลากของผลิตภัณฑ์ไล่แมลงประเภทสำเร็จรูป ที่ประกอบด้วย Ethyl butylacetylaminopropionate. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 119 ตอนที่ 45 ง (วันที่ 4 มิถุนายน 2545).
11. SOP 06-02-050 การตรวจวิเคราะห์ diethyltoluamide โดยวิธี GC.นนทบุรี : สำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2541.
12. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
13. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. แนวปฏิบัติการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดทางเคมี. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2550.

Simultaneous Determination of Insect Repellent by HPLC

Wongduan Nakniyom

Bureau of Cosmetics and Hazardous Substances, Department of Medical Sciences, Tiwanon Road, Nonthaburi, 11000 Thailand.

ABSTRACT Determination of ethyl butylacetylaminopropionate, dimethyl phthalate (DMP) and N, N-diethyl-m-toluamide (DEET) in insect repellent products was developed to analyse simultaneously by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) technique. The separation was achieved on a XTerra RP C8, 5 μ m, 4.6 mm $\times$ 150 mm column. Mixture of acetonitrile and water (25:75 v/v) was used as a mobile phase at flow rate of 1.0 mL per minute and with UV detection at 220 nm. Under the HPLC conditions, ethyl butylacetylaminopropionate, DMP and DEET were simultaneous separated without interference of other peaks with the retention time of 8.86, 11.6 and 14.2 minutes, respectively. The method validation was performed in samples of light lotion and cream. The validation showed the linear relationship between their concentration and peak area cover the range of 0.1 – 3 mg/mL with correlation coefficient (r) of 0.99995, 0.99998 and 0.99998 for ethyl butylacetylaminopropionate, DMP and DEET respectively. Repeatability was tested by replicate analysis of ethyl butylacetylaminopropionate, DMP and DEET in lotion and cream samples % RSD of three substances in both sample matrices were in the range 0.06 – 0.12%, 0.04% and 0.03 – 0.19%. There is no different of the results analysed for five days with p-value of 0.35 – 0.80, 0.06 and 0.13 – 0.996, respectively. Test results from different analyst were not different with p-value in the range of 0.22, 0.40 and 0.18 – 0.92. Analysis of spiked samples showed percent recovery of 99.7 – 104.6%, 94.6 – 98.9 and 97.5 – 101.6%, respectively. Limit of detection (LOD) is 0.08%w/w, 0.05%w/w and 0.05%w/w, respectively. Limit of quantitation (LOQ) is 0.30 %w/w, 0.20%w/w and 0.20%w/w, respectively. The relative expanded uncertainty are 0.027, 0.041 and 0.024, respectively. The developed methods with acceptable validation results could be routinely used to analyse the ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET in insect repellent samples.

Key Words : insect repellent, DEET, DMP, ethyl butylacetylaminopropionate