คำนำ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบเป็นข้อกำหนดตามมาตรฐาน ISO IEC 17025 : 2005 สำหรับห้องปฏิบัติการทดสอบที่ต้องการขอการรับรองความสามารถสำหรับวิธีทดสอบนั้น ๆ โดยจะต้องมีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบตามข้อกำหนดต่าง ๆ ก่อนนำไปใช้เป็นวิธีทดสอบมาตรฐานของห้องปฏิบัติการต่อไป สำหรับห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรได้รับการรับรองความสามารถในรายการทดสอบสารพิษกลุ่มออร์กาโนคลอรีนในน้ำโดยวิธี Gas Chromatography เมื่อวันที่ 3 ตุลาคม 2549 และมีนโยบายในการขยายขอบข่ายของวิธีทดสอบสำหรับขอการรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการเพิ่มทุก ๆ ปี ทั้งนี้เพื่อให้ครอบคลุมรายการทดสอบให้มากที่สุดและทันต่อนวัตกรรมการผลิตสารพิษตัวใหม่ ๆ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารพิษกลุ่มไพรีทรอดย์ในน้ำโดยใช้ Gas Chromatograph จึงเป็นการพิสูจน์วิธีการทดสอบที่ใช้ว่ามีความถูกต้อง แม่นยำ น่าเชื่อถือ สามารถสอบกลับได้และเหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการทดสอบ โดยจัดทำเป็นรายงานการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบตามข้อกำหนดมาตรฐาน ISO/IEC 17025 สำหรับขยายขอบข่ายยื่นขอการรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่องแก้ว
   - 1.1 เครื่องแก้วที่ใช้ในการสกัดได้แก่ separatory funnel พร้อมฝาจุกแก้ว/Teflon, beaker, cylinder, Erlenmeyer flask, round bottom flask, graduated tube, glass vial for Auto sampler, disposable pasture pipette และ glass funnel
   - 1.2 เครื่องแก้วที่ใช้เตรียมสารละลายของสารมาตรฐาน และ calibration curve ได้แก่ volumetric pipette class A, volumetric flask class A
2. เคมีภัณฑ์ชนิดต่าง ๆ
   - 2.1 สารเคมีชนิด analytical grade (AR) สำหรับใช้ในการสกัดตัวอย่าง ได้แก่
     - 2.1.1 hexane ยี่ห้อ J.T. Baker
     - 2.1.2 anhydrous sodium sulfate (anh. Na_2SO_4) ยี่ห้อ J.T.Baker ก่อนใช้นำไปเผาที่อุณหภูมิ 450 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง นำมาใส่ใน dessicator ทิ้งไว้ไม่น้อยกว่า 6 ชั่วโมง ให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง
   - 2.2 สารเคมีชนิด pesticide grade (PR) สำหรับใช้เตรียมสารละลายของสารมาตรฐานและปรับปริมาตรของตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องGas Chromatograph ได้แก่ iso octane และ hexane
   - 2.3 สารพิษมาตรฐานกลุ่มไพรีทรอยด์ pesticide grade ของ Dr. Ehrenstofer จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ bifenthrin, cyfluthrin, cypermethrin, deltamethrin, fenvalerate, lambda cyhalothrin และ permethrin

3. วัสดุและเครื่องมือวิทยาศาสตร์ได้แก่ aluminum foil, filter paper No. 1 จุกยาง น้ำจากเขื่อนศรีนครินทร์สำหรับใช้เป็น sample blank เครื่องชั่งละเอียด 5 ตำแหน่ง เครื่องสกัดวัตถุมีพิษชนิด separatory funnel shaker เครื่องลดปริมาตรชนิด rotary evaporator เครื่องลดปริมาตรชนิด nitrogen evaporator ตู้อบสารเคมี (digital oven) เตาเผาอุณหภูมิสูง (muffle furnace) เครื่องทำสุญญากาศ (vacuum pump) ตู้ดูดความชื้น (desiccator) เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) เครื่อง Gas Chromatograph (GC) ของบริษัท Agilent Technology รุ่น HP 6890 พร้อมหัวตรวจวัดชนิด Electron Capture Detector (ECD)

วิธีการ

1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน เพื่อทำ calibration curve

1.1 เตรียม stock standard solution ของสารพิษกลุ่มไพรีทรอยด์ 7 ชนิด ชั่งสารพิษกลุ่มไพรีทรอยด์ แต่ละชนิดให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน อยู่ในช่วงประมาณ 10 มิลลิกรัม ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เติม iso-octane (PR) เพื่อละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน จะได้ stock standard solution (sss) ที่มีความเข้มข้นประมาณ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.2 เตรียม intermediate standard solution ใช้ pipette ดูด stock standard solution แต่ละชนิด ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย hexane (PR) เขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จะได้ intermediate standard solution ของสารมาตรฐานแต่ละชนิดมีความเข้มข้นประมาณ 50 - 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.3 เตรียม working standard solution ใช้ pipette ดูดสารละลาย intermediate standard solution ของสารมาตรฐานแต่ละชนิด ใส่รวมใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ใบเดียวกัน ปรับปริมาตรด้วย hexane (PR) เขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จะได้ mixed working standard solution ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วงประมาณ 0.02 – 6.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. เตรียม fortified sample, sample blank และ reagent blank โดยตวงน้ำปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ใส่ใน separatory funnel ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ใช้ pipette ดูดสารละลายของสารมาตรฐานผสมในช่วง working standard solution ความเข้มข้นขึ้นอยู่กับช่วงที่จะประเมินผลการทดสอบ ใส่ลงไปแล้วหมุนวนให้สารละลายของสารมาตรฐานผสมกับน้ำเป็นเนื้อเดียวกันตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เตรียม sample blank เหมือนกับการเตรียม fortified sample แต่จะไม่เติมสารละลายของสารมาตรฐานลงในตัวอย่างน้ำที่ทดสอบ และเตรียม reagent blank จะใช้สารเคมีที่ใช้สกัดในปริมาตรเท่ากับที่ใช้ในการทดสอบเท่านั้น แล้วทำตามขั้นตอนของวิธีการสกัดตัวอย่าง

3. เตรียมเครื่อง Gas Chromatograph ควบคุมสภาวะการทำงานของเครื่องดังนี้

mode : splitless

GC column : column DB 1 capillary, 30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness

temperature : injector = 230 °C, detector = 300 °C

oven program : 100 °C (1 min) $\xrightarrow{20\,^{\circ}C/min}$ 225 °C (2 min) $\xrightarrow{1\,^{\circ}C/min}$ 230 °C (3 min) $\xrightarrow{7\,^{\circ}C/min}$ 250 °C (5 min) $\xrightarrow{20\,^{\circ}C/min}$ 260 °C (8 min) $\xrightarrow{20\,^{\circ}C/min}$ 280 °C (2 min)

carrier gas : helium flow 1.4 ml/min

make up gas : nitrogen flow 60 ml/min

injection volume : 1 µl

4. วิธีการสกัดตัวอย่าง

ตวงน้ำ 1,000 มิลลิลิตร ใส่ใน separatory funnel เติม hexane (AR) 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าโดยใช้ separatory funnel shaker นาน 3 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ไขชั้นล่างซึ่งเป็นชั้นน้ำเก็บไว้ใน Erlenmeyer flask ชั้นบนเป็นชั้นของ hexane กรองผ่าน anh. Na_2SO_4 ที่บรรจุใน funnel รองด้วยกระดาษกรอง ลงใน round bottom flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เทน้ำจาก Erlenmeyer flask ใส่ใน separatory funnel ใบเดิม เติม hexane (AR) 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าโดยใช้ separatory funnel shaker นาน 3 นาที ตั้งไว้ให้แยกชั้น ไขชั้นน้ำเก็บไว้ใน Erlenmeyer flask ใบเดิม ชั้นบนกรองผ่าน anh. Na_2SO_4 เก็บรวมกับครั้งแรก ทำการสกัดซ้ำอีกครั้งด้วย hexane (AR) 50 มิลลิลิตร และเก็บสารละลายชั้นบนรวมกัน เมื่อกรองเสร็จแล้วกลั้ว (rinse) separatory funnel ด้วย hexane (AR) ประมาณ 10 มิลลิลิตร 2 ครั้ง นำไปลดปริมาตรโดยใช้ rotary evaporator จนเกือบแห้ง ล้าง (rinse) round bottom flask ด้วย hexane (PR) ครั้งละประมาณ 2 - 3 มิลลิลิตร เขย่าด้วย vortex mixer ให้ทั่ว ใช้ pasteur pipette ดูด hexane จากการ rinse แต่ละครั้ง เก็บใน graduated tube ขนาด 12 หรือ 15 มิลลิลิตร ลดปริมาตรด้วย nitrogen evaporator และปรับปริมาตรให้ได้ 1 มิลลิลิตร นำไป inject ด้วยเครื่อง GC หัวตรวจวัดชนิด Electron Capture Detector (ECD)

5. การทดสอบและประเมินจากการวิเคราะห์ค่าต่าง ๆ

5.1 ตรวจสอบช่วงความเข้มข้น/ปริมาณของสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ (range) และตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่าง response กับความเข้มข้น/ปริมาณของสารที่วิธีทดสอบสามารถจะตรวจวิเคราะห์ที่ให้ค่าเป็นสมการเส้นตรงได้ (linearity)

5.1.1 การหา range

ทดสอบ reagent blank และ fortified sample 7 ความเข้มข้น ๆ ละ 1 ซ้ำ ทำการสกัดตัวอย่างตามวิธีการสกัดในข้อ 4 นำค่าที่ได้ไป plot graph ระหว่างความเข้มข้นของ fortified sample (แกน X) กับ response (แกน Y) พิจารณายอมรับค่าความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงที่เป็นเส้นตรง

5.1.2 การหา linearity

ทดสอบ reagent blank และ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้นภายใน range ของการทดสอบ 6 ความเข้มข้น ๆ ละ 3 ซ้ำ ทำการสกัดตัวอย่างตามวิธีการสกัดในข้อ 4 นำค่าที่ได้ไป plot graph ระหว่างความเข้มข้นของ fortified sample (แกน X) กับ response (แกน Y) คำนวณหา correlation coefficient (r), เกณฑ์การยอมรับ correlation coefficient ; $r \geq 0.995$

5.2 ประเมินค่าความใกล้เคียงกันระหว่างผลการวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีที่ศึกษากับค่าอ้างอิงจากตัวอย่าง (accuracy) ทดสอบ reagent blank, sample blank และ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้นภายในช่วงการทดสอบ 3 ระดับความเข้มข้น (low, medium, high) ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ทำการสกัดตามวิธีการในข้อ 4 หาค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบที่ลบค่า reagent blank ของ sample blank (X_1) และ fortified sample (X_2) นำไปประเมิน accuracy จากคำนวณค่าเปอร์เซนต์ recovery โดยใช้สูตรดังนี้

$$\% \text{ recovery} = \frac{X_2 - X_1}{C} \times 100$$

โดยที่ C = ปริมาณสารมาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่างมีหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (µg/ml)

กำหนดเกณฑ์การยอมรับเปอร์เซนต์ recovery โดยใช้เกณฑ์กำหนดของ AOAC peer-Verified Method Nov.1993 ที่ความเข้มข้นของ analyst ในตัวอย่าง 1 ไมโครกรัมต่อลิตร มีค่าอยู่ในช่วง 40 -120 เปอร์เซนต์

5.3 ประเมินค่าความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ (precision) ทดสอบ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้นภายในช่วงการทดสอบ 3 ระดับความความเข้มข้น (low, medium, high) ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ หาค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบ $(\overline{X})$ และ SD ของผลการทดสอบ คำนวณ % RSD

จากสูตร $\% \text{ RSD} = \frac{SD}{\overline{X}} \times 100$

กำหนดเกณฑ์การยอมรับเปอร์เซนต์ RSD โดยใช้เกณฑ์กำหนดของ AOAC peer-Verified Method Nov.1993 มีค่าไม่เกิน 20 เปอร์เซนต์ ถ้าเปอร์เซนต์ RSD ไม่อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด สามารถประเมิน precision โดยใช้ HORRAT (Horwitz ' s ratio) จากสูตร

$$\text{HORRAT (Horwitz ' s ratio)} = \frac{\% \text{ RSD จากการทดลอง}}{\text{Predicted Horwitz RSD}}$$

Predicted Horwitz RSD คำนวณได้จาก Horwitz equation แบบ Repeatability (RSD_r)

$$RSD_r = 0.66 \times 2^{(1 - 0.5 \log C)}$$

โดยที่ C = Concentration ratio

กำหนดเกณฑ์การยอมรับตาม AOAC ค่า HORRAT (Horwitz ' s ratio) < 2

5.4 หาค่าความเข้มข้น/ปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of Detection, LOD)

ทดสอบ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้นภายในช่วงการทดสอบ 4 ระดับความเข้มข้น ๆ ละ 10 ซ้ำ คำนวณค่า SD ของผลการทดสอบแต่ละความเข้มข้น plot graph ระหว่างความเข้มข้น (แกน X) กับ SD (แกน Y) หาค่า So โดย extrapolate เส้นกราฟมาตัดแกน Y จะได้ LOD เท่ากับ 3So

5.5 หาค่าความเข้มข้น/ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้อย่างถูกต้อง โดยมี accuracy และ precision ตามที่กำหนด (Limit of Quantitation, LOQ) คำนวณค่า predicted LOQ จากข้อ 5.4 โดย LOQ เท่ากับ 10So และเตรียม fortified sample ที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า predicted LOQ (10So) ทดสอบfortified sample 10 ซ้ำ คำนวณค่า accuracy และ precision ต้องผ่านการประเมิน