รายงานผลเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2555

1. ชุดโครงการ วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

2. โครงการวิจัย การพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์พืชและปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

กิจกรรมที่ 1 พัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ย พืช ดิน น้ำ สารอินทรีย์ สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช สารสกัด และวัตถุอันตรายทางการเกษตร

กิจกรรมย่อยที่ 1.2 พัฒนาเทคนิคระบบการตรวจวิเคราะห์และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์พืช

3. ชื่อการทดลอง(ภาษาไทย) ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์IAAในพืช

ชื่อการทดลอง(ภาษาอังกฤษ) Method Validation of IAA in Plant

4. คณะผู้ดำเนินงาน

ชื่อหัวหน้าโครงการ	นางจิติมา ยถาภูธานนท์	สำนักวิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ชื่อหัวหน้าการทดลอง	นางสาวนันทกานต์ ขุนโหร	สำนักวิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ผู้ร่วมงาน	นายมนต์ชัย อินทร์ท่าอิฐ	สำนักวิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นายจุลศักดิ์ บุญรัตน์	สำนักวิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์IAAในพืช เพื่อห้องปฏิบัติการใช้วิธีที่เป็นไปตามมาตรฐานสากล โดยห้องปฏิบัติการกรมวิชาการเกษตร กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี ปี 2555 จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ IAAในพืช โดยเครื่องHPLC พบว่า ค่า LOD และ LOQ มีค่า 0.017 และ 0.029 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ค่า Range คือช่วงที่เป็นเส้นตรง เท่ากับ 0.05-0.9มิลลิกรัมต่อลิตร การตรวจสอบ Linearity ได้ค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.9998 Accuracy อยู่ในช่วง 80-110 Precision มีค่า HORRAT 1.89 < 2 อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ทั้งสิ้น ดังนั้นวิธีวิเคราะห์IAAในพืชดังกล่าวสามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์มาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการต่อไป

6. คำนำ

การเจริญเติบโตของพืชถูกควบคุมโดยปัจจัยภายนอกและภายใน ปัจจัยภายนอกได้แก่สิ่งแวดล้อมต่างๆ เช่น แสง น้ำ ปริมาณธาตุอาหารในดิน สำหรับปัจจัยภายในมีทั้งพันธุกรรมและสารอินทรีย์ที่พืชสร้างขึ้นเพื่อควบคุมการเจริญเติบโตซึ่งเรียกว่า ฮอร์โมนพืช (Plant Hormone) โดยฮอร์โมนพืชจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของพืชอย่างเด่นชัดแม้จะมีความเข้มข้นที่ระดับความเข้มข้นส่วนในล้านส่วน และมีความแตกต่างกันในแต่ละเนื้อเยื่อพืช

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนพืชในปัจจุบันมีหน่วยงานที่ทำการวิเคราะห์ไม่มากนักในขณะที่ยังมีความต้องการการบริการของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ฮอร์โมนพืชเพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลในงานวิจัยต่างๆ กลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยพืช วัตถุเคมีการเกษตรและนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตรเป็นหน่วยงานที่ให้บริการเชิงวิชาการจำเป็นต้องมีวิธีวิเคราะห์ที่เป็นมาตรฐาน ดังนั้นการวิเคราะห์ต้องมีการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพ คุณภาพและมาตรฐาน

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. เครื่องแก้วและวัสดุวิทยาศาสตร์
    - Volumetric flask สีชา ขนาด 10, 50, และ 100 มิลลิลิตร
    - Volumetric pipette ขนาด 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตร
    - บิกเกอร์ ขนาด 10, 250, และ 1,000 มิลลิลิตร
    - Nylon membrane 0.45 ไมโครลิตร
    - Syringe filter
    - Syringe
    - Vial ขนาด 4 มิลลิลิตรสีชา
    - หลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร
    - หลอดหยด
    -
2. สารเคมี
    - Methanol HPLC grade
    - Methanol AR grade
    - Diethyl ether
    - Acetic acid

- Ammonium acetate
- Potassium dihydrogenphosphate
- Di-potassium hydrogenphosphate
- Polyvinylpolypyrolidon
- Indole acetic acid
- Nitrogen gas

3. วัสดุอ้างอิงมาตรฐาน
    - Indole acetic acid 99.0%
4. เครื่องมือวิทยาศาสตร์
    - เครื่องชั่งทศนิยม 5 ตำแหน่ง
    - High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) - Intelligent Fluorescence Detector
    - Ultrasonic bath
    - Filtration apparatus
    - Oven
    - เครื่องปั่นเหวี่ยง

- วิธีการ

ปรับสภาวะการทำงานของเครื่อง HPLC ดังนี้

- Column µBondapak 10 µm, C 18, 3.9x300 mm.
- Guard column µBondapak 5 µm C 18
- Temperature 35°C
- Fluorescence Detector λex 280 nm λem 350 nm
- Mobile phase 45 % MeOH/0.02 Ammonium acetate in acetic acid
- Flow rate 1.0 ml/min.
- Injection Volume 10 µl

เตรียมสารละลาย Mobile phase (45 % MeOH/0.02 M ammonium acetate in acetic acid)

- ชั่ง Ammonium acetate 1.5416 กรัม ใส่ในบิกเกอร์ ละลายด้วยน้ำกลั่น HPLC 900 มิลลิลิตร ลงใน Volumetric flask ขนาด 1000 มิลลิลิตร เติม Acetic acid 16.75 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น HPLC
- ตวง Methanol HPLC grade 450 มิลลิลิตร ลงใน Volumetric flask ขนาด 1000 มิลลิลิตร แล้วปรับด้วยสารละลายที่เตรียมข้างต้น

เตรียมสารละลาย Phosphase buffer

- ชั่ง Potassium dihydrogenphosphate 13.6 กรัม ใส่ในบิกเกอร์ ละลายด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง ลงใน Volumetric flask ขนาด 1000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง

- ชั่ง di-Potassium hydrogenphosphate 17.41 กรัม ใส่ในบิกเกอร์ละลายด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง ลงใน Volumetric flask ขนาด 1000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง
- นำสารละลาย Potassium dihydrogenphosphate ใส่ลงในบิกเกอร์ขนาด 2000 มิลลิลิตร เติมสารละลาย di-Potassium hydrogenphosphate ลงในสารละลาย Potassium dihydrogenphosphate จนกระทั่ง pH อยู่ที่ 6.2
- เก็บสารละลายที่ได้ในที่มืดและควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 4°C

การเตรียมตัวอย่างเพื่อสกัด IAA

- นำสารละลาย Technical grade ปริมาตรตามที่กำหนด ใส่ลงใน Phosphate buffer 15 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 25 °C
- นำสารละลายที่ได้ เติม Polyvinylpolypyrolidon ประมาณ 10 มิลลิกรัม เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบ/นาที นาน 10 นาที
- แยกสารละลายที่ได้ไปปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 2.5-3.0 ด้วย 4 M acetic acid แล้วจึงเติม diethyl ether ½ ส่วนของปริมาตรตัวอย่าง เขย่านาน 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที
- ดูดสารละลายส่วนบน เพื่อนำไประเหยแห้ง แล้วเติม diethyl ether ทำซ้ำอีกครั้งหนึ่ง นำสารละลายที่ได้ไประเหยภายใต้ก๊าซไนโตรเจนจนแห้ง แล้วจึงทำละลายด้วย Mobile phase ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
- กรองผ่าน Syringe filter 0.45 µm แล้วนำเข้าเครื่อง HPLC

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ IAA ในพืช

1. หา % ที่แน่นอนของสาร Technical grade ของ IAA

- ชั่งสารมาตรฐาน IAA 99.0 % w/w 20.20 มิลลิกรัม 2 ซ้ำ (S1,S2) ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย Methanol
- ปิเปตสารละลาย 5 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Methanol
- ปิเปตสารละลาย 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Mobile phase
- กรองผ่าน Syringe filter 0.45 µm แล้วนำเข้าเครื่อง HPLC
- ชั่งสาร Technical grade 98 % ประมาณ 20.xx กรัม (20 ซ้ำ TC1-TC20) จากนั้นทำเช่นเดียวกับสารมาตรฐาน
- ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ตามลำดับ S1,TC1,TC1,S2,TC2,TC2,S1,TC3,TC3,S2.....TC20

  คำนวณค่า Response factor (fi) ตามสูตร

$$fi = \frac{Hs}{S \times P}$$

fi = ค่า response factor ของสารมาตรฐาน

Hs= พื้นที่ใต้ peak ของ IAA ในสารมาตรฐาน

S = น้ำหนักของ IAA ในสารมาตรฐาน

P = ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน IAA 99.0 % w/w

- คำนวณ % Technical grade จากสูตร

$$\% \text{ Technical grade} = \frac{Hw}{f \times w}$$

Hw = พื้นที่ใต้ peak ของ IAA ในสารละลาย Technical grade

f = ค่าเฉลี่ย response factor

w = น้ำหนักของ IAA ในสารละลาย Technical grade

- นำค่า % Technical grade ที่ได้ ทั้ง 20 ค่า หาค่าเฉลี่ยจะได้เปอร์เซนต์ที่แน่นอน ของ Technical grade IAA

2. การหาค่าต่ำสุดของปริมาณที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of Detection:LOD) และค่าต่ำสุดของปริมาณที่สามารถตรวจหาปริมาณได้ (Limit of Quantitation:LOQ)

- ปิเปตสารละลาย Technical grade ที่ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ โดยที่ signal/noise $\geq$3 ลงใน Phosphate buffer และทำตามขั้นตอนการสกัด IAA ทำทั้งหมด 10 ซ้ำ
- นำผลที่ได้มาประเมิน ค่า LOD และ LOQ โดย

$$LOD = X + 3SD$$

$$LOQ = X + 10SD$$

X = ค่าเฉลี่ยปริมาณ IAA ของสารละลาย

3. การตรวจสอบช่วงการใช้งาน (Range)

- ปิเปตสารละลาย Technical grade ที่ความเข้มข้น 0.05 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 0.7 0.8 0.9 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปผ่านขั้นตอนการสกัด IAA
- Plot graph ระหว่างความเข้มข้นของสาร (x) กับ response (y)(พื้นที่ใต้ peak) พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง

4. ตรวจสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (linearity)

- เลือกความเข้มข้นจาก Range ที่เป็นเส้นตรง 6 ความเข้มข้น Plot graphระหว่างความเข้มข้นของสาร (x) กับ response (y)(พื้นที่ใต้ peak) พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง จากค่า Correlation Coefficient (r) $\geq$ 0.995

5. ตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy)

- ปิเปตสารละลาย Technical grade ที่ความเข้มข้น 0.1มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปผ่านขั้นตอนการสกัด IAA 10 ซ้ำ เป็น sample blank

- ปิเปตสารละลาย Technical grade ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ปิเปตสารละลายมาตรฐาน 0.1มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปผ่านขั้นตอนการสกัด IAA เป็น (spike sample)
- วัดด้วยเครื่อง HPLC-Fluorescence เพื่อนำมาประเมินค่า Accuracy โดยคำนวณจาก % recovery ดังสูตร % recovery = (X2-X1)/C x 100

  โดย X1 = spike sample

  X2 = sample blank

  C = Conc. Standard

6. ตรวจสอบความแม่นยำ (Precision)

   นำข้อมูลที่ได้จากการตรวจสอบความถูกต้อง มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย SD และ % RSD ซึ่งแสดงถึงความแม่นยำ (precision) ของวิธีวิเคราะห์หรือความใกล้เคียงกันของข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ ตัวอย่างการคำนวณ

$$\%RSD = \frac{SD \times 100}{Mean}$$

เกณฑ์ยอมรับ precision ของข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ HORRAT (Horwitz's Ratio) จากสูตร

$$\text{HORRAT (Horwitz's Ratio)} = \frac{\%\ \text{RSD Experiment}}{\text{Predicted Horwitz RSD}} \leq 2 \text{ (Horwitz et al, 1980)}$$

$$\text{Predicted Horwitz RSD} = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log c)}$$

C = Concentration

- เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2553 – เมษายน 2555 ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยพืช วัตถุเคมีการเกษตรและนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตร กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ IAA ในพืชโดยเครื่องHPLC ได้ผลวิเคราะห์ดังนี้ ปริมาณ IAA ของสาร Technical grad เมื่อเทียบกับสารเคมีมาตรฐานเท่ากับ 99.0 % ค่า LOD และ LOQ มีค่า 0.017 และ 0.029 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ค่า Range คือช่วงที่เป็นเส้นตรง เท่ากับ 0.05-0.9มิลลิกรัมต่อลิตร การตรวจสอบ Linearity ได้ค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.9998 % recovery ที่ spike สารมาตรฐาน

มีค่า 83.42 ซึ่งมีค่าที่ยอมรับได้อยู่ที่ 80-110 การประเมินความแม่นยำ (Precision) โดยใช้ HORRAT เท่ากับ 1.89 (ตารางที่1)

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์IAAในพืชโดยเครื่องHPLC มีค่า Accuracy อยู่ในช่วง 80-110 และค่า Precision มีค่า HORRAT ≤ 2 ซึ่งค่า Accuracy และ ค่า Precision อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ทั้งสิ้น ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ IAA ในพืชโดยเครื่องHPLC เป็นวิธีวิเคราะห์มาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการ แต่เนื่องจากในการทดสอบกับการตัวอย่างพืชคือมะม่วง ปริมาณ IAA ที่มีในแต่ละยอดมีปริมาณน้อยมาก หากห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยพืช วัตถุเคมีการเกษตรและนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตรจะทำการวิเคราะห์ จำเป็นต้องเก็บตัวอย่างพืชอย่างน้อย 15 ยอดต่อตัวอย่าง 1 ตัวอย่าง

10. การนำไปใช้ประโยชน์

ใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการวิเคราะห์วิจัยพืช วัตถุเคมีการเกษตรและนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตร

11. เอกสารอ้างอิง

จิตรา ชัยวิมล. 2545. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี. **เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการ “การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี”** กองเกษตรเคมี กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ

สุพิศสา ทองเขียวและคณะ. 2551. **การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเครราะห์ Indole acetic acid และ Indole butyric acid ในผลิตภัณฑ์สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช โดยใช้ HPLC**. ผลการปฏิบัติงานประจำปีงบประมาณ 2551 เล่มที่ ½ สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ

12. คำขอบคุณ

13. ภาคผนวก

ตารางที่ 1 แสดงผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

รายการตรวจสอบ	ผลการตรวจสอบ
LOD	0.017 $\mu g.ml^{-1}$
LOQ	0.029 $\mu g.ml^{-1}$
Range	0.05-0.9 $\mu g.ml^{-1}$

Correlation coefficient (Linearity)	0.9998 (≥ 0.995)
% Recovery (Accuracy)	83.42 % (80-110)
HORRAT (Precission)	1.89 (≤ 2) (ยอมรับ)