



มากกว่า 10% และวิธีนี้มีความจำเพาะเจาะจง (Specificity) ไม่มีการรบกวนของสารอื่น จากผลการทดสอบดังกล่าวพบว่า คุณลักษณะเฉพาะของวิธีเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ ดังนั้นวิธีที่พัฒนานี้จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

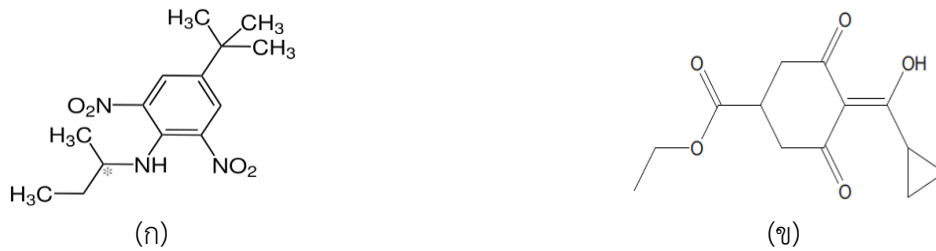
Method validation of butralin and trinexapac ethyl, the active ingredients in plant growth regulator were developed by High performance liquid chromatography with Photo Diode Array Detector (PDA). The result found that the working concentrations range and linearity of butralin were 25-250 mg/l and 25-500 mg/l, respectively. The working concentrations range and linearity of Trinexapac-ethyl were 5-50 mg/l and 5-100 mg/l, respectively. The correlation coefficient (r) of range and linearity were 0.99998 and 0.99998 for butralin and 0.99997 and 0.99998 for Trinexapac-ethyl which had accepted with limit of the correlation coefficient (r)  $\geq$  0.995. The precision of HorRat values for repeatability and Intermediate precision were found to be in the range 0.19-0.47. The HorRat values tested with Robustness and Ruggedness were found to be in the range 0.18-0.34 which were followed by the AOAC, EU and Codex due to their less than 2. The accuracy of this method was assessed by acceptance by recovery studied. The percentage recoveries of butralin analysis were 101.51 99.71 and 99.51 respectively and the percentage recoveries of Trinexapac-ethyl analysis were 98.82 99.50 and 98.71 respectively. The percentage recovery by AOAC (98-102%) for analytical concentrations more than 10% was accepted. This specific method did not have interference from other substances As a results, it was the performance characteristics of this method according to the criteria. The develop method, therefore, could be used to determine in plant growth regulator with accuracy and precision

## 6. คำนำ

บูทราลิน (Butralin) ชื่อ IUPAC N-butan-2-yl-4-tert-butyl-2,6-dinitroaniline ชื่อทางเคมี Butraline Dibutalin Rutralin Tamex สูตรโมเลกุล  $C_{14}H_{21}N_3O_4$  มวลโมเลกุลเท่ากับ  $295.339 \text{ gmol}^{-1}$  ออกฤทธิ์เป็นสารกำจัดวัชพืช dinitroanilide ประเภทเจาะจงพืช ใช้ควบคุมและกำจัดวัชพืชใบกว้างประเภทล้มลุก และวัชพืช ใบแคบพวกหญ้าต่าง ๆ และนำมาเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช โดยใช้กับการผลิตฝ้าย

ไตรเนกซาแพก เอทิล (Trinexapac ethyl) มีชื่อ IUPAC คือ 4-(cyclopropyl-hydroxy-methylene)-3,5-dioxo-cyclohexanecarboxylic acid ethyl ester ชื่อทางเคมี 4- (cyclopropylhydroxymethylene)-3,5-dioxo-cyclohexanecarboxylic acid ethyl ester สูตรโมเลกุล  $C_{13}H_{16}O_5$  น้ำหนักโมเลกุล  $252.266 \text{ gmol}^{-1}$  Trinexapac-ethyl ใช้เป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างฮอร์โมน Gibberellin หลังจากการพ่นทางใบให้กับพืชสารเคมีจะมีการเคลื่อนย้ายไปยังเนื้อเยื่อเจริญทำให้ความยาวข้อปล้องลดลงแต่ไม่มีผลต่อน้ำหนักผลผลิต น้ำหนักลำต้นในช่วงการเก็บเกี่ยว นำมาใช้กับธัญพืช เช่น ข้าวบาเลย์ ข้าว

โธ๊ต ข้าวสาลี (Paul, 2013) นอกจากนี้ยังใช้กับ หญ้าในสนามกอล์ฟ อ้อย ดาวเรืองและกุหลาบหนู สารทั้งสองชนิดมีโครงสร้างดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้าง (ก) Butralin (ข) Trinexapac-ethyl

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชแต่ละชนิดมีวิธีวิเคราะห์ที่จำเพาะเจาะจง ห้องปฏิบัติการสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ยังไม่มีวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ บูทราลิน (Butralin) ไตรเนกซาแพกเอทิล (Trinexapac-ethyl) วิธีวิเคราะห์ที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ได้มาจากวิธีวิเคราะห์ของเอกสารวิจัย และบริษัท เนื่องจากมีการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ (active ingredient) ของตัวอย่างสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth regulator) เพื่อการขึ้นทะเบียนและนำเข้าวัตถุดิบตาม พ.ร.บ. 2535

ดังนั้นเพื่อความถูกต้อง แม่นยำ และน่าเชื่อถือในการรายงานผลการวิเคราะห์จึงต้องมีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method validation) โดยการหาค่า Working range, Linearity, Accuracy และ Precision เป็นต้น Working range คือ การหาช่วงความเข้มข้น หรือ ปริมาณของสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้อง และแม่นยำ Linearity คือ การตรวจสอบหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นหรือปริมาณของสารที่วิธีวิเคราะห์สามารถทำได้กับสัญญาณ (Response) ที่ตรวจวัดได้เป็นเส้นตรง Accuracy คือ การหาความใกล้เคียงกันระหว่างผลการวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีทดสอบกับค่าอ้างอิงจากตัวอย่างเดียวกัน Precision คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ (ทิพวรรณ, 2549) นอกจากนี้ยังใช้เป็นข้อมูลในการยื่นขอการรับรองห้องปฏิบัติการให้เป็นไปตามมาตรฐานตามระบบ ISO/IEC 17025 ด้วย

## 7. วิธีดำเนินการ

### อุปกรณ์

1. เครื่อง High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) ที่ติดตั้งตัวตรวจวัดชนิด Photodiode Array Detector (PDA)
2. เครื่องชั่งความละเอียดทศนิยม 5 ตำแหน่ง ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
3. Ultrasonic bath
4. อุปกรณ์การกรอง ได้แก่ Suction เครื่องแก้ว และกระดาษกรอง ขนาด 0.2 และ 0.45 ไมโครเมตร
5. เครื่องแก้ว ได้แก่ Volumetric flask class A ขนาด 10, 50 และ 100 มิลลิลิตร, Volumetric pipette class A ขนาด 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตร, Beaker ขนาด 150 และ 250 มิลลิลิตร
6. Syringe ขนาด 5 มิลลิลิตร

7. Syringe membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร
8. Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร
9. สารมาตรฐาน Butralin 99.0% และ Trinexapac-ethyl 99.0%
10. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ Butralin 36 %W/V EC และ Trinexapac-ethyl 10 %W/V SL
11. Methanol ชนิด HPLC grade และ AR grade
12. Acetonitrile ชนิด HPLC grade และ AR grade
13. Ortho-phosphoric acid 85%

#### วิธีการ

1. การปรับตั้งสภาวะการทำงานของเครื่อง High Performance Liquid Chromatograph ที่ติดตั้งตัวตรวจวัดชนิด Photodiode Array Detector (PDA)

##### 1.1 สภาวะเครื่อง HPLC สำหรับการวิเคราะห์สาร Butralin

Column	: Sunfire 5 $\mu$ m, C18, (4.6 x 150 mm.)
Guard column	: Sunfire 5 $\mu$ m, C18
Detector	: PDA $\lambda$ 254 nm
Mobile phase	: 80/20 (Acetonitrile/ H <sub>2</sub> O)
Flow rate	: 1.0 ml/min.
Injection Volume	: 10 $\mu$ l

(ดัดแปลงจากวิธีการของ Dr. Ehrenstorfer, 2014)

##### 1.2 สภาวะเครื่อง HPLC สำหรับการวิเคราะห์สาร Trinexapac ethyl

Column	: Sunfire 5 $\mu$ m, C18, (4.6 x 150 mm.)
Guard column	: Sunfire 5 $\mu$ m, C18
Detector	: PDA $\lambda$ 254 nm
Mobile phase	: 80/20 (MeOH/ 0.5% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )
Flow rate	: 1.0 ml/min.
Injection Volume	: 10 $\mu$ l

ทดสอบความของการทำงานของเครื่อง HPLC ทุกครั้งก่อนทำการวิเคราะห์ โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานปริมาณ 10 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง HPLC ซ้ำกันหลายๆ ครั้งจนกระทั่งพื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐานที่ฉีดติดต่อกันมีความแตกต่างกันไม่เกิน 2 เปอร์เซ็นต์

#### 2. ตรวจสอบช่วงของการวัด (Range)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Butralin 6 ความเข้มข้น คลอบคลุมช่วงที่ใช้งาน ได้แก่ 25 50 100 150 200 และ 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร ด้วย สารละลาย Mobile

phase เขย่าให้เข้ากัน นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นกรองด้วย Syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ใส่ใน Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร เพื่อฉีดสารละลายเข้าเครื่อง HPLC ที่ทำการกำหนดสภาวะดังข้อ 1.1

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Trinexapac-ethyl 6 ความเข้มข้น คลอบคลุมช่วงที่ใช้งาน ได้แก่ 5 10 20 30 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร ด้วย สารละลาย Mobile phase เขย่าให้เข้ากัน นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นกรองด้วย Syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ใส่ใน Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร เพื่อฉีดสารละลายเข้าเครื่อง HPLC ที่ทำการกำหนดสภาวะดังข้อ 1.2

นำมาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน x) กับ response (แกน y) พิจารณช่วงที่เป็นเส้นตรงจากช่วงความเข้มข้นที่หาค่า Range โดยคำนวณค่า Correlation coefficient ( $r$ )  $\geq 0.995$

### 3. ตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Butralin 6 ความเข้มข้น คลอบคลุมช่วงที่ใช้งาน ได้แก่ 25 50 100 150 200 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร ด้วย สารละลาย Mobile phase เขย่าให้เข้ากัน นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นกรองด้วย Syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ใส่ใน Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร เพื่อฉีดสารละลายเข้าเครื่อง HPLC ตามสภาวะที่กำหนดดังข้อ 1.1

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Trinexapac-ethyl 6 ความเข้มข้น คลอบคลุมช่วงที่ใช้งาน ได้แก่ 10 20 30 40 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร ด้วย สารละลาย Mobile phase เขย่าให้เข้ากัน นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นกรองด้วย Syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ใส่ใน Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร เพื่อฉีดสารละลายเข้าเครื่อง HPLC ที่ทำการกำหนดสภาวะดังข้อ 1.2

นำมาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน x) กับ response (แกน y) พิจารณช่วงที่เป็นเส้นตรง โดยคำนวณค่า Correlation coefficient ( $r$ )  $\geq 0.995$

4. ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ที่แน่นอนของสารตัวอย่าง Butralin 36% W/V EC และ Trinexapac-ethyl 10% W/V SL

4.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน Butralin 6 ความเข้มข้น คลอบคลุมช่วงที่ใช้งาน ได้แก่ 25 50 100 150 200 และ 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร ด้วย สารละลาย Mobile phase เขย่าให้เข้ากัน นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นกรองด้วย Syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ใส่ใน Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

4.2 ปิเปตสารตัวอย่าง Butralin ในปริมาณที่ได้จากการคำนวณความเข้มข้นจากเปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ ให้อยู่ในช่วงของกราฟมาตรฐาน ละลายด้วย Mobile phase เขย่าให้เข้ากัน กรองด้วย Syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ใส่ใน Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

4.3 เตรียมสารละลายมาตรฐาน Trinexapac-ethyl 6 ความเข้มข้น คลอบคลุมช่วงที่ใช้งาน ได้แก่ 10 20 30 40 50 และ 60 มิลลิกรัมต่อลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร ด้วยสารละลาย Mobile phase เขย่าให้เข้ากัน นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นกรองด้วย Syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ใส่ใน Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

4.4 ปิเปตสารตัวอย่าง Trinexapac-ethyl ในปริมาณที่ได้จากการคำนวณความเข้มข้นจากเปอร์เซ็นต์ สารออกฤทธิ์ ให้อยู่ในช่วงของกราฟมาตรฐาน ละลายด้วย Mobile phase เขย่าให้เข้ากัน กรองด้วย Syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ใส่ใน Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

ฉีดสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างตามสภาวะที่กำหนดของแต่ละสาร โดยฉีดสารละลาย มาตรฐานซ้ำกันหลายๆ ครั้งจนค่าของพื้นที่ใต้พีค ที่ฉีดแต่ละครั้งมีค่าใกล้เคียงกัน และแตกต่างกันไม่เกิน 2 เปอร์เซ็นต์ จึงดำเนินการตรวจวิเคราะห์โดยฉีดสารละลายตัวอย่างเปรียบเทียบกับกราฟของสารมาตรฐาน

## 5. ตรวจสอบความแม่นยำ (Precision)

### 5.1 ตรวจสอบความแม่นยำ Repeatability

ตรวจสอบ Precision แบบ Repeatability ซึ่งเป็นการทดสอบจากห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน ในเวลาเดียวกัน

5.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน Butralin 6 ความเข้มข้น เพื่อทำ Standard calibration curve คลอบคลุมช่วงที่ใช้งาน ได้แก่ 25 50 100 150 200 และ 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร ด้วย สารละลาย Mobile phase เขย่าให้เข้ากัน นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นกรองด้วย Syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ใส่ใน Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

5.1.2 เตรียมสารละลายตัวอย่างของสาร Butralin ความเข้มข้น 36 108 และ 180 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Acetonitrile เขย่าให้เข้ากัน ปิเปตสารละลาย 5 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Acetonitrile เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นปิเปตสารละลาย 1 3 และ 5 มิลลิลิตร อย่างละ 10 ซ้ำ ใส่ใน Volumetric flask 50 มิลลิลิตร ปรับ ปริมาตรด้วย Mobile phase เขย่าให้เข้ากัน กรองด้วย Syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ใส่ใน Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร เพื่อฉีดสารละลายเข้าเครื่อง HPLC ตามสภาวะที่กำหนดดังข้อ 1.1

5.1.3 เตรียมสารละลายมาตรฐาน Trinexapac-ethyl 6 ความเข้มข้น เพื่อทำ Standard calibration curve คลอบคลุมช่วงที่ใช้งาน ได้แก่ 5 10 20 30 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ใส่ในขวดวัด ปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร ด้วย สารละลาย Mobile phase เขย่าให้เข้ากัน นำสารละลายแต่ละ ความเข้มข้นกรองด้วย Syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ใส่ใน Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

5.1.4 เตรียมสารละลายตัวอย่างของสาร Trinexapac-ethyl ความเข้มข้น 10 30 และ 50 มิลลิกรัม ต่อลิตร โดยปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Methanol เขย่าให้เข้ากัน ปิเปตสารละลาย 5 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Acetonitrile เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นปิเปตสารละลาย 1 3 และ 5 มิลลิลิตร อย่างละ 10 ซ้ำ ใส่ใน Volumetric flask 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Mobile phase เขย่าให้เข้ากัน กรองด้วย Syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ใส่ใน Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร เพื่อฉีดสารละลายเข้าเครื่อง HPLC ตามสภาวะที่กำหนดดังข้อ 1.2

คำนวณค่าเฉลี่ย (Mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation) ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (Relative standard deviation) และประเมินด้วย HorRat โดยต้องมีค่าไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณา AOAC, EC, Codex

$$\text{คำนวณ \%RSD ตามสูตร \%RSD} = \frac{SD \times 100}{\bar{x}}$$

ประเมิน precision โดยใช้ HorRat

$$\text{HorRat} = \text{RSD experiment} / \text{Precision Horwitz RSD}$$

คำนวณ Precision Horwitz RSD ตามสูตร

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

$$C = \text{Concentration ratio}$$

เกณฑ์ยอมรับ Precision

AOAC (2016) ยอมรับ HorRat < 2

## 5.2 ตรวจสอบ Intermediate precision

ตรวจสอบ Precision แบบ Intermediate precision ซึ่งเป็นการทดสอบจากห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน ในเวลาต่างกัน โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างดังข้อ 5.1 และประเมินค่า HorRat ค่าไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณา AOAC

$$\text{HorRat} = \text{RSD experiment} / \text{Precision Horwitz RSD}$$

คำนวณ Precision Horwitz RSD ตามสูตร

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

$$C = \text{Concentration ratio}$$

เกณฑ์ยอมรับ Precision

AOAC (2016) ยอมรับ HorRat < 2

## 5.3 ตรวจสอบความแม่นยำ Robustness/Ruggedness

วิเคราะห์ตัวอย่าง Butralin และ Trinexapac-ethyl เช่นเดียวกับข้อ 5.1 โดยทำการเปลี่ยนอัตราส่วนของสารละลาย Mobile phase และ เปลี่ยนผู้วิเคราะห์ คำนวณค่าเฉลี่ย (Mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation) ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (Relative standard deviation) และประเมินด้วย HorRat โดยต้องมีค่าไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณา AOAC สำหรับ Ruggedness คำนวณค่า HorRat ดังสมการ

$$\text{HorRat} = \text{RSD experiment} / \text{Precision Horwitz RSD}$$

คำนวณ Precision Horwitz RSD ตามสูตร

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

$$C = \text{Concentration ratio}$$

เกณฑ์ยอมรับ Precision

AOAC (2016) ยอมรับ HorRat < 2

## 6. ตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy)

### 6.1 เตรียม Stock solution ของ Butralin และ Trinexapac ethyl

เตรียมสารมาตรฐาน Butralin ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ใน Volumetric flask ขนาด 500 มิลลิลิตร เติม Acetonitrile 200 มิลลิลิตร ปิดฝา นำไปเขย่าด้วยเครื่อง Ultrasonic bath 5-10 นาที นำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วปรับปริมาตรด้วย Acetonitrile ส่วนสาร Trinexapac-ethyl เตรียมความเข้มข้นของสารให้มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ใน Volumetric flask ขนาด 500 มิลลิลิตร เติม Methanol 200 มิลลิลิตร ปิดฝา นำไปเขย่าด้วยเครื่อง Ultrasonic bath 5-10 นาที นำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วปรับปริมาตรด้วย Methanol

### 6.2 เตรียม Stock sample

6.2.1 เตรียมสารละลายตัวอย่าง Butralin ความเข้มข้น 36% W/V โดยปิเปตสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Acetonitrile ปิดฝา เขย่าให้เข้ากัน ปิเปตสารละลาย 5 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Acetonitrile ปิดฝา เขย่าให้เข้ากัน

6.2.2 เตรียมสารละลายตัวอย่าง Trinexapac-ethyl ความเข้มข้น 10% W/V โดยปิเปตสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Methanol ปิดฝา เขย่าให้เข้ากัน ปิเปตสารละลาย 5 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Methanol ปิดฝา เขย่าให้เข้ากัน

### 6.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

6.3.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน Butralin 6 ความเข้มข้น เพื่อทำ Standard calibration curve คลอบคลุมช่วงที่ใช้งาน ได้แก่ 25 50 100 150 200 และ 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร ด้วย สารละลาย Mobile phase เขย่าให้เข้ากัน นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นกรองด้วย Syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ใส่ใน Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

6.3.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน Trinexapac-ethyl 6 ความเข้มข้น เพื่อทำ Standard calibration curve คลอบคลุมช่วงที่ใช้งาน ได้แก่ 5 10 20 30 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร ด้วย สารละลาย Mobile phase เขย่าให้เข้ากัน นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นกรองด้วย Syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ใส่ใน Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

### 6.4 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า Origin

ปิเปตสารละลาย Butralin จาก Stock sample ข้อ 6.2 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร จำนวน 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย Mobile phase เขย่าให้เข้ากัน กรองด้วย Syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ใส่ใน Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร



ปิเปตสารละลาย Trinexapac-ethyl จาก Stock sample ข้อ 6.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร จำนวน 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย Mobile phase เขย่าให้เข้ากัน กรองด้วย Syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ใส่ใน Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายเข้าเครื่อง HPLC โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานข้อ 6.3 เพื่อหาความเข้มข้นที่แน่นอน

#### 6.5 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า Spike

ปิเปตสารละลาย Butralin จาก Stock sample ข้อ 6.2.1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร จำนวน 3 ชุด ชุดละ 10 ซ้ำ จากนั้นเติมสารละลาย Stock standard ปริมาตร 0.5 2 และ 4 มิลลิลิตร อย่างละ 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย Mobile phase เขย่าให้เข้ากัน กรองด้วย Syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ใส่ใน Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร และปิเปตสารละลาย Trinexapac-ethyl จาก Stock sample ข้อ 6.2.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร จำนวน 3 ชุด ชุดละ 10 ซ้ำ จากนั้นเติมสารละลาย Stock standard ปริมาตร 1 3 และ 5 มิลลิลิตร อย่างละ 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย Mobile phase เขย่าให้เข้ากัน กรองด้วย Syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ใส่ใน Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายเข้าเครื่อง HPLC โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานข้อ 6.3

#### 6.6 ประเมินค่า Accuracy จากค่า %Recovery ดังนี้

$$\%Recovery = (C_{Spike} - C_{Origin}) \times 100 / C_{Add}$$

$C_{Spike}$  = ปริมาณ Butralin หรือ Trinexapac-ethyl ในสารละลาย Spike

$C_{Origin}$  = ปริมาณ Butralin หรือ Trinexapac-ethyl ในสารละลาย Origin

$C_{Add}$  = ปริมาณสารละลายมาตรฐาน Butralin หรือ Trinexapac-ethyl ที่เติม

### 7. การหา Specificity/Selectivity

ทดลองโดยการฉีดสารมาตรฐาน สารละลายตัวอย่าง Butralin และ Trinexapac-ethyl ตามสภาวะเครื่อง HPLC ของแต่ละสาร ดังข้อ 1.1 และ 1.2 เพื่อดูว่ามีสารอื่นแปลกปลอมหรือมารบกวนสารออกฤทธิ์ Butralin และ Trinexapac-ethyl หรือไม่

ระยะเวลา (เริ่มต้น-สิ้นสุด) ตุลาคม 2559 – กันยายน 2560

สถานที่ดำเนินงาน

กลุ่มงานวิเคราะห์พืช วัตถุเคมีการเกษตรและนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตร กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

### 8. ผลการทดลองและวิจารณ์

#### 1. ผลการศึกษาช่วงของการวัด (Working range)

ตรวจสอบช่วงของการวัด พบว่าช่วงของการวัดของสาร Butralin และ Trinexapac-ethyl อยู่ในช่วงความเข้มข้น 25-250 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่า Correlation coefficient เท่ากับ 0.99998 ส่วนสาร Trinexapac-ethyl

มีช่วงของการวัดอยู่ในช่วงความเข้มข้น 5-50 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่า Correlation coefficient เท่ากับ 0.99997 ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับค่า Correlation coefficient ( $r$ )  $\geq 0.995$

## 2. ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรงของสาร พบว่าช่วงความเป็นเส้นตรงของสาร Butralin และ Trinexapac-ethyl อยู่ในช่วงความเข้มข้น 25-500 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่า Correlation coefficient เท่ากับ 0.99998 ส่วนสาร Trinexapac-ethyl มีช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่า Correlation coefficient เท่ากับ 0.99998 ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับค่า Correlation coefficient ( $r$ )  $\geq 0.995$

### 3. ผลการหาเปอร์เซ็นต์ที่แน่นอนของสาร

เปอร์เซ็นต์ที่แน่นอนของสาร Butralin และ Trinexapac-ethyl เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 37.03 %W/V %RSD เท่ากับ 0.320 และ 10.10 %W/V %RSD เท่ากับ 0.362 ตามลำดับ เกณฑ์ยอมรับ %RSD คือ  $\leq 2$  ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ จึงสามารถนำไปใช้สำหรับการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ Butralin และ Trinexapac-ethyl ในขั้นตอนการตรวจสอบ Precision และ ตรวจสอบ Accuracy

### 4. ผลการตรวจสอบ Precision

ตรวจสอบ Precision สำหรับ Repeatability ของสาร Butralin ที่ระดับความเข้มข้น 36 108 และ 180 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 36.24 37.03 และ 36.83 %W/V ตามลำดับ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.13 0.12 และ 0.13 ตามลำดับ ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 0.36 0.32 และ 0.34 ตามลำดับ ประเมินด้วย HorRat เท่ากับ 0.24 0.21 และ 0.22 ตามลำดับ ตรวจสอบ Precision สำหรับ Repeatability ของสาร Trinexapac-ethyl ที่ระดับความเข้มข้น 10 30 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 10.13 10.10 และ 10.08 %W/V ตามลำดับ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.05 0.04 และ 0.05 ตามลำดับ ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 0.52 0.36 และ 0.54 ตามลำดับ ประเมินด้วย HorRat เท่ากับ 0.28 0.19 และ 0.29 ตามลำดับ

ตรวจสอบ Precision สำหรับ Intermediate precision ของสาร Butralin ที่ระดับความเข้มข้น 36 108 และ 180 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 36.66 36.94 และ 36.93 %W/V ตามลำดับ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.21 0.18 และ 0.11 ตามลำดับ ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 0.56 0.49 และ 0.31 ตามลำดับ ประเมินด้วย HorRat เท่ากับ 0.37 0.32 และ 0.20 ตามลำดับ ตรวจสอบ Precision สำหรับ Intermediate precision ของสาร Trinexapac-ethyl ที่ระดับความเข้มข้น 10 30 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 10.26 10.11 และ 10.13 %W/V ตามลำดับ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.08 0.06 และ 0.09 ตามลำดับ ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 0.81 0.61 และ 0.87 ตามลำดับ ประเมินด้วย HorRat เท่ากับ 0.44 0.33 และ 0.47 ตามลำดับ

ตรวจสอบ Robustness ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงตัวแปรบางตัวในการวิเคราะห์โดยมีการเปลี่ยนอัตราส่วนของสารละลาย Mobile phase ในการทดสอบพบว่าการวิเคราะห์สาร Butralin ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 37.21 37.77 และ 38.06 %W/V ตามลำดับ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.20 0.19 และ 0.19 ตามลำดับ ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 0.53 0.51 และ 0.50 ตามลำดับ ประเมินด้วย HorRat เท่ากับ 0.34 0.33 และ 0.33 ตามลำดับ การวิเคราะห์สาร Trinexapac-ethyl ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 10.11 10.12 และ 10.13 %W/V ตามลำดับ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.04 0.06 และ 0.03 ตามลำดับ ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 0.36 0.56 และ 0.34 ตามลำดับ ประเมินด้วย HorRat เท่ากับ 0.19 0.30 และ 0.0.18 ตามลำดับ

ตรวจสอบ Ruggedness ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงตัวแปรบางตัวในการวิเคราะห์โดยมีการเปลี่ยนผู้ทดสอบ พบว่าการวิเคราะห์สาร Butralin ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 36.98 37.07 และ 37.35 %W/V ตามลำดับ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.19 0.27 และ 0.18 ตามลำดับ ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 0.50 0.73

และ 0.47 ตามลำดับ ประเมินด้วย HorRat เท่ากับ 0.22 0.31 และ 0.20 ตามลำดับ การวิเคราะห์สาร Trinexapac-ethyl ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 10.18 10.11 และ 10.17 %W/V ตามลำดับ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.05 0.07 และ 0.06 ตามลำดับ ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 0.53 0.69 และ 0.58 ตามลำดับ ประเมินด้วย HorRat เท่ากับ 0.19 0.24 และ 0.20 ตามลำดับ

## 5. ผลการตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy)

ตรวจสอบ Accuracy โดยการหา %Recovery พบว่า ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงในสารละลายตัวอย่าง 3 ระดับความเข้มข้น ระดับละ 10 ซ้ำ สำหรับสาร Butralin คือ 25 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่า %Recovery ได้เท่ากับ 101.51 99.71 และ 99.53 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) สำหรับสาร Trinexapac-ethyl คือ 10 30 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่า %Recovery ได้เท่ากับ 98.82 99.50 และ 98.71 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ซึ่งอยู่ในช่วงเกณฑ์ยอมรับที่ 98-102 เปอร์เซ็นต์ ตามเกณฑ์การพิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ ของ AOAC ดังนั้นวิธีวิเคราะห์นี้สามารถนำมาใช้วิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ Butralin และ Trinexapac-ethyl ได้อย่างถูกต้อง

**ตารางที่ 1** ตรวจสอบ %Recovery ของสาร Butralin

ลำดับ	Conc. Added (25mg/l)			Conc. Added (100mg/l)			Conc. Added (200mg/l)		
	Mean origin	Spike	Recovery (%)	Mean origin	Spike	Recovery (%)	Mean origin	Spike	Recovery (%)
1	21.650	47.163	101.820	21.650	121.753	99.876	21.650	221.605	99.750
2	21.650	47.097	101.557	21.650	121.249	99.373	21.650	220.268	99.083
3	21.650	47.057	101.397	21.650	121.116	99.240	21.650	219.763	98.832
4	21.650	46.658	99.805	21.650	121.583	99.706	21.650	220.448	99.173
5	21.650	47.183	101.900	21.650	121.761	99.884	21.650	222.057	99.976
6	21.650	47.191	101.932	21.650	121.555	99.678	21.650	221.751	99.823
7	21.650	47.047	101.357	21.650	122.134	100.256	21.650	221.303	99.600
8	21.650	47.158	101.800	21.650	121.863	99.985	21.650	221.678	99.787
9	21.650	47.145	101.748	21.650	121.539	99.662	21.650	221.600	99.748
10	21.650	47.147	101.756	21.650	121.271	99.395	21.650	221.219	99.558
Mean		25.435	101.507		99.932	99.705		199.519	99.533
SD		0.158	0.630		0.311	0.311		0.752	0.375
%RSD		0.621	0.621		0.312	0.312		0.377	0.377

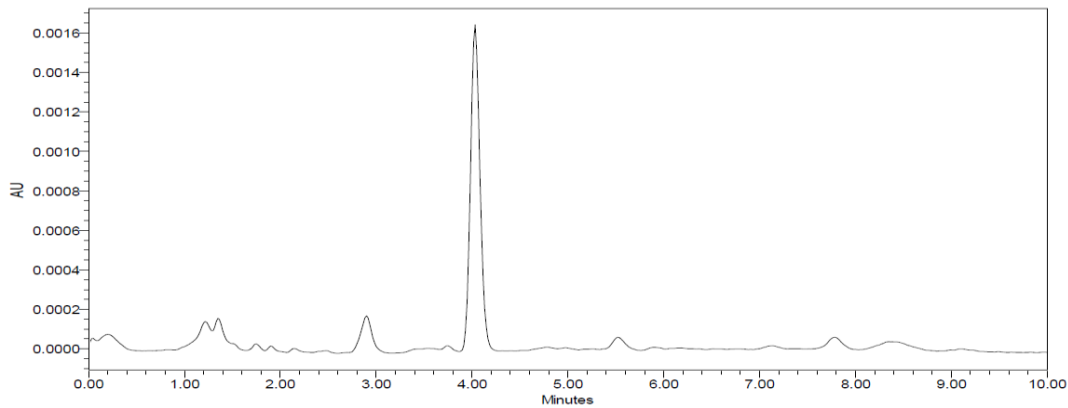
**ตารางที่ 2** ตรวจสอบ %Recovery ของสาร Trinexapac ethyl

ลำดับ	Conc. Added (10 mg/l)			Conc. Added (30 mg/l)			Conc. Added (50 mg/l)		
	Mean origin	Spike	Recovery (%)	Mean origin	Spike	Recovery (%)	Mean origin	Spike	Recovery (%)
1	9.987	19.902	98.149	9.987	40.320	100.089	9.987	60.156	99.325
2	9.987	19.849	97.624	9.987	40.020	99.099	9.987	60.139	99.292
3	9.987	20.049	99.604	9.987	39.962	98.908	9.987	60.132	99.278
4	9.987	20.019	99.307	9.987	40.168	99.588	9.987	59.953	98.923
5	9.987	19.873	97.862	9.987	40.886	101.957	9.987	59.631	98.286
6	9.987	19.864	97.773	9.987	40.839	101.802	9.987	59.779	98.579
7	9.987	19.921	98.337	9.987	39.719	98.106	9.987	59.864	98.747
8	9.987	20.100	100.109	9.987	39.856	98.558	9.987	59.533	98.092
9	9.987	20.084	99.951	9.987	39.855	98.555	9.987	59.229	97.490

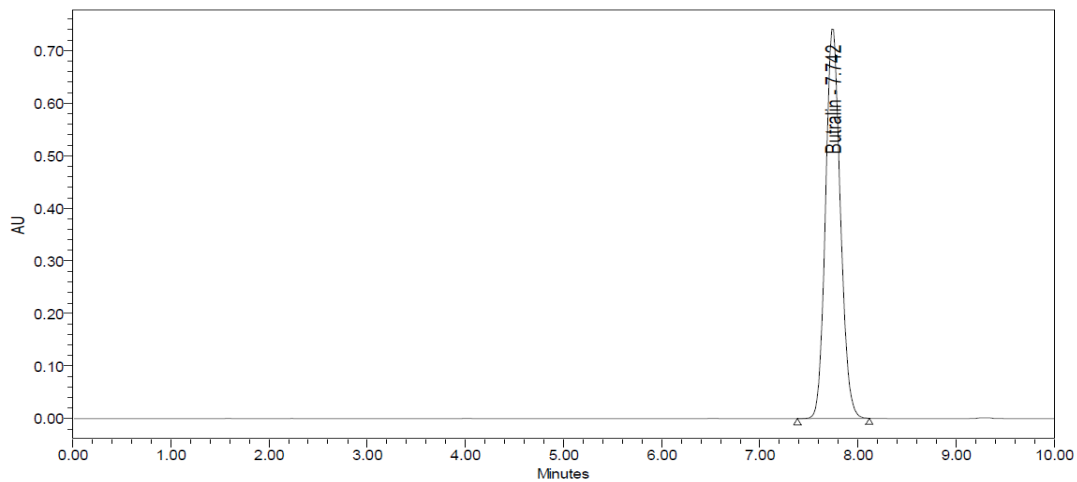
10	9.987	20.038	99.495	9.987	39.799	98.370	9.987	60.019	99.054
Mean		9.983	98.821		30.155	99.503		49.857	98.707
SD		0.097	0.965		0.419	1.382		0.305	0.603
%RSD		0.976	0.976		1.389	1.389		0.611	0.611

## 6. ผลการตรวจสอบ Specificity/Selectivity

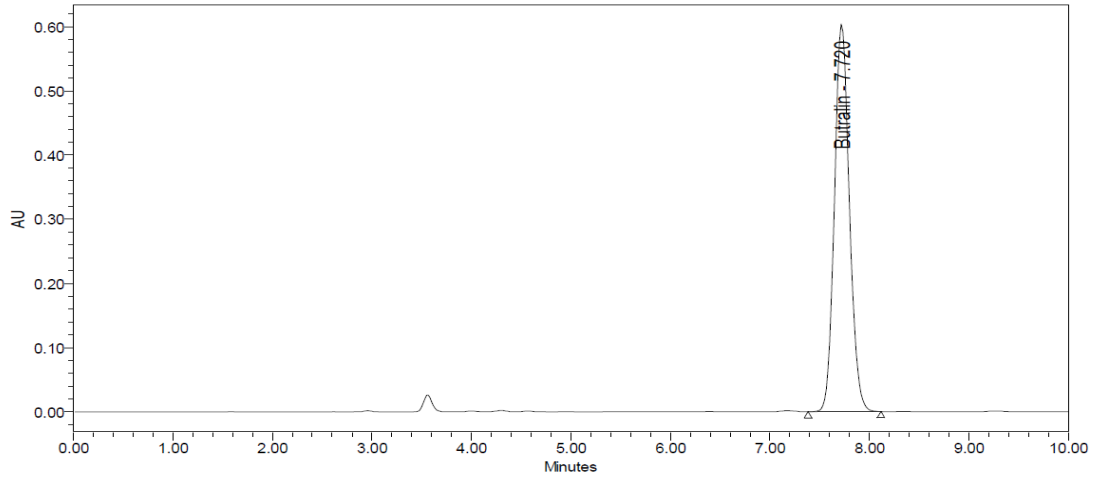
จากผลการตรวจสอบ Specificity/Selectivity สาร Butralin และ Trinexapac-ethyl โดยพิจารณาจากโครมาโทแกรมของสารละลาย Blank สารละลายมาตรฐาน และสารละลายตัวอย่างของสารทั้งหมด พบว่าไม่มีสารแปลกปลอมอื่นมารบกวนพีกของสารออกฤทธิ์ที่วิเคราะห์ได้ แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้มี Specificity/Selectivity สำหรับสารดังกล่าว ดังแสดงในภาพที่ 2-7



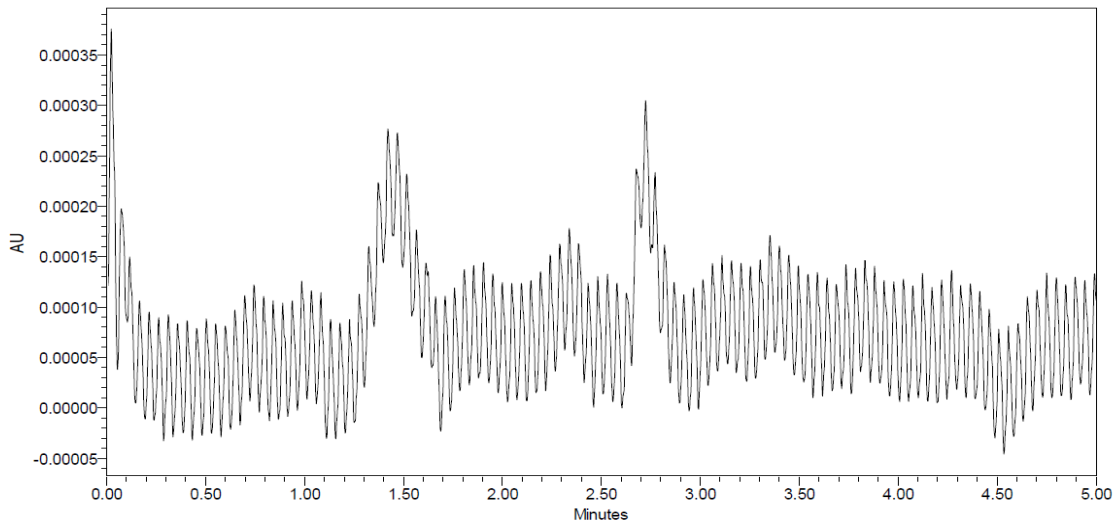
ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมของสารละลาย Blank



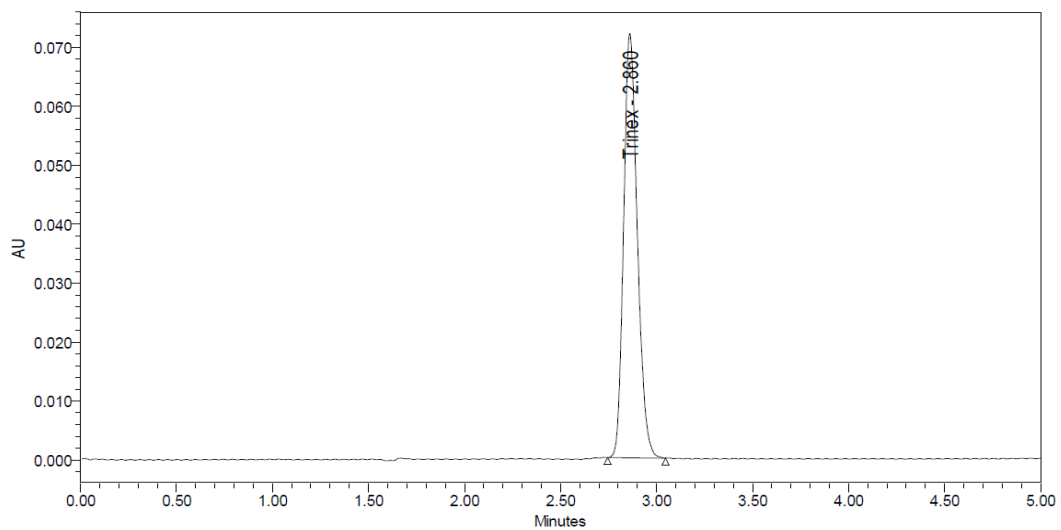
ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน Butralin



ภาพที่ 4 โครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่าง Butralin

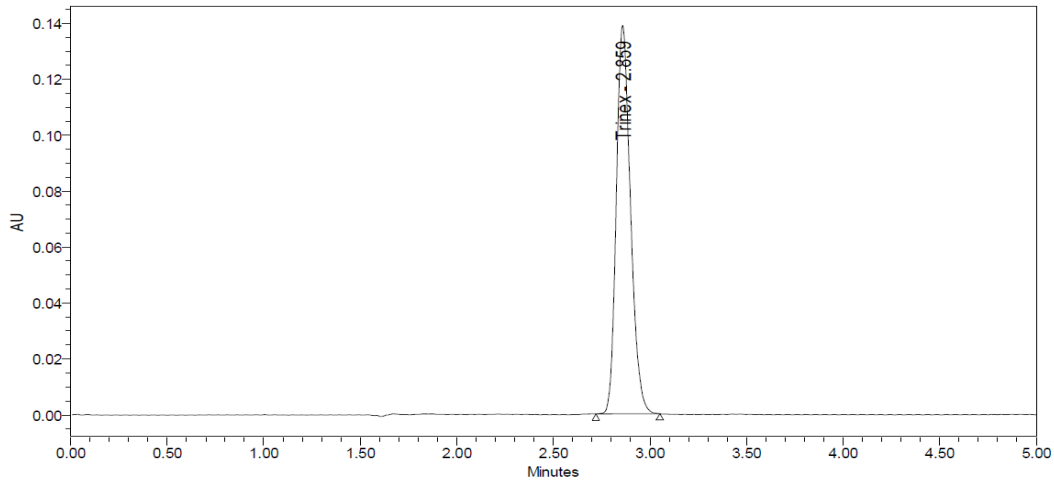


ภาพที่ 5 โครมาโทแกรมของสารละลาย Blank



ภาพที่ 6 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน Trinexapac ethyl





ภาพที่ 7 โครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่าง Trinexapac ethyl

## 9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ศึกษาการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ Butralin และ Trinexapac-ethyl ในผลิตภัณฑ์สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ที่ติดตั้งตัวตรวจวัดชนิด Photo Diode Array (PDA) จากการทดสอบพบว่า ช่วงของการวัด (Working range) และค่าความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของสาร Butralin และ Trinexapac-ethyl โดยพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) ผ่านเกณฑ์ยอมรับ ค่า Correlation coefficient ( $r \geq 0.995$ ) ตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ทั้งแบบ Repeatability และ Intermediate precision ได้ค่า HorRat อยู่ในช่วง 0.18-0.34 ตรวจสอบ Robustness และ Ruggedness ได้ค่า HorRat อยู่ในช่วง 0.19-0.47 ซึ่งไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC, EU และ Codex จากการตรวจสอบความแม่นยำ (Accuracy) โดยประเมินจาก %Recovery ที่ 3 ระดับความเข้มข้นของ Trinexapac-ethyl มีค่าอยู่ในช่วง 98.8 -99.5 ส่วนการตรวจสอบความแม่นยำของสาร Butralin โดยประเมินจาก %Recovery ที่ 3 ระดับความเข้มข้น มีค่าเท่ากับ 99.5-101.6 อยู่ในช่วง 98-102% ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% และวิธีนี้มีความจำเพาะเจาะจง (Specificity) ไม่มีการรบกวนของสารอื่น จากการศึกษาพบว่าคุณสมบัติเฉพาะของวิธีเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ ดังนั้นจึงสามารถนำวิธีวิเคราะห์นี้ไปใช้ในการวิเคราะห์สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชดังกล่าวได้อย่างถูกต้อง แม่นยำและเป็นที่น่าเชื่อถือได้

## 10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

เสนอเป็นวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการในการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ Butralin และ Trinexapac-ethyl ในผลิตภัณฑ์สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เพื่อเป็นแนวทางในการขอรับรองคุณภาพห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 รวมทั้งสามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ที่เผยแพร่ให้แก่ห้องปฏิบัติการทั้งภาครัฐและภาคเอกชนนำไปใช้ได้อย่างน่าเชื่อถือ

## 11. คำขอบคุณ -

## 12. เอกสารอ้างอิง

ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว.

เอกสารการฝึกอบรม. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.

Ehrenstorfer, 2014. Reference Materials for Residue Analysis of Butralin. Labor Dr. Ehrenstorfer-Schafers. Augsburg Germany.

Pual Humphrey. 2013. Trinexapac ethyl. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, Canberra, Australia. JMPR. 1595-1716.