



คู่มือวิธีวิเคราะห์

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช :

อีทีฟอน และแพกโคลบิวทราซอล

จัดทำโดย

กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี

กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร



คู่มือวิธีวิเคราะห์สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช : อีทีฟอน และแพกโคลบิวทราซอล
ISBN : 978-616-358-757-2

ที่ปรึกษา

นายเทวรัตน์ บุรณสวัสดิ์พงษ์

ผู้อำนวยการกองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิต
ทางการเกษตร

นางสาวจรีรัตน์ กุศลวิริยะวงศ์

ผู้เชี่ยวชาญด้านวิเคราะห์และทดสอบ

นางสาวรุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล

ผู้อำนวยการกลุ่มวิจัยเกษตรเคมี

คณะผู้จัดทำ

นางสาธิตา โพธิ์น้อย

นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ

นางสาวสุพิศสา ทองเขียว

นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ

นางสาวเพชรรัตน์ ศิริวิ

นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ

นางสาวสุวลักษณ์ ไชยทอง

นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ

นางสาวดวงพร อีระพิทยาพงศ์

นักวิทยาศาสตร์ปฏิบัติการ

นายชาคร ทองหยอด

นักวิทยาศาสตร์ปฏิบัติการ

ลิขสิทธิ์ของกรมวิชาการเกษตร

ห้ามคัดลอกข้อความหรือส่วนใดส่วนหนึ่งของหนังสือไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต

สถานที่ติดต่อ กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

โทรศัพท์ 0 2579 8600

โทรสาร 0 2561 5034

คำนำ

การจัดทำคู่มือวิธีวิเคราะห์สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช มีวัตถุประสงค์เพื่อเผยแพร่ความรู้เรื่องวิธีวิเคราะห์สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช 2 ชนิด คือ อีทีฟอน และแพกโคลบิวทราซอล โดยรวบรวมหลักการ วัตถุประสงค์ขอบเขต เครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ และขั้นตอนของการวิเคราะห์อ้างอิงตามวิธีมาตรฐานของ Collaborative International Pesticides Analytical Council, (CIPAC) เพื่อให้การตรวจสอบปริมาณสารออกฤทธิ์อีทีฟอน และแพกโคลบิวทราซอลได้อย่างถูกต้อง และเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานที่กรมวิชาการเกษตรกำหนด ทั้งนี้เพื่อให้ผู้ประกอบการผลิตผลิตภัณฑ์สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช นักวิชาการ และผู้สนใจทั่วไป ได้ทราบถึงวิธีวิเคราะห์ เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพในผลิตภัณฑ์ทั้งก่อนผลิตและวางจำหน่าย การนำเข้า ขึ้นทะเบียน และวัตถุประสงค์อื่นๆ

กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร หวังเป็นอย่างยิ่งว่าคู่มือฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ประกอบการ นักวิชาการ และผู้สนใจทั่วไป ในการประยุกต์ใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการหรืออ้างอิงต่อไป

(นายเทวรัตน์ บุณย์สวัสดิ์พงษ์)

ผู้อำนวยการกองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

กรกฎาคม 2569

สารบัญ

คำนำ	ก
สารบัญ	ข
บทนำ	ค
อู่ทืฟอน Titrimetric method	1
แพกโคลบืวทราซอล High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	5

บทนำ

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชจัดเป็นวัตถุอันตรายทางการเกษตรตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 ซึ่งกรมวิชาการเกษตรเป็นผู้กำกับดูแล รับผิดชอบในการควบคุมนำเข้า ขึ้นทะเบียนและขออนุญาตประกอบกิจการต่างๆ ทั้งนี้ภารกิจหลักของกลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร รับผิดชอบในการให้บริการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ขึ้นทะเบียน การผลิตและนำเข้า เพื่อเป็นการตรวจสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ให้ตรงตามเกณฑ์ที่กำหนด จากการรายงานสรุปการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตรของสำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร พบว่า ในปี พ.ศ. 2566 มีปริมาณการนำเข้าของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชสูงกว่าปี พ.ศ. 2565 ถึง 571,460 กิโลกรัม คิดเป็นมูลค่าการนำเข้าสูงถึง 200 กว่าล้านบาท โดยปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่มีการนำเข้ามากที่สุด 2 อันดับคือ สารอีทีฟอน และสารแพกโคลบิวทราซอล ตามลำดับ (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2566) ซึ่งวิธีวิเคราะห์สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ใช้ในห้องปฏิบัติการยังไม่มีวิธีมาตรฐานที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ โดยส่วนใหญ่จะได้มาจากการค้นคว้าเอกสารงานวิจัยที่ได้ศึกษาและนำมาปรับใช้ให้เหมาะสมกับเครื่องมือ อุปกรณ์สารเคมีที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ

ปัจจุบันวิธีวิเคราะห์สารอีทีฟอน และแพกโคลบิวทราซอลในห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยเกษตรเคมีที่อ้างอิงตามวิธีมาตรฐานสากลของ Collaborative International Pesticides Analytical Council, (CIPAC) ได้มีการตรวจสอบ ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ให้เป็นไปตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 เพื่อใช้ในการยื่นขอการรับรองห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ และเป็นการยกระดับห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ให้เป็นที่ยอมรับในระดับสากล ดังนั้นจึงได้มีการจัดทำคู่มือวิธีวิเคราะห์สารอีทีฟอน และสารแพกโคลบิวทราซอล เพื่อเป็นการเผยแพร่วิธีวิเคราะห์ที่อ้างอิงตามวิธีมาตรฐาน ให้นักวิชาการผู้ประกอบการ และผู้ที่สนใจทั่วไป ได้ทราบถึงขั้นตอนการวิเคราะห์สารดังกล่าว สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบ และควบคุมคุณภาพของการกระบวนการผลิต นำเข้า และขึ้นทะเบียนต่อไป

อีทีฟอน

โดย Titrimetric Method

.....

1. ขอบข่ายและวัตถุประสงค์

เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์อีทีฟอนในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร (สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช)

2. หลักการ

สารอีทีฟอน ($\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{PO}(\text{OH})_2$) เมื่อทำปฏิกิริยากับโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) โดยมี Thymol blue เป็นอินดิเคเตอร์ จะทำให้เกิดเป็นสาร Ethephon disodium salt ($\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{OP}(\text{ONa})_2$) เมื่อได้รับความร้อน จะเกิดสารโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4) และปลดปล่อยแก๊สเอทิลีน (C_2H_4) หลังจากนั้นทำการไทเทรตโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4) กับ NaOH แล้วนำปริมาตรของ NaOH ที่ได้มาคำนวณหาปริมาณอีทีฟอน

3. เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี

3.1 เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 เครื่องไทเทรตอัตโนมัติ

3.1.2 pH-meter

3.1.3 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 5 ตำแหน่ง

3.1.4 ตู้อบลมร้อน

3.1.5 เตาไฟฟ้า

3.1.6 เทอร์โมมิเตอร์

3.1.7 ขวดหาความถ่วงจำเพาะ Pycnometer (Density bottle) ขนาด 25 มิลลิลิตร

3.1.8 เครื่องแก้วและวัสดุอื่นๆ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารมาตรฐานอีทีฟอนความเข้มข้น 97%

3.2.2 สารอีทีฟอนชนิดเทคนิคเกรดความเข้มข้นมากกว่า 85%

3.2.3 สารมาตรฐาน Potassium hydrogen phthalate ($\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$) ความเข้มข้น 99%

3.2.4 สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1.0 โมลต่อลิตร

3.2.5 สารละลายมาตรฐานบัฟเฟอร์ pH 4, 7, 9.21 และ 10

3.2.6 95% Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), AR grade

3.2.7 Phenolphthalein indicator, AR grade

3.2.8 Thymol blue indicator, AR grade

4. วิธีการ

4.1 การเตรียมสารเคมี

4.1.1 สารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.05 โมลต่อลิตร

ปิเปตสารละลาย NaOH 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน

4.1.2 สารละลาย Thymol blue Indicator

ชั่ง Thymol blue Indicator 0.10xx กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 200 มิลลิลิตร เติมน้ำ NaOH ความเข้มข้น 0.05 โมลต่อลิตร ปริมาตร 4.3 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลาย แล้วปรับปริมาตรด้วย 95% Ethanol

4.1.3 สารละลาย Phenolphthalein indicator

ชั่ง Phenolphthalein indicator จำนวน 0.50xx กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย 95% Ethanol เขย่าให้เข้ากัน

4.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

4.2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน NaOH ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร

เปิดสารละลายมาตรฐาน NaOH ความเข้มข้น 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 1000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4.2.2 การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐาน NaOH

4.2.2.1 ชั่งสารมาตรฐาน Potassium hydrogen phthalate 0.1xxx กรัม ใส่ในบีกเกอร์ ขนาด 150 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 75 มิลลิลิตร เติมน้ำ Phenolphthalein indicator จำนวน 2-3 หยด

4.2.2.2 นำสารละลายข้อ 4.2.2.1 ไปไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐาน NaOH ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร จนถึงจุด End point (สารละลายจะเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพู)

4.2.2.3 บันทึกปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน NaOH ที่ใช้ในการไทเทรต

4.2.2.4 ทดสอบแบลงค์ (Blank) โดยไม่ใส่สารมาตรฐาน และทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับ ข้อ 4.2.2.1-4.2.2.3

4.3 การหาความถ่วงจำเพาะ (Specific gravity; Sp.Gr.)

4.3.1 ชั่งน้ำหนัก Density bottle พร้อมฝา และบันทึกน้ำหนัก

4.3.2 เทสารตัวอย่างอีทีฟอนใส่ Density bottle ปิดฝา ซับตัวอย่างที่ล้นออกมาจากขวดให้แห้ง นำไปชั่งและบันทึกน้ำหนัก

4.3.3 หา Density ของน้ำ โดยใช้น้ำแทนตัวอย่าง และดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 4.3.1-4.3.2

4.4 การเตรียมตัวอย่าง

4.4.1 ชั่งตัวอย่างใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร ให้มีเนื้อสารอีทีฟอนเท่ากับ 0.25 กรัม โดยคำนวณตามสูตร

$$\text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)} = \frac{0.25 \text{ (g)} \times 100 \text{ (g)}}{\text{เนื้อสารอีทีฟอนในตัวอย่าง (g)}}$$

เมื่อ 0.25 คือ เนื้อสารอีทีฟอนที่ต้องการเตรียม มีหน่วยเป็นกรัม

4.4.2 นำตัวอย่างที่ชั่งได้จากข้อ 4.4.1 ไปเติมน้ำกลั่นปริมาตร 150 มิลลิลิตร และ Thymol blue indicator จำนวน 3-5 หยด

4.5 วิธีวิเคราะห์

- 4.5.1 ตรวจสอบประสิทธิภาพของเครื่องไทเทรตอัตโนมัติ หรือตรวจสอบ pH-meter ด้วยการ Calibrate อิเล็กโทรด โดยใช้บัฟเฟอร์ pH 4, 7 และ 10 ในการตรวจสอบ และพิจารณาค่า Slope โดยมีเกณฑ์กำหนดอยู่ในช่วง 95 - 105% จากนั้นทำการทวนสอบอิเล็กโทรดโดยการวัดบัฟเฟอร์ pH 9.21 โดยพิจารณาเกณฑ์ยอมรับ ต้องมีค่าเท่ากับ 9.21 ± 0.05 ตามเกณฑ์กำหนดของ APHA, AWWA & WEF (2023)
- 4.5.2 นำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้จากข้อ 4.4.2 ไปไทเทรตกับสารละลายมาตรฐาน NaOH 0.1 โมลต่อลิตร ให้มีค่า pH 9.3 (สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำเงิน)
- 4.5.3 นำสารละลายจากข้อ 4.5.2 ไปต้มบน Hot plate ที่อุณหภูมิ 90 ± 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (สารละลายจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลือง) จากนั้นทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
- 4.5.4 นำสารละลายจากข้อ 4.5.3 ไปไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐาน NaOH 0.1 โมลต่อลิตร ให้มีค่า pH 9.3 บันทึกปริมาตรสารละลายมาตรฐาน NaOH ที่ใช้ในการไทเทรต
- 4.5.5 ทดสอบแบลнк (Blank) โดยไม่ใส่ตัวอย่าง และทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่าง ตามข้อ 4.5.2-4.5.4

5. คำนวณ

5.1 ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน NaOH

$$N(\text{NaOH}) = \frac{W_{\text{KHP}} \times 1000}{V \times 204.228}$$

เมื่อ $N(\text{NaOH})$	คือ	ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน NaOH มีหน่วยเป็นโมลต่อลิตร
W_{KHP}	คือ	น้ำหนัก $\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$ มีหน่วยเป็นกรัม
V	คือ	ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน NaOH ที่ใช้ไทเทรตกับ $\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$ มีหน่วยเป็นมิลลิลิตร
204.228	คือ	มวลโมเลกุลของ $\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$

5.2 ความถ่วงจำเพาะ

$$\text{Density ของตัวอย่าง} = \frac{(\text{น้ำหนัก Density bottle + ตัวอย่าง}) - \text{น้ำหนัก Density bottle}}{\text{ปริมาตรของ Density bottle}}$$

$$\text{ความถ่วงจำเพาะ} = \frac{\text{Density ของตัวอย่าง}}{\text{Density ของน้ำ}}$$

5.3 ปริมาณสารออกฤทธิ์อีทีฟอน

คำนวณปริมาณสารออกฤทธิ์อีทีฟอนที่มีหน่วยเป็นร้อยละโดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก (% W/W) ตามสมการที่ 1 และมีหน่วยเป็นร้อยละโดยน้ำหนักต่อปริมาตร (% W/V) ตามสมการที่ 2

$$\% \text{อีทีฟอน (W/W)} = \frac{(V_2 - V_1) \times C \times 14.45}{W_{\text{ethephon}}} \dots\dots\dots(1)$$

$$\% \text{ อีทีฟอน (W/V)} = \frac{(V_2 - V_1) \times C \times 14.45 \times \text{Sp.Gr.}}{W_{\text{ethephon}}} \dots\dots\dots(2)$$

เมื่อ V_1	คือ ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน NaOH ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร ที่ใช้ในการไทเทรต Blank มีหน่วยเป็นมิลลิลิตร
V_2	คือ ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน NaOH ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร ที่ใช้ในการไทเทรตตัวอย่างอีทีฟอน มีหน่วยเป็นมิลลิลิตร
C	คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน NaOH ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร มีหน่วยเป็นโมลต่อลิตร
W_{ethephon}	คือ น้ำหนักตัวอย่างอีทีฟอน มีหน่วยเป็นกรัม
14.45	คือ ค่าคงที่ของผลคูณของมวลโมเลกุลอีทีฟอน กับค่าเปอร์เซ็นต์หารด้วย 1 หน่วยปริมาตรความเข้มข้นของ NaOH
Sp.Gr.	คือ ค่าความถ่วงจำเพาะของตัวอย่าง

6. เอกสารอ้างอิง

CIPAC Handbook: Vol.H: Analysis of Technical and Formulated Pesticides.1998. Page 165-170
(Ethephon373/TK/M/-)

Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater APHA, AWWA & WEF, 24rd
Edition 2023, 3120 B.

แพกโคลบิวทราซอล
โดย High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

.....

1. ขอบข่ายและวัตถุประสงค์

เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์แพกโคลบิวทราซอลในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร (สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช)

2. หลักการ

แพกโคลบิวทราซอล สามารถวิเคราะห์ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ซึ่งเป็นการแยกสารโดยใช้เครื่องสูบแรงดันสูง (High pressure pump) สูบสารละลาย Acetonitrile:H₂O ที่อัตราส่วน 55:45 ซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ (Mobile Phase) พาสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าช่องฉีดสาร (Injector) เคลื่อนที่ผ่านอนุภาคที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ (Column) ชนิด Sunfire C18 เมื่อสารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์แล้วจะถูกแยกออกจากคอลัมน์ ซึ่งแพกโคลบิวทราซอลใช้เวลาหน่วงในคอลัมน์และถูกแยกออกมาที่เวลา 5.30 นาที จากนั้นสารจะผ่านเข้าสู่เครื่องตรวจวัดชนิด UV-Detector และทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 225 นาโนเมตร โดยสัญญาณที่บันทึกได้จะมีลักษณะเป็นพีกซึ่งเรียกว่า โครมาโทแกรม

3. เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี

3.1 เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์

- 3.1.1 เครื่องโครมาโทกราฟีประสิทธิภาพสูง (HPLC)
- 3.1.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 5 ตำแหน่ง
- 3.1.3 เครื่อง Ultrasonic
- 3.1.4 ชุดกรองสารละลาย Mobile phase ขนาด 1000 มิลลิลิตร
- 3.1.5 เครื่องแก้วและวัสดุอื่นๆ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์

3.2 สารเคมี

- 3.2.1 สารมาตรฐานแพกโคลบิวทราซอล ความเข้มข้นมากกว่า 95%
- 3.2.2 สารแพกโคลบิวทราซอลชนิดเทคนิคัลเกรด ความเข้มข้นมากกว่า 90%
- 3.2.3 Methanol (CH₃OH) ชนิด HPLC grade
- 3.2.4 Acetonitrile (CH₃CN) ชนิด HPLC grade
- 3.2.5 Acetonitrile (CH₃CN) ชนิด AR grade
- 3.2.6 น้ำกลั่นที่มีการกลั่นซ้ำ 2 ครั้ง โดยมีค่าความต้านทานไฟฟ้า ไม่ต่ำกว่า 18.2 mΩ/cm

4. วิธีการ

4.1 การเตรียมสารเคมี

4.1.1 สารละลายทำความสะอาดระบบเครื่อง HPLC

4.1.1.1 สารละลาย 20% CH₃OH ชนิด HPLC grade (สาย Seal wash)

- 1) ตวงน้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปริมาตร ขนาด 500 มิลลิลิตร
- 2) ตวง CH₃OH ชนิด HPLC grade ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปริมาตร ขนาด 500 มิลลิลิตร จากข้อ 1) ปิดฝา และเขย่าให้เข้ากัน
- 3) นำมากรองด้วยชุดกรองสารละลายผ่าน Nylon membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

- 4) เทสารละลาย 20% CH₃OH ที่ผ่านการกรองจากข้อ 3) ใส่ในขวดปริมาตร ขนาด 500 มิลลิลิตร ปิดฝาพอหลวมๆ
- 5) นำไปไล่อากาศ (Degas) ด้วยเครื่อง Ultrasonic เป็นเวลา 30 นาที
- 4.1.1.2 100% CH₃OH ชนิด HPLC grade (สาย A และ สาย B)
 - 1) นำ CH₃OH ชนิด HPLC grade มากรองด้วยชุดกรองสารละลายผ่าน Nylon membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ปริมาตร 500 มิลลิลิตร
 - 2) เท CH₃OH ที่ผ่านการกรอง จากข้อ 1) ใส่ในขวดปริมาตร ขนาด 500 มิลลิลิตร ปิดฝาพอหลวมๆ
 - 3) นำไปไล่อากาศ (Degas) ด้วยเครื่อง Ultrasonic เป็นเวลา 30 นาที
- 4.1.1.3 น้ำกลั่น (สาย C)
 - 1) นำน้ำกลั่นมากรองด้วยชุดกรองสารละลายผ่าน Nylon membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ปริมาตร 500 มิลลิลิตร
 - 2) เทน้ำกลั่นที่ผ่านการกรองจากข้อ 1) ใส่ในขวดปริมาตร ขนาด 500 มิลลิลิตร ปิดฝาพอหลวมๆ
 - 3) นำไปไล่อากาศ (Degas) ด้วยเครื่อง Ultrasonic เป็นเวลา 30 นาที
- 4.1.2 เตรียมสารละลาย Mobile phase สาร CH₃CN : H₂O ที่อัตราส่วน 55:45 (สาย D)
 - 4.1.2.1 ตวงน้ำกลั่นปริมาตร 450 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปริมาตร ขนาด 1000 มิลลิลิตร
 - 4.1.2.2 ตวง CH₃CN ชนิด HPLC grade ปริมาตร 550 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปริมาตร ขนาด 1000 มิลลิลิตร จากข้อ 4.1.2.1 ปิดฝา และเขย่าให้เข้ากัน
 - 4.1.2.3 นำมากรองด้วยชุดกรองสารละลายผ่าน Nylon membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร
 - 4.1.2.4 เทสารละลาย Mobile phase ที่ผ่านการกรองจากข้อ 4.1.2.3 ใส่ในขวดปริมาตร ขนาด 1000 มิลลิลิตร ปิดฝาพอหลวมๆ
 - 4.1.2.5 นำไปไล่อากาศ (Degas) ด้วยเครื่อง Ultrasonic เป็นเวลา 30 นาที
- 4.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน
 - 4.2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Stock standard ที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชั่งสารมาตรฐานแพกโคลบิวทราซอลน้ำหนัก 0.025xx กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายสารด้วยสารละลาย Mobile phase ปริมาตร 40 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่อง Ultrasonic เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และปรับปริมาตรด้วยสารละลาย Mobile phase
 - 4.2.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานขั้นใช้งาน (Working standard) เพื่อทำ Calibration curve ที่ความเข้มข้น 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร
 - 4.2.2.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐานจากข้อ 4.2.1 ปริมาตร 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารละลาย Mobile phase
 - 4.2.2.2 กรองสารละลายมาตรฐานจากข้อ 4.2.2.1 ผ่าน Nylon syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ใส่ในขวดฉีดยา ขนาด 2 มิลลิลิตร เพื่อรอฉีดเข้าเครื่อง HPLC
- 4.3 การเตรียมสารละลายตัวอย่างแพกโคลบิวทราซอล
 - 4.3.1 ชั่งตัวอย่าง 0.015xx- 0.30xxx กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วยสารละลาย Mobile phase ปริมาตร 90 มิลลิลิตร
 - 4.3.2 นำไปเขย่าด้วยเครื่อง Ultrasonic เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และปรับปริมาตรด้วย Mobile phase

4.3.3 กรองสารละลายตัวอย่างจากข้อ 4.3.2 ผ่าน Nylon syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ใส่ในขวดฉีดสาร ขนาด 2 มิลลิลิตร เพื่อฉีดเข้าเครื่อง HPLC

4.4 วิธีวิเคราะห์

4.4.1 นำสารที่ใช้ทำความสะอาดระบบเครื่อง HPLC (สาย Seal wash, A, B และ C) และสารละลาย Mobile phase (สาย D) จากข้อ 4.1.1 และ 4.1.2 ใส่เข้าเครื่อง HPLC ให้ตรงกับสายที่ระบุที่เครื่อง HPLC

4.4.2 เปิดเครื่อง HPLC ตามวิธีปฏิบัติงานและปรับตั้งสภาวะของเครื่อง ดังนี้

Column	:	Sunfire C18, 5 μ m, (4.6 mm x 150 mm)
Temperature	:	30 °C
Detector	:	PDA λ 225 nm
Mobile phase	:	55:45 (Acetonitrile:H ₂ O)
Flow rate	:	1.0 mL/min
Injection volume	:	10 μ L
Run time	:	10 min

4.4.3 ตรวจสอบระบบ System suitability ของเครื่อง HPLC โดยการนำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้จากข้อ 4.2 ที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ด้วยระบบฉีดอัตโนมัติ จำนวน 5 ซ้ำ ที่มีการปรับตั้งสภาวะเครื่องตามข้อ 4.4.2 จากนั้นคำนวณหาค่า %RSD ของค่า Retention time (R_t) และ Peak area หาค่า Tailing Factor และหาค่า Number of theoretical plates (N) ซึ่งค่าที่ได้จะต้องผ่านเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐานที่กำหนด เช่น USP43 (2022) เป็นต้น

4.4.4 นำสารละลายมาตรฐานจากข้อ 4.2 และสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้ จากข้อ 4.3 ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ด้วยระบบฉีดอัตโนมัติ ที่มีการปรับตั้งสภาวะเครื่องตามข้อ 4.4.2

4.4.5 คำนวณความเข้มข้นของสารแพกโคลบิวทราซอลที่ได้จากเครื่อง HPLC ในหน่วยความเข้มข้น มิลลิกรัมต่อลิตร โดยคำนวณค่าเทียบกับ Calibration curve ของสารละลายมาตรฐาน

5. คำนวณ

คำนวณหาค่า (%) แพกโคลบิวทราซอล

$$\% \text{ แพกโคลบิวทราซอล} = \frac{C_S \times D_S \times 100}{W_{PBZ} \times 10^6}$$

เมื่อ C_S คือ ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่อ่านได้จาก Calibration curve มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร

D_S คือ Dilution Factor ที่ใช้ในการเจือจางตัวอย่าง

W_{PBZ} คือ น้ำหนักของตัวอย่างแพกโคลบิวทราซอล มีหน่วยเป็นกรัม

6. เอกสารอ้างอิง

CIPAC Handbook: Vol.1C: Analysis of Technical and Formulated Pesticide, 1985.

Page 2236-2240

United States Pharmacopeia 43 <621>. 2022. Chromatography (System suitability)



50 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว
เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900