การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ในผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตร

Development and Validation Method for Analyzing Indole acetic acid (IAA) and Gibberellic acid (GA_3) in Chemical Agricultural Substances

เพชรรัตน์ ศิริวิ *สุพิศสา ทองเขียว* *สาธิดา โพธิ์น้อย*

Phetcharat Siriwi *Supissa Thongkheaw* *Sathida Phonoi*

กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ABSTRACT

The analysis method for Indole acetic acid (IAA) and Gibberellic acid (GA_3) in chemical agricultural substances samples was developed and validated by high performance liquid chromatography (HPLC) technique. The sample preparation with ethyl acetate combined with solid phase extraction technique has been developed. The samples from extraction were detected by HPLC-PDA at wavelength of 206 nm. The separation was carried out on a Nucleosil C_{18} reversed-phase column, using methanol/water containing 0.025% phosphoric acid (35:65, v/v) as the isocratic mobile phase at the flow rate of 1.0 mL/min., the Indole acetic acid (IAA) and Gibberellic acid (GA_3) were eluted at 9.74 and 6.80 min., respectively. Good linearities were found within the range of 0.005-5.0 mg/L for Indole acetic acid and 0.05-5.0 mg/L for Gibberellic acid (GA_3) with the correlation coefficients at 0.9998 and 0.9998, respectively. The limit of detections (LOD) were 0.001 mg/L for Indole acetic acid (IAA) and 0.005 mg/L for Gibberellic acid (GA_3), and the limit of quantitation were 0.005 mg/L and 0.05 mg/L for Indole acetic acid (IAA) and Gibberellic acid (GA_3), respectively. Trueness of three concentration level was in the range of 86.76-106.57 and 81.30-104.70 for Indole acetic acid (IAA) and Gibberellic acid (GA_3), respectively. The precision of the method was tested with HorRat value, the HorRat value of Indole acetic acid (IAA) and Gibberellic acid (GA_3) was in the range of 0.30-0.62 and 0.32-0.35 for Indole acetic acid (IAA) and Gibberellic acid (GA_3), respectively. Therefore, this method can be used for the determination of Indole acetic acid (IAA) and Gibberellic acid (GA_3) in chemical agricultural substances samples with the analytical scope in the concentration range of 0.013-5.00 and 0.125-5.00 mg/L, respectively, accurately and precisely.

Keywords: Indole acetic acid (IAA) Gibberellic acid (GA_3) Solid phase extraction Chemical agricultural substances

บทคัดย่อ

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตร โดยใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ได้ทำการพัฒนาวิธีการสกัดตัวอย่างด้วย Ethyl acetate และนำมา Cleanup ด้วยเทคนิค Solid phase extraction และทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC-PDA โดยใช้ Column Nucleosil C_{18} (5 µm, 4.6 mm x 150 mm) และใช้ Mobile phase เป็น 35:65 (Methanol:0.025% H_3PO_4 in Water) ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที จากผลการทดลองพบว่าค่า Retention time ของสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่วิเคราะห์ได้มีค่าเท่ากับ 9.74 และ 6.80 นาที ตามลำดับ ค่าความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.005-5.0 และ 0.05-5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ค่า r เท่ากับ 0.9998 และ 0.9998 ตามลำดับ ได้ค่าขีดจำกัดในการตรวจพบ (LOD) ของสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) มีค่าเท่ากับ 0.001 และ 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และขีดจำกัดในการตรวจวัดเชิงปริมาณ (LOQ) มีค่าเท่ากับ 0.005 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากการพิสูจน์ความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง และสูง พบว่าสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ให้ %Recovery อยู่ในช่วง 86.76-106.57 และ 81.30-104.70 ตามลำดับ และจากการประเมินค่า HorRat ที่ได้จากการทดสอบความเที่ยง พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 0.30-0.62 และ 0.32-0.35 ซึ่งอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับของ AOAC (2016) ดังนั้นวิธีนี้สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตรที่มีขอบข่ายในการวิเคราะห์อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.013-5.00 และ 0.125-5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ

คำหลัก : กรดอินโดล-3-แอซีติก (ไอเอเอ) กรดจิบเบอเรลลิก (จีเอ 3) การสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง ผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตร

คำนำ

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth regulators; PGRs) จัดเป็นสารสังเคราะห์ที่มีคุณสมบัติคล้ายฮอร์โมนพืช (Plant hormones) โดยทั่วไปมักจะเรียกสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชว่า “ฮอร์โมน” ซึ่งบทบาทหน้าที่ของฮอร์โมนพืชจะเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของพืชทุกขั้นตอนตั้งแต่การงอก การพัฒนาของพืช การออกดอกติดผล การพัฒนาการของผล การสุก จนกระทั่งต้นตาย ฮอร์โมนพืชเป็นสารอินทรีย์ที่พืชสร้างขึ้นเองในปริมาณน้อยมาก โดยพืชจะสร้างสารดังกล่าวที่อวัยวะหรือเนื้อเยื่อส่วนหนึ่งแล้วเคลื่อนย้ายไปยังอีกส่วนหนึ่ง และมีผลต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาที่ข่อนข้างเฉพาะเจาะจงภายในพืช หรือเป็นสารที่พืชสร้างขึ้นโดยอวัยวะหรือเนื้อเยื่อนั้นและมีผลโดยตรงกับอวัยวะหรือเนื้อเยื่อนั้นๆ

Indole acetic acid (IAA) เป็นสารกลุ่มออกซิน (Auxins) ที่พืชสามารถสร้างขึ้นเองได้ มีสูตรโครงสร้างดังภาพที่ 1 สารกลุ่มนี้มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขยายขนาดของเซลล์ การแบ่งตัวของเซลล์ในแคมเบียม การขยายขนาดของใบ การเกิดราก การขยายขนาดของผล ป้องกันการหลุดร่วงของใบ ดอก ผล ยับยั้งการแตกตาข้าง ส่วนของพืชที่มีการสร้างมากคือบริเวณปลายยอด ปลายราก ผลอ่อนและบริเวณที่มีปริมาณเนื้อเยื่อเจริญอยู่มาก (Meristematic tissue) ปริมาณ Indole acetic acid (IAA) ในเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิดจะมีมากน้อยแตกต่างกันไป ส่วนที่กำลังมีการเจริญเติบโตจะมีปริมาณ Indole acetic acid (IAA) มาก แต่ส่วนที่มี Indole acetic acid Oxidase สูงจะมีปริมาณของ Indole acetic acid (IAA) ต่ำ และพืชจะมีกลไกลในการรักษาระดับปริมาณ Indole acetic acid ภายในเนื้อเยื่อพืช โดยมีระบบการสร้างและการทำลายไปพร้อมๆกัน เนื้อเยื่อที่กำลังมีการเจริญเติบโตจะมีการสร้างมากกว่าการทำลาย ส่วนเนื้อเยื่อที่มีอายุมากจะมีการทำลายมากกว่าการสร้าง (ทวีศักดิ์, 2559)

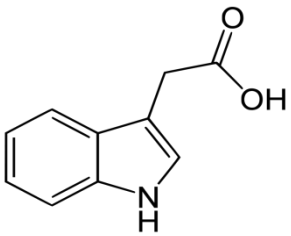

Figure 1. Chemical structure of indole acetic acid (IAA)

Gibberellic acid สารกลุ่มนี้มีทั้งที่พืชสร้างขึ้นเองและเชื้อราบางชนิดสร้างขึ้น มีสูตรโครงสร้างดังภาพที่ 2 เป็นสารที่เกี่ยวข้องกับการยืดตัวของเซลล์ (Cell elongation) ช่วยขยายขนาดของผล ทำลายการพักตัวของพืช กระตุ้นการงอกของเมล็ด กระตุ้นการเจริญของพืชทั้งต้นและผล กระตุ้นการออกดอกของพืชบางชนิดหรือยับยั้งการออกดอกของพืชบางชนิด ปรับเปลี่ยนเพศดอก ทำให้เกิดดอกเพศผู้ กระตุ้นให้เกิดผลแบบไม่มีเมล็ดในพืชบางชนิด แหล่งที่มีการสร้างจิบเบอเรลลินในพืชเช่น กิ่งที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว เมล็ดและผลที่กำลังพัฒนา บริเวณที่กำลังยืดตัวเช่น ปลายยอดและปลายราก ปัจจุบันมีสารประกอบประเภทนี้มากกว่า 80 ชนิด (ทวีศักดิ์, 2559) แต่ที่มีการนำมาใช้ทางการเกษตรมากที่สุดคือสาร Gibberellic acid (GA_3) ซึ่งพืชสามารถสร้างได้ปริมาณน้อยมาก โดยสาร Gibberellic acid (GA_3) ที่นำมาใช้ทางการเกษตรนั้นได้มาจากการเพาะเลี้ยงเชื้อราบางชนิดแล้วสกัดสารออกมา เนื่องจากปัจจุบันยังไม่สามารถสังเคราะห์สาร Gibberellic acid (GA_3) ได้ด้วยวิธีทางเคมี (พีรเดช, 2537)

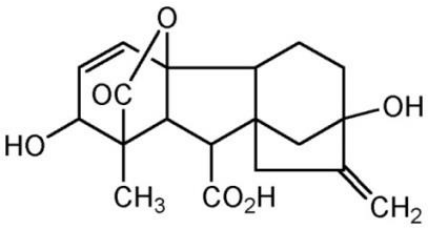

Figure 2. Chemical structure of gibberellic acid (GA_3)

ปัจจุบันเกษตรกรได้มีการใช้ผลิตภัณฑ์สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชกันอย่างแพร่หลาย ทั้งที่มีและไม่มีการขึ้นทะเบียน หรือขอใบอนุญาต วางจำหน่ายในท้องตลาดเป็นจำนวนมาก และมีการอ้างถึงสรรพคุณกันมากมาย สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชจัดเป็นวัตถุอันตรายทางการเกษตรชนิดที่ 3 ตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตรายทางการเกษตร ซึ่งวัตถุประสงค์ของพระราชบัญญัติดังกล่าวเพื่อตรวจสอบ ควบคุม กำกับ ดูแล ผู้ประกอบกิจการให้ปฏิบัติตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย ทั้งนี้เพื่อป้องกันอันตรายที่จะเกิดกับบุคคล สัตว์ พืช ทรัพย์สิน และสิ่งแวดล้อม คุ้มครองเกษตรกร และควบคุมผู้ประกอบการ ซึ่งประโยชน์ที่เกษตรกรจะได้รับคือใช้วัตถุอันตรายที่มีคุณภาพ ลดความเสียหายที่เกิดจากการใช้ผิด ลดต้นทุนในการผลิต ผู้ประกอบการไม่กล้าละเมิดกฎหมาย และเกษตรกรถูกเอารัดเอาเปรียบในทางการค้าน้อยลง (ทวีศักดิ์, 2559)

ดังนั้นวิธีการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตรจึงต้องเป็นวิธีที่ได้มาตรฐาน และสามารถตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ได้ ซึ่งปัจจุบันวิธีการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตรที่มีใช้ในห้องปฏิบัติการเป็นวิธีที่มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยาก ใช้เวลานานในการวิเคราะห์ ใช้ปริมาณสารเคมีและตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นพิษในปริมาณที่สูง ซึ่งอาจก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมเป็นพิษ ปัญหาสุขภาพของผู้ทำการทดลองเอง และมีค่าใช้จ่ายสูงในการกำจัดของเสียดังกล่าว นอกจากนี้วิธีการวิเคราะห์แบบเดิมยังคงมีปัญหาการถูกรบกวนของเมทริกซ์ที่มีอยู่ในตัวอย่าง เมื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารในระดับต่ำ ๆ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้มีการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์

วัตถุเคมีการเกษตร ให้มีความถูกต้อง แม่นยำ น่าเชื่อถือ สะดวกในการนำไปใช้กับเครื่องมือวิเคราะห์ เพื่อตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตรได้อย่างมีประสิทธิภาพและเหมาะสม

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่อง High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) ยี่ห้อ Water รุ่น Alliance e2695
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 5 ตำแหน่ง
3. เครื่องวัด pH-Meter
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง
5. เครื่องระเหยสารสุญญากาศ (Rotary Evaporator)
6. เครื่อง Ultrasonic bath
7. ชุดกรองสารละลาย Mobile phase
8. ชุดสกัดสาร SPE-Cartridge
9. Nylon syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร และ Nylon membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร
10. Syringe ขนาด 5.0 มิลลิลิตร
11. Vial ขนาด 2.0 มิลลิลิตร
12. เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดวัดปริมาตรขนาด กรวยแยกสาร ปิเปต บีกเกอร์ กระบอกตวง ขวดก้นกลม
13. สารมาตรฐาน ได้แก่ Gibberellic acid (GA_3) ความบริสุทธิ์ 97.9% และ Indole acetic acid (IAA) ความบริสุทธิ์ 99.6%
14. สารเคมี ได้แก่ Methanol ชนิด HPLC grade และ Ortho-phosphoric acid Formic acid Ethyl acetate Hydrochloric acid Potassium hydroxide ชนิด AR grade
15. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตร

วิธีการ

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐานของสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) โดยเตรียม Stock standard ที่ความเข้มข้นประมาณ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จากสารมาตรฐานของ Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) เพื่อนำไปเตรียม Intermediate standard (ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร) Working standard ที่ความเข้มข้นต่างๆ สำหรับทำเป็น Calibration curve และ Spike ลงในตัวอย่าง

2. หาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์สาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ด้วยเทคนิค HPLC

2.1 สภาวะการทำงานของเครื่อง HPLC (ยี่ห้อ Water รุ่น Alliance e2695, 2998 PDA-Detector) ที่เริ่มใช้ในการวิเคราะห์สาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ดังนี้ (ดัดแปลงมาจากวิธี Tansupo *et al.* (2010))

Column	:	Nucleosil C18, 5 µm, 4.6 mm x 150 mm
Guard column:		Nucleosil C18, 5 µm
Temperature	:	30 °C
Detector	:	PDA λ 208 nm
Mobile phase	:	35:65 (Methanol:0.025% H_3PO_4 in Water), pH 2.83
Flow rate	:	0.8 ml/min.

Injection volume: 10 µl

Run Time : 15 min.

2.2 หาสภาวะการทำงานของเครื่อง HPLC แบบ Isocratic elution จากสภาวะข้อ 2.1 ดังนี้

1) ปรับเปลี่ยนสภาวะอัตราส่วนของ Mobile phase ที่อัตราส่วน 3 อัตราส่วนดังนี้คือ อัตราส่วน 30:70 (Methanol:0.025% H_3PO_4 in Water) ที่ pH 2.76 อัตราส่วน 35:65 (Methanol:0.025% H_3PO_4 in Water) ที่ pH 2.83 และอัตราส่วน 40:60 (Methanol:0.025% H_3PO_4 in Water) ที่ pH 2.86

2) ปรับเปลี่ยนสภาวะอัตราการไหลของ Mobile phase ที่ 0.8 1.0 และ 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที

3) ปรับเปลี่ยนค่าความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัดสารที่ความยาวคลื่นที่ 206 208 และ 280 นาโนเมตร

3. การเตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตร

3.1 การสกัดตัวอย่างก่อนนำไป Clean-up ด้วย Cartridge (ดัดแปลงมาจากวิธีของ Tansupo *et al.* (2010))

การปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอด Centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร นำไป Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เทลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร นำสารละลายตัวอย่างปรับ pH ให้เป็น 2.5 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก และสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ นำมาสกัดด้วย Ethyl acetate ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง นำไประเหยให้แห้งด้วยเครื่อง Evaporator ที่อุณหภูมิ 40-42 °C นำมาละลายด้วยสารละลายกรดฟอร์มิกความเข้มข้น 1% แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 25 มิลลิลิตร แล้วนำไป Clean-up ด้วย Cartridge ต่อไป

3.2 การ Clean-up ตัวอย่างด้วย SPE-Cartridge มีขั้นตอนดังนี้

3.2.1 การหาชนิดของ SPE-Cartridge ที่เหมาะสมในการสกัดสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ทำการศึกษาชนิดของ SPE-Cartridge จำนวน 3 ชนิด คือ SSQAX Cartridge HR-XA Cartridge และ HLB Cartridge ชนิดละ 3 ซ้ำ โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐาน Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ นำไปผ่านลงใน SPE-Cartridge แต่ละชนิด จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วยเทคนิค HPLC

3.2.2 หาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่างด้วย SPE-Cartridge ที่ได้จากข้อ (3.2.1) โดยทำการทดลองที่สภาวะละ 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบวิธีการสกัดตัวอย่างทั้งหมด 2 วิธี โดยวิธีที่ 1 เป็นสภาวะที่ได้จาก Tansupo *et al.* (2010) และวิธีที่ 2 เป็นสภาวะที่ได้จาก Cui *et al.* (2015)

3.2.3 หาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่างด้วย SPE-Cartridge ที่ได้จากข้อ (3.2.2) ดังนี้

1) หาความเข้มข้นของสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ Cartridge ชนิด HR-XA สามารถจุได้ ที่ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานทั้ง 2 ชนิด ที่ความเข้มข้น 0.5 5.0 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ก่อนนำไปผ่านลงใน Cartridge ชนิด HR-XA และวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วยเทคนิค HPLC

2) หาปริมาณสารตัวอย่างที่เหมาะสมที่ใช้ในการผ่านลงใน Cartridge ชนิด HR-XA ที่ปริมาตรละ 3 ซ้ำ โดยทำการศึกษาที่ปริมาตรสารตัวอย่างเท่ากับ 3.0 5.0 และ 7.0 มิลลิลิตร นำไปผ่านลงใน Cartridge ชนิด HR-XA และวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วยเทคนิค HPLC

4. เปรียบเทียบวิธีเดิมที่มีในห้องปฏิบัติการและวิธีใหม่ที่ได้พัฒนาขึ้น

ทำการทดสอบการเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์เดิมที่มีในห้องปฏิบัติการและวิธีใหม่ที่ได้พัฒนาขึ้นโดยการทดสอบ Sample blank (ตัวอย่างที่มีสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ในระดับต่ำ ๆ หรือไม่มี) ที่เติมสารมาตรฐาน Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้น 0.10 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบของแต่ละวิธีจำนวน 10 ซ้ำ นำผลการทดสอบแต่ละวิธีที่ได้มาคำนวณหาค่าทางสถิติ (t-test) โดยมีเกณฑ์การยอมรับ $t_{stat} < t_{crit}$ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

5. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ได้พัฒนาขึ้น

5.1 หาความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Selectivity หรือ Specificity) ของวิธีวิทดสอบ

ทำการทดสอบโดยการเติมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มขัน 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในตัวอย่างที่มี Matrix ที่แตกต่างกันทั้งหมดจำนวน 3 ชนิดตัวอย่าง การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของ Matrix ที่อยู่ในแต่ละตัวอย่างเทียบกับสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มขัน 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวนตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด ดังนี้

1) ตัวอย่างสารชีวอินทรีย์สกัดจากธรรมชาติพืชและสัตว์มีลักษณะเป็นสารละลายใส

2) ตัวอย่างสารสกัดสาหร่ายเข้มข้นจากธรรมชาติมีลักษณะเป็นสารละลายสีดำข้น เหนียวหนืด

3) ตัวอย่างสารสกัดสาหร่ายจากธรรมชาติผสมกับสารที่มีประโยชน์ต่อพืชเช่น กรดอะมิโน ฮิวมิก มีลักษณะเป็นสารละลายสีเขียว สีเหลือง สีน้ำตาล และสีดำ ข้น เหนียวหนืด

5.2 ศึกษาผลของ Matrix effect ของวิธีทดสอบ

ทำการทดสอบ Matrix calibration curve เปรียบเทียบกับ Standard calibration curve ของสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ช่วงความเข้มข้น 0.05-0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยแบ่งออกเป็น 2 ชุด ชุดแรกเตรียมในสารละลาย Mobile phase (35:65;Methanol:0.025% H_3PO_4 in Water) และชุดที่ 2 เตรียมใน Matrix ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตร (Sample blank) ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบ นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงไป (แกน x) กับค่าพื้นที่ใต้พีกที่อ่านได้จากเครื่อง HPLC (แกน y) จากนั้นนำค่าความชันจากสมการเส้นตรงที่ได้จากทั้ง 2 ชุดการทดสอบมาเปรียบเทียบกัน โดยพิจารณาค่า %RPD ในการเปรียบเทียบ ซึ่งมีเกณฑ์การยอมรับ < 10% ตาม NATA (2018)

5.3 หาค่า Limit of Detection (LOD) และค่า Limit of Quantitation (LOQ)

ทำการทดสอบ Sample blank (ตัวอย่างที่มีสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ในระดับต่ำ ๆ หรือไม่มี) ที่มีการเติมสารละลายมาตรฐาน Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ ลงใน Sample blank ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบ 10 ซ้ำ บันทึกข้อมูลคำนวณหาค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) คำนวณค่า LOD และ LOQ ตามสูตร LOD = 3 S'_0 และ LOQ = 10 S'_0 ตามวิธีของ EURACHEM (2014)

5.4 การพิสูจน์ความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision) ที่ระดับ LOQ

โดยทำการทดสอบสารมาตรฐานที่ระดับ LOQ ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ นำผลการวิเคราะห์มาคำนวณทางสถิติ ประเมินค่า Trueness โดยมีเกณฑ์การยอมรับ %Recovery อยู่ในช่วง 80-110 และประเมินค่า Precision ด้วยการหาค่า HorRat อยู่ในช่วง 0.3-1.3 ตามเกณฑ์การยอมรับของ AOAC (2016)

5.5 หาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity) และช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ (Range)

โดยเตรียมสารมาตรฐาน Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) จำนวน 7 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานกับค่าพื้นที่ใต้พีกที่อ่านได้จากเครื่อง HPLC พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรงคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient: r) ซึ่งมีเกณฑ์การยอมรับที่ค่า $r \geq 0.995$

5.6 พิสูจน์ความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision)

ทำการทดสอบสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง และสูง ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) โดยทำการทดสอบต่างวันเวลาแบบ Intermediate precision (ทำการทดสอบจำนวน 1 ชุดการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 10 วัน) นำผลการวิเคราะห์มาคำนวณทางสถิติ ประเมินค่า Trueness โดยมีเกณฑ์การยอมรับ %Recovery อยู่ในช่วง 80-110 และประเมินค่า Precision ด้วยการหาค่า HorRat อยู่ในช่วง 0.3-1.3 ตามเกณฑ์การยอมรับของ AOAC (2016)

5.7 ทดสอบความคงทนของวิธี (Ruggedness)

ทำการทดสอบโดยการปรับเปลี่ยนสภาวะที่มีผลกระทบต่อการวิเคราะห์สาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) อย่างน้อย 3 สภาวะดังนี้ การทดสอบปริมาณตัวอย่างที่ใช้ในการสกัด การทดสอบค่า pH ที่ใช้ในการสกัด และการทดสอบปริมาณ Solvent ที่ใช้ในการสกัดตัวอย่าง

5.8 เก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตร จังหวัดราชบุรี ปทุมธานี นนทบุรี นครปฐม สุพรรณบุรี สมุทรสงคราม สมุทรสาคร

6. วิเคราะห์หาปริมาณสารตัวอย่าง Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ในตัวอย่างจริงของผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตรที่จำหน่ายในท้องตลาด

7. คำนวณผลการทดสอบ ประเมินผล และรวบรวมผลการทดสอบ

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2562 สิ้นสุด กันยายน 2564

สถานที่ทำการทดลอง

1. สถานที่สำรวจและเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตร จังหวัดราชบุรี ปทุมธานี นนทบุรี นครปฐม สุพรรณบุรี สมุทรสงคราม สมุทรสาคร

2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยพืชวัตถุเคมีการเกษตรและนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตร กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC ในการวิเคราะห์สาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3)

1.1 อัตราส่วนของ Mobile phase ที่เหมาะสมในการแยกสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3)

จากผลการทดสอบอัตราส่วนของ Mobile phase ที่ใช้ในการแยกสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ของอัตราส่วน Methanol ต่อสารละลาย 0.025% H_3PO_4 ทั้ง 3 อัตราส่วน

Table 1. The results of mobile phase ratio for separation indole acetic acid (IAA) and gibberellic acid (GA_3) by high performance liquid chromatography (HPLC)

Mobile phase Ratio	Retention time (R_t) Gibberellic acid (GA_3) (min.)	Retention time (R_t) Indole acetic acid (IAA) (min.)
30:70	10.99	14.63
35:65	6.80	9.74
40:60	4.82	7.02

พบว่าอัตราส่วนของ Mobile phase ที่ใช้ในการแยกสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่เหมาะสมที่สุดคืออัตราส่วน 35:65 ที่อัตราส่วน 30:70 ใช้เวลาในการแยกสารทั้ง 2 ชนิดออกจากคอลัมน์นานเกินไป และที่อัตราส่วน 40:60 ใช้เวลาในการแยกสารทั้ง 2 ชนิดออกจากคอลัมน์เร็วเกินไปทำให้ Base line ในการวิเคราะห์สารไม่นิ่ง (ตารางที่ 1)

1.2 อัตราการไหลของ Mobile phase ที่เหมาะสมในการแยกสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3)

จากผลการทดสอบอัตราการไหลของ Mobile phase ที่ใช้ในการแยกสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อัตราการไหลของ Mobile phase ที่แตกต่างกัน

Table 2. The results of mobile phase flow rate for separation indole acetic acid (IAA) and gibberellic acid (GA_3) by high performance liquid chromatography (HPLC)

Flow rate of Mobile phase (mL/min.)	Retention time (R_t) Gibberellic acid (GA_3) (min.)	Retention time (R_t) Indole acetic acid (IAA) (min.)
0.8	8.44	12.11
1.0	6.80	9.74
1.2	5.66	8.09

พบว่าอัตราการไหลของ Mobile phase ที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ให้ผลในการแยกสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ออกจากกันดีที่สุดและใช้เวลาในการวิเคราะห์ไม่นานเกินไป (ตารางที่ 2) ส่วนที่อัตราการไหลที่ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ให้ผลในการแยกสารทั้ง 2 ชนิด ออกจากกันได้ดี แต่ใช้เวลาในการวิเคราะห์นานเกินไป และที่อัตราการไหลที่ 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที ให้ผลในการแยกสารออกจากกันดี และใช้เวลาในการวิเคราะห์สารน้อยกว่าทั้ง 2 อัตราการไหล แต่มีข้อเสียคือถ้าใช้อัตราการไหลของ Mobile phase สูงเกินไปจะทำให้แรงดัน (Pressure) ของระบบเครื่อง HPLC สูงเกินไปเสี่ยงต่อการชำรุดเสียหายของเครื่องมือวิเคราะห์ และเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์สารทั้ง 2 ชนิดไม่ได้แตกต่างจากอัตราการไหลของ Mobile phase ที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที มากเกินไป

1.3 ความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3)

ผลการทดสอบความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ความยาวคลื่นต่างๆ พบว่าที่ความยาวคลื่น 206 นาโนเมตร ให้ Sensitivity ในการตรวจวัดปริมาณสาร ทั้ง 2 ชนิดพร้อมกันค่อนข้างสูง ส่วนที่ความยาวคลื่น 208 นาโนเมตร ให้ Sensitivity ในการตรวจวัดปริมาณสาร Indole acetic acid (IAA) สูง แต่ให้ Sensitivity ในการตรวจวัดปริมาณสาร Gibberellic acid (GA_3) ปานกลาง และที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ให้ Sensitivity ในการตรวจวัดปริมาณสาร Indole acetic acid (IAA) สูง แต่ให้ Sensitivity ในการตรวจวัดปริมาณสาร Gibberellic acid (GA_3) ต่ำ

2. ผลการศึกษาวิธีการสกัดตัวอย่างในการวิเคราะห์สาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ในผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตร

2.1 ชนิดของ SPE-Cartridge ที่เหมาะสมในการสกัดสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3)

จากผลการศึกษาหาชนิดของ SPE-Cartridge ที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการสกัดสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) จำนวน 3 ชนิด คือชนิด SSQAX HR-XA (Tansupo *et al.,* 2010) และ HLB Cartridge (Cui *et al.*, 2015) ผลการทดลองพบว่าค่า %Recovery ของสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ผ่านการแยกด้วย Cartridge ชนิด SSQAX ได้ค่า %Recovery เท่ากับ 67.83 และ 101.26 ตามลำดับ ชนิด HR-XA ได้ค่า %Recovery เท่ากับ 81.86 และ 101.00 ตามลำดับ และชนิด HLB ให้ค่า %Recovery มีค่าเท่ากับ 99.73 และ 21.18 ตามลำดับ ซึ่งจากการพิจารณาค่า %Recovery ในการแยกสารทั้ง 2 ชนิด ด้วย Cartridge ชนิด HR-XA ให้ค่า %Recovery ดีที่สุด (ตารางที่ 3) และค่าที่ได้ยังอยู่ในเกณฑ์การยอมรับของ AOAC (2016)

Table 3. The recovery of indole acetic acid (IAA) and gibberellic acid (GA_3) were eluted from SSQAX, HR-XA and HLB Cartridge

Type of cartridge	%Recovery	
	Indole acetic acid (IAA)	Gibberellic acid (GA_3)
SSQAX Cartridge	67.83	101.26
HR-XA Cartridge	81.86	101.00
HLB Cartridge	99.73	21.18

2.2 สภาวะที่เหมาะสมของ Cartridge ที่ใช้ในการสกัดสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3)

ทำการทดสอบสภาวะที่จะนำไปใช้ในการสกัดสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ด้วย HR-XA Cartridge จำนวน 2 สภาวะการทดลอง ผลการทดลองพบว่าวิธีที่ 2 ให้ค่า %Recovery ของสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ดีกว่าวิธีที่ 1 ซึ่งมีค่า %Recovery มีค่าเท่ากับ 99.49 และ 96.90 ตามลำดับ และยังมีขั้นตอนการดำเนินงานที่ง่ายและรวดเร็วกว่า (ตารางที่ 4)

Table 4. The recovery of indole acetic acid (IAA) and gibberellic acid (GA_3) were eluted from HR-XA Cartridge by two methods

Test Method	%Recovery	
	Indole acetic acid (IAA)	Gibberellic acid (GA_3)
Method 1	101.22	94.18
Method 2	99.49	96.90

2.3 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3)ที่ HR-XA Cartridge สามารถจุได้

ทำการทดสอบความเข้มข้นของสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ HR-XA Cartridge สามารถจุปริมาณความเข้มข้นของสารทั้ง 2 ชนิดไว้ใน Cartridge ได้ ผลที่ได้จากการทดลองแสดงดังตารางที่ 5

Table 5. The recovery of indole acetic acid (IAA) and gibberellic acid (GA_3) at different concentration were contained by HR-XA Cartridge

Concentration of GA_3 and IAA (mg/l)	%Recovery	
	Indole acetic acid (IAA)	Gibberellic acid (GA_3)
0.5	103.91	83.27
5.0	104.28	87.81
10	100.54	91.24
20	93.88	97.87

ผลการทดลองพบว่าค่า %Recovery ของทั้ง 4 ระดับความเข้มข้นที่ทำการทดสอบยังให้ค่า %Recovery อยู่ในเกณฑ์การยอมรับของ AOAC (2016) ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร Cartridge ชนิด HR-XA สามารถจุปริมาณสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ไว้ใน Cartridge ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.4 ปริมาณสารตัวอย่างที่เหมาะสมที่ใช้ในการผ่านลงใน HR-XA Cartridge

ทำการทดสอบปริมาณของสารตัวอย่าง Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ใช้ในการผ่านลงใน HR-XA Cartridge เพื่อให้เกิดความเหมาะสมกับความสามารถในการจุสารของ Cartridge ซึ่งจะทำให้การแยกสารมีประสิทธิภาพ ผลที่ได้จากการทดลองแสดงดังตารางที่ 6

Table 6. The recovery of indole acetic acid (IAA) and gibberellic acid (GA_3) in different sample volume were eluted by HR-XA Cartridge

Sample volume (ml)	%Recovery	
	Indole acetic acid (IAA)	Gibberellic acid (GA_3)
3.0	75.77	103.66
5.0	98.11	103.34
7.0	101.81	109.85

ผลการทดลองพบว่าปริมาณสารตัวอย่าง Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร ได้ค่า %Recovery เท่ากับ 75.77 และ 103.66 ตามลำดับ ที่ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ได้ค่า %Recovery เท่ากับ 98.11 และ 103.34 ตามลำดับ และที่ปริมาตร 7.0 มิลลิลิตร ได้ค่า %Recovery เท่ากับ 101.81 และ 109.85 ตามลำดับ จากการพิจารณาค่า %Recovery ของสารทั้ง 2 ชนิด ที่แต่ละปริมาตรแล้วพบว่าที่ปริมาณของสารตัวอย่างที่ 5.0 มิลลิลิตร ให้ค่า %Recovery ดีที่สุด และค่า %Recovery ยังอยู่ในเกณฑ์การยอมรับของ AOAC (2016)

3. ผลการเปรียบเทียบวิธีเดิมที่มีในห้องปฏิบัติการ (Rivier *et al.*, 1987) และวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Tansupo *et al.* (2010) และ Cui *et al.* (2015)

จากผลการเปรียบเทียบวิธีเดิมที่มีในห้องปฏิบัติการและวิธีที่ได้พัฒนาขึ้น โดยพิจารณาจากค่าทางสถิติ (t-test) พบว่าค่า t_{stat} ที่คำนวณได้จากการเปรียบเทียบวิธีเดิมที่มีในห้องปฏิบัติการและวิธีใหม่ที่ได้พัฒนาขึ้นของสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ให้ค่า $t_{stat} > t_{Critical}$ ทั้ง 2 สาร แสดงว่าทั้ง 2 วิธีให้ผลการทดสอบสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 7) โดยวิธีเดิมที่มีในห้องปฏิบัติการในการวิเคราะห์สาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ให้ค่า %Recovery อยู่ในช่วง 81.19-88.68 และ 81.74-89.32 ตามลำดับ และวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นให้ค่า %Recovery อยู่ในช่วง 92.22-102.37 และ 91.48-99.07 ตามลำดับ จากการพิจาณาค่า %Recovery ของทั้ง 2 วิธี พบว่าทั้งสองวิธีมีค่า %Recovery อยู่ในเกณฑ์ยอมรับตาม AOAC (2016) แต่วิธีที่ได้พัฒนาขึ้นให้ค่า %Recovery ที่ดีกว่าวิธีเดิมที่มีในห้องปฏิบัติการ ดังนั้นวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นจึงสามารถนำมาทดแทนวิธีเดิมที่มีในห้องปฏิบัติการในการสกัดสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ได้

Table 7. The comparison of analytical method for determination of indole acetic acid (IAA) and gibberellic acid (GA_3) by laboratory method and new method developed

Type of plant hormone	t-test Value		Comparison
	t_{stat}	$t_{Critical}$	
Indole acetic acid (IAA)	9.87	2.11	*S
Gibberellic acid (GA_3)	5.68	2.10	*S

ns = non-significant at 5% level; *S = Significant at 5% level

4. ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ได้พัฒนาขึ้น

4.1 หาความจำเพาะเจาะจง (Selectivity หรือ Specificity) ของวิธีทดสอบ

ทำการทดสอบโดยการเติมสารมาตรฐาน Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในตัวอย่างที่มี Matrix แตกต่างกันจำนวน 3 ชนิดตัวอย่างได้แก่ ตัวอย่างสารชีวอินทรีย์สกัดจากธรรมชาติพืชและสัตว์ ตัวอย่างสารสกัดสาหร่ายเข้มข้นจากธรรมชาติ และตัวอย่างสารสกัดสาหร่ายจากธรรมชาติผสมกับสารที่มีประโยชน์ต่อพืช ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบ จากนั้นนำโครมาโทแกรมที่ตรวจวัดได้จากเครื่อง HPLC-PDA มาเปรียบเทียบกับโครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ผลการทดลองที่ได้แสดงดังภาพที่ 3 จากการพิจารณาโครมาโทแกรมที่ได้ของตัวอย่างแต่ละ Matrix เทียบกับสารมาตรฐาน พบว่าโครมาโทแกรมของตัวอย่างสารชีวอินทรีย์สกัดจากธรรมชาติพืชและสัตว์มีความจำเพาะในการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้มากที่สุด เนื่องจากพีกของสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ไม่ถูกรบกวนจากสารอื่นที่มีอยู่ใน Matrix ของตัวอย่างชนิดนี้ ส่วนตัวอย่างสารสกัดสาหร่ายเข้มข้นจากธรรมชาติและตัวอย่างสารสกัดสาหร่ายจากธรรมชาติผสมกับสารที่มีประโยชน์ต่อพืช พบว่าพีกของสาร Indole acetic acid (IAA) ไม่ถูกรบกวน แต่พีกของสาร Gibberellic acid (GA_3) ถูกรบกวนจากสารอื่นที่มีอยู่ใน Matrix ของตัวอย่างทั้ง 2 ชนิดนี้ ทำให้วิธีนี้ไม่สามารถแยกสารออกจากกันได้ภายใต้สภาวะการวิเคราะห์เดียวกัน ดังนั้นวิธีนี้จึงเหมาะสมกับการวิเคราะห์สาร Indole acetic acid

(IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ในตัวอย่างสารชีวอินทรีย์สกัดจากธรรมชาติพืชและสัตว์ที่มีลักษณะตัวอย่างเป็นสารละลายใส ไม่เหนียวหรือไม่ข้นหนืดเท่านั้น

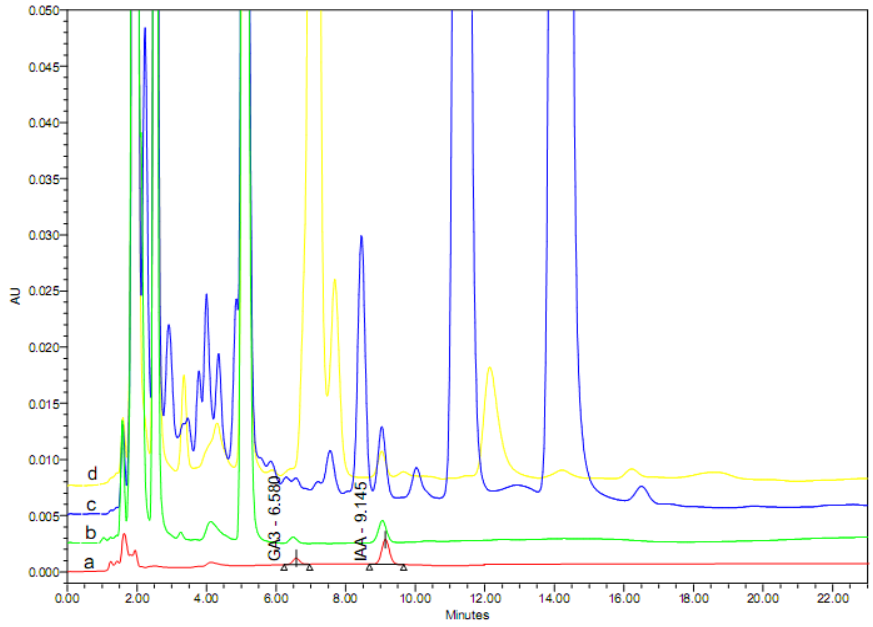

Figure 3. Chromatogram of a) Standard solution of indole acetic acid (IAA) and gibberellic acid (GA_3) b) Sample of bio-organic extracts from natural plants and animals c) Sample of concentrated seaweed extract from nature and d) Sample of natural algae extract mixed with substances that are beneficial to plants

4.2 ผลของการศึกษา Matrix effect ของวิธีทดสอบ

จากการทดสอบ Matrix effect ของการวิเคราะห์ของสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) พบว่ามีค่า %RPD เท่ากับ 7.78 และ 8.09 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ < 10% ตาม NATA (2018) ดังนั้นในการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) สามารถเตรียม Calibration curve ในสารละลาย Mobile phase ได้ ซึ่งให้ผลการวิเคราะห์ไม่แตกต่างกัน ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 8

Table 8. The comparison slope of the straight line equation from standard solution of indole acetic acid (IAA) and gibberellic acid (GA_3) and spike standard solution in sample blank

Type of plant hormone	Equation		Slope		%RPD
	Solvent	Matrix	Solvent	Matrix	
IAA	Y=64620.47x-494.14 r=0.9999	Y=59782.98x+752.89 r=0.9985	64620	59782	7.78
GA_3	Y=14140.50x-248.16 r= 0.9999	Y=15333.44x-11.58 r= 0.9991	13536	14272	8.09

4.3 การหาค่า Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ)

ทำการทดสอบ Sample blank ที่เติมสารมาตรฐาน Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้น 0.01 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบจำนวน 10 ซ้ำ บันทึกข้อมูล

คำนวณหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 9 จากผลการทดสอบพบว่าค่า Limit of Detection (LOD) ของสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) มีค่าเท่ากับ 0.001 และ 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และค่า Limit of Quantification (LOQ) ที่ได้จากการ Predicted LOQ พบว่า มีค่าเท่ากับ 0.005 และ 0.017 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Table 9. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for Indole acetic acid (IAA) and Gibberellic acid (GA_3)

Number of repetitions	Indole acetic acid (IAA) (0.01 mg/L)		Gibberellic acid (GA_3) (0.05 mg/L)	
	Sample blank	Concentration (mg/L)	Sample blank	Concentration (mg/L)
1	0.00	0.0142	0.00	0.0580
2	0.00	0.0131	0.00	0.0485
3	0.00	0.0110	0.00	0.0470
4	0.00	0.0124	0.00	0.0446
5	0.00	0.0140	0.00	0.0480
6	0.00	0.0132	0.00	0.0560
7	0.00	0.0150	0.00	0.0480
8	0.00	0.0111	0.00	0.0570
9	0.00	0.0120	0.00	0.0460
10	0.00	0.0110	0.00	0.0570
Mean		0.0129		0.0503
SD		0.0014		0.0053
S'_0		0.0005		0.0017
LOD		0.001		0.005
LOQ		0.005		0.017

หมายเหตุ $S'_0 = SD/\sqrt{n}$

4.4 การตรวจสอบค่า Linearity และ Range ของวิธีทดสอบ

4.4.1 ทดสอบ Linearity โดยการเตรียมสารมาตรฐานจำนวน 7 ระดับความเข้มข้นดังนี้ สาร Indole acetic acid (IAA) ที่ความเข้มข้น 0.005 0.05 0.10 0.50 1.0 2.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้น 0.05 0.10 0.30 0.50 1.0 2.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบ นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกับพื้นที่ใต้พีก (Peak area) ที่อ่านค่าได้จากเครื่อง HPLC ผลการทดสอบแสดงดังภาพที่ 4 และภาพที่ 5 พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรงคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient : r) โดยมีเกณฑ์การยอมรับ $r \geq 0.995$ จากการทดสอบพบว่าค่า Correlation Coefficient (r) ของสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) มีค่าเท่ากับ 0.9998 และ 0.9998 ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่าเกณฑ์การยอมรับ AOAC (2016) ที่มีเกณฑ์การยอมรับค่า $r \geq 0.995$

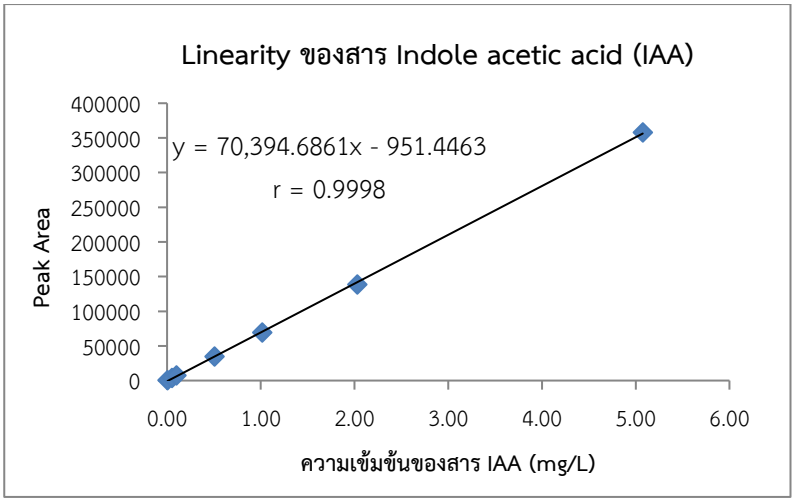

Figure 4. The graph shows the linearity of indole acetic acid (IAA) at a concentration of 0.005-5.00 mg/l

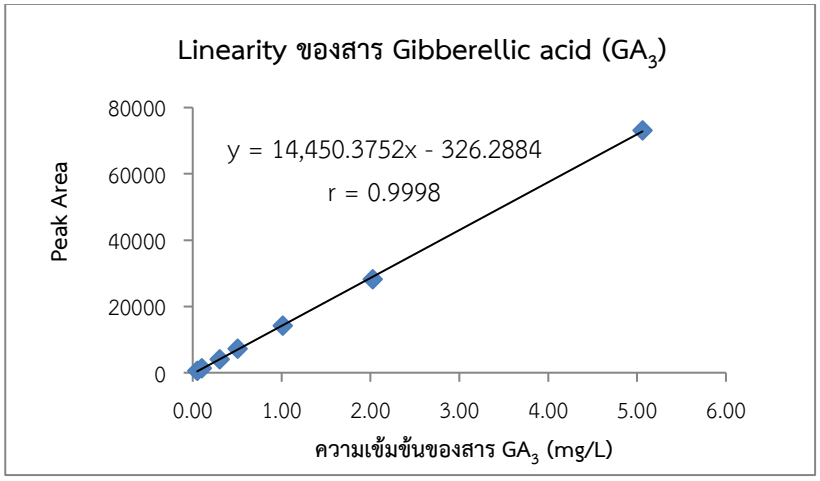

Figure 5. The graph shows the linearity of gibberellic acid (GA_3) at a concentration of 0.05-5.00 mg/l

4.4.2 ทดสอบ Range โดยการเตรียมสารมาตรฐานจำนวน 7 ระดับความเข้มข้นดังนี้ สาร Indole acetic acid (IAA) ที่ความเข้มข้น 0.005-1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้น 0.05-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบ นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกับพื้นที่ใต้พีก (Peak area) ที่อ่านค่าได้จากเครื่อง HPLC ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 10 พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรงคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient : r) โดยมีเกณฑ์การยอมรับ $r \geq 0.995$ จากการทดสอบพบว่าค่า r ของสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) มีค่าเท่ากับ 0.9995 และ 0.9991 ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่าเกณฑ์การยอมรับ AOAC (2016) ที่มีเกณฑ์การยอมรับค่า $r \geq 0.995$

Table 10. The straight line equation and correlation coefficient (r) of working range standard from indole acetic acid (IAA) and gibberellic acid (GA_3)

Type of plant hormone	Straight line equation	Correlation Coefficient (r)
Indole acetic acid (IAA)	y = 67,813.35x - 29.38	0.9995
Gibberellic acid (GA_3)	y = 14,475.55x + 152.93	0.9991

4.5 พิสูจน์ความถูกต้องและความแม่นยำที่ระดับ LOQ ของสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3)

ทำการทดสอบ Sample blank โดยเติมสารมาตรฐาน Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้น 0.005 และ 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบจำนวน 10 ซ้ำ คำนวณค่าเฉลี่ย %Recovery ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และค่า HorRat จากผลการทดสอบ พบว่าสาร Indole acetic acid (IAA) ที่ความเข้มข้น 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่า %Recovery อยู่ในช่วง 91.19-107.11 และมีค่า HorRat เท่ากับ 0.30 ส่วนสาร Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีค่า %Recovery อยู่ในช่วง 66.55-80.19 และค่า HorRat มีค่าเท่ากับ 0.30 จากผลการพิสูจน์ความถูกต้องและความแม่นยำที่ระดับ LOQ ของสาร Gibberellic acid (GA_3) พบว่าผลการทดสอบมีความแม่นยำ แต่ไม่มีความถูกต้อง เนื่องจากค่า %Recovery ที่ได้จากการทดสอบมีค่าอยู่ในช่วง 66.55-80.19 ซึ่งมีบางค่าไม่ผ่านเกณฑ์การยอมรับของ AOAC (2016) จึงทำการทดสอบที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้น คือ ที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 11 จากผลการทดสอบพบว่า ที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่า %Recovery อยู่ในช่วง 81.91-95.93 และค่า HorRat เท่ากับ 0.33 ซึ่งให้ผลการทดสอบที่มีทั้งความถูกต้องและความแม่นยำที่ระดับ LOQ

Table 11. Truenes and precision at the LOQ level of indole acetic acid (IAA) and gibberellic acid (GA_3)

Number of repetitions	Indole acetic acid (IAA) (0.005 mg/L)		Gibberellic acid (GA_3) (0.05 mg/L)	
	Concentration (mg/L)	%Recovery	Concentration (mg/L)	%Recovery
1	0.00522	93.34	0.04460	90.65
2	0.00537	96.02	0.04120	83.74
3	0.00591	105.68	0.04270	86.79
4	0.00570	101.92	0.04460	90.65
5	0.00510	91.19	0.04500	91.46
6	0.00519	92.80	0.04540	92.28
7	0.00599	107.11	0.04660	94.72
8	0.00580	103.71	0.0472	95.93
9	0.00585	104.60	0.04030	81.91
10	0.00596	106.57	0.04100	83.33
MEAN	0.00561	100.29	0.04386	86.74
SD	0.00035		0.00242	
%RSD	6.25		5.52	
HorRat	0.30		0.33	

4.6 การทดสอบความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision)

ทดสอบ Sample blank ที่เติมสารมาตรฐาน Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง โดยทำการทดสอบความถูกต้องและความเที่ยงที่ 3 ระดับความเข้มข้นดังนี้ สาร Indole acetic acid (IAA) ที่ความเข้มข้น 0.013 1.00 และ 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และสาร Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้น 0.125 1.00 และ 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ นำผลการทดสอบที่ได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย, ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน, %Recovery และค่า HorRat ผลการทดสอบที่ได้แสดงดังตารางที่ 12 และตารางที่ 13 จากผลการทดสอบความถูกต้องและความเที่ยงของวิธีทดสอบสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวให้ผลการทดสอบที่มีทั้งความถูกต้องและความเที่ยง เนื่องจากทุกระดับความเข้มข้นที่ทดสอบ

ให้ค่า %Recovery ของการทดสอบอยู่ในช่วง 80-110% ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับของ AOAC (2016) และค่า HorRat ที่ได้มีค่าอยู่ในช่วง 0.3-1.3 ทุกระดับความเข้มข้นที่ทำการทดสอบ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับของ AOAC (2016)

Table 12. Trueness and precision at the low, middle and high concentration level of indole acetic acid (IAA)

Number of repetitions	IAA (0.013 mg/L)		IAA (1.00 mg/L)		IAA (5.00 mg/L)	
	Conc. (mg/L)	% Recovery	Conc. (mg/L)	% Recovery	Conc. (mg/L)	% Recovery
1	0.0131	93.34	1.02375	93.70	5.4288	99.37
2	0.0134	96.02	1.03650	94.86	5.3700	98.30
3	0.0148	105.68	0.96725	88.53	5.3175	97.34
4	0.0143	101.92	1.03925	95.12	4.8506	88.79
5	0.0128	91.19	1.03250	94.50	5.4013	98.87
6	0.0130	92.80	1.03325	94.57	4.9125	89.92
7	0.0132	94.59	0.96050	87.91	5.0425	92.30
8	0.0145	103.71	1.03875	95.07	4.8988	89.67
9	0.0146	104.60	0.97025	88.80	5.3163	97.31
10	0.0149	106.57	0.97150	88.92	4.7400	86.76
Mean	0.01385	99.04	1.00735	92.20	5.1278	93.86
SD	0.00084		0.03479		0.26433	
%RSD	6.06		3.45		5.15	
HorRat	0.30		0.33		0.62	

Table 13. Trueness and precision at the low, middle and high concentration level of gibberellic acid (GA_3)

Number of repetitions	GA_3 (0.125 mg/L)		GA_3 (1.00 mg/L)		GA_3 (5.00 mg/L)	
	Conc. (mg/L)	% Recovery	Conc. (mg/L)	% Recovery	Conc. (mg/L)	% Recovery
1	0.11150	90.65	1.1455	99.26	5.9425	102.99
2	0.10300	83.74	1.1390	98.70	6.0563	104.96
3	0.10675	86.79	1.1555	100.13	5.8063	100.63
4	0.11150	90.65	1.1463	99.33	5.9450	103.03
5	0.10575	85.98	1.1815	102.38	5.6225	97.45
6	0.11350	92.28	1.1500	99.65	5.7338	99.37
7	0.11650	94.72	1.1253	97.51	5.8063	100.63
8	0.10675	86.79	1.2083	104.70	6.0113	104.18
9	0.10075	81.91	1.1373	98.55	5.5988	97.03
10	0.10000	81.30	1.0638	92.18	5.9125	102.47
Mean	0.10760	87.48	1.1452	99.24	5.8435	101.28
SD	0.0055		0.0374		0.1570	
%RSD	5.14		3.26		2.69	
HorRat	0.35		0.32		0.33	

4.7 ผลการศึกษา Ruggedness ของวิธีทดสอบ Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) โดยทำการทดสอบปัจจัยต่างๆ ในวิธีทดสอบดังนี้

4.7.1 ทดสอบปริมาณของตัวอย่างที่ใช้ในการสกัด

ทำการทดสอบ Sample blank ที่เติมสารมาตรฐาน Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้น 0.010 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบ โดยมีการเปลี่ยนแปลงปริมาตรสารตัวอย่างที่ใช้จากสภาวะปกติปริมาตร 10 มิลลิลิตร เปลี่ยนแปลงสภาวะเป็นปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำการทดสอบจำนวน 10 ซ้ำ ผลการเปรียบเทียบการทดสอบแสดงดังตารางที่ 14 จากการเปรียบเทียบสภาวะการทดสอบปริมาณของตัวอย่างที่ใช้ในการสกัด Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่สภาวะดังกล่าว โดยนำค่าวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณค่าทางสถิติ (t-test) จากการพิจารณาค่าทางสถิติ (t-test) ที่คำนวณได้จากการทดสอบทั้ง 2 สภาวะ พบว่าสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ให้ค่า $t_{stat} < t_{Critical}$ แสดงว่าทั้ง 2 สภาวะให้ผลการทดสอบสารทั้ง 2 ชนิด ไม่แตกต่างกัน

Table 14. The comparison of sample volume for extraction of indole acetic acid (IAA) and gibberellic acid (GA_3)

Type of plant hormone	t-test Value		Comparison
	t_{stat}	$t_{Critical}$	
Indole acetic acid (IAA)	1.375	2.101	ns
Gibberellic acid (GA_3)	0.492	2.101	ns

ns = non-significant at 5% level; *S = Significant at 5% level

4.7.2 ทดสอบค่า pH ที่ใช้ในการสกัดสารตัวอย่าง

ทำการทดสอบ Sample blank ที่เติมสารมาตรฐาน Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้น 0.010 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบโดยมีการเปลี่ยนแปลงสภาวะค่า pH ที่ใช้ในการสกัดสารตัวอย่าง Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่สภาวะปกติ pH 2.5 และจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะที่ค่า pH 2.7 ทำการทดสอบจำนวน 10 ซ้ำ ผลการเปรียบเทียบการทดสอบแสดงดังตารางที่ 15 จากการเปรียบเทียบสภาวะของค่า pH ที่ใช้ในการสกัดสารตัวอย่าง Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่สภาวะดังกล่าว โดยนำค่าวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณค่าทางสถิติ (t-test) จากการพิจารณาค่าทางสถิติ (t-test) ที่คำนวณได้จากทั้ง 2 สภาวะ พบว่าสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ให้ค่า $t_{stat} < t_{Critical}$ แสดงว่าทั้ง 2 สภาวะให้ผลการทดสอบสารทั้ง 2 ชนิด ไม่แตกต่างกัน

Table 15. The comparison of pH value for extraction of indole acetic acid (IAA) and gibberellic acid (GA_3)

Type of plant hormone	t-test Value		Comparison
	t_{stat}	$t_{Critical}$	
Indole acetic acid (IAA)	0.598	2.101	ns
Gibberellic acid (GA_3)	0.981	2.101	ns

ns = non-significant at 5% level; *S = Significant at 5% level

4.7.3 ทดสอบปริมาณของ Solvent ที่ใช้ในการสกัดตัวอย่าง

ทดสอบ Sample blank ที่เติมสารมาตรฐาน Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้น 0.010 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบโดยมีการเปลี่ยนแปลงสภาวะการทดสอบปริมาณของ Solvent ที่ใช้ในการสกัด Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่สภาวะปกติปริมาตร 20 มิลลิลิตร และจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะปริมาตร 30 มิลลิลิตร ทำการทดสอบจำนวน 10 ซ้ำ ผลการ

เปรียบเทียบการทดสอบแสดงดังตารางที่ 16 จากการเปรียบเทียบสภาวะการทดสอบปริมาณของ Solvent ที่ใช้ในการสกัด Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่สภาวะดังกล่าว โดยนำค่าวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณค่าทางสถิติ (t-test) จากการพิจารณาค่าทางสถิติ (t-test) ที่คำนวณได้จากการทดสอบทั้ง 2 สภาวะ พบว่า Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ให้ค่า $t_{stat} < t_{Critical}$ แสดงว่าทั้ง 2 สภาวะให้ผลการทดสอบสารทั้ง 2 ชนิด ไม่แตกต่างกัน

Table 16. The comparison of solvent volume for extraction of indole acetic acid (IAA) and gibberellic acid (GA_3)

Type of plant hormone	t-test Value		Comparison
	t_{stat}	$t_{Critical}$	
Indole acetic acid (IAA)	0.575	2.101	ns
Gibberellic acid (GA_3)	0.196	2.101	ns

ns = non-significant at 5% level; *S = Significant at 5% level

5. การหาปริมาณสารตัวอย่าง Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตร

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารตัวอย่าง Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตร ซึ่งเป็นตัวอย่างผลิตภัณฑ์สารชีวอินทรีย์สกัดจากธรรมชาติพืชและสัตว์ที่มีลักษณะเป็นสารละลายใส ไม่เหนียว และไม่ข้นหนืด ทั้งหมดจำนวน 20 ตัวอย่าง จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารตัวอย่าง Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) พบว่ามีปริมาณสาร Indole acetic acid (IAA) อยู่ในช่วง 0.005-5.26 มิลลิกรัมต่อลิตร และสาร Gibberellic acid (GA_3) อยู่ในช่วง 0.05-5.40 มิลลิกรัมต่อลิตร และจากการทดสอบหาค่า %Recovery พบว่าสาร Indole acetic acid (IAA) อยู่ในช่วง 82.62-103.01 และ Gibberellic acid (GA_3) อยู่ในช่วง 90.00-98.84 ซึ่งค่า %Recovery ที่ได้ของสารทั้ง 2 ชนิด อยู่ในเกณฑ์การยอมรับของ AOAC (2016)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ/คำแนะนำ

จากการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตร โดยใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ได้สภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารทั้ง 2 ชนิด ออกจากกันและมีความจำเพาะเจาะจง (Selectivity) ในการตรวจวิเคราะห์สารทั้ง 2 ชนิด สำหรับวิธีการเตรียมตัวอย่างได้ประยุกต์ใช้วิธีการสกัดสารด้วย Ethyl acetate (Tansupo *et al.*, 2010) ร่วมกับการ Clean-up ตัวอย่างด้วยเทคนิค Solid phase extraction ซึ่งมีการใช้ Cartridge ชนิด XR-HA (Cui *et al.*, 2015) ในการสกัดสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) จากผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ พบว่าได้ค่าความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.005-5.0 และ 0.05-5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่า r เท่ากับ 0.9998 และ 0.9998 ตามลำดับ ได้ค่าขีดจำกัดในการตรวจวัด (LOD) ของสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) มีค่าเท่ากับ 0.001 และ 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และขีดจำกัดในการตรวจวัดเชิงปริมาณ (LOQ) มีค่าเท่ากับ 0.005 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากการพิสูจน์ความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีทดสอบที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง และสูง พบว่าสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ให้ค่า %Recovery อยู่ในช่วง 86.76-106.57 และ 81.30-104.70 ตามลำดับ และจากการประเมินค่า HorRat ที่ได้จากการทดสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 0.30-0.62 และ 0.32-0.35 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับ AOAC (2016) ดังนั้นวิธีนี้สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตรที่มีขอบข่ายในการวิเคราะห์อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.013-5.00 และ 0.125-5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และมีความน่าเชื่อถือ

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยพืชวัตถุเคมีการเกษตรและนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตร สามารถนำวิธีที่ได้นี้ไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์สาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตร

2. เพิ่มประสิทธิภาพและศักยภาพให้กับห้องปฏิบัติการวิเคราะห์สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชให้มากยิ่งขึ้น และสามารถถ่ายทอดวิธีการวิเคราะห์ดังกล่าวให้แก่เจ้าหน้าที่ของสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1-8 และหน่วยงานอื่นๆ ที่สนใจได้

3. สามารถนำวิธีการวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นนี้ ไปขยายขอบข่ายในการขอรับรองห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ได้

เอกสารอ้างอิง

ทวีศักดิ์ แสงอุดม. 2559. ***สารควบคุมการเจริญเติบโตพืชและแนวทางการใช้กับไม้ผล***. สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ. 88 หน้า.

พีรเดช ทองอำไพ. 2537. ***ฮอร์โมนและสารสังเคราะห์ แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศ***. วิชัยการพิมพ์ กรุงเทพฯ.

AOAC. 2016. Appendix F: Guidelines for Standard Method performance Requirements.

Cui, K., Y. Lin, X. Zhou, S. Li, H. Lui, F. Zeng, F. Zhu, G. Ouyang and Z. Zeng. 2015. Comparision of sample pretreatment methods for the determination of multiple phytohormones in plant samples by liquid chromatography-electrospry ionization-tandam mass spectrometry. ***Microchemical Journal*** 121:25-31.

EURACHEM. 2014. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, The Fitness for Purpose of Analytical Methods.

NATA. General Accreditation Guidance-Validation and verification of Quantitative and Qualitative Test Methods, 2018.

Rivier, L. and A. Crozier. 1987. ***Principles and Practice of Plant Hormone Analysis.*** Vol. II. London: Academic Press INC.

Tansupo, P., P. Suwannasom, D. L. Luthria, S. Chanthai and C. Ruangviriyachai. 2010. Optimised separation procedures for the simultaneous assay of three plant hormone in liquid biofertilizer. ***Phytochem Anal***. 21 (2):157-162.