บทที่ 4

อภิปรายผลการทดลองและสรุปผลการทดลอง

(Discussion and Conclusion)

เทคนิคไฮเปอร์ฟอร์แมนซ์ธินแลร์โครมาโทกราฟ(HPTLC)นั้น เป็นเทคนิคที่ได้รับการพัฒนามาจากเทคนิคธินแลร์โครมาโทกราฟ(TLC) เทคนิค TLC นั้นโดยส่วนใหญ่นักวิทยาศาสตร์ได้นำมาใช้ในการแยกและทำคุณภาพวิเคราะห์(และปริมาณวิเคราะห์ในบางครั้ง) สำหรับสารอินทรีย์เป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นเมื่อได้พัฒนาเทคนิค HPTLC นี้ จึงได้นำมาพัฒนาเป็นเทคนิคสำหรับการทำปริมาณวิเคราะห์ ในวิทยานิพนธ์นี้จึงได้นำเอาเทคนิคใหม่ชนิดนี้มาใช้ในการทดสอบการทำปริมาณวิเคราะห์สำหรับสารกำจัดศัตรูพืชประเภทต่างๆ และพัฒนาเทคนิคขึ้นมาใช้เพื่อการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชในธัญญพืชต่างๆ อีกด้วย

ในขั้นตอนแรกของการทดสอบนั้น เราจำเป็นต้องใช้แผ่น TLC แทนแผ่น HPTLC เนื่องจากพบว่าแผ่น HPTLC มีราคาค่อนข้างสูงและเป็นแผ่นประเภทที่ใช้แล้วไม่นำกลับมาใช้อีก (irreconditionable) โดยที่แผ่น TLC ที่ใช้แทนแผ่น HPTLC นั้นมีชนิดและคุณสมบัติเทียบเท่าแผ่น HPTLC ทุกประการ นั่นคือใช้เป็น Normal phase silica gel 60 GF254 ยกเว้นแต่ขนาดเม็ด(mesh size) ที่มีความแตกต่างกัน ซึ่งขนาดเม็ดของซิลิกาเจลนี้ก่อให้เกิดความแตกต่างของการแยก(separation)เป็นอย่างมาก

สารกำจัดศัตรูพืชที่ใช้ในการทดสอบนี้มีอยู่ด้วยกัน 6 ชนิดโดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มสารประกอบไตรอะซีนได้แก่ อะมีทริน มีคุณสมบัติในการกำจัดวัชพืช กลุ่มสารประกอบคาร์บาเมตได้แก่ เบนไธโอคาร์บมีคุณสมบัติในการกำจัดวัชพืช และคาร์โบฟูรานมีคุณสมบัติในการกำจัดแมลง หนอน เพลี้ย และอื่นๆ และกลุ่มของสารประกอบออร์แกโนฟอสเฟตได้แก่ เมธิลพาราไธออน โมโนโครโทฟอส และเมวินฟอส ทั้ง 3 ตัวนี้มีคุณสมบัติในการกำจัดแมลงทั้งหมด

เพื่อหา condition มีเหมาะสมที่สุดในการแยกสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิดออกจากกัน เราจึงจำเป็นต้องทำการพัฒนาระบบการแยก โดยเริ่มจากโมบายเฟสที่มีตัวทำละลายเพียงตัวเดียว พบว่าเมื่อดูจากค่า number of separation และลักษณะการแยกที่ดี พบว่าตัวทำละลาย ไดคลอโรมีเทน ทำให้เกิดการแยกที่ดีที่สุด ดังรูปที่ 3.1 แต่ spot ภายหลัง

จากการแยกนั้นยังซ้อนทับกันอยู่ ดังนั้นจึงเปลี่ยนแปลงไปใช้โมบายเฟสที่เป็นตัวทำละลายผสม 2 ชนิด พบว่า เมื่อใช้อัตราส่วนของคู่ตัวทำละลายในแต่ละคู่ โดยพิจารณาเลือกจับคู่ตัวทำละลายให้ตัวทำละลายตัวหนึ่งควรมีขั้วมากกว่าไดคลอโรมีเทน ส่วนอีกตัวหนึ่งควรมีขั้วน้อยกว่าไดคลอโรมีเทน พบว่าโมบายเฟสที่ทำให้เกิดการแยกได้ดีนั้นได้จากตัวทำละลาย 2-บิวทาโนนและไซโคลเฮกเซนผสมกันในอัตราส่วน 1 ต่อ 4 โดยปริมาตรตามลำดับ และยังได้ทดลองการพัฒนาหาโมบายเฟส โดยเลือกใช้โมบายเฟสที่เตรียมจากตัวทำละลาย 3 ชนิด เพื่อให้ได้ลักษณะการแยกที่ดีกว่า (1:4)2-บิวทาโนน-ไซโคลเฮกเซน และพบว่ามีระบบโมบายเฟส 3 ชนิดอยู่ 3 ระบบที่สามารถทำการแยกได้ดีแต่ยังไม่ดีเท่า (1:4)2-บิวทาโนน-ไซโคลเฮกเซน คือ (1:4:1)อะซีโตน-ไซโคลเฮกเซน-เบนซีน (1:4:1)อะซีโตน-เฮกเซน-คาร์บอนเตตระคลอไรด์ และ(1:4:1)อะซีโตน-เฮกเซน-คาร์บอนเตตระคลอไรด์ ทำการ development 2 ครั้ง ดังรูปที่ 3.4 แต่ไม่มีระบบใดในโมบายเฟสของ 3 ตัวทำละลายเหล่านี้ ที่สามารถทำการแยกได้ดีกว่า (1:4)2-บิวทาโนน-ไซโคลเฮกเซน และอีกประการหนึ่งนั้น เนื่องจากระบบโมบายเฟสที่เกิดจากตัวทำละลาย 3 ชนิดนั้นทำได้ยากกว่า(1:4)2-บิวทาโนน-ไซโคลเฮกเซน ดังนั้นจึงใช้(1:4)2-บิวทาโนน-ไซโคลเฮกเซน ดังกล่าวในการแยกสารกำจัดศัตรูพืช 6 ชนิดนั้น

หลังจากการหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารกำจัดศัตรูพืชโดยใช้ TLC แล้วนั้น จึงได้ทดลองนำระบบเหล่านั้นมาใช้ในการทำคุณภาพวิเคราะห์โดยใช้แผ่น HPTLC พบว่า เมื่อเปลี่ยนจากการใช้แผ่น TLC มาเป็นแผ่น HPTLC นั้น แผ่น HPTLC ยังต้องทำการ clean-up เสียก่อน(ซึ่งแตกต่างจาก TLC) ทั้งนี้เนื่องจากแผ่น HPTLC เมื่อเก็บไว้เป็นระยะเวลานาน แผ่นจะเกิดการเปลี่ยนสีเล็กน้อย จะเปลี่ยนจากสีขาว เป็นสีขาวเหลือง เนื่องจากแผ่น HPTLC ค่อยๆ ถูกออกซิไดซ์ไปอย่างช้าๆ ซึ่งถ้าไม่ทำการ clean-up แผ่นจะทำให้ baseline ของโครมาโทแกรมนั้นไม่ดีพอที่จะใช้งานได้ และ พบว่าเมื่อใช้ 1 - 5 % แอมโมเนีย-เมธานอล จะมีความสามารถในการ clean-up แผ่น HPTLC Silica gel GF 254 ได้ดี

ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมที่ใช้ได้ดีใน TLC ได้ถูกนำมาทดลองใช้กับ HPTLC พบว่า แนวโน้มของการแยกจากการใช้ TLC และ HPTLC มีลักษณะเหมือนกันทุกประการ และเมื่อดูจากโครมาโทแกรมแล้วพบว่า(1:4)2-บิวทาโนน-ไซโคลเฮกเซนมีความสามารถในการแยกได้ดีที่สุดสำหรับสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิด โดยทั่วไปแล้วความสามารถในการแยก

สารได้ดีที่สุดสำหรับ HPTLC จะอยู่ในช่วงประมาณ 3 เซนติเมตรจากขอบแผ่นด้านล่าง ดังนั้นจึงใช้ระยะทางในการ development ประมาณ 5 เซนติเมตรเท่านั้น และยังพบอีกว่าในบรรดาโมบายเฟสทั้งหมดนั้น(1:4)2-บิวทาโนน-ไซโคลเฮกเซน สามารถทำให้เกิดการแยกได้ดีในช่วงบริเวณดังกล่าวอีกด้วย โดยมีค่า retention time ของเบนไธโอคาร์บ 116.7 วินาที เมธิลพาราไธออน 94.6 วินาที อะมีทริน 76.8 วินาที คาร์โบฟูราน 61.7 วินาที เมวินฟอส 44.1 วินาที และโมโนโครโทฟอส 32.4 วินาที ตามลำดับ และเมื่อได้ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมมาเป็นโมบายเฟสแล้ว จึงได้ใช้โมบายเฟสนี้สำหรับการทดลองต่อ ๆ ไป และได้ทำการทดลอง หาค่าความเที่ยงของการ scan ด้วยเครื่อง densitometer และการคำนวณพื้นที่พีกด้วยเครื่อง integrator เมื่อทำการทดสอบเป็นจำนวน 10 ครั้งแล้วนำมาหาค่า % RSD พบว่าค่า % RSD มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.4 ดังในตารางที่ 3.9 แสดงว่าเครื่อง densitometer วัดค่า absorbance และ integrate ออกมาเป็นพื้นที่พีกด้วยเครื่อง integrator อยู่ในเกณฑ์ที่ดี

ในการหาขีดจำกัดของการวิเคราะห์ของสารกำจัดศัตรูพืชแต่ละชนิดทั้ง 6 ชนิดนั้น โดยทั่วไปแล้วขีดจำกัดของการวิเคราะห์โดยวิธีการเทคนิค HPTLC ขึ้นอยู่กับความสามารถในการดูดกลืนแสงของสารประกอบแต่ละชนิดในช่วงความยาวคลื่นที่ทำการวิเคราะห์ดังกล่าว จากการทดลองเมื่อดูจากตารางที่ 3.7 พบว่าค่าปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชที่น้อยที่สุดที่สามารถทำการวิเคราะห์ได้ (LOQ) ของสารอะมีทรินมีค่าดีที่สุดนั่นคือ สามารถทำการวิเคราะห์เมื่อสารมีปริมาณน้อย ๆ ได้ต่ำถึง 0.004 ug และรองลงมาคือเมธิลพาราไธออน 0.02 ug โมโนโครโทฟอส 0.03 ug เบนไธโอคาร์บ 0.06 ug ส่วนคาร์โบฟูรานและเมวินฟอสมีค่าใกล้เคียงกันคือ 0.24 และ 0.25 ug ตามลำดับ และเป็นคู่ที่มีค่าขีดจำกัดการวิเคราะห์สูงที่สุดในกลุ่ม

ในการใส่สารลงบนแผ่นโดยให้ปริมาณของสารเท่ากันพบว่ามีวิธีการใส่ได้ 2 วิธีคือ

1. โดยให้ความเข้มข้นของสารมาก และทำการใส่สารในปริมาณน้อย
2. โดยให้ความเข้มข้นของสารน้อย และทำการใส่สารในปริมาณมาก

จากการทดลองพบว่า(โดยดูจากค่าความเที่ยงของการใส่สาร) ถ้าใส่สารปริมาณมากลงบนแผ่น ถึงแม้จะใส่สารในลักษณะเป็นแถบก็ตาม อัตราการระเหยของตัวทำละลายเมื่อสารกำลังถูกพ่นลงไปบนแผ่นที่วางอยู่บนแท่นที่กำลังเคลื่อนที่ ทำให้เกิดการแพร่กระจายของแถบเริ่มต้นมาก ค่าความเที่ยงจึงไม่ดีเท่าการใส่สารโดยให้ความเข้มข้นของสารมากและใส่สาร

ในปริมาณน้อย ตัวอย่างเช่น เมื่อใส่สารอะมีทรินความเข้มข้น 20, 50 และ 100 ng ลงบนแผ่นโดยมีปริมาตรครั้งละ 10 μL หาค่า %RSD ได้ 3.29, 2.56 และ 2.34 ตามลำดับ แต่เมื่อให้มีปริมาตรครั้งละ 100 μL %RSD จะมีค่ามากกว่าคือ 5.15, 5.51 และ 2.93 ตามลำดับ เมื่อทดลองกับสารเบนไธโอคาร์บ โดยให้เบนไธโอคาร์บมีความเข้มข้น 1, 2 และ 3 μg ทำการใส่สารในปริมาตร 10 μL มีค่า %RSD 3.42, 2.34 และ 1.79 ตามลำดับ แต่เมื่อทำการใส่สารในปริมาตร 100 μL จะมีค่า %RSD สูงกว่าคือ 13.94 , 3.67 และ 13.81 ตามลำดับ ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 3.10 ก และ 3.10 ข

เมื่อดูค่าความเที่ยงของการใส่สารเมื่อใช้วิธีการ External Standardization พบว่า ในแถบที่มีความเข้มข้นเดียวกัน(แถบที่ 1, 2 และ 3) มีค่า % RSD ที่แตกต่างกันในแต่ละความเข้มข้น เมื่อเปลี่ยนค่าความเข้มข้นจากน้อยไปมากของสารกำจัดศัตรูพืชแต่ละชนิด แนวโน้มของ % RSD มีแนวโน้มไปทางเดียวกันคือ มีค่าจากมากไปน้อย นั่นคือ ยิ่งเพิ่มความเข้มข้นของสารบนแผ่นมากขึ้นค่า % RSD จะยิ่งมีค่าน้อยลง ในขณะเดียวกัน การหาค่าความเที่ยงของการใส่สารโดยวิธีการ Internal Standardization พบว่าแนวโน้มของค่า % RSD ของสารกำจัดศัตรูพืชแต่ละชนิดนั้นไม่เหมือนกับ External Standardization คือมีค่าไม่แน่นอน การที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจากในการทำ Internal Standardization นั้น นอกจากจะเกิดความคลาดเคลื่อน(deviate) ของการวัด absorbance ของแถบของสารกำจัดศัตรูพืชเองแล้ว ยังสามารถเกิดความคลาดเคลื่อนของการวัด absorbance ของแถบ internal standard ได้ด้วย ดังนั้นถึงแม้ค่า %RSD โดยส่วนใหญ่แล้วสำหรับสารกำจัดศัตรูพืชแต่ละชนิด Internal Standardization จะดีกว่า External Standardizaton ก็ตาม แนวโน้มของ % RSD ของวิธีการทั้งสองจึงแตกต่างกัน(ดูจากตารางที่ 3.2)

ในการเลือกใช้สารเพื่อเป็น internal standard นั้น งานวิจัยครั้งนี้จำเป็นต้องเลือกเมธิลพาราไธออนเป็น internal standard เนื่องจากเมื่อดูจากโครมาโทแกรมในรูปที่ 3.6 เมื่อใช้โมบายเฟส (1:4) 2-บิวทาโนน-ไซโคลเฮกเซน พบว่าเมธิลพาราไธออนเป็นพีกที่อยู่ค่อนข้างกลางของโครมาโทแกรมและเป็นพีกเดี่ยว ซึ่งแตกต่างจากอะมีทรินและคาร์โบฟูรานซึ่งเป็นพีกที่อยู่ติดกันและมีการแยกที่ไม่ดี นอกจากนี้เมธิลพาราไธออนยังเป็นพีกที่ไม่มี isomer ดังเช่นเมวินฟอส และเป็นพีกที่ไม่เคลื่อนที่ออกจากแถบเริ่มต้นดังเช่นโมโนโครโทฟอส ส่วนเบนไธโอคาร์บนั้นเนื่องจากเมื่อทำการ development ไปแล้วแถบของเบนไธโอคาร์บจะเคลื่อนที่ไปอยู่สูงสุดในบรรดาสารทั้งหมด ทำให้เกิดการแพร่กระจายมากกว่า ดังนั้นจึงไม่ใช้

เป็น internal standard

ในการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่าง ปริมาณของสารกำจัดศัตรูพืชแต่ละชนิด กับค่า absorbance ที่วัดได้ ทั้งโดยวิธีการ External Standardization และ Internal Standardization พบว่าวิธีการทั้ง 2 นี้ให้ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้น(หรืออัตราส่วนความเข้มข้น) กับค่า absorbance (หรืออัตราส่วน absorbance)เป็นแบบเส้นตรง และเมื่อนำความสัมพันธ์ดังกล่าวมาใช้ในการหาค่าความถูกต้องของการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชแต่ละชนิดแล้วพบว่า % Error ที่เกิดขึ้นโดยวิธีการ External Standardization ใกล้เคียงกับ Internal Standardization โดยที่วิธีการ External Standardization มีค่า % Error มากกว่าของ Internal Standardization เล็กน้อย ดังนั้นจึงสามารถกล่าวได้ว่าวิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทาง HPTLC นั้นสามารถใช้ได้ดีทั้งแบบ External Standardization และแบบ Internal Standardization ดังตารางที่ 3.26 และ 3.27 % Error เมื่อใช้วิธีการ External Standardization และวิธีการ Internal Standardization ของสารกำจัดศัตรูพืชอะมีทรินคือ 4.80 และ 2.72 เบนไธโอคาร์บ 5.64 และ 2.22 คาร์โบฟูราน 4.63 และ 2.73 เมธิลพาราไธออน 9.53 และ 4.00 โมโนโครโทฟอส 2.23 และ 0.58 และเมวินฟอส 17.44 และ 5.24 ตามลำดับ และเมื่อทำการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชที่ผสมกันในตัวอย่าง โดยหาค่าความถูกต้องจากวิธีการ 2 วิธีนี้ เมื่อพิจารณาโดยทั่วไปแล้วพบว่าวิธีการ External Standardization นั้นสามารถให้ค่าความถูกต้องของการวิเคราะห์ดีกว่า Internal Standardization ทั้งนี้เนื่องจากวิธีการของ Internal Standardization นั้นถึงแม้จะได้เลือก internal standard ที่เหมาะสมที่สุดแล้วก็ตาม แต่การแยกของแต่ละพีกที่ไม่ใช่ internal standard อันได้แก่ อะมีทริน คาร์โบฟูราน และเมวินฟอสในสารผสมนั้น มีการแยกออกจากกันยังไม่ดี ส่วนการวิเคราะห์โมโนโครโทฟอสนั้นจำเป็นต้องเปลี่ยนโมบายเฟสที่แตกต่างจาก (1:4) 2-บิวทาโนน-ไซโคลเฮกเซน ทั้งนี้เนื่องจากโมโนโครโทฟอสนั้นเมื่อใช้ (1:4) 2-บิวทาโนน - ไซโคลเฮกเซน แถบของโมโนโครโทฟอสไม่เคลื่อนที่ออกจากแถบเริ่มต้นทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ ดังนั้นจึงต้องเปลี่ยนโมบายเฟสเป็นเอธิลอะซีเตต ซึ่งโมบายเฟสชนิดนี้ทำได้เฉพาะใน External Standardization เท่านั้นและไม่สามารถทำโดยเทคนิค Internal Standardizaton ได้ เนื่องจาก ถ้าใช้โมบายเฟสเอธิลอะซีเตตแล้ว จะมีแต่โมโนโครโทฟอสที่แยกออกจากตัวอื่นเท่านั้น ส่วนการวิเคราะห์เมธิพาราไธออน (ซึ่งใช้เป็น

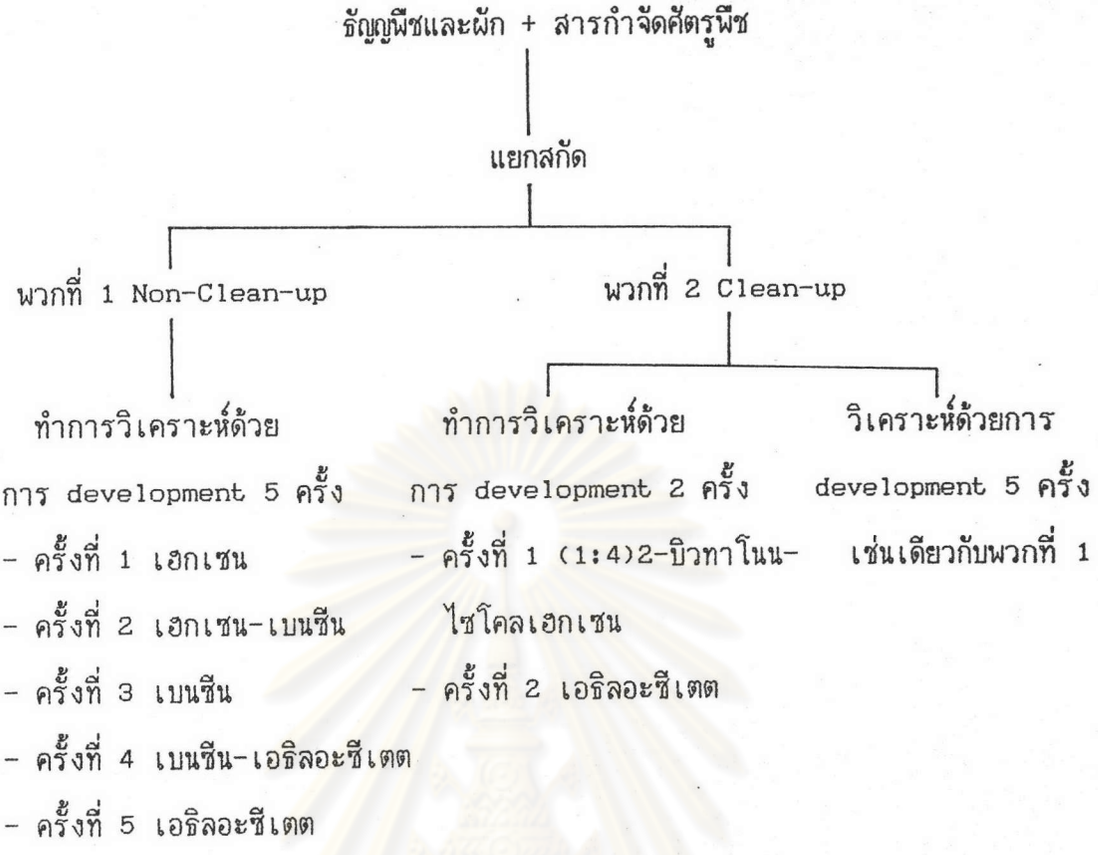
internal standard เองนั้น) ใช้อะมีทรินเป็น internal standard แทน ผลการวิเคราะห์ที่ทดลองได้ไม่ดีให้ % error มาก ดังนั้นเมื่อสรุปโดยรวมแล้ว จากการทดลองที่ใช้สภาวะดังกล่าวนี้วิเคราะห์ใน mixture ของสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิดนั้น เทคนิคการวิเคราะห์ที่เหมาะสมที่สุดจึงควรเป็นเทคนิค External Standardization ซึ่งให้ผลการวิเคราะห์ดีมี % error ต่ำ

สำหรับการทดลองการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชในธัญพืชและผักนั้น ได้นำเอาเทคนิคที่พัฒนาขึ้นไปใช้โดยคาดว่า HPTLC เป็นเทคนิคที่สามารถนำมาใช้ในการ clean-up สารตัวอย่าง ในขณะเดียวกันนั้นสามารถทำการวิเคราะห์ได้ด้วย ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองโดยแบ่งวิธีทำออกเป็น 2 พวกนั่นคือ พวกที่ 1 เป็นสารที่แยกสกัดจากธัญพืชและผักที่ได้ผสมสารกำจัดศัตรูพืชไว้ด้วย โดยไม่มีการ clean-up ด้วย Florisil column และพวกที่ 2 เป็นตัวอย่างของสารที่แยกสกัดจากธัญพืชและผักซึ่งได้ผสมสารกำจัดศัตรูพืชไว้ด้วย และได้ทำการ clean-up ด้วย Florisil column (Florisil column เป็น column ที่นิยมใช้ในการ clean-up สารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชที่แยกสกัดออกมาจากธัญพืชและผักก่อนนำไปฉีดเข้าเครื่อง GC คอลัมน์นี้เป็นส่วนผสมของ silica และ alumina ซึ่งจะช่วยดูดซับสารต่างๆ ที่สกัดได้จากพืชไว้)

พวกที่ 1 เนื่องจากในส่วนนี้เป็นส่วนที่แยกสกัดได้และไม่ได้ทำการ clean-up ดังนั้นจึงต้องใช้โมบายเฟส จำนวน 5 ระบบ ดังในการทดลองที่ 3.6.2.2 ทำการ development 5 ครั้งครั้งละ 1 ระบบเพื่อเป็นการ clean-up และทำการวัด absobance ของสารกำจัดศัตรูพืชไปด้วย แล้วจึงทำการวิเคราะห์ได้

พวกที่ 2 เป็นส่วนที่แยกสกัดได้และทำการ clean-up ด้วย Florisil column แล้วนำมาทดสอบใน 2 รูปแบบคือ แบบที่หนึ่ง-ทำการ development ด้วยโมบายเฟส จำนวน 5 ระบบเช่นเดียวกับพวกที่ 1 และแบบที่สอง-ทำการ development ด้วยโมบายเฟสที่ได้คัดเลือกมาจากการทดลองในช่วงแรกๆ คือใช้ (1:4)2-บิวทาโนน-ไซโคลเฮกเซนเสียก่อนเพื่อทำการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืช 5 ชนิดคือ อะมีทริน เบนไธโอคาร์บ คาร์โบฟูราน เมธิลพาราไธออน และเมวินฟอส แล้วตามด้วยการ development ครั้งที่ 2 โดยใช้ เอธิลอะซีเตต เพื่อทำการวิเคราะห์เฉพาะ โมโนโครโทฟอส

ดังนั้นเมื่อเขียนเป็นแผนภูมิของวิธีการดังกล่าวจะได้ดังนี้



จากการทดลองดังกล่าวพบว่า % Recovery ของสารกำจัดศัตรูพืชที่วิเคราะห์ได้ในข้าว เมื่อไม่ได้ทำการ clean-up ด้วย Florisil column พบว่ามีค่า % Recovery ที่สามารถเทียบกันได้กับ ส่วนที่สกัดแยกสารกำจัดศัตรูพืชในข้าวเมื่อทำการ clean-up แล้ว โดยเมื่อดูจากส่วนใหญ่แล้วมีค่า % Recovery อยู่ในเกณฑ์ที่ใกล้เคียงกัน

เมื่อดูค่า %Recovery ของสารกำจัดศัตรูพืชที่วิเคราะห์ได้ในข้าวโพด พบว่าในส่วนของที่แยกสกัดจากข้าวโพดแต่ยังไม่ได้ทำการ clean-up นั้น โดยทั่วไปแล้วมีค่า %Recovery สูงกว่าในส่วนของการ clean-up ทั้งนี้น่าจะมีปัจจัยมาจากการสูญเสียสารกำจัดศัตรูพืชที่เติมลงไปนั้นในระหว่างการ clean-up และการ development หลายๆ ครั้งดังกล่าว

ในการทดสอบการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชในกระหล่ำปลีพบว่า เมื่อดูจากค่า %Recovery เปรียบเทียบกันในส่วนที่แยกสกัดได้ เมื่อยังไม่ได้ทำการ clean-up และเมื่อทำการ clean-up แล้วพบว่า สารกำจัดศัตรูพืชส่วนใหญ่นั้นมีแนวโน้มของค่า %Recovery ในส่วนที่ยังไม่ได้ทำการ clean-up สูงกว่าส่วนที่ทำการ clean-up แล้วนั้น ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ในการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชในธัญญพืชนั้น โดยส่วนใหญ่แล้ววิธีของการ clean-up โดยมีแผ่น HPTLC เป็นตัว clean-up นั้นดีกว่าการใช้ florisil column โดยมีเหตุผลที่

คาดหมายได้ดังนี้

1. ความสามารถในการ clean-up ของ Florisil column ไม่ดีนัก เนื่องจาก เมื่อดูลักษณะของ Florisil column แล้วพบว่า mesh size ของ Florisil นั้นค่อนข้างหยาบ และอีกทั้ง retain volume ค่อนข้างน้อยคือประมาณ 3 mL จึงไม่เหมาะสำหรับการ clean-up สารกำจัดศัตรูพืช จึงทำให้การ clean-up ได้ผลไม่ดี

2. Florisil มีคุณสมบัติที่ดีในการดูดซับสารกำจัดศัตรูพืช แม้จะใช้โมบายเฟสในการชะล้างออกแล้วก็ตาม ก็ยังคงมีสารกำจัดศัตรูพืชบางส่วนที่ตกค้างอยู่ใน column ทำให้ค่า %Recovery ลดลง

เมื่อทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างจริงโดยการสุ่มตัวอย่างจากท้องตลาดทั่วไป ทำการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคและขั้นตอนการทดลองดังกล่าว พบว่าไม่พบสารกำจัดศัตรูพืชในธัญญพืชและผักตัวอย่างดังกล่าวเลย ซึ่งทั้งนี้น่าจะมีเหตุผลสนับสนุนคือ

1. ปริมาณของสารกำจัดศัตรูพืชที่มีในข้าว ซึ่งทำการวิเคราะห์เป็นจำนวน 6 ชนิดนั้นอาจมีปริมาณสารน้อยเกินกว่าที่จะสามารถใช้เทคนิคนี้ในการวิเคราะห์ได้

2. สารตัวอย่างที่นำมาทดสอบนี้ไม่มีสารกำจัดศัตรูพืชดังกล่าวที่วิเคราะห์

ดังนั้น เมื่อดูจากลักษณะและวิธีการของเทคนิคนี้แล้ว อาจมีสาเหตุที่ทำให้การวิเคราะห์โดยเทคนิค HPTLC ไม่สามารถตรวจพบและวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิดนี้จากสารตัวอย่างที่เก็บมาได้ดังนี้

1. เนื่องจากตำแหน่งในการเลือกความยาวคลื่นที่จะวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืช โดยทั่วไปแล้วสารกำจัดศัตรูพืชย่อมมีโครงสร้างที่คล้ายกับเอนไซม์ในพืช ดังนั้นเมื่อใช้ความยาวคลื่นที่ 254 นาโนเมตร ซึ่งไม่ได้เป็นความยาวคลื่นที่จำเพาะชนิดของสารกำจัดศัตรูพืช แต่เป็นความยาวคลื่นที่มักพบว่าสารอินทรีย์แทบทุกชนิดมีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นนี้ จึงทำให้ทำการวิเคราะห์โดยเลือกใช้ specific wavelength ไม่ได้ และ matrix ในสารตัวอย่างได้แก่ ข้าว ข้าวโพด และพืชผัก ปนเปื้อนได้ง่าย ซึ่งผิดกับการวิเคราะห์หาปริมาณ แอลฟ่าท็อกซินในถั่วและธัญญพืชซึ่งมี specific wavelength (ที่ 366 nm) จึงทำได้อย่างดีเยี่ยม

2. ความสามารถในการวิเคราะห์ของ HPTLC ยังด้อยอยู่ เนื่องจาก HPTLC เป็นระบบ open system ทำให้ความสามารถในการวิเคราะห์ต่ำกว่าปกติ แต่ถึงอย่างไรก็ตามโดยทั่วไปแล้วระบบ open system โดยการใช้แผ่น HPTLC เพียงครั้งเดียว

แล้วทิ้งนั้นมีประโยชน์มากต่อการกำจัดสิ่งปนเปื้อนและสารที่ไม่ต้องการออกไปได้มากมายทำให้การวิเคราะห์มีความถูกต้องยิ่งขึ้น

3. สารตัวอย่างที่เก็บมาจากตลาดนั้นอาจไม่มีหรือมีน้อยกว่าขีดความสามารถของการตรวจหาก็ได้ จึงทำให้วิเคราะห์แล้วไม่พบ

ดังนั้นถ้าหากต้องการนำระบบและเทคนิคชนิดนี้ไปใช้ในการวิจัย เพื่อพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ต่อๆ ไป จึงเห็นควรให้

1. เลือกใช้สารที่จะวิเคราะห์ ที่สามารถดูดกลืนแสงได้ดีจำเพาะเจาะจงและเหมาะสมมากขึ้น เพื่อลดการรบกวนจาก matrix และ interference อื่นๆที่จะทำให้ค่าของการวิเคราะห์เกิดการเปลี่ยนแปลงไป

2. เมื่อสารที่ต้องการวิเคราะห์นั้น มีปริมาณมากพอที่จะใช้ในการวิเคราะห์โดย HPTLC ได้ เช่นมีความเข้มข้นของสารกำจัดศัตรูพืชในข้าวในปริมาณค่อนข้างสูง มิฉะนั้นจะต้องหาทางเพิ่มความเข้มข้นเสียก่อน

3. เมื่อ matrix ที่ทำการวิเคราะห์นั้น สามารถทราบได้อย่างแน่นอนว่ามีอะไรปนเปื้อนอยู่บ้าง เช่น การวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณของ major และ minor product ของการทำการสังเคราะห์สารอินทรีย์(organic synthesis) องค์ประกอบต่างๆ สามารถทราบได้ จึงขอแนะนำผู้ทำวิจัยด้านเคมีสังเคราะห์หรือผู้วิจัยด้านผลิตภัณฑ์ธรรมชาติได้ทดลองใช้เทคนิคนี้ทำการวิเคราะห์หาสารที่ต้องการ เช่น

<u>การหาความบริสุทธิ์ของสารอินทรีย์ทำได้อย่างดีและรวดเร็วโดยใช้วิธีการทาง HPTLC</u>

การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ (% Purity) ของสารอินทรีย์โดยวิธีนี้นั้น มีข้อจำกัดเพียงเล็กน้อยคือ สารที่จะวิเคราะห์ต้องเป็นสารอินทรีย์ที่ไม่ระเหยง่าย และสามารถเกาะติดบนตัวดูดซับได้ ขั้นตอนต่างๆ ของการวิเคราะห์สามารถทำได้ดังนี้

1. ทำการเลือกโมบายเฟส ซึ่งสามารถให้การแยกได้ดีที่สุดบนแผ่น TLC ซิลิกาเจล

2. ทำการ pre-clean-up แผ่น HPTLC ซิลิกาเจล โดยใช้ 1 - 5 % แอมโมเนีย-เมธานอล โดยทำการ develop ให้มีระยะทางเท่ากับระยะทางที่จะใช้ในการทดลองดัง

ระยะทางที่สามารถทำให้เกิดการแยกได้ดีที่สุด บนแผ่น TLC (cm.)	ระยะทางที่ใช้ในการทดลอง บนแผ่น HPTLC (cm.)
7	5
10 - 15	7
20	10

3. ทำการอบแผ่น HPTLC ที่อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ให้แห้งหรือเป่าลมร้อนให้แห้ง

4. ปล่อยให้แผ่นเย็น และทำการใส่สารลงบนแผ่น HPTLC ตามที่ต้องการด้วยเครื่อง Linomat II

5. develop ด้วยโมบายเฟสระบบเดียวกันกับโมบายเฟสที่แยกได้ดีที่สุดบนแผ่น TLC

6. ระเหยโมบายเฟสออกให้รวดเร็วที่สุด โดยเป่าด้วยลมร้อนแล้วนำไปวางบนแท่นของเครื่อง densitometer เพื่อวัดค่า absorbance

ข้อควรระวัง การใส่สารด้วยเครื่องนั้นจะพบว่า แถบเริ่มต้นเมื่อยังไม่ develop ด้วยโมบายเฟสนั้นแยกออกเป็น 2 ซีก เนื่องจากขณะที่ทำการฉีดสารตัวอย่าง ต้องใช้แรงดันแก๊สทำให้การใส่สารเริ่มต้นไม่ดีเท่าที่ควร ดังนั้นต้องไม่ใช้ลมแรงเกินไป แต่ภายหลังเมื่อทำการ develop แล้วและมีการเคลื่อนที่ของแถบไปได้ระยะหนึ่งจะเกิดการรวมเป็นพีกเดียวกัน(ประมาณ 2 mm.)

ส่วนใหญ่แล้วเมื่อทำการ develop ด้วย TLC นั้น พบว่าความสามารถในการแยกของสาร (separation number)นั้นน้อยกว่า HPTLC โดยสรุปแล้วเทคนิค HPTLC มีข้อได้เปรียบกว่า TLC ดังนี้

1. HPTLC สามารถทำการวิเคราะห์ trace analysis ได้ดี

2. HPTLC มีความสามารถในการแยก isomer ได้ดีมาก อาจพบว่าในบางครั้งสารที่คิดว่ามีความบริสุทธิ์ 99-100 % จะแยกเป็น 2 พีก เนื่องจากสารนั้นเป็น isomer กัน (แต่ทั้งนี้ต้องสังเกตุด้วยว่าไม่ใช่เป็นพีกจากการใส่สารเริ่มต้น)

3. เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์สารอินทรีย์บางประเภทได้ในเวลาอันรวดเร็วมาก เมื่อเทียบกับวิธีการอื่น

4. ไม่ต้องหาคอลัมน์ และโมบายเฟสใหม่ดังเช่นวิธีการของ GC

5. สามารถทำการวิเคราะห์ได้ทั้งคุณภาพและปริมาณวิเคราะห์ในแผ่น HPTLC เดียวกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย