



บทที่ 3

การทดลองและผลการทดลอง
(Experiment and Discussion)3.1 เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง3.1.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง มีดังนี้

1. เครื่อง Linomat III ความคมการ apply สารลงบนแผ่น HPTLC ของ บริษัท CAMAG ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
2. แผ่น HPTLC silica gel 60 และ แผ่น HPTLC silica gel 60 GF₂₅₄ ขนาด 10x10 เซนติเมตร ของบริษัท CAMAG ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
3. เครื่อง Densitometer model TLC Scanner II บริษัท CAMAG
4. เครื่อง Integrator ของ Spectra-Physics model SP4290 ของบริษัท CAMAG ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
5. Microsyringe ขนาด 100.00 uL ของ บริษัท Hamilton ประเทศสหรัฐอเมริกา ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
6. เครื่องกลั่นสารสูญญากาศ (Rotatory Vacuum Evaporator) ของ บริษัท Tokyo Rikakikai (EYELA) ประเทศญี่ปุ่น
7. เครื่องบดสาร (Homogenizer, Blender) ของ บริษัท Warning Commercial ประเทศสหรัฐอเมริกา
8. เครื่องเขย่าสารผสม (Shaker) model SA-31 ของ บริษัท Yamato ประเทศญี่ปุ่น
9. Micropipette ขนาด 50-200 uL ของ บริษัท Finnpiette Helsinki ประเทศฟินแลนด์
10. Vial ขนาด 1 dram, 2 drams, 4 drams และ 8 drams.
11. เครื่องแก้วอื่นๆ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
เฮกเซน (AR)	Merck
ไซโคลเฮกเซน (AR)	BDH
เอทิล อะซีเตท (AR)	Merck
2-บิวทานโนน (AR)	Merck
อะซีโตน (AR)	JT. Baker
ไดคลอโรมีเทน (AR)	JT. Baker
เบนซีน (AR)	JT. Baker
โทลูอีน (AR)	Merck
ไดเอทิลอีเธอร์ (AR)	Merck
คลอโรฟอร์ม (AR)	Merck
คาร์บอนเตตระคลอไรด์ (AR)	BDH
แอมโซลูท เอธานอล (AR)	Merck
เมธานอล	Merck
Silica gel 60 G (GF ₂₅₄)	Merck

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.3 สารมาตรฐานสารกำจัดศัตรูพืชที่ใช้ในการทดลอง

สารมาตรฐาน	บริษัทผู้ผลิต
อะมีทริน (Standard Ametryne)	Chem Service ประเทศ USA
เบนไทโอคาร์บ หรือ ไธโอเบนคาร์บ (Standard Benthocarb or Thiobencarb)	Chem Service
คาร์โบฟูราน หรือ ฟูราดาน (Standard Carbofuran or Furadan)	Chem Service
เมธิลพาราไธออน (Standard MethylParathion)	Chem Service
โมนโครโทฟอส (Standard Monocrotophos)	Chem Service
เมวินฟอส หรือ ฟอสดริน (Standard Mevinphos or Phosdrin)	Chem Service

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 การทำคุณภาพวิเคราะห์ของสารกำจัดศัตรูพืช ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี(TLC)

เนื่องจากแผ่น HPTLC มีราคาค่อนข้างสูง ประกอบกับการเลือกระบบตัวทำละลายเบื้องต้น ที่เหมาะสมของเทคนิค TLC ยังมีความคล้ายคลึงกับเทคนิค HPTLC อย่างยิ่ง ดังนั้น ในการทดลองนี้จึงได้นำเทคนิค TLC มาใช้ในการคัดเลือกตัวทำละลาย และระบบตัวทำละลายเบื้องต้น ที่มีผลต่อการแยกและลักษณะการแยกของสารกำจัดศัตรูพืชชนิดต่างๆ เสียก่อน ก่อนที่จะนำไปใช้กับ HPTLC เพื่อเป็นการประหยัด

3.2.1 การเตรียมแผ่น TLC

1. คัดขนาดเม็ด Silica Gel GF₂₅₄ ชนิดผงที่ใช้ในการทำ TLC ด้วยเครื่องร่อน ให้มีขนาดเม็ดระหว่าง 200 ถึง 300 ไมครอน
2. ชั่ง Silica Gel ที่คัดขนาดแล้วนั้นมาจำนวน 30 กรัม ผสมกับน้ำในอัตราส่วน 1:2 โดยประมาณ เขย่าจนเป็น slurry (มีลักษณะเหลว แต่ไม่ใส และเป็นเนื้อเดียวกัน)
3. นำ slurry ที่ได้ เทลงในเครื่องมือที่ใช้ในการเคลือบแผ่น ทำการเคลือบ Silica Gel บนแผ่นกระจกขนาด 6x7 cm. ให้มีความหนาของชั้นเคลือบ 0.2 mm. เรียบเสมอกัน
4. ทิ้งให้แห้ง นำเข้าตู้อบที่ 120 C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปล่อยทิ้งให้เย็นใน desiccator พร้อมทั้งจะใช้

3.2.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานสารกำจัดศัตรูพืช เพื่อทำคุณภาพวิเคราะห์ โดยเทคนิค TLC

1. ชั่งสารมาตรฐานสารกำจัดศัตรูพืช ตัวอย่างละประมาณ 1 มิลลิกรัม จำนวน 6 ตัวอย่าง
2. ละลายในตัวทำละลายเมธานอลตัวอย่างละ 0.5 mL จะได้สารละลายมาตรฐานจำนวน 6 ตัวอย่าง
3. ในตัวอย่างที่ 7 นั้น ให้ทำเป็นสารละลายผสมของสารมาตรฐานทั้ง 6 ตัวอย่าง โดยการชั่งสารมาตรฐานทั้ง 6 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 1 มิลลิกรัมใส่ขวดใบเดียวกัน และเติมเมธานอลจำนวน 0.5 mL ละลายจนเป็นเนื้อเดียวกัน
4. ใช้ capillaries เล็กๆ ดูดสารละลายมาตรฐานสารกำจัดศัตรูพืช

ชนิดต่างๆ แต้มลงบนแผ่น TLC ที่เตรียมไว้ พยายาม spot ให้มีรัศมีเล็กที่สุดเท่าที่สามารถทำได้ตามรูปเรียงตามลำดับตาม code ข้างล่างนี้



A = อะมีทริน
 B = เบนไรโอคาร์บ
 C = คาร์โบฟูราน
 MP = เมธิลพาราไรออน
 Mo = โมโนโครโทฟอส
 Me = เมวินฟอส
 Mix = ของผสมจากสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ข้างต้น

5. นำแผ่น TLC ที่ spot แล้วนั้นไปวางไว้ใต้แสง UV ความเข้มข้นของสารที่พอเหมาะบนแผ่นสามารถดูได้จากความเข้มของ spot ทึบแสงที่มองเห็นภายใต้แสง UV พยายามทำให้สารมาตรฐานทุกตัวมีความเข้มของแต่ละ spot เท่าๆ กัน

6. บุผนังภาชนะที่เตรียมบรรจุโม่บાયเฟสด้วยกระดาษกรอง เทโม่บાયเฟสลงในภาชนะ ปิดฝาภาชนะ เขย่าเพื่อให้กระดาษกรองชุ่มด้วยโม่บાયเฟส ตั้งทิ้งไว้สักครู่

7. นำแผ่นที่ได้รับการ spot แล้วนั้น มาวางลงในภาชนะที่บรรจุโม่บાયเฟส เมื่อโม่บાયเฟสเคลื่อนขึ้นไปตามความยาวของแผ่นจนสุดขอบบนของแผ่นจึงเอาแผ่น TLC ออกทำการระเหยโม่บાયเฟสออกอย่างรวดเร็ว ด้วยเครื่องเป่าลมร้อน

8. นำแผ่น TLC ที่ทำการ develop แล้วนั้นไปวางไว้ภายใต้แสง UV เพื่อดูลักษณะการแยก

3.2.3 การ develop แผ่น TLC ด้วยโม่บાયเฟสที่เป็นตัวทำละลายเดี่ยว

ในการเลือกตัวทำละลายเดี่ยวเพื่อใช้ในการ develop แผ่น ให้เรียงจากตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยไปหาตัวทำละลายที่มีขั้วมาก ดังแสดงในตารางที่ 3.1

การเลือกใช้ตัวทำละลายนั้นเลือกใช้ตัวทำละลายที่นิยมใช้มากในห้องปฏิบัติการ และมีความเป็นพิษต่ำ อันได้แก่

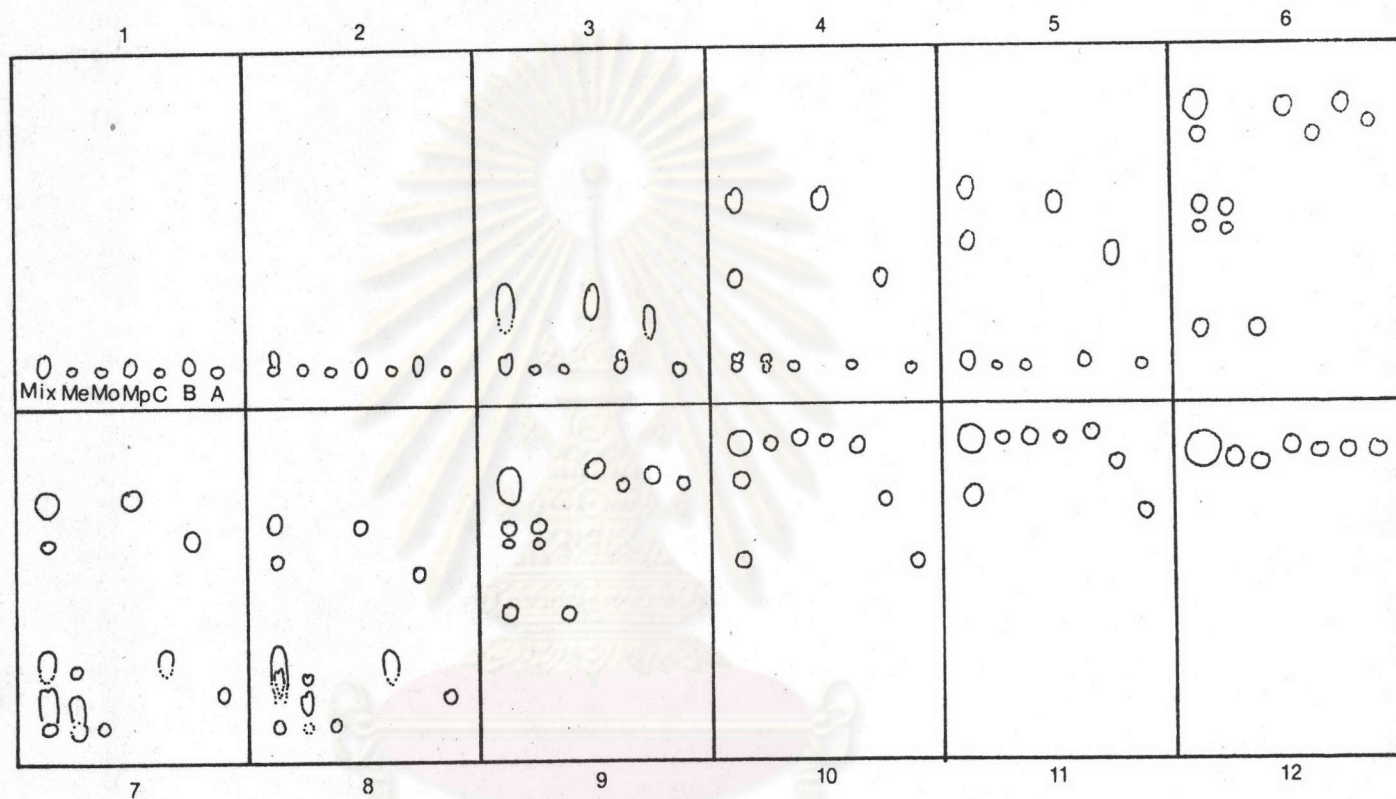
เฮกเซน	ไซโคลเฮกเซน	คาร์บอนเตตระคลอไรด์
โทลูอิน	เบนซีน	ไดเอธิลอีเทอร์
ไดคลอโรมีเทน	คลอโรฟอร์ม	เอธิลอะซีเตต
2-บิวทานอน	อะซีโตน	และ เอทานอล

ตารางที่ 3.1 แสดงถึงควมมีขั้ว(Polarity)ของตัวทำละลายชนิดต่างๆ

ตัวทำละลาย	Polarity	ตัวทำละลาย	Polarity
เพนเทน	0.0	โพรพานอล	4.0
เฮกเซน	0.1	เตตระไฮโดรฟูราน	4.0
เฮพเทน	0.2	คลอโรฟอร์ม	4.1
ไซโคลเฮกเซน	0.2	เอธิลอะซีเตต	4.4
คาร์บอนไดซัลไฟด์	0.3	2-บิวทานิน	4.7
คาร์บอนเตตระคลอไรด์	1.6	ไดออกเซน	4.8
บิวทิลอีเทอร์	2.1	เอทานอล	4.3
ไอโซโพรพิลอีเทอร์	2.4	อะซีโตน	5.1
โทลูอิน	2.4	เมทานอล	5.1
ไซลีน	2.5	อะซีโตนไนไตรด์	5.8
คลอโรเบนซีน	2.7	อะซีติกแอซิด	6.0
เบนซีน	2.7	ไนโตรมีเทน	6.0
ไดเอธิลอีเทอร์	2.8	อะนิลีน	6.3
ไดคลอโรมีเทน	3.1	ไดเมทิลฟอร์มาไมด์	6.4
1,2-ไดคลอโรอีเทน	3.5	เอธิลีนไกลคอล	6.9
บิวทานอล	3.9	ฟอร์มาไมด์	9.6
ไอโซโพรพานอล	3.9	น้ำ	10.2

ผลของการใช้ตัวทำละลายเดี่ยวในการแยกสารกำจัดศัตรูพืช ดังแสดงในรูป

ที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แสดงถึงตัวทำละลายต่างชนิดที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของ spot ของสารกำจัดศัตรูพืช: A=อะมีทริน; B=เบนโทไอคาร์บ; C=คาร์โบฟูราน; MP=เมธิลพาราไรออน; Mo=โมโนโครโทฟอส; Me=เมวินฟอส; Mix=สารผสมทั้ง 6 :
 โมบายเฟส ได้แก่ (1)เฮกเซน, (2)ไซโคลเฮกเซน, (3)คาร์บอนเตตระคลอไรด์, (4)โทลูอิน, (5)เบนซีน, (6) ไดเอทิลอีเธอร์, (7)ไดคลอโรมีเทน, (8)คลอโรฟอร์ม, (9)เอทิลอะซิเตต, (10)2-บิวทานอน, (11)อะซีโตน และ (12)เอทานอล

3.2.4 การ develop แผ่น TLC ด้วยโมบายเฟสที่เป็นตัวทำละลายผสม 2 ชนิด

เนื่องจากไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลายที่ทำให้เกิดการแยกได้ดีที่สุด ดังนั้น ตัวทำละลายผสม 2 ชนิด ที่ใช้เพื่อให้เกิดการแยกได้ดี ชนิดหนึ่งควรจะเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยกว่าไดคลอโรมีเทน และอีกชนิดหนึ่งควรจะเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าไดคลอโรมีเทน แต่เนื่องจากพบว่า นอกจาก Polarity ที่มีผลต่อการแยกแล้ว ปัจจัยอื่นๆ ดังกล่าวของตัวทำละลายยังมีผลต่อการแยก ดังนั้น จึงได้ลองจับคู่ทำการผสมกันในระหว่างตัวทำละลายเดี่ยวหลายคู่ พบว่า คู่ที่น่าจะสามารถทำให้เกิดการแยกได้ดี คือ

อีเธอร์-คาร์บอนเตตระคลอไรด์	อีเธอร์-ไซโคลเฮกเซน
ไดคลอโรมีเทน-เบนซีน	อะซีโตน-เบนซีน
อะซีโตน-ไดคลอโรมีเทน	2-บิวทาโนน-คาร์บอนเตตระคลอไรด์
2-บิวทาโนน-ไซโคลเฮกเซน	เอธิลอะซีเตต-เฮกเซน
เอทานอล-โทลูอิน	อะซีโตน-ไซโคลเฮกเซน
เอธิลอะซีเตต-ไซโคลเฮกเซน	

ดังนั้น จึงได้ทดลองทำการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของตัวทำละลายทั้งคู่ เป็น 10%, 20%, 30%, ..., และ 90% พบว่า ในตัวทำละลายบางคู่สามารถทำให้เกิดการแยกได้ดี เช่น

[1:1]อีเธอร์-คาร์บอนเตตระคลอไรด์	[3:2]อีเธอร์-ไซโคลเฮกเซน
[3:2]ไดคลอโรมีเทน-เบนซีน	[1:2]อะซีโตน-เบนซีน
[1:4]2-บิวทาโนน-ไซโคลเฮกเซน	[1:4]เอธิลอะซีเตต-เฮกเซน
[1:4]อะซีโตน-ไซโคลเฮกเซน	[1:4]เอธิลอะซีเตต-ไซโคลเฮกเซน

แต่ในโมบายเฟสบางคู่ การมีตัวทำละลายที่ต่างกันมากผสมอยู่ร่วมกัน จึงจำเป็นต้องค่อยๆ ทำการเปลี่ยนความเข้มข้นของตัวทำละลายทีละน้อย โดยค่อยๆ เพิ่มอัตราส่วนของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าลงไปในตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยกว่าครั้งละเล็กน้อย พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมมีดังต่อไปนี้

[3:17]2-บิวทาโนน-คาร์บอนเตตระคลอไรด์
[1:19]เอทานอล-โทลูอิน

และในตัวทำละลายผสมบางคู่ที่ใช้เป็นโมบายเฟสพบว่า ในการ develop ครั้งแรกนั้นเกือบจะสามารถแยกได้ดีจึงต้องมีการ develop ซ้ำครั้งที่ 2 ด้วยโมบายเฟสชนิดเดิมได้แก่

[1:19]เอธานอล-โทลูอิน

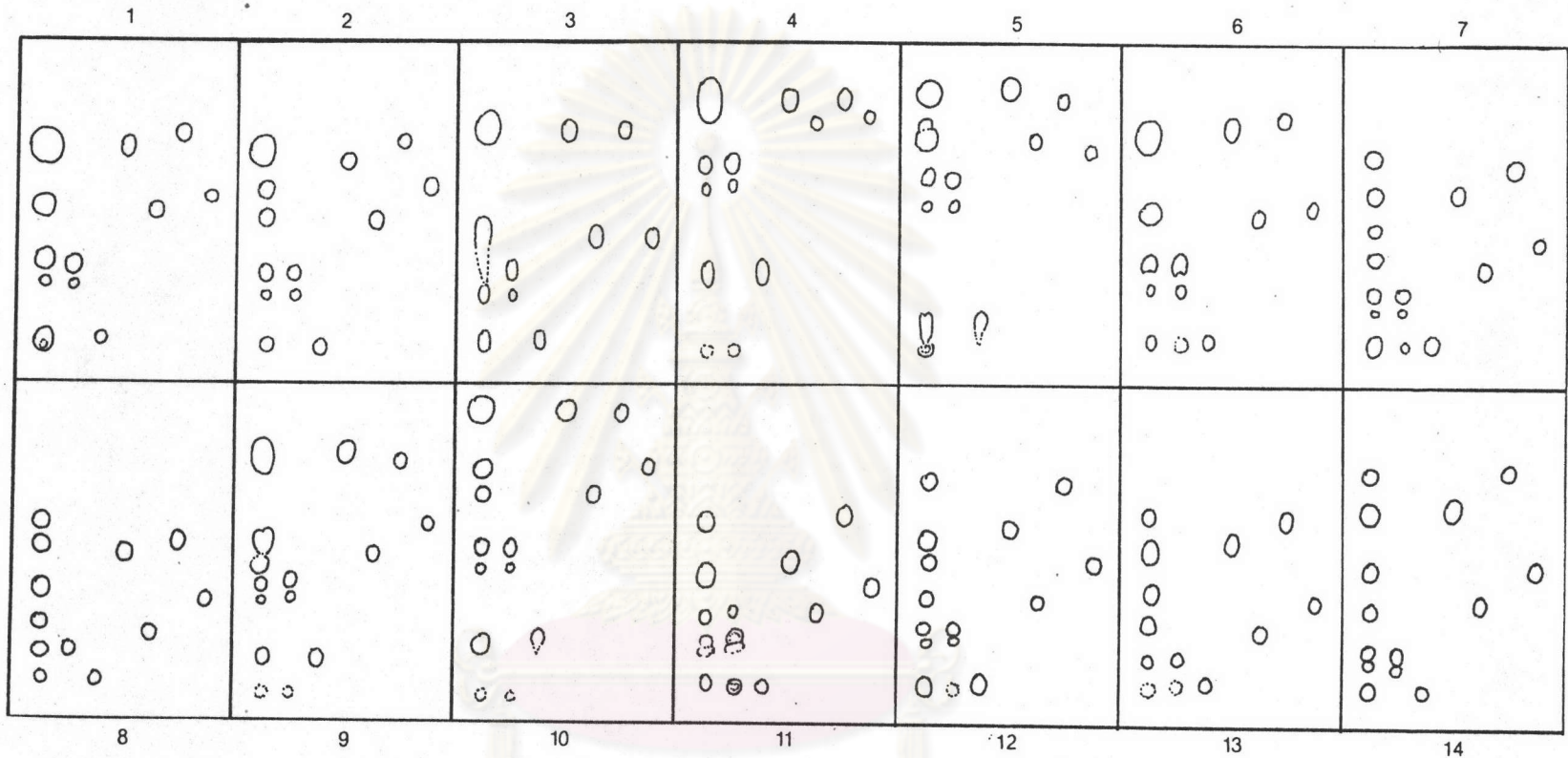
[1:4]อะซีโตน-ไซโคลเฮกเซน

[1:4]เอริลอะซีเตต-ไซโคลเฮกเซน

ผลจากการนำตัวทำละลายผสมสองชนิดเป็น โมบายเฟส เพื่อดูลักษณะการแยก
ดังแสดงในรูปที่ 3.3

โดยทั่วไปแล้วการที่จะดูว่า โมบายเฟสชนิดใดทำให้เกิดการแยกได้ดีที่สุดนั้นมัก
ดูจากจำนวนองค์ประกอบมากที่สุดที่สามารถทำให้เกิดการแยกได้ (number of separation)
ถ้าสารที่ผสมกันเมื่อทำการ develop ด้วยโมบายเฟสแล้วทำให้เกิดการแยกมากที่สุด และแยก
ออกจากกันได้ดีที่สุดแล้ว จึงจะถือว่าโมบายเฟสชนิดนั้นเหมาะสมต่อการแยก

จากรูปที่ 3.3 พบว่า ระบบตัวทำละลายผสมส่วนใหญ่สามารถทำให้เกิดการ
แยกได้ แต่บางระบบก็ไม่สามารถทำให้เกิดการแยกได้ดีเท่าที่ควร เช่น [3:2]ไดคลอโรมีเทน-
เบนซีน, [3:17]2-บิวทานอน-คาร์บอนเตตระคลอไรด์ และอื่นๆ เป็นต้น ถ้าดูจาก number
of separation จะพบว่าจำนวนองค์ประกอบที่สามารถแยกออกได้มากที่สุดคือ 7 องค์ประกอบ
และโมบายเฟสที่สามารถทำให้แยกได้ดีที่สุดมีหลายระบบคือ [1:4]2-บิวทานอน-ไซโคล
เฮกเซน(7), [1:19]เอธานอล-โทลูอิน(9), [1:19]เอธานอล-โทลูอิน ทำการ develop
2 ครั้ง(10), [1:4]อะซีโตน-ไซโคลเฮกเซน ทำการ develop 2 ครั้ง(12) และ [1:4]
เอริลอะซีเตต-ไซโคลเฮกเซน ทำการ develop 2 ครั้ง(14) แต่เมื่อนำมาพิจารณาให้ดีจะ
เห็นได้ว่า โมบายเฟส[1:19]เอธานอล-โทลูอิน(9) นั้น spot ของอะมิทรินและคาร์โบฟูราน
ยังไม่แยกจากกันอย่างเด็ดขาด การ separation จึงไม่ดีเท่าที่ควร อีกทั้งตำแหน่ง spot
ของเบนโซอิคาร์บและเมธิลพาราโรออนยังทับกันสนิท ถึงแม้จะทำการ develop ครั้งที่ 2
(10) แล้วก็ตาม ส่วน spot ทางด้านล่างสุดเป็น trace ของ mixture โมบายเฟส
[1:4]อะซีโตน-ไซโคลเฮกเซน ทำการ develop 2 ครั้ง(12) ถึงแม้จะแยกได้ครบก็ตาม
แต่ละ spot อยู่ติดกันมากเกินไป ส่วนโมบายเฟส[1:4]เอริลอะซีเตต-ไซโคลเฮกเซน
ทำการ develop 2 ครั้ง(14)นั้น spot ของเมวินฟอสที่เป็น isomer ไม่สามารถแยกจาก
กันโดยเด็ดขาด ดังนั้นโมบายเฟสที่สามารถใช้ได้ดีที่สุดจึงเป็น[1:4]2-บิวทานอน-ไซโคล
เฮกเซน(7) ซึ่งสามารถแยกองค์ประกอบได้ครบทุกตัวและมีการ separation ที่ดีที่สุด อย่างไรก็ตาม
ไรก็ตามอาจมีระบบตัวทำละลายอื่นที่สามารถ ทำให้เกิดการแยกได้ดีกว่า ดังนั้นจึงจำเป็นต้อง
ทดสอบตัวทำละลายผสม 3 ชนิดบางระบบที่มีผลต่อการแยกสารกำจัดศัตรูพืช



รูปที่ 3.3 แสดงถึงตัวทำละลายผสมสองชนิดที่มีผลต่อการแยกและลักษณะการแยกสารกำจัดศัตรูพืช :

โมบายเฟส (1)=[1:1]อีเธอร์-คาร์บอนเตตระคลอไรด์, (2)=[3:2]อีเธอร์-ไซโคลเฮกเซน, (3)=[3:2]ไดคลอโรมีเทน-เบนซีน, (4)=[1:2]อะซีโตน-เบนซีน, (5)=[1:24]อะซีโตน-ไดคลอโรมีเทน, (6)=[3:17]2-บิวทาโนน-คาร์บอนเตตระคลอไรด์, (7)=[1:4]2-บิวทาโนน-ไซโคลเฮกเซน, (8)=[1:4]เอทิลอะซีเตต-ไซโคลเฮกเซน, (9)=[1:19]เอทานอล-โทลูอีน, (10)=[1:19]เอทานอล-โทลูอีน ทำการ development 2 ครั้ง, (11)=[1:4]อะซีโตน-ไซโคลเฮกเซน, (12)=[1:4]อะซีโตน-ไซโคลเฮกเซน ทำการ development 2 ครั้ง, (13)=[1:4]เอทิลอะซีเตต-ไซโคลเฮกเซน, (14)=[1:4]เอทิลอะซีเตต-ไซโคลเฮกเซน ทำการ development 2 ครั้ง

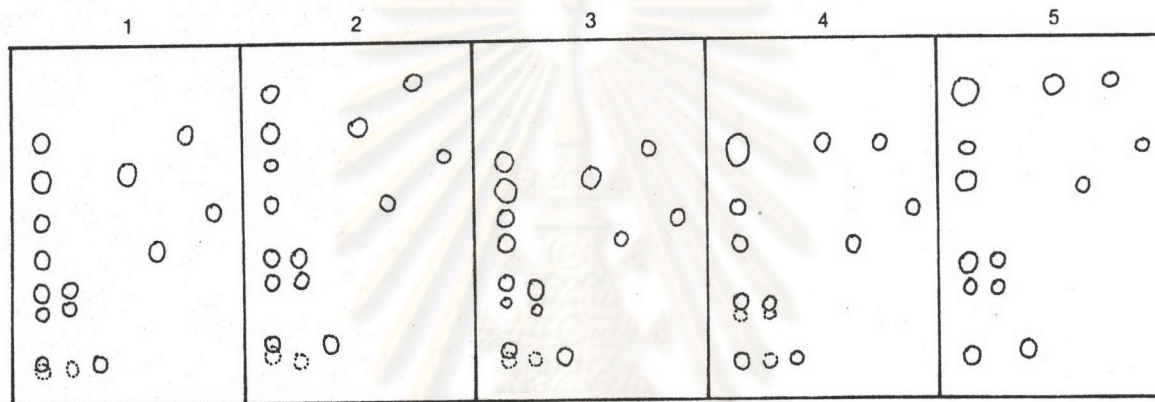
3.2.4 การ develop แผ่น TLC ด้วยโมบายเฟสที่เป็นตัวทำละลายผสม 3 ชนิด

ในโมบายเฟสที่เป็นตัวทำละลายผสม 2 ชนิดบางอย่างนั้น เกือบจะสามารถทำให้เกิดการแยกได้ดีแล้ว ดังนั้นจึงได้นำเอาอัตราส่วนนั้นมาเป็นจุดเริ่มต้น และหาตัวทำละลายเดี่ยวอีกชนิดที่สามารถทำให้ตำแหน่ง spot ที่เกิดการซ้อนทับกัน เกิดการแยกได้มาผสม โดยค่อยๆ เพิ่มอัตราส่วนครั้งละเล็กน้อย พบว่า อัตราส่วนของโมบายเฟสที่สามารถทำให้เกิดการแยกได้ดีดังแสดงในรูปที่ 3.4

ระบบตัวทำละลายผสม 3 ชนิดที่นำมาใช้เป็นโมบายเฟสจากรูปนั้น แทบทุกระบบสามารถนำมาใช้เป็นโมบายเฟสเพื่อให้เกิดการแยกได้ดีทั้งสิ้น แต่เมื่อพิจารณาจาก number of separation แล้วจะพบว่า โมบายเฟสในระบบ [1:4:1] อะซีโตน-เฮกเซน-โทลูอีน (4) และเมื่อทำการ develop 2 ครั้ง (5) นั้นมี number of separation เพียงแค่ 6 เท่านั้น ดังนั้นระบบของโมบายเฟสที่ใช้ได้ดีในกลุ่มนี้คือ [1:4:1] อะซีโตน-ไซโคลเฮกเซน-เบนซีน (1), [1:4:1] อะซีโตน-เฮกเซน-คาร์บอนเตตระคลอไรด์ (2) และ [1:4:1] อะซีโตน-เฮกเซน-คาร์บอนเตตระคลอไรด์ ทำการ develop 2 ครั้ง (3)

ดังนั้น จากรูป 3.1, 3.3 และ 3.4 เราสามารถสรุปได้ว่า สำหรับการแยกสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิด ด้วยวิธีการ TLC นั้น ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมที่ใช้เป็นโมบายเฟส ได้แก่ [1:4] 2-บิวทานโนน-ไซโคลเฮกเซน, [1:4:1] อะซีโตน-ไซโคลเฮกเซน-เบนซีน, [1:4:1] อะซีโตน-เฮกเซน-คาร์บอนเตตระคลอไรด์ และ [1:4:1] อะซีโตน-เฮกเซน-คาร์บอนเตตระคลอไรด์ โดยทำการ development 2 ครั้ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.4 แสดงถึงตัวทำละลายผสม 3 ชนิดที่มีผลต่อการแยกและลักษณะการแยกสารกำจัดศัตรูพืช:
 โมบายเฟส(1)=[1:4:1]อะซีโตน-ไซโคลเฮกเซน-เบนซีน, (2)=[1:4:1]อะซีโตน-เฮกเซน-คาร์บอนเตตระคลอไรด์,
 (3)=[1:4:1]อะซีโตน-เฮกเซน-คาร์บอนเตตระคลอไรด์ ทำการ development 2 ครั้ง, (4)=[1:4:1]อะซีโตน-
 เฮกเซน-โทลูอิน, (5)[1:4:1]อะซีโตน-เฮกเซน-โทลูอิน ทำการ development 2 ครั้ง

3.3 การทำคุณภาพวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืช ด้วยเทคนิค ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์รีโวลูชันโครมาโทกราฟี (HPTLC)

จากการที่ได้หาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม สำหรับการแยกสารกำจัดศัตรูพืช โดยเทคนิค TLC มาแล้วนั้น บางครั้งพบว่า ลักษณะการแยกของสารบางชนิดที่ได้จาก TLC และ HPTLC ต่างกัน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำคุณภาพวิเคราะห์เพื่อดูลักษณะการแยกสารกำจัดศัตรูพืช ด้วยเทคนิค HPTLC

3.3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Stock Solution 1000 ppm ของสารกำจัดศัตรูพืช

1. ชั่งสารมาตรฐานมาตัวอย่างละ 0.0100 กรัม อย่างละเอียด จำนวน 6 ตัวอย่าง
2. ละลายด้วยตัวทำละลายเมธานอล จำนวน 10.00 mL จะได้ สารละลายมาตรฐาน stock solution 1000 ppm

3.3.2 การเตรียมสารละลายสารกำจัดศัตรูพืช สำหรับการวิเคราะห์
จากสารละลายมาตรฐาน 1000 ppm นั้น นำมาเตรียมสารละลายของสารกำจัดศัตรูพืช 6 ชนิด โดยมีความเข้มข้นดังต่อไปนี้

- ขวดที่ 1 สารละลายอะมีทรินความเข้มข้น 1 ppm
- ขวดที่ 2 สารละลายเบนโทไธโอคาร์บความเข้มข้น 25 ppm
- ขวดที่ 3 สารละลายคาร์โบฟูรานความเข้มข้น 30 ppm
- ขวดที่ 4 สารละลายเมธิลพาราไรออนความเข้มข้น 5 ppm
- ขวดที่ 5 สารละลายโมโนโครโทฟอสความเข้มข้น 10 ppm
- ขวดที่ 6 สารละลายเมวินฟอสความเข้มข้น 30 ppm

และเตรียมสารละลายผสมของสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิดในขวดที่ 7 โดยมีความเข้มข้นของอะมีทริน เบนโทไธโอคาร์บ คาร์โบฟูราน เมธิลพาราไรออน โมโนโครโทฟอส และเมวินฟอส ตามลำดับดังต่อไปนี้ 1, 25, 30, 5, 10 และ 30 ppm

3.3.3 การเตรียมแผ่น HPTLC เพื่อทำการวิเคราะห์

ก่อนทำการวิเคราะห์ทุกครั้ง ควรมีการทำความสะอาดแผ่นเปล่า HPTLC เพื่อให้การทดลองทุกครั้งมีความเที่ยงดีโดย

1. เตรียมโมบายเฟส 1-5% แอมโมเนีย-เมธานอล ในภาชนะที่ใช้ในการ development
2. จุ่มแผ่นเปลา HPTLC ขนาด 10x10 เซนติเมตร ลงในภาชนะนั้น เมื่อโมบายเฟสเคลื่อนที่จนเต็มแผ่นแล้วจึงนำแผ่นออก
3. นำไปอบที่อุณหภูมิ 120 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปล่อยทิ้งให้เย็นจึงนำไปใส่สารตัวอย่าง

3.3.3 การใส่สารกำจัดศัตรูพืช และการทำ development

1. นำแผ่น HPTLC ที่ทำความสะอาดแล้วนั้น วางลงบนแท่นของเครื่อง Linomat III เปิดเครื่อง ใช้แม่เหล็กกดแผ่นไม่ให้เคลื่อนที่ กำหนดให้ตำแหน่งของการ spot อยู่เหนือขอบแผ่นด้านล่าง 15 mm. ความดันของแก๊สไนโตรเจนอยู่ระหว่าง 20-30 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (psi) อัตราการฉีดสารละลาย 7 วินาทีต่อไมโครลิตร (sec/ μ L) ความเร็วของแท่นที่เคลื่อนที่ 60 มิลลิเมตรต่อไมโครลิตร (mm/ μ L) ความยาวของแถบ 1 mm.

และ ปริมาตรของสารที่ใช้ 10 μ L

2. ทำการใส่สารละลายที่เตรียมได้ในข้อ 3.3.2 จำนวน 7 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 1 แถบ
3. เตรียมโมบายเฟสชนิดต่างๆ ที่ได้ทำการทดลองกับแผ่น TLC ธรรมดา แล้วนั้นในภาชนะบรรจุ
4. จุ่มแผ่น HPTLC ที่ได้ทำการใส่สารแล้วนั้น ลงในภาชนะที่บรรจุโมบายเฟส ทำการ development เป็นระยะทาง 5.00 cm.
5. จับเวลาการเคลื่อนที่ของโมบายเฟสเมื่อครบ 5.00 cm.
6. นำแผ่นขึ้น และรีบทำการระเหยโมบายเฟสอย่างรวดเร็ว

3.3.4 การวัดการดูดกลืนแสงของสารหลังจากการทำ development

1. นำแผ่น HPTLC ที่แห้งแล้ววางลงบนแท่นของเครื่อง densitometer ซึ่งต่อเข้ากับ integrator
2. เลือก light source เป็น mercury lamp เปิดเครื่อง
3. เลือก detection mode เป็นการวัดการดูดกลืนแสง(absorbance)

เตรียมการ scan โดยกำหนดให้

วัดค่าความเข้มข้นที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

ความเร็วของการ scan 0.2 มิลลิเมตรต่อวินาที

เริ่มการ scan ที่ตำแหน่งห่างจากขอบแผ่นด้านล่าง 10.0 mm.

ผลจากการวัดค่า Retention Time (RT) ของสารกำจัดศัตรูพืช โดยใช้
โมบายเฟสชนิดต่างๆ ดังแสดงตารางที่ 3.2 ถึง 3.4 และรูปที่ 3.5 ถึง 3.7

จากตารางที่ 3.2 ถึง 3.4 ค่า Retention Time ที่วัดได้จากการ
integrate ของเครื่องเป็นค่าที่มีความสัมพันธ์กับ ระยะทางที่แถบเคลื่อนที่ไปได้ และความเร็วในการ scan ของเครื่อง ดังนั้นจึงต้องมีการเปลี่ยนค่าจากค่า Retention Time เป็น
ค่า R_f ดังแสดงในตารางที่ 3.5 ถึง 3.7 (ดูวิธีการคำนวณการเปลี่ยนค่า Retention
Time เป็นค่า R_f ใน ภาคผนวก 1)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.2 ค่า Retention Time ของสารกำจัดศัตรูพืช เมื่อทำการ develop ด้วยตัว ทำละลายเดี่ยวชนิดต่างๆ

โมบายเฟส	Developing Time (นาที)	ค่า Retention Time (วินาที)					
		อะมีทริน	เบนไรโอคาร์บ	คาร์โบฟูราน	เมธิลพาราไรออน	โมโนโครโทฟอส	เมวินฟอส
เฮกเซน	5.35	30.3	31.3	31.7	28.2	30.7	27.0, 31.7
ไซโคลเฮกเซน	8.27	30.2	28.1	33.2	29.2	30.8	27.8, 31.7
คาร์บอนเตตระคลอไรด์	8.00	30.7	35.7	32.1	38.1	31.3	30.4, 30.5
เอธิลอะซีเตต	4.30	182.6	191.9	180.1	190.3	68.7	139.1, 156.1
ไดเอธิลอีเธอร์	8.00	196.7	210.0	190.3	210.0	40.7	96.9, 127.6
อะซีโตน	4.13	182.9	185.8	179.4	185.2	142.0	171.7
2-บิวทาโนน	4.17	173.0	176.9	165.3	176.9	102.6	152.2, 145.5
เบนซีน	8.38	30.3	93.0	45.3	140.0	30.7	31.2
โทลูอีน	5.37	32.4	75.7	39.9	113.5	29.2	34.1
ไดคลอโรมีเทน	5.00	35.4	118.3	65.2	161.2	30.8	33.0, 52.4

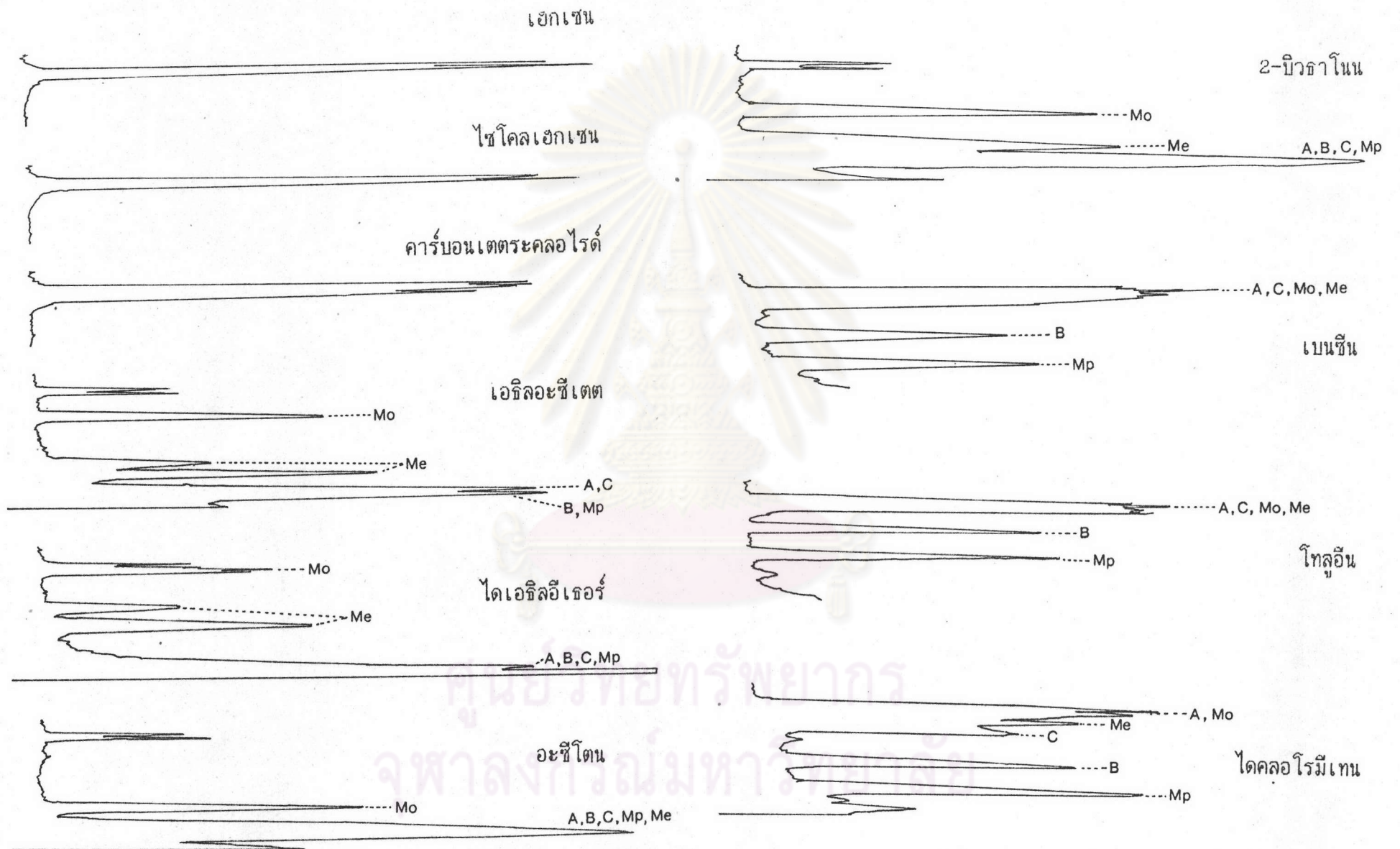
ตารางที่ 3.3 ค่า Retention Time ของสารกำจัดศัตรูพืช เมื่อทำการ development ด้วยตัวทำละลายผสม Z ชนิด

โมบายเฟส	Developing Time (นาที)	ค่า Retention Time (วินาที)					
		อะมีทรีน	เบนไซโอคาร์บ	คาร์โบฟูราน	เมธิลพาราไซออน	โมโนโครโทฟอส	เมวินเฟอส
C1:1วอีเธอร์-คาร์บอนเตตระคลอไรด์	5.35	76.2	133.3	78.3	127.9	31.2	46.9, 53.3
C3:2วอีเธอร์-ไซโคลเฮกเซน	5.45	80.4	134.0	67.4	125.0	30.6	48.7
C3:2วไดคลอโรมีเทน-เบนซีน	5.30	34.3	92.4	42.0	136.2	30.0	34.3
C1:2วอะซีโตน-เบนซีน	4.00	137.8	157.0	136.2	154.5	50.7	96.9, 112.2
C1:24วอะซีโตน-ไดคลอโรมีเทน	4.25	86.0	174.0	109.7	197.8	29.2	74.8
C3:17ว2-บิวทานอน-คาร์บอนเตตระคลอไรด์	9.00	80.2	144.3	77.3	136.2	30.1	49.7, 56.2
C1:4ว2-บิวทานอน-ไซโคลเฮกเซน	7.50	76.8	116.7	61.7	94.6	32.4	44.1
C1:4วเอธิลอะซีเตต-เฮกเซน	4.00	45.3	97.5	42.8	80.5	32.0	34.7
C1:19วเอธานอล-โทลูอีน	5.30	71.0	133.7	71.3	157.7	31.6	53.8
C1:4วอะซีโตน-ไซโคลเฮกเซน	6.34	62.3	110.6	35.0	74.8	30.0	41.4
C1:4วเอธิลอะซีเตต-ไซโคลเฮกเซน	7.15	61.5	109.3	50.5	88.9	32.5	31.4, 37.3

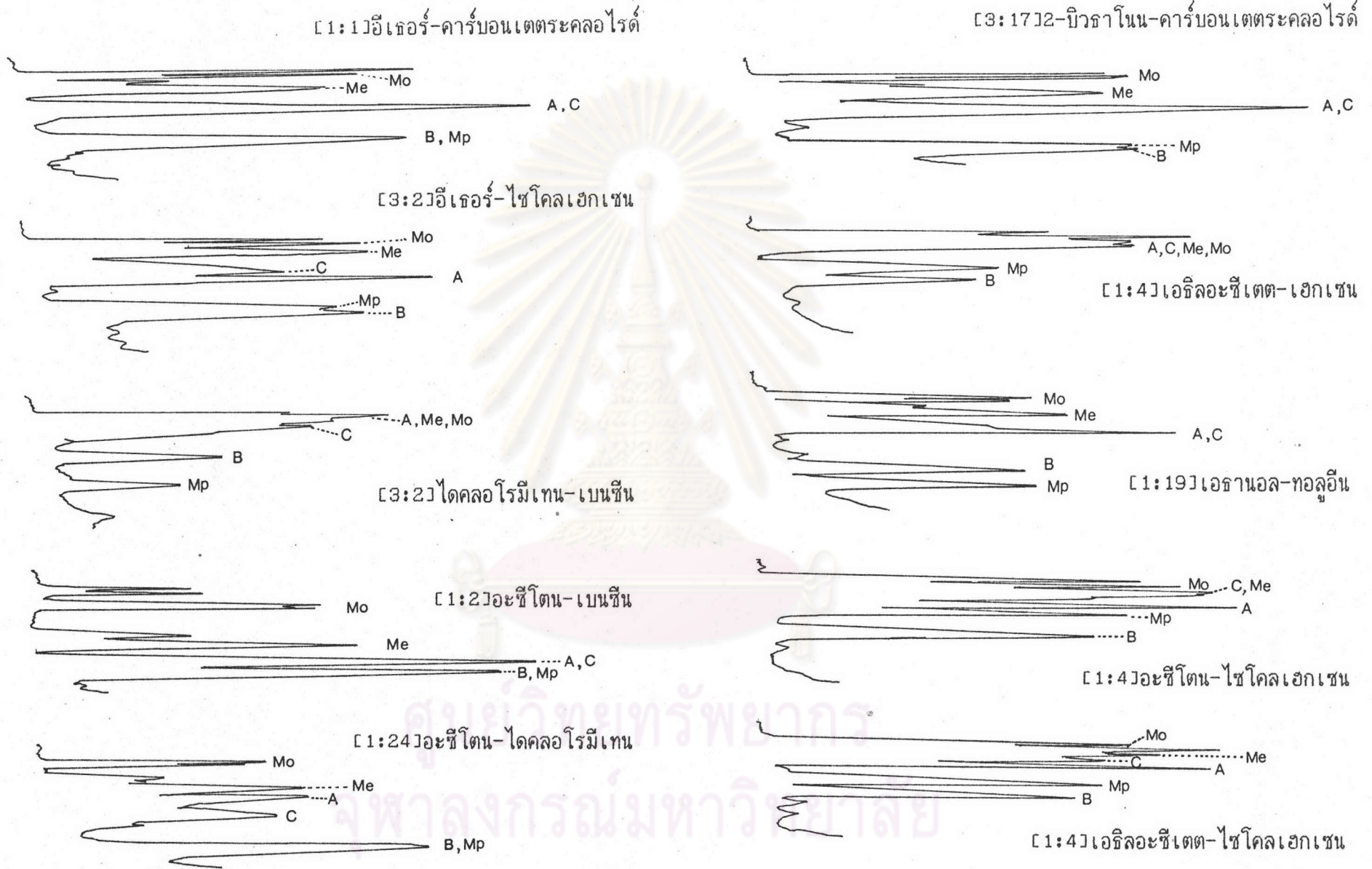
ตารางที่ 3.4 ค่า Retention Time ของสารกำจัดศัตรูพืช เมื่อทำการ develop ด้วยตัวทำละลายผสม 3 ชนิด

โมบายเฟส	Developing Time (นาที)	ค่า Retention Time (วินาที)					
		อะมีทริน	เบนไดโอคาร์บ	คาร์โบฟูราท	เมธิลพาราไดออน	โมโนโครโตฟอส	เมวินฟอส
(2:1:1) เฮกเซน-โทลูอิน-เอทิลอะซิเตต	4.45	87.2	135.9	75.4	127.9	32.7	38.5, 50.3
(4:1:1) เฮกเซน-โทลูอิน-อะซิโตน	4.30	79.4	127.3	64.2	97.8	31.7	47.6, 53.7
(4:1:1) เฮกเซน-อะซิโตน-คาร์บอนเตตระคลอไรด์	7.00	65.2	129.5	50.1	91.1	30.5	42.9
(4:1:1) ไฮโคลเฮกเซน-อะซิโตน-เบนซีน	7.30	71.9	122.8	58.5	96.5	28.5	47

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

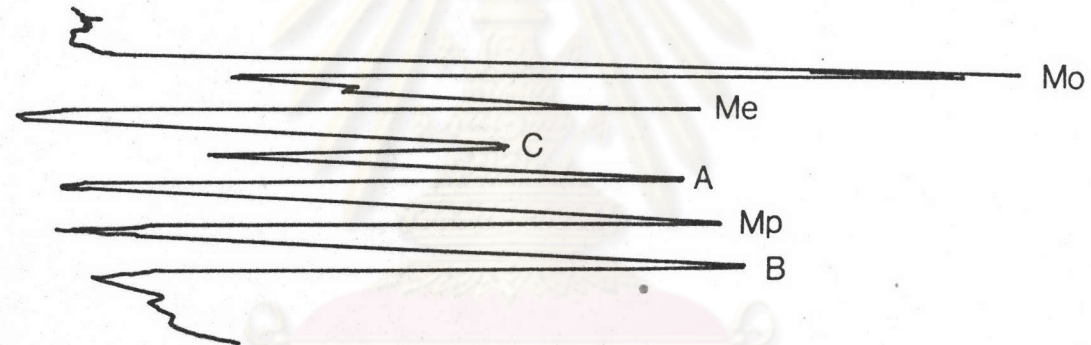


รูปที่ 3.5 โครมาโทแกรม แสดงลักษณะการแยกของสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิด ในตัวทำละลายเดี่ยว



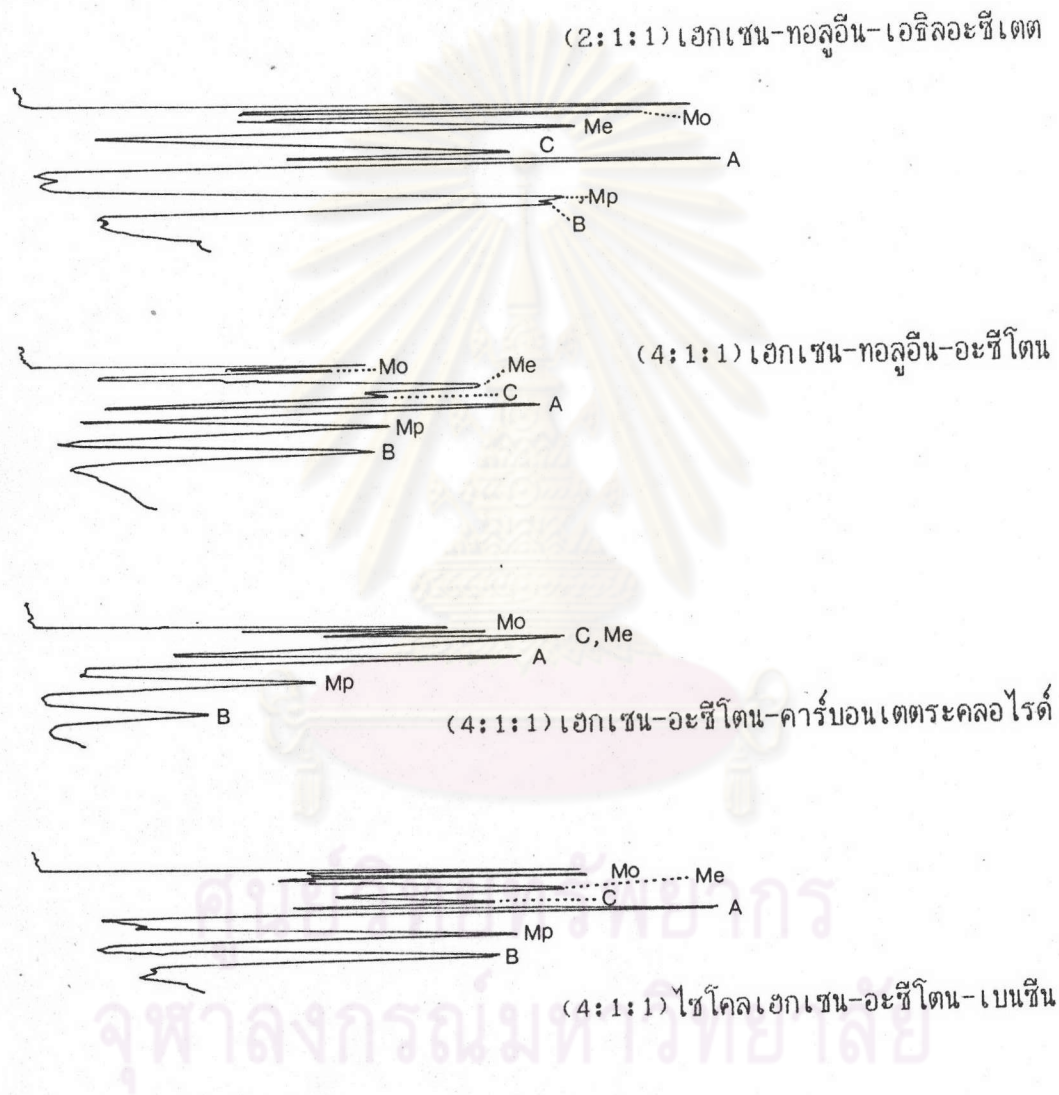
รูปที่ 3.6 โครมาโทแกรมแสดงลักษณะการแยกของสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิด ในโมบายเฟสที่เป็นตัวทำละลายผสม 2 ชนิด

[1:4]2-บิวทาโนน-ไซโคลเฮกเซน



รูปที่ 3.6 (ต่อ)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.7 โครมาโทแกรมแสดงลักษณะการแยกของสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิด ในโมบายเฟสที่เป็นตัวทำละลายผสม 3 ชนิด

ตารางที่ 3.5 ค่า R_f ของสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิด ในตัวทำละลายเดี่ยว

โมบายเฟส	Developing Time (นาที)	ค่า R_f					
		อะมีทริน	เบนโธโอคาร์บ	คาร์โบฟูราน	เมธิลพาราไรออน	โมนิโครโทฟอส	เมวินฟอส
เฮกเซน	5.35	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01
ไซโคลเฮกเซน	8.27	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.01
คาร์บอนเตตระคลอไรด์	8.00	0.00	0.03	0.01	0.05	0.01	0.00
เอธิลอะซีเตต	4.30	0.87	0.93	0.86	0.92	0.22	0.62, 0.72
ไดเอธิลอีเธอร์	8.00	0.95	1.00	0.92	1.00	0.06	0.38, 0.56
อะซีโตน	4.13	0.87	0.89	0.85	0.89	0.64	0.81
2-บิวทาโนน	4.17	0.82	0.84	0.77	0.84	0.41	0.66, 0.70
เบนซีน	8.38	0.00	0.36	0.09	0.63	0.00	0.01
โทลูอิน	5.37	0.01	0.26	0.06	0.48	0.00	0.02
ไดคลอโรมีเทน	5.00	0.03	0.50	0.20	0.75	0.00	0.02, 0.13

ตารางที่ 3.6 ค่า R_f ของสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิดเมื่อทำการ develop ด้วยตัวทำลายผสม 2 ชนิด

โมบายเฟส	Developing Time (นาทีก)	ค่า R_f					
		อะมีทรีน	เบนไดโอคาร์บ	คาร์โบฟูราน	เมธิลพาราไอออน	โมโนโครโทฟอส	เมวินเฟอส
C1:11 ไดเอธิลอีเธอร์-คาร์บอนเตตระคลอไรด์	5.35	0.26	0.59	0.28	0.56	0.01	0.10, 0.13
C3:21 ไดเอธิลอีเธอร์-ไซโคลเฮกเซน	5.45	0.29	0.59	0.21	0.54	0.00	0.11
C3:21 ไดคลอโรมีเทน-เบนซีน	5.30	0.02	0.36	0.07	0.61	0.00	0.02
C1:21 อะซีโตน-เบนซีน	4.00	0.62	0.73	0.61	0.71	0.12	0.38, 0.47
C1:24 อะซีโตน-ไดคลอโรมีเทน	4.25	0.32	0.82	0.46	0.96	0.00	0.26
C3:1712-บิวทาโนน-คาร์บอนเตตระคลอไรด์	9.00	0.29	0.60	0.27	0.61	0.00	0.11, 0.15
C1:412-บิวทาโนน-ไซโคลเฮกเซน	7.50	0.30	0.50	0.18	0.37	0.01	0.08
C1:41 เอธิลอะซีเตต-เฮกเซน	4.00	0.09	0.39	0.07	0.29	0.01	0.03
C1:191 เอทานอล-โทลูอิน	5.30	0.23	0.59	0.24	0.73	0.01	0.14
C1:41 อะซีโตน-ไซโคลเฮกเซน	6.34	0.18	0.46	0.03	0.26	0.00	0.07
C1:41 เอธิลอะซีเตต-ไซโคลเฮกเซน	7.15	0.27	0.45	0.12	0.34	0.01	0.01, 0.04

ตารางที่ 3.7 ค่า R_f ของสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิดเมื่อทำการ develop ด้วยตัวทำละลายผสม 3 ชนิด

โมบายเฟส	Developing Time (นาที)	ค่า R_f					
		อะมีทรีน	เบนโธไธคาร์บ	คาร์โบฟูราน	เมธิลพาราไรออน	โมโนโครโทฟอส	เมวินฟอส
(2:1:1) เฮกเซน-โทลูอิน-เอธิลอะซีเตต	4.45	0.33	0.61	0.26	0.56	0.02	0.05, 0.12
(4:1:1) เฮกเซน-โทลูอิน-อะซีโตน	4.30	0.28	0.56	0.20	0.39	0.01	0.10, 0.14
(4:1:1) เฮกเซน-อะซีโตน-คาร์บอนเตตระคลอไรด์	7.00	0.20	0.57	0.11	0.35	0.00	0.07
(4:1:1) ไซโคลเฮกเซน-อะซีโตน-เบนซีน	7.30	0.24	0.53	0.16	0.38	0.00	0.10

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเคลื่อนที่ของ integrator นั้น เข้มของ integrator จะเริ่มเคลื่อน จากซ้ายไปขวา และแทนของเครื่อง densitometer จะเริ่มต้นเคลื่อนจากจุดเริ่มต้นของ แถบไปตามทิศทางการเคลื่อนที่ของ โมบายเฟสที่ละลายแผ่น จึงพบว่า baseline ที่อยู่ทางด้าน ขวา นั้นจะ shift ขึ้น เพราะเมื่อทำการ develop ไปเรื่อยๆ นั้นสารทุกตัวจะเคลื่อนที่สู่ ปลายแผ่นและไปสะสมรวมกันที่ปลายแผ่น แต่ละพีกที่ปรากฏบนโครมาโทแกรมคือแต่ละแถบที่ถูก แยกอยู่บนแผ่น

จากรูปที่ 3.5 โมบายเฟส ไฮโคลเฮกเซน คาร์บอนเตตระคลอไรด์ และ เฮกเซนไม่สามารถทำให้เกิดการแยกได้ โมบายเฟส อะซีโตน เบนซีน และ โทลูอิน มี number of separation เพียงแค่ 3 เท่านั้น ส่วนโมบายเฟส อีเธอร์ และ 2-บิวทาโน สามารถแยกได้ 4 องค์ประกอบในสารผสม โมบายเฟสที่ดีที่สุดในกลุ่มนี้คือโมบายเฟส เอธิล อะซีเตตและไดคลอโรมีเทน สามารถแยกองค์ประกอบได้ถึง 5 องค์ประกอบ แต่ลักษณะของ การ separation ยังไม่ดี

ในรูปที่ 3.6 เมื่อดูจาก number of separation แล้วจะพบว่าโมบายเฟส ที่มาจากตัวทำละลาย 2 ชนิดผสมกัน สามารถจำแนกออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่คือ

กลุ่มที่ 1 มี number of separation = 4 ได้แก่

(1:4) เอธิลอะซีเตต-เฮกเซน (3:2) ไดคลอโรมีเทน-เบนซีน

กลุ่มที่ 2 มี number of separation = 5 ได้แก่

(1:19) เอทานอล-โทลูอิน (1:4) อะซีโตน-ไฮโคลเฮกเซน

(1:1) ไดเอธิลอีเธอร์-คาร์บอนเตตระคลอไรด์

กลุ่มที่ 3 มี number of separation = 6 ได้แก่

(1:4) เอธิลอะซีเตต-ไฮโคลเฮกเซน (3:2) ไดเอธิลอีเธอร์-ไฮโคลเฮกเซน

(3:2) ไดคลอโรมีเทน-เบนซีน (1:24) อะซีโตน-ไดคลอโรมีเทน

(3:17) 2-บิวทาโนน-คาร์บอนเตตระคลอไรด์ (1:2) อะซีโตน-เบนซีน

(1:4) 2-บิวทาโนน-ไฮโคลเฮกเซน

โมบายเฟสในกลุ่มที่ 3 นี้มีความสามารถในการแยกได้จำนวนองค์ประกอบมาก ที่สุด แต่เมื่อดูจากลักษณะการแยกแล้วจะพบว่า ลักษณะการแยกเมื่อใช้โมบายเฟส (1:4) 2- บิวทาโนน-ไฮโคลเฮกเซนดีที่สุดในการบรรดาตัวทำละลายผสม 2 ชนิด

ในรูปที่ 3.7 นั้นโมบายเฟสอันได้แก่ (2:1:1) เฮกเซน-โทลูอิน-เอธิลอะซีเตต

(1:4:1)อะซีโตน-เฮกเซน-โทลูอิน (1:4:1)อะซีโตน-เฮกเซน-คาร์บอนเตตระคลอไรด์ และ (1:4:1)อะซีโตน-ไซโคลเฮกเซน-โทลูอิน มีความสามารถในการแยกองค์ประกอบได้ถึง 6 ชนิดแต่ลักษณะของการ separation ยังไม่ดีเท่า (1:4)2-บิวทาโนน-ไซโคลเฮกเซน ดังนั้นจึงสามารถกล่าวได้ว่า โมบายเฟสที่เหมาะสมที่สุดในการแยกองค์ประกอบของสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิดที่ใช้คือ (1:4)2-บิวทาโนน-ไซโคลเฮกเซน

3.4 การหาขีดจำกัดการวิเคราะห์ (Limit of Quantity) ของสารกำจัดศัตรูพืชแต่ละชนิด

ขีดจำกัดการวิเคราะห์ (Limit of Quantity, LOQ) คือค่าของปริมาณสารในระดับต่ำที่สุดที่สามารถทำปริมาณวิเคราะห์ได้ ในทางปฏิบัติเพื่อให้การหาค่า LOQ เป็นไปได้ได้ใช้ปริมาณของสารต่ำที่สุด ที่สามารถวัดได้บ้างไม่ได้บ้าง แต่จะต้องวัดได้โดยมีค่า confidence 95 %

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสารมาตรฐานสารกำจัดศัตรูพืชแต่ละชนิด โดยให้มี ความเข้มข้นของปริมาณสารที่อยู่บนแผ่นต่างๆ กัน ตั้งแต่ 1 ng ถึง 1 μ g
2. ทำการ clean up แผ่น HPTLC ดังการทดลองในหัวข้อ 3.3.3
3. ทำการใส่สารกำจัดศัตรูพืชที่เตรียมไว้บนบนแผ่น HPTLC โดยมีวิธีการดัง การทดลอง 3.3.4
4. ทำการ develop แผ่นด้วย โมบายเฟส (1:4) 2-บิวทาโนน-ไซโคลเฮกเซน วัด absorbance ของสารที่อยู่บนแผ่นด้วยเครื่อง densitometer ปริมาณสารที่น้อยที่สุดที่สามารถทำการวิเคราะห์ได้นี้ เมื่อใช้ (1:4)2-บิวทาโนน-ไซโคลเฮกเซน เป็นโมบายเฟสแสดงในตารางที่ 3.8

ตารางที่ 3.8 แสดงปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชที่น้อยที่สุด ที่สามารถทำการวิเคราะห์ได้
(Limit of Quantity)

สารกำจัดศัตรูพืช	ค่า LOQ (ไมโครกรัม)
อะมีทริน	0.004
เบนไรโอคาร์บ	0.06
คาร์โบฟูราน	0.24
เมธิลพาราไรออน	0.02
โมนโครโทฟอส	0.03
เมวินฟอส	0.25

จากตารางที่ 3.8 พบว่า ขีดจำกัดของการวิเคราะห์ของสารอะมีทรินมีค่าต่ำที่สุด ในขณะที่ขีดจำกัดการวิเคราะห์ของเมวินฟอสมีค่าสูงที่สุด การที่ขีดจำกัดของการวิเคราะห์ของเมวินฟอสมีค่าสูงที่สุดเนื่องจาก พิกของเมวินฟอสจากการวัด absorbance นั้นมีการแยกเป็น 2 พิก โดยที่เครื่อง integrater ไม่สามารถทำการ integrate 2 พิกนั้นให้รวมกันได้ จึงต้องทำการวัด absorbance เพียงพิกเดียว ทำให้ค่าปริมาณสารที่น้อยที่สุดที่วิเคราะห์ได้สูงกว่าที่ควรจะเป็น

ค่า LOQ เรียงลำดับจากน้อยไปมากดังนี้

อะมีทริน < เมธิลพาราไรออน < โมนโครโทฟอส < เบนไรโอคาร์บ
< คาร์โบฟูราน < เมวินฟอส

3.5 การหาความถูกต้อง (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ในการวิเคราะห์ สารกำจัดศัตรูพืชแต่ละชนิด

ค่าความถูกต้อง (Accuracy) คือค่าความผิดพลาดคิดเป็นร้อยละ หรือ % error ที่แตกต่างกันระหว่างค่าของผลการทดลอง และค่าที่แท้จริง ดังนั้น

$$\text{ค่าความถูกต้อง} = \frac{\text{ค่าสัมบูรณ์}[\text{ค่าที่แท้จริง} - \text{ค่าที่ได้จากการทดลอง}] \times 100}{\text{ค่าที่แท้จริง}}$$

การหาค่าความเที่ยง (Precision) ของการวิเคราะห์ นิยามได้ว่าเป็นการวัดค่าสัมประสิทธิ์ของการเปลี่ยนแปลง (Coefficient of Variation) ในการทดลองแบบเดียวกัน

$$\begin{aligned} \text{Precision} &= \text{Coefficient of Variation (CV)} \\ &= \frac{\text{ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation, SD)}}{\text{ค่าเฉลี่ย (Mean)}} \end{aligned}$$

ในบางครั้งเราใช้ ค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% Relative Standard Deviation, % RSD) เป็นตัวบ่งบอกถึงค่าความเที่ยงของการวิเคราะห์ ซึ่ง

$$\begin{aligned} \% \text{ RSD} &= \frac{\text{ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน} \times 100}{\text{ค่าเฉลี่ย}} \\ &= \text{CV} \times 100 \end{aligned}$$

3.5.1 การหาความเที่ยงของการ scan ด้วยเครื่อง densitometer และ integrater

เนื่องจาก ความแตกต่างในการ scan (และการ integrate) พื้นที่ที่พิกบนแถบเดียวกันมีมาก ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองเพื่อดูความเที่ยงของการ integrate พื้นที่พิกบนแถบเดียวกันนั้น การทดลองทำโดย

1. ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับการทดลองในหัวข้อ 3.3.3 แต่ทำการใส่สารมาตรฐานสารกำจัดศัตรูพืชเพียง 1 ตัวอย่างและ 1 แถบ (ซึ่งตัวอย่างที่จะทดลองใช้ในที่นี้คือคาร์โบฟูราท) และใช้โมบายเฟส (1:4) 2-บิวทานอน-ไซโคลเฮกเซน

2. เมื่อโมบายเฟสระเหยออกหมดแล้วให้นำแผ่น HPTLC วางลงบนแท่นของเครื่อง densitometer ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับการทดลองในหัวข้อ 3.3.4

3. ทำการ scan บนแถบเดียวกันเช่นเดียวกันกับข้อ 2 จำนวน 10 ครั้ง
4. บันทึกผลของการวัด absorbance ของสาร
5. คำนวณค่า CV และ % RSD

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.9

ตารางที่ 3.9 แสดงผลของความเที่ยงของการ integrate ด้วยเครื่อง integrater

จำนวนครั้ง ของการ scan	พื้นที่พิก ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)	ค่าเฉลี่ย (Mean)	CV	% RSD	
1	366376				
2	376050	4837	371213	0.0130	1.30
3	380802	6002	374409	0.0160	1.60
4	375429	5217	374664	0.0139	1.39
5	368408	5294	373413	0.0142	1.42
6	377389	5055	374075	0.0135	1.35
7	381397	5335	375121	0.0142	1.42
8	378997	5153	375606	0.0137	1.37
9	369323	5244	374907	0.0140	1.40
10	371379	5086	374555	0.0136	1.36
			ค่าเฉลี่ย	1.40	

จะเห็นได้ว่าความเที่ยงของการ integrate ด้วยเครื่อง integrator SPECTRA-PHYSICS SP4290 นั้น ไม่ว่าจะทำการ scan 2 ครั้ง หรือเพิ่มจนถึง 10 ครั้ง ยังคงมีค่าความเที่ยงไม่แตกต่างกันมากนัก โดยมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ อยู่ในช่วงระหว่าง 0.010-0.016

ดังนั้นเพื่อความเที่ยงของการวิเคราะห์ ในการทดลองครั้งต่อไป จึงได้ทำการวัดค่า absorbance อย่างน้อย 2 ครั้งในทุกๆ การทดลอง

3.5.2 การเปรียบเทียบความเที่ยงของการใส่สารแต่ละครั้งด้วยเครื่อง Linomat II เมื่อมีปริมาตรการ spot ไม่เท่ากัน

การเปรียบเทียบความเที่ยงของการใส่สารแต่ละแถบ โดยใช้ปริมาตรไม่เท่ากัน แต่ความเข้มข้นบนแผ่นเท่ากัน เราสามารถทำการทดลองโดย

1. เตรียมสารมาตรฐานสารกำจัดศัตรูพืชตัวอย่างคือ อะมีทริน และเบนไรโอคาร์บ โดยมีความเข้มข้นดังต่อไปนี้

อะมีทริน ความเข้มข้น 2.0, 5.0 และ 10.0 ppm

เบนไรโอคาร์บ ความเข้มข้น 100, 200 และ 300 ppm

ทำการใส่สารเช่นเดียวกันกับการทดลองในหัวข้อ 3.3.3 ความเข้มข้นละ 3 แถบ ปริมาตร แถบ ละ 10 μ L

คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ของการเปลี่ยนแปลงจากการใส่สาร ในแต่ละความเข้มข้นนั้น

2. เตรียมสารมาตรฐานสารกำจัดศัตรูพืช อะมีทรินและเบนไรโอคาร์บ จาก Standard Stock Solution บนขวดเดียวกัน โดยมีความเข้มข้นดังต่อไปนี้

อะมีทริน ความเข้มข้น 0.2, 0.5 และ 1.0 ppm

เบนไรโอคาร์บ ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 ppm

ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับในหัวข้อที่ 1 ข้างต้น แต่ทำการใส่สารโดยมีปริมาตรแถบละ 100 μ L ทำการ scan บันทึกผล และคำนวณเช่นเดียวกับข้างต้น

3. เปรียบเทียบค่า % RSD และวิเคราะห์ผล

ผลการทดลองแสดงการเปรียบเทียบความเที่ยงของการใส่สารโดยใช้ปริมาตรไม่เท่ากัน ดังแสดงในตารางที่ 3.10 ก และ 3.10 ข

ศูนย์วิจัยกีฏวิทยาการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.10 ก แสดงถึงการเปรียบเทียบความเที่ยงของการใส่สารกำจัดศัตรูพืชอะมีโทริน ครั้งละ 10 μ L และ 100 μ L

ความเข้มข้น ของสารบนแผ่น (นาโนกรัม)	แผ่นที่	เมื่อใส่สารในปริมาณครั้งละ			
		10 μ L		100 μ L	
		ค่าเฉลี่ยของพื้นที่ฟอก ในแต่ละแถบ	% RSD	ค่าเฉลี่ยของพื้นที่ฟอก ในแต่ละแถบ	% RSD
20	1	163376		151999	
	2	164564	3.29	155026	5.15
	3	152826		137539	
50	1	379416		337999	
	2	356345	2.56	385819	5.51
	3	368841		372075	
100	1	663408		638120	
	2	627480	2.34	619595	2.93
	3	638565		594069	

ตารางที่ 3.10 ข แสดงถึงการเปรียบเทียบความเที่ยงของการใส่สารกำจัดศัตรูพืชเบนโทอิลคาร์บครั้งละ 10 μ L และ 100 μ L

ความเข้มข้น ของสารบนแผ่น (ไมโครกรัม)	แผ่นที่	เมื่อใส่สารในปริมาตรครั้งละ			
		10 μ L		100 μ L	
		ค่าเฉลี่ยของพื้นที่พิก ในแต่ละแถบ	% RSD	ค่าเฉลี่ยของพื้นที่พิก ในแต่ละแถบ	% RSD
1	1	475392		438866	
	2	478271	3.42	362229	13.94
	3	443108		313063	
2	1	847784		667740	
	2	836794	2.34	715302	3.67
	3	802263		658319	
3	1	1065393		1095712	
	2	1112850	1.79	1004513	13.81
	3	1085441		780103	

เมื่อดูค่าสัมประสิทธิ์ของการเปลี่ยนแปลงในการใส่สารปริมาตร 10 μL และ 100 μL ในตารางที่ 3.10 ก และ ตารางที่ 3.10 ข เปรียบเทียบค่าทั้ง 2 ในความเข้มข้นเดียวกันจะพบว่า ความเที่ยงของการใส่สารแต่ละครั้งนั้น ไม่ขึ้นอยู่กับชนิดของสารตัวอย่าง แต่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารตัวอย่าง ถ้าความเข้มข้นของสารตัวอย่างในสารละลายมาก จึงทำการใส่สารเพียงแค่ 10 μL เท่านั้น การวัดจะมีความเที่ยงมากยิ่งขึ้นกว่า เมื่อความเข้มข้นของสารตัวอย่างในสารละลายน้อย(ซึ่งต้องทำการใส่สารถึง 100 μL) ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อทำการใส่สารในปริมาณมาก จะเกิดการแพร่กระจาย(diffuse)ของ แแถบ เริ่มต้นมากยิ่งขึ้นกว่า เมื่อทำการใส่สารในปริมาณน้อย ความเที่ยง(precision) จึงลดลง

3.5.3 การเปรียบเทียบความเที่ยง(precision) ของการใส่สารเมื่อใช้วิธีการแตกต่างกัน ระหว่าง External Standardization และ Internal Standardization

3.5.3.1 การหาค่าความเที่ยงเมื่อใช้วิธีการ External Standardization

1. เตรียมสารละลายสารกำจัดศัตรูพืชจากสารละลายมาตรฐาน stock solution โดยมีความเข้มข้น ดังต่อไปนี้

สารละลายอะมีทริน ความเข้มข้น 0.2, 0.5 และ 1.0 ppm

สารละลายเบนไรโอคาร์บ ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 ppm

สารละลายคาร์โบฟูราน ความเข้มข้น 20, 40 และ 60 ppm

สารละลายเมธิลพาราไรออน ความเข้มข้น 3, 6 และ 12 ppm

สารละลายโมโนโครโทฟอส ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 ppm

สารละลายเมวินฟอส ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 ppm

2. นำมาใส่สารตัวอย่างละ 3 แแถบโดยแต่ละแแถบทำการใส่สารจำนวน 100 μL

3. สำหรับสารอะมีทริน เบนไรโอคาร์บ คาร์โบฟูราน เมธิลพาราไรออน และเมวินฟอส ทำการ develop ด้วยโมบายเฟส(1:4)2-บิวทานโน-ไซโคลเฮกเซน เฉพาะ สารโมโนโครโทฟอส เท่านั้นที่ทำการ develop ด้วยโมบายเฟส เอธิลอะซีเตต

4. ทำการวัด absorbance ดังการทดลองในหัวข้อ 3.3.4 จำนวน 2 ครั้ง บันทึกผล หาค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้พีค

5. คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ของความเปลี่ยนแปลงในแต่ละความเข้มข้นนั้น

ผลการทดลองการหาค่าความเที่ยง เมื่อใช้วิธีการ External
Standardization ดังแสดงในตารางที่ 3.11 ถึง 3.16

ตารางที่ 3.11 แสดงถึงความเที่ยงของการใส่สารกำจัดศัตรูพืชอะมีทรินเมื่อใช้วิธีการ
External Standardization

ความเข้มข้น ของสารบนแผ่น (นาโนกรัม)	แถบที่	ค่าเฉลี่ยของพื้นที่พิค ของแต่ละแถบ	% RSD
20	1	151999	5.15
	2	155026	
	3	137539	
50	1	337999	5.51
	2	385819	
	3	372075	
100	1	638120	2.93
	2	619595	
	3	594069	

ตารางที่ 3.12 แสดงถึงความเที่ยงของการใส่สารกำจัดศัตรูพืชเบนโธโอคาร์บเมื่อใช้
วิธีการ External Standardization

ความเข้มข้น ของสารบนแผ่น (ไมโครกรัม)	แถบที่	ค่าเฉลี่ยของพื้นที่ฟก	
		ของแต่ละแถบ	% RSD
1	1	438866	13.94
	2	362229	
	3	313063	
2	1	667740	3.67
	2	715302	
	3	658319	
3	1	1095712	4.34
	2	1004513	
	3		

- ข้อมูลใช้ไม่ได้เนื่องจากเกิดความผิดพลาดในการใส่สาร

ตารางที่ 3.13 แสดงถึงความเที่ยงของการใส่สารกำจัดศัตรูพืชคาร์โบฟูราท โดยวิธี
การ External Standardization

ความเข้มข้น ของสารบนแผ่น (ไมโครกรัม)	แถบที่	ค่าเฉลี่ยของพื้นที่พีค ของแต่ละแถบ	% RSD
2	1	317256	3.77
	2	305171	
	3	334442	
4	1	411327	2.07
	2	394164	
	3	393490	
8	1	913233	3.90
	2	899758	
	3	982720	

ศูนย์วิทยพัชกร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.14 แสดงถึงความเที่ยงของการใส่สารกำจัดศัตรูพืช เมธิลพาราโรอน
โดยวิธีการ External Standardization

ความเข้มข้น ของสารบนแผ่น (ไมโครกรัม)	แผ่นที่	ค่าเฉลี่ยของพื้นที่พิง	
		ของแต่ละแผ่น	% RSD
0.3	1	599945	7.86
	2	574210	
	3	496936	
0.6	1	1032016	7.27
	2	997760	
	3	868938	
1.2	1	1614372	4.06
	2	1557000	
	3	1462380	

ศูนย์วิทยพักร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.15 แสดงถึงความเที่ยงของการใส่สารกำจัดศัตรูพืชโมโนโครโทฟอส โดย
วิธีการ External Standardization

ความเข้มข้น ของสารบนแผ่น (ไมโครกรัม)	แถบที่	ค่าเฉลี่ยของพื้นที่พีค	
		ของแต่ละแถบ	% RSD
0.5	1	413959	4.02
	2	447779	
	3	418488	
1.0	1	748004	3.87
	2	710658	
	3	777633	
1.5	1	951239	2.93
	2	960082	
	3	899417	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.16 แสดงถึงความเที่ยงของการใส่สารกำจัดศัตรูพืชเมวินฟอส โดยวิธีการ
External Standardization

ความเข้มข้น ของสารบนแผ่น (ไมโครกรัม)	แถบที่	ค่าเฉลี่ยของพื้นที่ฟก	
		ของแต่ละแถบ	% RSD
1	1	219781	13.38
	2	222531	
	3	163847	
2	1	322488	3.28
	2	348380	
	3	329449	
4	1	529652	7.59
	2	613297	
	3	519382	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5.3.2 การหาค่าความเที่ยงเมื่อใช้วิธีการ Internal Standardization

1. เตรียมสารละลายสารกำจัดศัตรูพืช เช่นเดียวกันกับการทดลองในหัวข้อ 3.5.3.1
2. เติม internal standard ลงในสารละลายแต่ละขวด โดยกำหนดให้
ใช้ เมธิลพาราไรออน เป็น internal standard สำหรับ อะมีทริน เบนไรโอคาร์บ คาร์โบฟูราน โมโนโครโทฟอส และเมวินฟอส และให้ สารอะมีทริน เป็น internal standard สำหรับ เมธิลพาราไรออน
3. ทำการ develop ด้วยโมบายเฟส เช่นเดียวกันกับการทดลองในหัวข้อ 3.5.3.1
4. วิธีทำการทดลองสามารถเขียนเป็นตารางได้ดังนี้

สารกำจัดศัตรูพืช	Internal Standard		โมบายเฟส
	สาร	ความเข้มข้น(ug)	
อะมีทริน	เมธิลพาราไรออน	0.5	(1:4)2-บิวทานโน-ไซโคลเฮกเซน
เบนไรโอคาร์บ	เมธิลพาราไรออน	0.5	(1:4)2-บิวทานโน-ไซโคลเฮกเซน
คาร์โบฟูราน	เมธิลพาราไรออน	0.5	(1:4)2-บิวทานโน-ไซโคลเฮกเซน
เมธิลพาราไรออน	อะมีทริน	0.05	(1:4)2-บิวทานโน-ไซโคลเฮกเซน
โมโนโครโทฟอส	เมธิลพาราไรออน	0.5	เอธิลอะซีเตต
เมวินฟอส	เมธิลพาราไรออน	0.5	(1:4)2-บิวทานโน-ไซโคลเฮกเซน

5. ทำการวัด absorbance ของสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิด และของ internal standard เป็นจำนวน 2 ครั้งในแต่ละแถบ
6. หาค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนพื้นที่พีคของ สารตัวอย่างต่อ internal standard ในแถบเดียวกัน
7. คำนวณค่า % RSD บนความเข้มข้นของสารตัวอย่างเดียวกัน

ผลการทดลองการหาค่าความเที่ยงของการใส่สาร เมื่อใช้วิธีการ
Internal Standardization ดังแสดงในตารางที่ 3.17 ถึง 3.22

ตารางที่ 3.17 ความเที่ยงของการใส่สารกำจัดศัตรูพืชอะมีทริน เมื่อใช้วิธีการ
Internal Standardization

ความเข้มข้น ของสารบนแผ่น (นาโนกรัม)	แถบที่	ค่าเฉลี่ยอัตราส่วนพื้นที่ที่ สารตัวอย่างต่อสารมาตรฐาน ของแต่ละแถบ (As/Ai)	% RSD
20	1	0.1826	2.54
	2	0.1881	
	3	0.1943	
50	1	0.4183	8.93
	2	0.5061	
	3	0.5115	
100	1	0.7701	2.09
	2	0.7429	
	3	0.7810	

ตารางที่ 3.18 ความเที่ยงของการใส่สารกำจัดศัตรูพืชเบนโทไครบ เมื่อใช้วิธีการ
Internal Standard

ความเข้มข้น ของสารบนแผ่น (ไมโครกรัม)	แถบที่	ค่าเฉลี่ยอัตราส่วนพื้นที่พีค สารตัวอย่างต่อสารมาตรฐาน ของแต่ละแถบ (As/Ai)	% RSD
1	1	0.5322	5.47
	2	0.4671	
	3	0.5155	
2	1	0.9224	1.81
	2	0.8825	
	3	0.9054	
3	1	1.3174	5.52
	2	1.2702	
	3	1.1535	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.19 ความเที่ยงของการใส่สารกำจัดศัตรูพืชคาร์โบฟูราท เมื่อใช้วิธีการ
Internal Standardization

ความเข้มข้น ของสารบนแผ่น (ไมโครกรัม)	แถบที่	ค่าเฉลี่ยอัตราส่วนพื้นที่ฟิก สารตัวอย่างต่อสารมาตรฐาน ของแต่ละแถบ (As/Ai)	% RSD
2	1	0.3925	2.79
	2	0.3672	
	3	0.3853	
4	1	0.4048	2.06
	2	0.3849	
	3	0.3958	
8	1	1.0984	4.05
	2	1.1108	
	3	1.2018	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.20 ความเที่ยงของการใส่สารกำจัดศัตรูพืชเมธิลพาราไรออน เมื่อใช้วิธีการ Internal Standardization

ความเข้มข้น ของสารบนแผ่น (ไมโครกรัม)	แถบที่	ค่าเฉลี่ยอัตราส่วนพื้นที่พีก สารตัวอย่างต่อสารมาตรฐาน ของแต่ละแถบ (As/Ai)	% RSD
0.3	1	1.5587	3.46
	2	1.5271	
	3	1.6556	
0.6	1	2.7185	2.21
	2	2.7523	
	3	2.6125	
1.2	1	4.0062	3.90
	2	4.0373	
	3	4.3631	

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.21 ความเที่ยงของการใส่สารกำจัดศัตรูพืชโมโนโครโทฟอส เมื่อใช้วิธีการ Internal Standardization

ความเข้มข้น ของสารบนแผ่น (ไมโครกรัม)	แถบที่	ค่าเฉลี่ยอัตราส่วนพื้นที่พีค สารตัวอย่างต่อสารมาตรฐาน ของแต่ละแถบ (As/Ai)	% RSD
0.5	1	0.4735	2.80
	2	0.5050	
	3	0.4877	
1.0	1	0.8076	2.99
	2	0.8034	
	3	0.7650	
1.5	1	1.0681	2.46
	2	1.0554	
	3	1.1159	

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.22 ความเที่ยงของการใส่สารกำจัดศัตรูพืชเมวินฟอส เมื่อใช้วิธีการ
Internal Standardization

ความเข้มข้น ของสารบนแผ่น (ไมโครกรัม)	แถบที่	ค่าเฉลี่ยอัตราส่วนพื้นที่พีค สารตัวอย่างต่อสารมาตรฐาน ของแต่ละแถบ (As/Ai)	% RSD
1	1	0.2806	6.75
	2	0.2955	
	3	0.2507	
2	1	0.4437	2.12
	2	0.4674	
	3	0.4570	
4	1	0.6721	7.08
	2	0.7949	
	3	0.7093	

จากผลการทดลอง แสดงในตารางที่ 3.11 ถึง 3.22 เมื่อนำมาเปรียบเทียบความเที่ยงของการใส่สารเมื่อใช้วิธี External Standardization และ Internal Standardization เพื่อศึกษาดูว่าวิธีการใดของการวิเคราะห์ให้ผลดีกว่ากัน ซึ่งแสดงในตารางที่ 3.23 จะเห็นได้ว่าทั้ง 2 วิธีนี้ โดยทั่วไปแล้วให้ผลใกล้เคียงกันและยอมรับได้ ยกเว้นเบนโทไคคาร์บ เมธิลพาราไธออน และเมวินฟอส วิธีการใช้แบบ Internal Standard จะให้ผลดีกว่า ซึ่งสามารถดูได้จากค่า % RSD ต่ำกว่า

ตารางที่ 3.23 แสดงค่าความเที่ยงของการใส่สารเมื่อใช้วิธีการแตกต่างกันระหว่าง External Standardization และ Internal Standardization ในรูปของ %RSD ในแต่ละความเข้มข้นต่างๆ กันของสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิด

สารกำจัดศัตรูพืช	ความเข้มข้น		% RSD		สารกำจัดศัตรูพืช	ความเข้มข้น		% RSD	
	ของ	สารบนแผ่น (μg)	Ext.Std.	Int.Std.		ของ	สารบนแผ่น (μg)	Ext.Std.	Int.Std.
อะมีทริน	0.02		5.15	2.54	เบนโทไธคาร์บ	1		13.94	5.47
	0.05		5.51	8.93		2		3.67	1.81
	0.10		2.93	2.10		3		-	5.52
คาร์โบฟูราน	2		3.77	2.79	เมธิลพาราไรออน	0.3		7.83	3.46
	4		2.07	2.06		0.6		7.27	2.21
	8		3.90	4.05		1.2		4.06	3.90
โมนิโครโทฟอส	0.5		4.02	2.80	เมวินฟอส	1		13.38	6.75
	1.0		3.87	2.99		2		3.28	2.12
	1.5		2.93	2.46		3		7.59	7.00

3.5.4 การศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของสารกำจัดศัตรูพืชแต่ละชนิดกับค่า absorbance ที่วัดได้

ก. การใช้เทคนิคแบบ External Standard

1. เตรียมสารละลายสารกำจัดศัตรูพืชจาก stock solution 1000 ppm โดยมีความเข้มข้นดังต่อไปนี้

อะมีทริน มีความเข้มข้น 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 ppm

เบนโทคาร์บ มีความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm

คาร์โบฟูราน มีความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ppm

เมธิลพาราไธออน มีความเข้มข้น 3, 6, 9, 12 และ 15 ppm

โมโนโครโทฟอส มีความเข้มข้น 5, 10, 15, 20 และ 25 ppm

เมวินฟอส มีความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm

2. นำสารละลายแต่ละชนิดไปทำการใส่สารลงบนแผ่น HPTLC ซึ่ง clean-up แผ่นแล้ว

3. ทำการ develop ด้วยโมบายเฟส (1:4)2-บิวทานโนน-ไซโคลเฮกเซน สำหรับสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 5 ชนิด ส่วนโมโนโครโทฟอส ให้ทำการ develop ด้วยโมบายเฟสเอธิลอะซีเตต

4. นำแผ่นที่ระเหยโมบายเฟสออกไปแล้วไปวัด absorbance ด้วยเครื่อง densitometer

5. เขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง ค่าพื้นที่ใต้พีกและความเข้มข้นบนแผ่นของสารละลายสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิด

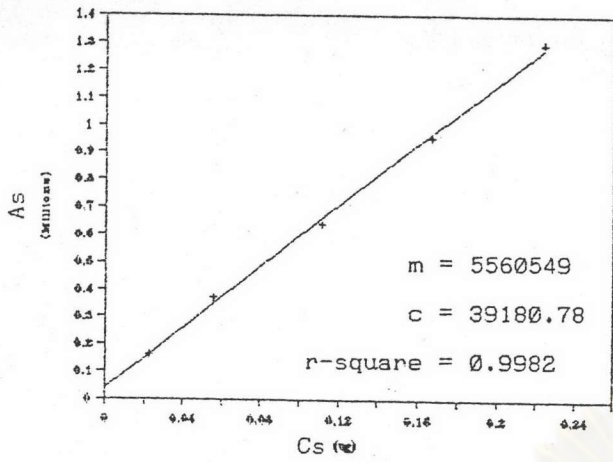
ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.24 และ รูปที่ 3.8

จากผลการทดลองที่ 3.5.4.1 ก. ดังแสดงในตารางที่ 3.24 และรูปที่ 3.8 จะเห็นได้ว่าในช่วงของความเข้มข้นที่ใช้ของสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิด ให้ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่า absorbance หรือพื้นที่พีกเป็นแบบเส้นตรงหรือมีความสัมพันธ์กันโดยตรง โดยที่ slope มีค่ามากกว่า 0.99

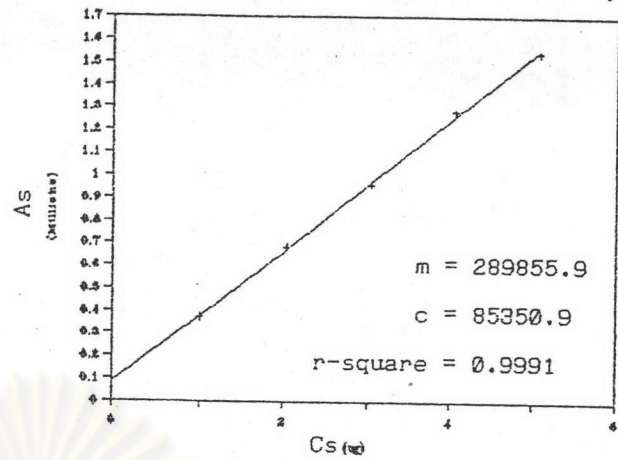
ตารางที่ 3.24 แสดงค่าพื้นที่ผิวของสารมาตรฐานสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ

อะมิทริน		เบนโรโอคาร์บ	
ความเข้มข้น (μg)	พื้นที่ผิว	ความเข้มข้น (μg)	พื้นที่ผิว
0.0223	162044	1.013	371386
0.0558	370469	2.026	680454
0.1116	638134	3.039	960110
0.1674	954690	4.052	1278865
0.2232	1297465	5.065	1540301
คาร์โบฟูราท		เมทิลนาราไดรอน	
ความเข้มข้น (μg)	พื้นที่ผิว	ความเข้มข้น (μg)	พื้นที่ผิว
2.140	318957	0.2965	557030
4.280	540065	0.5930	966238
6.420	779357	0.8895	1233572
8.560	931904	1.1860	1544584
10.700	1152131	1.4835	1459835
โมโนโครโทฟอส		เมวินฟอส	
ความเข้มข้น (μg)	พื้นที่ผิว	ความเข้มข้น (μg)	พื้นที่ผิว
0.5385	426743	1.160	202053
1.0770	745432	2.320	333439
1.6155	944412	3.480	440806
2.1540	1198976	4.640	554110
2.6925	1459835	5.800	659915

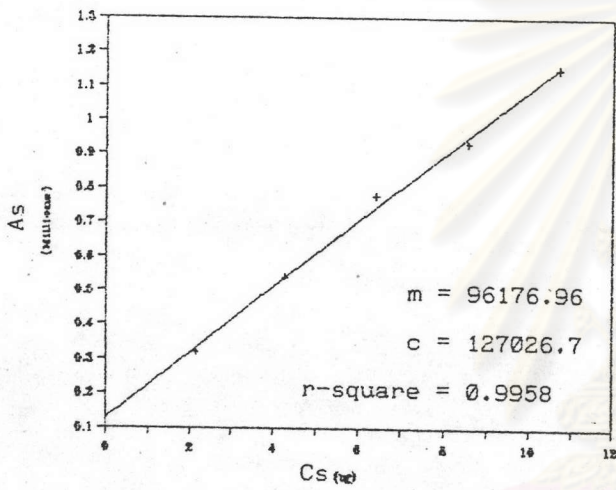
Calibration Curve of Ametryne



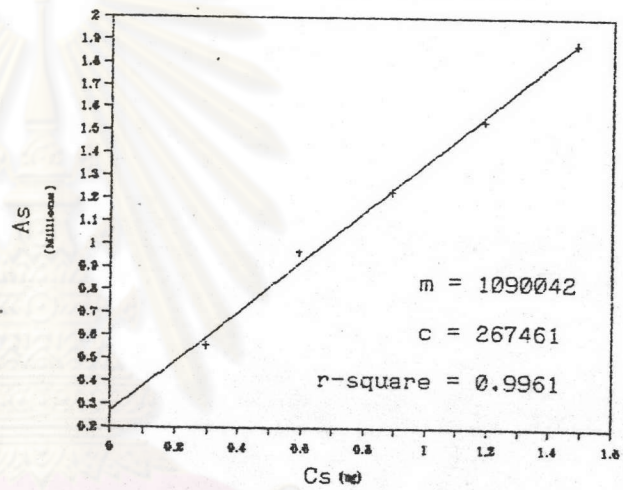
Calibration Curve of Benthicarb



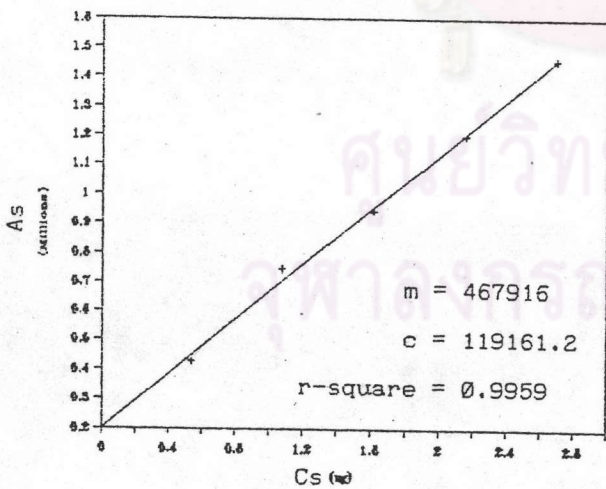
Calibration Curve of Carbofuran



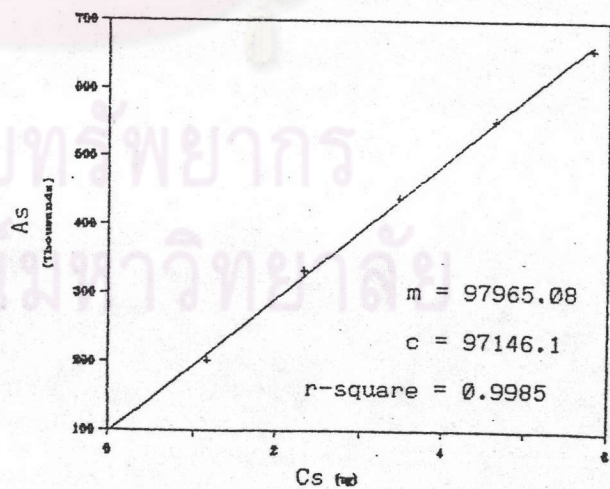
Calibration Curve of Methyl Parathion



Calibration Curve of Monocrotophos



Calibration Curve of Mevinphos



รูปที่ 3.8 แสดง Calibration Curve ของ External Standardization ของสาร

กำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิด

ข. การใช้เทคนิคแบบ Internal Standard

1. เตรียมสารละลายเช่นเดียวกันกับ การทดลองในหัวข้อ 3.5.4.1

ข้อ 1

2. เติม internal standard โดยกำหนดให้

สารมาตรฐาน	internal standard (IS)	ความเข้มข้น IS (ppm)
อะมีทริน	เมธิลพาราไรออน	5
เบนโซอีคาร์บ	เมธิลพาราไรออน	5
คาร์โบฟูราน	เมธิลพาราไรออน	5
เมธิลพาราไรออน	อะมีทริน	0.5
โมโนโครฟอส	เมธิลพาราไรออน	5
เมวินฟอส	เมธิลพาราไรออน	5

3. ทำการ develop ด้วย (1:4)2-บิวทานอน-ไซโคลเฮกเซน สำหรับสารกำจัดศัตรูพืช 5 ชนิด ส่วนโมโนโครโทฟอสให้ทำการ develop ด้วยเอธิลอะซีเตต

4. นำแผ่นที่ทำการ develop แล้วไปวัด absorbance ด้วย densitometer integrate พื้นที่ใต้พีกของสารมาตรฐาน และ internal standard

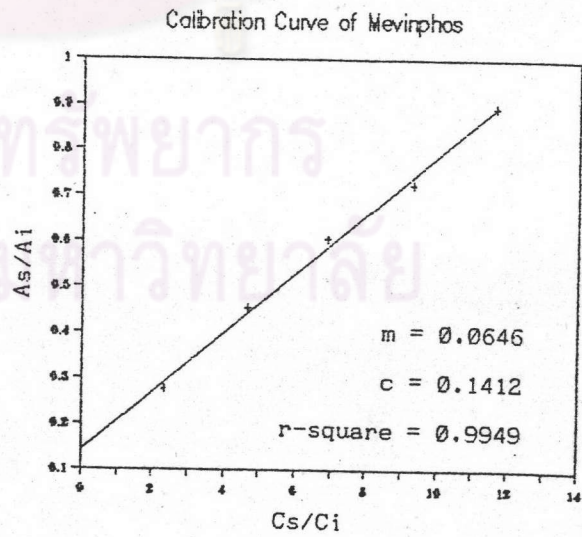
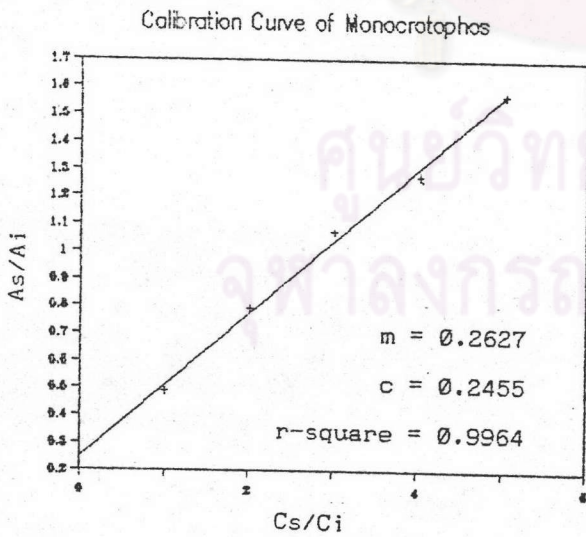
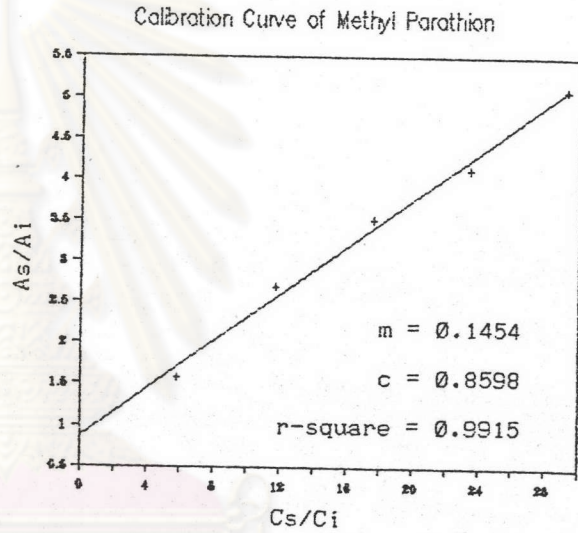
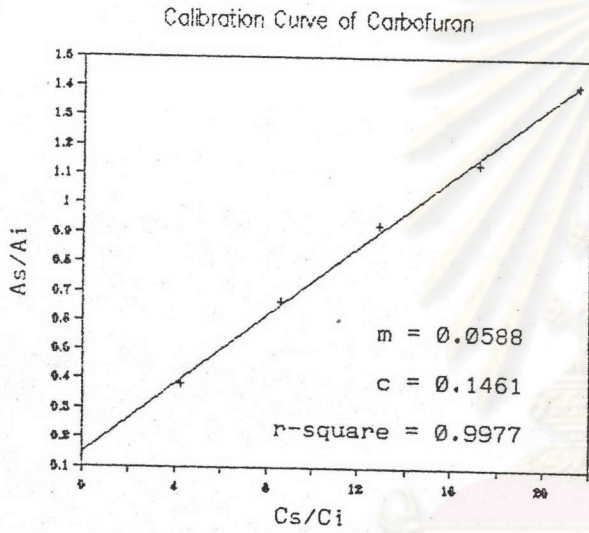
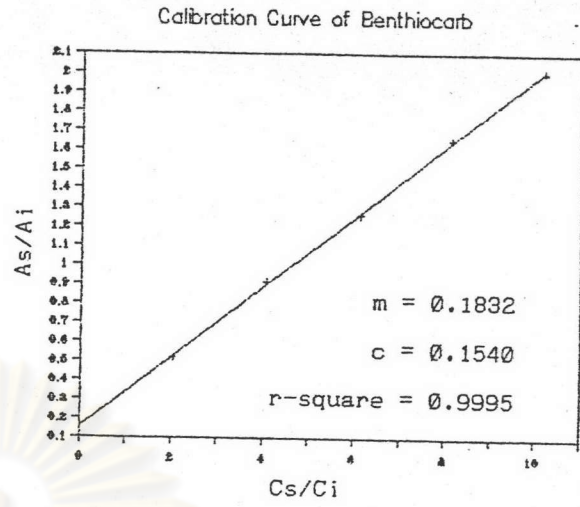
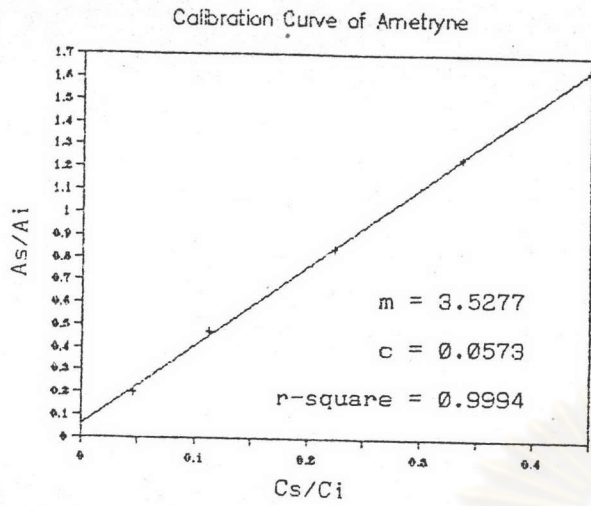
5. เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่า อัตราส่วนของความเข้มข้นของสารมาตรฐานต่อ internal standard (C_s/C_i) และ อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีกของสารมาตรฐานต่อ internal standard (A_s/A_i)

ผลการทดลองแสดงดังในตารางที่ 3.25 และ รูปที่ 3.9

จากผลการทดลองนี้ดังในตารางที่ 3.25 และรูปที่ 3.9 แสดงให้เห็นว่า ความสัมพันธ์ในช่วงความเข้มข้นที่ใช้กับค่า absorbance หรือพื้นที่พีกเป็นแบบเส้นตรงเช่นเดียวกันกับวิธี External Standization และค่า slope มีค่ามากกว่า 0.99

ตารางที่ 3.25 แสดงค่าอัตราส่วนพื้นที่ผิว ที่อัตราส่วนความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ระหว่างสารมาตรฐานสารกำจัดศัตรูพืชชนิดต่าง ๆ และ internal standard

อะมีทริน		เบนไรโอคาร์บ	
Cs/Ci	As/Ai	Cs/Ci	As/Ai
0.0448	0.2006	2.0321	0.5173
0.1120	0.4756	4.0642	0.9125
0.2239	0.8398	6.0963	1.2605
0.3360	1.2415	8.1284	1.6542
0.4880	1.6381	10.1605	2.0102
คาร์โบฟูราน		เมธิลพาราไรออน	
Cs/Ci	As/Ai	Cs/Ci	As/Ai
4.2929	0.3817	5.8366	1.5805
8.5858	0.6646	11.6732	2.6944
12.8786	0.9294	17.5098	3.5170
17.1715	1.1370	23.3465	4.1355
21.4645	1.4093	29.1830	5.1041
โมโนโครโทฟอส		เมวินฟอส	
Cs/Ci	As/Ai	Cs/Ci	As/Ai
1.0084	0.4887	2.3270	0.2756
2.0168	0.7920	4.6540	0.4561
3.0253	1.0726	6.8910	0.6063
4.0337	1.2776	9.3079	0.7255
5.0420	1.5705	11.6349	0.8934



รูปที่ 3.9 แสดง Calibration Curve ของ Internal Standardization ของสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิด

3.5.5 การหาค่าความถูกต้อง (Accuracy) ของการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิด โดยการวัดความเข้มข้นโดยอาศัย External Standard และ Internal Standard

3.5.5.1 การหาความถูกต้องของการวิเคราะห์โดยการวัดความเข้มข้นแบบ External Standardization

1. เตรียมสารตัวอย่างสารกำจัดศัตรูพืชอะมีทริน มีความเข้มข้นที่ทราบค่าได้อย่างละเอียด (4.464 ppm) โดยมีความเข้มข้นเดียวกันจำนวน 3 ตัวอย่างเป็น unknown
2. ทำการใส่สารความเข้มข้นเดียวกันนั้น ขนาดละ 3 แถบ แถบละ 100 μL บนแผ่น HPTLC ที่ clean-up แล้วแผ่นเดียวกัน จะได้ทั้งหมด 9 แถบ
3. develop ด้วยโมบายเฟสตามที่กำหนด เช่นเดียวกับกับการทดลองที่ 3.5.4.1
4. นำมาทำการวัด absorbance ของแต่ละแถบ ภายหลังจากการ develop จำนวน 3 ครั้งแล้วหาค่าเฉลี่ย แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย ดังนั้นในตัวอย่างหนึ่งๆ จะได้ค่าพื้นที่พิกเฉลี่ยจำนวน 3 ค่า
5. นำค่าพื้นที่พิกเฉลี่ยนั้นไปอ่านจาก Calibration Curve ของการทดลองที่ 3.5.4.1 หาค่าความเข้มข้นของสารบนแผ่น จะได้ความเข้มข้น 3 ค่า หาค่าเฉลี่ยความเข้มข้น
6. เปรียบเทียบความเข้มข้นที่ได้จากการทดลองกับค่าความเข้มข้นที่แท้จริง หาค่า % Error ที่เกิดขึ้น
7. ทำการทดลองซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 1 ถึง 6 ข้างต้น แต่เปลี่ยนชนิดของสารจากอะมีทริน เป็น เบนโทไธคาร์บ คาร์โบฟูราน เมธิลพาราไรธอน โมโนโครโทฟอส และเมวินฟอส ตามลำดับ
8. หาค่า % Error ของสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 5 ที่เหลือ (ดูวิธีการคำนวณในภาคผนวก 2)

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.26

ตารางที่ 3.26 ค่าความถูกต้อง(Accuracy) ซึ่งแสดงในรูปของ % Error ของสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิด โดยการทำให้ External Standardization

สารกำจัดศัตรูพืช	ครั้งที่ทดลอง	พื้นที่พิกเนเลีย (As)	ความเข้มข้นของสารบนแผ่น (μg)			% Error
			ที่แท้จริง	ที่ได้จากการทดลอง	เนเลีย	
อะมีทริน	1	306955	0.0446	0.0482		
	2	293886	0.0446	0.0458	0.0468	
	3	297148	0.0446	0.0464		
เบนไรโอคาร์บ	1	588662	1.5195	1.7364		
	2	532793	1.5195	1.5438	1.6052	
	3	530386	1.5195	1.5354		
คาร์โบฟูราน	1	693491	5.8850	5.8898		
	2	746483	5.8850	6.4408	6.1576	
	3	717765	5.8850	6.1422		

ตารางที่ 3.26 (ต่อ)

สารกำจัดศัตรูพืช	ครั้งที่ ทดลอง	พื้นที่ปกคลุม (As)	ความเข้มข้นของสารบนแผ่น (μg)			% Error
			ที่แท้จริง	ที่ได้จากการทดลอง	เฉลี่ย	
เมธิลพาราไธออน	1	1149586	0.7116	0.8093		
	2	1164166	0.7116	0.8226	0.7794	9.53
	3	1037318	0.7116	0.7063		
โมโนโครโทฟอส	1	630206	0.9155	0.9212		
	2	605905	0.9155	0.8693	0.8951	2.23
	3	617807	0.9155	0.8947		
เมวินฟอส	1	427611	2.9000	3.3733		
	2	416947	2.9000	3.2644	3.4059	17.44
	3	447859	2.9000	3.5800		

จากผลการทดลองนี้ จะเห็นว่าการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิด โดยการทำ External Standardization พบว่า ความถูกต้องของการวิเคราะห์ดีเพราะมี % Error น้อย (2.23%-9.58%) ยกเว้นการวิเคราะห์ของเมวินฟอสซึ่งมี %Error 17.44% ทั้งนี้เพราะเมวินฟอสมี 2 ไอโซเมอร์ ทำให้ได้โครมาโทแกรมมี 2 พีก และการหาพื้นที่พีกนั้น เครื่อง integrator ทำงานได้เพียงพีกเดียวประกอบกับการแยกพีกทั้งสองนี้ไม่ได้ 100 % การหาพื้นที่พีกจึงมีโอกาสผิดพลาดได้ส่วนใหญ่จะวัดพื้นที่พีกได้มากกว่าปกติ



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5.5.2 การหาความถูกต้องของการวิเคราะห์โดยการวัดความเข้มข้นแบบ Internal Standardization

1. เตรียมสารตัวอย่างสารกำจัดศัตรูพืช อะมีทริน ทราบค่าความเข้มข้นอย่างละเอียด เป็น unknown เติมเมธิลพาราไรออนเป็น internal standard ให้มีค่าความเข้มข้นของเมธิลพาราไรออน 5 ppm จำนวน 3 ตัวอย่าง
2. นำตัวอย่างไปทำการใส่สารบนแผ่น HPTLC ที่ clean-up แล้ว ตัวอย่างละ 3 แถบโดยมีปริมาตรแถบละ 100 μ L จะได้จำนวน 9 แถบ
3. นำแผ่นที่ทำการใส่สารแล้วนั้นไปทำการ develop ด้วยตัวทำละลาย (1:4) 2-บิวทานโนน-ไซโคลเฮกเซน
4. เมื่อโมบายเฟสระเหยออกหมดแล้วให้นำไปทำการวัดด้วยเครื่อง densitometer
5. หาค่าพื้นที่ใต้พีกของทั้งสารตัวอย่าง และ internal standard และนำมาคำนวณหาค่าอัตราส่วนพื้นที่พีกของสารตัวอย่างต่อ internal standard
6. คำนวณค่าอัตราส่วนพื้นที่พีกเฉลี่ยของ 3 แถบเป็น 1 สารตัวอย่าง
7. นำค่าอัตราส่วนพื้นที่พีกเฉลี่ยมาเปรียบเทียบกับใน Calibration Curve ของการทดลองที่ 3.5.4.2 เพื่อหาค่าอัตราส่วนความเข้มข้นของสารตัวอย่างต่อ internal standard
8. คำนวณค่าความเข้มข้นของสารที่ใส่เป็นแถบลงบนแผ่น
9. หาค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของ 3 ตัวอย่างนั้น และ % Error ที่เกิดขึ้นระหว่างค่าความเข้มข้นจากการทดลองและค่าที่แท้จริง
10. ทำการทดลองซ้ำข้างต้น (ข้อ 1 ถึง 9) กับสารกำจัดศัตรูพืชอื่น ๆ อันได้แก่ เบนไรโอคาร์บ, คาร์โบฟูราน, เมธิลพาราไรออน, โมโนโครโทฟอส และ เมวินฟอส โดยใช้ internal standard และโมบายเฟสตามที่กำหนดในการทดลองที่ 3.5.4.2
11. หาค่า Accuracy จาก % Error ของสารกำจัดศัตรูพืชอีก 5 ชนิดที่เหลือนั้น (ดูวิธีการคำนวณในภาคผนวก 3)

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.27

ตารางที่ 3.27 แสดงค่าความถูกต้องของสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิด โดยการทำให้ Internal Standardization

สารกำจัดศัตรูพืช	ครั้งที่ทดลอง	ความเข้มข้น internal standard	อัตราส่วนพื้นที่พิกเนลลีย์ (As/Ai)	ความเข้มข้นของสารบนแผ่น (μg)			% Error
				ที่แท้จริง	ที่ได้จากการทดลอง	เฉลี่ย	
อะมีทรีน	1	0.4985	0.3841	0.0446	0.0462		
	2	0.4985	0.3762	0.0446	0.0451	0.0459	2.72
	3	0.4985	0.3853	0.0446	0.0463		
เบนโรโอคาร์บ	1	0.4985	0.7376	1.5195	1.5871		
	2	0.4985	0.6866	1.5195	1.4485	1.4858	2.22
	3	0.4985	0.6768	1.5195	1.4218		
คาร์โบฟูราน	1	0.4985	0.7818	5.8850	5.3822		
	2	0.4985	0.8581	5.8850	6.0280	5.7241	2.73
	3	0.4985	0.8267	5.8850	5.7621		

ตารางที่ 3.27 (ต่อ)

สารกำจัดศัตรูพืช	ครั้งที่ ทดลอง	ความเข้มข้น internal standard	อัตราส่วน พื้นที่พีคเฉลี่ย (As/Ai)	ความเข้มข้นของสารบนแผ่น (μg)			% Error
				ที่แท้จริง	ที่ได้จากการทดลอง	เฉลี่ย	
เมธิลพาราไรออน	1	0.508	2.9256	0.7116	0.7216		
	2	0.508	2.9725	0.7116	0.7380	0.7401	4.00
	3	0.508	3.0377	0.7116	0.7607		
โมโนโครโทฟอส	1	0.5340	0.7077	0.9155	0.9394		
	2	0.5340	0.6612	0.9155	0.8450	0.9208	0.58
	3	0.5340	0.7267	0.9155	0.9780		
เมวินฟอส	1	0.4985	0.5262	2.9000	2.9682		
	2	0.4985	0.5224	2.9000	2.9393	3.0520	5.24
	3	0.4985	0.5625	2.9000	3.2485		

จากตารางที่ 3.27 เมื่อเปรียบเทียบค่าความถูกต้องของสารแต่ละชนิดเมื่อใช้ internal standard พบว่า โมโนโครโทฟอสมีค่าความถูกต้องดีมาก ส่วนสารกำจัดศัตรูพืชชนิดอื่นๆ มีค่าความถูกต้องดี ซึ่งคล้ายกันกับการหาค่าความถูกต้องโดย External Standard คือ โมบายเฟสที่ทำให้เกิดการแยกที่ใช้ในการวิเคราะห์โมโนโครโทฟอสนั้น ใช้เอธิลอะซีเตต ซึ่งเมื่อดูจากโครมาโทแกรมแล้ว พีกของโมโนโครโทฟอสเป็นพีกเดี่ยว ที่แยกจากพีกของเมธิลพาราไรออน การวิเคราะห์จึงมีค่าความถูกต้องที่ดี

ส่วนเมวินฟอสนั้นก็เช่นเดียวกันกับการวิเคราะห์โดย External Standard บนโครมาโทแกรมจะเห็นเป็นพีกที่เหลื่อมซ้อนกัน (overlap) ระหว่าง 2 isomer ความถูกต้องของการวิเคราะห์จึงต่ำที่สุด

จากการทดลองนี้ จะเห็นได้ว่าวิธีการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิดนี้ โดยใช้วิธี Internal Standardization ได้ผลความถูกต้องดีมาก โดยมี % Error อยู่ในช่วง 2.22-5.24 % โดยเฉพาะการวิเคราะห์เมวินฟอสจะให้ % Error สูงกว่าตัวอื่นๆ เช่นเดียวกัน แต่ยังต่ำกว่าของวิธี External Standardization

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5.6 การหาค่าความถูกต้องของการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชผสมทั้ง 6 ชนิด

ในการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชโดยทั่วไปนั้น มักจะพบว่าสารกำจัดศัตรูพืชมักจะไม่ได้แยกเป็นสารเดี่ยวมักจะอยู่ผสมรวมกัน ดังนั้นในการทดลองนี้จึงต้องทำการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชเมื่ออยู่ผสมรวมกัน

3.5.6.1 การหาค่าความถูกต้องของสารกำจัดศัตรูพืชผสม เมื่อใช้วิธีการวิเคราะห์แบบ External Standardization

1. เตรียมสารละลายสารกำจัดศัตรูพืชผสมทั้ง 6 ชนิด จำนวน 3 ตัวอย่าง โดยทำตัวอย่างละ 3 ขวด และกำหนดให้ แต่ละตัวอย่างมีความเข้มข้นของสารกำจัดศัตรูพืชดังต่อไปนี้

ตัวอย่างที่	ความเข้มข้น (ppm)					
	Am	Be	Ca	MP	Mo	Me
1	0.6	26	46	3	11	45
2	0.4	14	22	2	5	24
3	1.1	28	44	2	12	40

2. นำสารตัวอย่างแต่ละขวดมาทำการใส่ลงบนแผ่น HPTLC ที่ clean-up แล้ว ครั้งละ 100 μ L

3. ทำการ develop ด้วยโมบายเฟส (1:4)2-บิวทานโนน-ไซโคลเฮกเซน

4. เมื่อโมบายเฟสระเหยออกจนหมดแล้ว จึงนำแผ่น HPTLC นั้นไปวัดค่า absorbance ทำการ integrate พื้นที่ใต้พีกของ อะมีทริน เบนไรโอคาร์บ คาร์โบฟูราน และเมวินฟอส เฉลี่ยค่าพื้นที่พีกในแต่ละขวด

5. จากค่าพื้นที่พีกนั้น นำไปทำการเปรียบเทียบกับ Calibration Curve ในการทดลองที่ 3.5.4.1 เพื่อหาค่าความเข้มข้นที่ได้จากการทดลอง

6. คำนวณ % Error ที่เกิดขึ้นโดยหาจากความแตกต่างของค่าที่ได้จากการทดลอง และค่าที่แท้จริง

7. เตรียมสารละลายสารกำจัดศัตรูพืช จำนวน 3 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 3 ขวด เพื่อใช้ในการหาค่าความถูกต้องของ เมธิลพาราไรออน และ โมโนโครโทฟอส โดยกำหนดให้มีความเข้มข้นดังต่อไปนี้

ตัวอย่างที่	ความเข้มข้น (ppm)					
	Am	Be	Ca	MP	Mo	Me
1	1.0	26	46	3	11	45
2	0.6	14	22	2	8	24
3	1.0	28	44	5	12	40

8. นำสารตัวอย่างแต่ละขวดมาทำการใส่ลงบนแผ่น HPTLC ที่ clean-up แล้ว ครึ่งละ 100 μ L ทำการ develop ด้วยโมบายเฟส (1:4) 2-บิวทาโน-ไซโคลเฮกเซน ระเหยโมบายเฟสออก นำไปวัดค่า absorbance และทำการ integrate พื้นที่พิกของเมธิลพาราไรออน เฉลี่ยค่าพื้นที่พิกในแต่ละขวด

9. ทำเช่นเดียวกันกับในข้อ 8 แต่ทำการ develop ด้วยโมบายเฟส เอธิลอะซีเตต และทำการวัดพื้นที่พิกของโมโนโครโทฟอส เฉลี่ยค่าพื้นที่พิก

10. นำค่าพื้นที่พิกที่ได้ทั้ง 2 นี้ ไปเปรียบเทียบกับ Calibration Curve ของการทดลองที่ 3.5.4.1 เพื่อหาค่าความเข้มข้น

11. คำนวณค่า % Error ที่แตกต่างกันระหว่างค่าที่ทดลองได้ และค่าที่แท้จริง

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.28 ถึง 3.33

ตารางที่ 3.28 ค่าความถูกต้องการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชอะมีทริน ในสารผสม โดยวิธีการ External Standardization

ครั้งที่ ทดลอง	พื้นที่เฉลี่ย	ความเข้มข้นของสาร (μg)			% Error
		ที่แท้จริง	ที่ได้จากการทดลอง	เฉลี่ย	
1	419761	0.0601	0.0684		
2	384226	0.0601	0.0621	0.0632	5.05
3	367106	0.0601	0.0590		
1	284355	0.0401	0.0441		
2	287871	0.0401	0.0447	0.0439	9.45
3	277087	0.0401	0.0428		
1	639895	0.1102	0.1080		
2	623969	0.1102	0.1052	0.0999	9.33
3	520867	0.1102	0.0866		

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.29 ค่าความถูกต้องการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืช เบนไดโอคาร์บ ในสารผสม
โดยวิธีการ External Standardization

ครั้งที่ ทดลอง	พื้นที่เฉลี่ย	ความเข้มข้นของสาร (μg)			% Error
		ที่แท้จริง	ที่ได้จากการทดลอง	เฉลี่ย	
1	957803	2.8626	3.0100		
2	911498	2.8626	2.8502	2.7204	4.97
3	752317	2.8626	2.3010		
1	598909	1.5414	1.7718		
2	605071	1.5414	1.7930	1.6644	7.98
3	499406	1.5414	1.4285		
1	1002600	3.0828	3.1645		
2	995375	3.0828	3.1396	3.0302	1.71
3	893023	3.0828	2.7865		

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.30 ค่าความถูกต้องการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชคาร์โบฟูรานในสารผสม โดย
วิธีการ External Standardization

ครั้งที่ ทดลอง	พื้นที่เฉลี่ย	ความเข้มข้นของสาร (μg)			% Error
		ที่แท้จริง	ที่ได้จากการทดลอง	เฉลี่ย	
1	720011	4.7794	6.1656		
2	605644	4.7794	4.9764	5.2060	8.93
3	557516	4.7794	4.4760		
1	355172	2.2858	2.3721		
2	347553	2.2858	2.2929	2.2274	2.56
3	321026	2.2858	2.0171		
1	651740	4.5716	5.4557		
2	615909	4.5716	5.0832	4.9272	7.78
3	535076	4.5716	4.2427		

ศูนย์วิทยพัชกร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.31 ค่าความถูกต้องการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชเมธิลพาราโรซอน ในสารผสม
โดยวิธีการ External Standardization

ครั้งที่ ทดลอง	พื้นที่เฉลี่ย	ความเข้มข้นของสาร (μg)			% Error
		ที่แท้จริง	ที่ได้จากการทดลอง	เฉลี่ย	
1	562201	0.3204	0.3437		
2	472305	0.3204	0.2699	0.2850	11.06
3	437471	0.3204	0.2413		
1	385766	0.2136	0.1988		
2	361153	0.2136	0.1786	0.1799	15.76
3	341415	0.2136	0.1624		
1	884768	0.5340	0.6087		
2	924638	0.5340	0.6414	0.6109	14.40
3	853050	0.5340	0.5826		

ศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.32 ค่าความถูกต้องการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชโมโนโครโทฟอส ในสารผสม
โดยวิธีการ External Standardization

ครั้งที่ ทดลอง	พื้นที่เฉลี่ย	ความเข้มข้นของสาร (μg)			% Error
		ที่แท้จริง	ที่ได้จากการทดลอง	เฉลี่ย	
1	596627	0.8616	0.8688		
2	622845	0.8616	0.9271	0.8753	1.59
3	579142	0.8616	0.8300		
1	701726	1.1847	1.1022		
2	746046	1.1847	1.2006	1.1442	3.42
3	714095	1.1847	1.1297		
1	737512	1.2924	1.1817		
2	813913	1.2924	1.3514	1.2720	1.58
3	783164	1.2924	1.2831		

ศูนย์วิทยุโทรทรรศน์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.33 ค่าความถูกต้องการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชเมวินฟอสในสารผสม โดยวิธีการ External Standardization

ครั้งที่ทดลอง	พื้นที่เฉลี่ย	ความเข้มข้นของสาร (μg)			% Error
		ที่แท้จริง	ที่ได้จากการทดลอง	เฉลี่ย	
1	572559	5.4180	4.8529		
2	530544	5.4180	4.4240	4.8527	10.43
3	614518	5.4180	5.2812		
1	420455	2.8896	3.3003		
2	407219	2.8896	3.1651	3.1481	8.94
3	388964	2.8896	2.9788		
1	594303	4.8160	5.0748		
2	563629	4.8160	4.7617	4.9709	3.22
3	594443	4.8160	5.0763		

จากตารางที่ 3.28 ถึง 3.33 พบว่า % Error ของสารกำจัดศัตรูพืชแต่ละชนิดอยู่ระหว่าง 2.1-13.7 % ซึ่งจัดได้ว่ามีค่าความถูกต้องที่ดียอมรับได้

การที่ %Error ของเมธิลพาราไรออนมีค่ามาก เนื่องจากเมื่อดูจากโครมาโทแกรมแล้วพีกของเมธิลพาราไรออนมีการ overlap กับพีกของ internal standard ของมันเอง (ซึ่งในที่นี้คืออะมีทริน) และยังแสดงให้เห็นว่าอะมีทรินเป็น internal standard ที่ไม่ดีสำหรับเมธิลพาราไรออนอีกด้วย

3.5.6.2 การหาค่าความถูกต้องของสารกำจัดศัตรูพืชผสม เมื่อใช้วิธีการ
วิเคราะห์แบบ Internal Standardization

1. เตรียมสารละลายสารกำจัดศัตรูพืชผสมทั้ง 6 ชนิด จำนวน 3 ตัวอย่าง โดยทำตัวอย่างละ 3 ขวด โดยกำหนดให้ เมธิลพาราไรออน เป็น internal standard และให้แต่ละตัวอย่างมีความเข้มข้นของสารกำจัดศัตรูพืชดังต่อไปนี้

ตัวอย่างที่	ความเข้มข้น (ppm)					
	Am	Be	Ca	MP	Mo	Me
1	0.4	14	22	2	5	24
2	0.6	26	46	3	11	45
3	1.1	28	44	2	12	40

2. นำสารตัวอย่างแต่ละขวดมาทำการใส่ลงบนแผ่น HPTLC ที่ clean-up แล้ว ครึ่งละ 100 μ L แล้วทำการ develop ด้วยโมบายเฟส(1:4)2-บิวทาโนน-ไซโคลเฮกเซน

3. เมื่อโมบายเฟสระเหยออกจนหมดแล้ว จึงนำแผ่น HPTLC นั้นไป วัดค่า absorbance ทำการ integrate พื้นที่ใต้พีกของ อะมีทริน และเมธิลพาราไรออน

4. เนื่องจากเมธิลพาราไรออนเป็น internal standard ให้คำนวณหาค่าอัตราส่วนระหว่างพื้นที่พีกของสารตัวอย่าง (ในที่นี้คือ อะมีทริน) ต่อพื้นที่พีกของเมธิลพาราไรออน

5. นำค่าอัตราส่วนของพื้นที่พีกนั้น ไปเปรียบเทียบกับ Calibration Curve ของการทดลองที่ 3.5.4.2 เพื่อหาอัตราส่วนความเข้มข้นของสารตัวอย่างต่อ internal standard

6. จากการที่ทราบค่าความเข้มข้นของ internal standard จะสามารถหาความเข้มข้นของสารตัวอย่างได้

7. คำนวณค่า % Error ของความแตกต่างระหว่าง ความเข้มข้นที่คำนวณได้ และความเข้มข้นที่แท้จริง

8. ทำซ้ำในข้อที่ 1 ถึง 6 สำหรับสารตัวอย่าง เบนโซอิคาร์บ คาร์โบฟูราน และ เมวินฟอส

9. ในการหาค่าความถูกต้องของเมธิลพาราโรออน กำหนดให้อะมีทรินเป็น internal standard ให้เตรียมสารละลายสารกำจัดศัตรูพืชจำนวน 3 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 3 ขวด มีความเข้มข้นดังต่อไปนี้

ตัวอย่างที่	ความเข้มข้น (ppm)					
	Am	Be	Ca	MP	Mo	Me
1	0.6	14	22	2	8	24
2	1.0	26	46	3	11	45
3	1.0	28	44	5	12	40

10. นำสารตัวอย่างแต่ละขวดมาทำการใส่ลงบนแผ่น HPTLC ที่ clean-up แล้ว ครึ่งละ 100 μ L ทำการ develop ด้วยโมบายเฟส (1:4)2-บิวทาโน-ไซโคลเฮกเซน ระเหยโมบายเฟสออก แล้วนำไปวัดค่า absorbance

11. ทำการ integrate พื้นที่พีคของเมธิลพาราโรออน และอะมีทริน

12. จากการที่อะมีทรินเป็น internal standard ให้คำนวณค่าอัตราส่วนของพื้นที่พีคของเมธิลพาราโรออน ต่ออะมีทริน

13. นำค่าอัตราส่วนที่ได้ขึ้นไปทำการเปรียบเทียบกับใน Calibration Curve ของการทดลองที่ 3.5.4.2 เพื่อหาค่าอัตราส่วนความเข้มข้นของสารตัวอย่างต่อ internal standard

14. ในการทดลองนี้ทราบค่าความเข้มข้นของ internal standard (อะมีทริน) สามารถนำไปคำนวณหาค่าความเข้มข้นของเมธิลพาราโรออนได้

15. หาค่า % Error ของความแตกต่างระหว่างค่าที่ทดลองได้และค่าที่แท้จริง

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.34 ถึง 3.38

ตารางที่ 3.34 ค่าความถูกต้องการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชอะมีทริน ในสารผสม โดยวิธี
การ Internal Standardization

ครั้งที่ ทดลอง	ความเข้มข้น internal standard	อัตราส่วน พื้นที่พีคเฉลี่ย (As/Ai)	ความเข้มข้นของสาร (μg)			% Error
			ที่แท้จริง	ที่ได้จากการทดลอง	เฉลี่ย	
1	0.2020	0.9980	0.0401	0.0539		
2	0.2020	1.0316	0.0401	0.0558	0.0570	42.19
3	0.2020	1.1282	0.0401	0.0613		
1	0.3030	0.9387	0.0601	0.0757		
2	0.3030	0.9052	0.0601	0.0728	0.0758	26.06
3	0.3030	0.9754	0.0601	0.0789		
1	0.2020	1.8910	0.1102	0.1045		
2	0.2020	1.8022	0.1102	0.0999	0.1000	9.27
3	0.2020	1.7184	0.1102	0.0951		

ในการหาปริมาณของอะมีทริน โดยใช้เมทิลพาราไรออนเป็น internal standard จะเห็นว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของอะมีทรินประมาณ $0.04 \mu\text{g}$ ได้ผลไม่ค่อยดี มี %Error สูงถึง 42.19% แต่เมื่อใช้ความเข้มข้นสูงขึ้น %Error จะลดลงซึ่งเมื่อความเข้มข้น เป็น $0.1102 \mu\text{g}$ พบว่า %Error เพียง 9.27% สาเหตุที่ผลการวิเคราะห์มี %Error สูง เพราะพีคของอะมีทรินอยู่ชิดมากกับพีคของคาร์โบฟูรานทำให้การแยกไม่ได้ 100% เมื่อใช้ความเข้มข้นต่ำๆ จึงทำให้ข้อผิดพลาดในการหาพื้นที่พีคมากขึ้น แต่เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นการหาพื้นที่ พีคจะดีขึ้น %Error จึงน้อยลง

ตารางที่ 3.35 ค่าความถูกต้องการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืช เบนโรโอคาร์บ ในสารผสม
โดยวิธีการ Internal Standardization

ครั้งที่ ทดลอง	ความเข้มข้น internal standard	อัตราส่วน พื้นที่พีคเฉลี่ย (As/Ai)	ความเข้มข้นของสาร (μg)		% Error	
			ที่แท้จริง	ที่ได้จากการทดลอง เฉลี่ย		
1	0.2020	1.3857	1.5414	1.3574		
2	0.2020	1.4332	1.5414	1.4097	1.4029	8.99
3	0.2020	1.4622	1.5414	1.4416		
1	0.3030	1.6583	2.8626	2.4865		
2	0.3030	1.7487	2.8626	2.6361	2.5573	10.66
3	0.3030	1.6963	2.8626	2.5494		
1	0.2020	2.8250	3.0828	2.9435		
2	0.2020	2.8217	3.0828	2.9398	2.8363	8.00
3	0.2020	2.5365	3.0828	2.6255		

ในการหาปริมาณของเบนโรโอคาร์บโดยใช้เมธิลพาราไรออนเป็น internal standard จะพบว่า การวิเคราะห์นี้ได้ผลถูกต้องดี มี %Error 10.66% เมื่อใช้ความเข้มข้น 2.8626 μg ที่เป็นเช่นนี้เพราะสารทั้งสองนี้แยกออกจากกันอย่างดี ดูโครมาโทแกรมรูปที่ 3.6 การหาพื้นที่จึงทำได้ถูกต้องดีมาก ทำให้การวิเคราะห์ไม่มีปัญหา

ตารางที่ 3.36 ค่าความถูกต้องการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชคาร์โบฟูราทในสารผสม โดยวิธีการ Internal Standardization

ครั้งที่ทดลอง	ความเข้มข้น internal standard	อัตราส่วนพื้นที่พีกเฉลี่ย (As/Ai)	ความเข้มข้นของสาร (μg)			% Error
			ที่แท้จริง	ที่ได้จากการทดลอง	เฉลี่ย	
1	0.2020	0.8162	2.2858	2.2989		
2	0.2020	0.8223	2.2858	2.3199	2.4474	7.07
3	0.2020	0.9399	2.2858	2.7234		
1	0.3030	1.2454	4.7794	5.6569		
2	0.3030	1.1609	4.7794	5.2220	5.5299	15.70
3	0.3030	1.2558	4.7794	5.7109		
1	0.2020	1.8347	4.5716	5.7933		
2	0.2020	1.7455	4.5716	5.4870	5.3296	16.58
3	0.2020	1.5185	4.5716	4.7084		

ในการหาปริมาณของคาร์โบฟูราท โดยใช้เมธิลพาราไรออนเป็น internal standard ผลการทดลองนี้ก็นับว่ายังใช้ได้ดีอยู่เพราะ %Error อย่างสูง 16.58% แม้กระนั้นก็ตามผลการวิเคราะห์ควรจะดีกว่านี้ถ้าพีกของคาร์โบฟูราทแยกออกได้อย่างดีจากอะมีทรินซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ %Error สูงกว่าที่ควร

ตารางที่ 3.37 ค่าความถูกต้องการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชเมธิลพาราไรออน ในสารผสม
โดยวิธีการ Internal Standardization

ครั้งที่ ทดลอง	ความเข้มข้น internal standard	อัตราส่วน พื้นที่พีคเฉลี่ย (As/Ai)	ความเข้มข้นของสาร (μg)			% Error
			ที่แท้จริง	ที่ได้จากการทดลอง	เฉลี่ย	
1	0.06132	0.7344	0.2136	0.1138		
2	0.06132	0.7209	0.2136	0.1084	0.1184	44.58
3	0.06132	0.7826	0.2136	0.1330		
1	0.1022	0.7271	0.3204	0.1847		
2	0.1022	0.6683	0.3204	0.1455	0.1591	50.36
3	0.1022	0.6705	0.3204	0.1470		
1	0.1022	1.2439	0.5340	0.5296		
2	0.1022	1.2898	0.5340	0.5602	0.5672	6.21
3	0.1022	1.3671	0.5340	0.6118		

การวิเคราะห์เมธิลพาราไรออน โดยใช้อะมีทรินเป็น internal standard จะเห็นว่าผลการวิเคราะห์ไม่ดีเลย เพราะให้ %Error สูงและไม่แน่นอนทั้งนี้จะเป็นเพราะการใช้อะมีทรินเป็น internal standard ซึ่งตัว internal standard เองก็แยกออกจากคาร์โบฟูรานได้ไม่ดี 100% การหาพื้นที่พีคจึงมีปัญหาได้ ทำให้ผลการวิเคราะห์ไม่ดี ถ้าจะเปลี่ยน internal standard เป็นตัวอื่นเช่น ใช้เบนไรโอคาร์บก็เห็นว่าไม่เหมาะสมแม้การแยกของพีคจะแยกออกจากกันได้ดีก็ตาม แต่ sensitivity ของเบนไรโอคาร์บไม่ดีเท่าของเมธิลพาราไรออนและต่ำมาก ประกอบกับการแยกเบนไรโอคาร์บนั้น พีคขึ้นสูงและกว้าง อาจทำให้การวิเคราะห์ได้ผลไม่ดีนัก

ตารางที่ 3.38 ค่าความถูกต้องการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชเมวินฟอสในสารผสม โดยวิธีการ Internal Standardization

ครั้งที่ทดลอง	ความเข้มข้น internal standard	อัตราส่วน พื้นที่พิกเฉลิย (As/Ai)	ความเข้มข้นของสาร (μg)		% Error
			ที่แท้จริง	ที่ได้จากการทดลอง เฉลิย	
1	0.2020	1.2197	2.8896	3.3700	
2	0.2020	1.1561	2.8896	3.1710	3.1742 9.85
3	0.2020	1.0954	2.8896	2.9815	
1	0.3030	1.0580	5.4180	4.2969	
2	0.3030	0.8986	5.4180	3.5499	4.3101 20.45
3	0.3030	1.2258	5.4180	5.0836	
1	0.2020	1.6201	4.8160	4.6212	
2	0.2020	1.3150	4.8160	3.6677	4.1396 14.05
3	0.2020	1.4629	4.8160	4.1300	

การวิเคราะห์เมวินฟอสโดยใช้เมธิลพาราไรออนเป็น internal standard จะเห็นว่าผลการวิเคราะห์เมวินฟอสที่ความเข้มข้นต่ำดีกว่าที่ความเข้มข้นสูง โดยให้ %Error ต่ำกว่า ทั้งนี้เนื่องจากเมวินฟอสประกอบด้วยไอโซเมอร์ 2 ชนิด เมื่อใช้ความเข้มข้นต่ำ ไอโซเมอร์ทั้งสองนี้จะไม่แยกจากกันเป็นพิกในโครมาโทแกรม แต่ถ้าความเข้มข้นสูง ไอโซเมอร์ทั้งสองจะแยกออกจากกันทำให้ได้พิก 2 พิกที่เห็นได้ชัด การหาพื้นที่พิกจึงแตกต่างกัน เมื่อความเข้มข้นสูงพื้นที่พิกที่ได้เป็นเพียงพิกเดียว แต่ถ้าความเข้มข้นต่ำพื้นที่พิกจะเป็นพิกของทั้งสองไอโซเมอร์ เพราะไม่สามารถแยกออกจากกัน ดังนั้นการวิเคราะห์หาปริมาณของเมวินฟอสที่ความเข้มข้นต่ำจึงดีกว่าความเข้มข้นสูง

ในการวิเคราะห์โมโนโครโทฟอสโดย ใช้เมธิลพาราไรออน เป็น internal standard นั้นไม่สามารถทำการวิเคราะห์ได้ เพราะไม่มี system ใดที่ศึกษาเหมาะสมที่จะแยกโมโนโครโทฟอสออกจาก mixture ได้ มี system ที่สามารถแยกได้คือ โมบายเฟส เอธิลอะซีเตต แต่ก็มีปัญหาที่สารตัวอื่นไม่แยกออกจากกัน การทำโดยวิธี Internal Standardization จึงใช้ไม่ได้ แต่วิธีการ External Standardization ใช้ได้ผลดีดัง ได้กล่าวมาแล้ว

เมื่อนำค่า % Error ของการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชในสารผสม ในการวิเคราะห์โดยวิธีที่แตกต่างกันคือ External Standardization และ Internal Standardization จากตารางที่ 3.29 ถึงตารางที่ 3.39 มาเปรียบเทียบกัน พอที่จะประมวลได้อย่างคร่าวๆ ดังนี้

สารกำจัดศัตรูพืช	External Standardization	Internal Standardization
อะมีทริน	ได้ผลดี	ได้ผลไม่ดี
เบนโรโอคาร์บ	ได้ผลดี	ได้ผลดี
คาร์โบฟูราน	ได้ผลดี	ได้ผลดีพอใช้
เมธิลพาราไรออน	ได้ผลดีพอใช้	ได้ผลไม่ดี
โมโนโครโทฟอส	ได้ผลดีมาก	ใช้ไม่ได้
เมวินฟอส	ได้ผลดี	ใช้ไม่ได้

3.6 การวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชในธัญพืชและผัก โดยใช้เทคนิคไฮเปอร์ฟอร์แมนซ์รีนแลร์โครมาโทกราฟี

3.6.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน เพื่อการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิดในข้าว ข้าวโพด และกระหล่ำปลี

ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชใน ข้าว ข้าวโพด และกระหล่ำปลีนั้น จำเป็นต้องสร้างกราฟมาตรฐานของสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิดขึ้นมาใหม่ เนื่องจากมีระบบโหมบายเฟสที่แตกต่างกันออกไป และเนื่องจากพิกของโครมาโทแกรมของสารละลายที่แยกสกัดได้นั้น มีลักษณะซึ่งซับซ้อน (complex chromatogram) ดังนั้นการวิเคราะห์จึงจำเป็นต้องทำเป็นแบบ External Standardization

1. เตรียมสารละลายสารกำจัดศัตรูพืชจาก stock solution 1000 ppm โดยมีความเข้มข้นดังต่อไปนี้

อะมีทริน มีความเข้มข้น 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 และ 1.5 ppm

เบนโทคาร์บ มีความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm

คาร์โบฟูราน มีความเข้มข้น 10, 20, 40, 60 และ 80 ppm

เมธิลพาราไธออน มีความเข้มข้น 2, 4, 6, 8 และ 10 ppm

โมโนโครโทฟอส มีความเข้มข้น 2, 5, 10, 15 และ 20 ppm

เมวินฟอส มีความเข้มข้น 10, 20, 30, 60 และ 80 ppm

2. นำสารละลายแต่ละขวด ไปทำการใส่ลงบนแผ่น HPTLC ที่ clean-up แล้ว

3. ทำการ develop ด้วยโหมบายเฟสดังต่อไปนี้

3.1 โหมบายเฟสชุด ก ประกอบด้วย

- development ครั้งที่ 1 ใช้โหมบายเฟส เอกเซน

- development ครั้งที่ 2 ใช้โหมบายเฟส 50% เอกเซน-เบนซีน

ทำการระเหยโหมบายเฟสออกไปแล้ว นำไปทำการ integrate

พื้นที่พิก และวัดค่า Retention Time ของ เบนโทคาร์บ และ เมธิลพาราไธออน ด้วย

เครื่อง densitometer

- development ครั้งที่ 3 ใช้โมบายเฟส เบนซีน

ทำการระเหยโมบายเฟสออกไปแล้ว นำไปทำการ integrate พื้นที่พิก และหาค่า Retention Time ของ อะมีทริน เบนโรโอคาร์บ คาร์โบฟูราน เมธิลพาราไรออน และเมวินฟอส โดยอาศัยเครื่อง densitometer และ integrator

- development ครั้งที่ 4 ใช้โมบายเฟส 50 % เบนซีน-เอธิล

อะซีเตต

ทำการระเหยโมบายเฟสออกไปแล้ว นำไปทำการ integrate พื้นที่พิก และวัดค่า Retention Time ของ อะมีทริน คาร์โบฟูราน โมโนโครโทฟอส และเมวินฟอส โดยอาศัยเครื่อง densitometer และ integrator

- development ครั้งที่ 5 ใช้โมบายเฟส เอธิลอะซีเตต

ทำการระเหยโมบายเฟสออกไปแล้ว นำไปทำการ integrate พื้นที่พิก และวัดค่า Retention Time ของ อะมีทริน คาร์โบฟูราน และเมวินฟอส โดยอาศัยเครื่อง densitometer และ integrator

3.2 โมบายเฟสชุด ข ประกอบด้วย

- development ครั้งที่ 1 ด้วยโมบายเฟส 5 mL (1:4)

2-บิวทานอน-ไซโคลเฮกเซน

นำแผ่นที่ระเหยโมบายเฟสออกไปแล้วไป integrate พื้นที่พิกและวัดค่า Retention Time สำหรับสาร อะมีทริน เบนโรโอคาร์บ คาร์โบฟูราน เมธิลพาราไรออน และเมวินฟอส

- development ครั้งที่ 2 ใช้โมบายเฟส เอธิลอะซีเตต ทำการระเหยโมบายเฟสออกไปแล้ว นำไปทำการ integrate พื้นที่พิก และวัดค่า Retention Time ของโมโนโครโทฟอส โดยอาศัยเครื่อง densitometer และ integrator

4. นำค่า Retention Time มาประมวลผล แสดงให้อยู่ในรูปของค่า R_f การคำนวณค่า R_f นั้นสามารถทำได้เช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 3.3.4

5. เขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง ค่าพื้นที่ใต้พิกและความเข้มข้นบนแผ่นของสารละลายสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิด ในโมบายเฟสชนิดต่าง ๆ

ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.38

ตารางที่ 3.39 แสดงค่า Retention Time ของสารกำจัดศัตรูพืชแต่ละชนิด เมื่อทำการ development ด้วยโมบายเฟสชุด ก และเมื่อทำการ development ด้วยโมบายเฟสชุด ข ดังนี้

สารกำจัดศัตรูพืช	ค่า Retention Time เมื่อทำการ development ด้วยโมบายเฟส					
	ชุด ก			ชุด ข		
	50 % เอกเซน	50 % เอกเซน- เบนซีน	50 % เบนซีน- เอริลอะซีเตต	(1:4) เอริลอะซีเตต	2-บิวทาโนน- ไซโคลเอกเซน	เอริลอะซีเตต
อะมีทริน	29.6	30.0	38.0	122.0	66.0	165.0
เบนไรโอคาร์บ	30.1	48.0	87.0		110.0	
คาร์โบฟูราน	29.0	30.2	40.0	138.0	178.0	57.0
เมธิลพาราไรออน	28.0	60.0	130.0		90.0	
โมนิโครโทฟอส	30.2	31.0	31.0	36.0	55.0	29.8
เมวินฟอส	30.0	32.0	92.0	144.0	42.0	135.0

ตารางที่ 3.40 แสดงค่า R_f^* ของสารกำจัดศัตรูพืชแต่ละชนิด เมื่อทำการ development ด้วยโมบายเฟลชชุด ก และเมื่อทำการ development ด้วยโมบายเฟลชชุด ข ดังนี้

สารกำจัดศัตรูพืช	ค่า R_f เมื่อทำการ development ด้วยโมบายเฟลช					
	ชุด ก			ชุด ข		
	50 % เฮกเซน	50 % เฮกเซน- เบนซีน	50 % เบนซีน เอริลอะซีเตต	เอริลอะซีเตต	(1:4) 2-บิวทานอน- ไซโคลเฮกเซน	เอริลอะซีเตต
อะมีทริน	0.00	0.00	0.05	0.53	0.21	0.77
เบนโทไธคาร์บ	0.00	0.10	0.32		0.46	
คาร์โบฟูราน	0.00	0.00	0.06	0.62	0.85	0.77
เมธิลพาราไธออน	0.00	0.17	0.57		0.34	
โมโนโครโทฟอส	0.00	0.00	0.00	0.03	0.14	0.13
เมวินฟอส	0.00	0.01	0.35	0.65	0.07	0.60

* การคำนวณค่า R_f นี้เป็นการคำนวณค่าแบบสัมพัทธ์ (Relative) ซึ่งหมายถึง เป็นการคำนวณซึ่งได้จากการวัดค่า Retention Time โดยตรง และทำการ development เรียงตามลำดับชั้น

ตารางที่ 3.41 แสดงค่าพื้นที่ผิวของสารมาตรฐานสารกำจัดศัตรูพืชที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อใช้ โหมบยเฟลซด ก

- development ครั้งที่ 1 ใช้โหมบยเฟลส เอกเซน
- development ครั้งที่ 2 ด้วยโหมบยเฟลส เอกเซน-เบนซีน

เบนไรโอคาร์บ		เมธิลพาราไรออน	
ความเข้มข้น (μg)	พื้นที่ผิว	ความเข้มข้น (μg)	พื้นที่ผิว
1.046	341188	0.2056	417253
2.092	691700	0.4112	736353
3.136	894413	0.6168	1000440
4.184	1139929	0.8224	1065005
5.230	1350911	1.0280	1353624

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- development ครั้งที่ 3 ด้วยโมบายเฟส เบนซิน

อะมีทริน		เบนโซโอะคาร์บ	
ความเข้มข้น (µg)	พื้นที่ผก	ความเข้มข้น (µg)	พื้นที่ผก
0.04125	267660	1.046	378989
0.06228	328992	2.092	796100
0.08304	389984	3.138	1083365
0.10380	440097	4.148	1344682
0.15570	551684	5.230	1585398

คาร์โบฟูราน		เมธิลพาราไรออน	
ความเข้มข้น (µg)	พื้นที่ผก	ความเข้มข้น (µg)	พื้นที่ผก
1.046	219194	0.2056	408272
2.092	294658	0.4112	726988
4.184	371753	0.6168	978303
6.276	482455	0.8224	1194732
8.368	636220	1.0280	1423718

เมวินเฟอส

ความเข้มข้น (µg)	พื้นที่ผก
1.189	177607
2.378	344702
3.567	534011
7.134	1096038
9.512	1412919

ตารางที่ 3.41 (ต่อ)

- development ครั้งที่ 4 ด้วยโมบายเฟส เบนซีน-เอธิลอะซีเตต

อะมีทรีน		คาร์โบฟูราน	
ความเข้มข้น (μg)	พื้นที่พิก	ความเข้มข้น (μg)	พื้นที่พิก
0.04152	139098	1.046	184189
0.06228	204644	2.092	233894
0.08304	337257	4.184	417058
0.10380	436489	6.276	546878
0.15570	626312	8.368	656115
โมโนโทฟอส		เมวินฟอส	
ความเข้มข้น (μg)	พื้นที่พิก	ความเข้มข้น (μg)	พื้นที่พิก
0.2325	89512	1.1890	250160
0.5210	190916	2.3780	472735
1.0420	418136	3.5670	597601
1.5630	603080	7.1340	1108712
2.0840	798599	9.5120	1330828

ตารางที่ 3.41 (ต่อ)

- development ครั้งที่ 5 ด้วยโมบายเฟส เอลิอะซีเตต

อะมีทรีน		คาร์โบฟูราน	
ความเข้มข้น (μg)	พื้นที่พิก	ความเข้มข้น (μg)	พื้นที่พิก
0.04152	162797	1.046	28759
0.06228	247855	2.092	104764
0.08304	325978	4.184	238145
0.10380	409203	6.276	398569
0.15570	639757	8.368	535897
โมโนโครโทฟอส		เมวินฟอส	
ความเข้มข้น (μg)	พื้นที่พิก	ความเข้มข้น (μg)	พื้นที่พิก
0.26050	146011	1.1890	254069
0.5210	291334	2.3780	466180
1.0420	560587	3.5670	571315
1.5630	797494	7.1340	1050708
2.0840	1021443	9.5120	1207128

ตารางที่ 3.42 แสดงค่าพื้นที่ผิวของสารมาตรฐานสารกำจัดศัตรูพืชที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อใช้ โมบายเฟสชุด ข

- developent ครั้งที่ 1 ด้วยโมบายเฟส 5 mL.(1:4)2-บิวทาโน-ไฮโคลเฮกเซน

อะมีทริน		เบนโรโอคาร์บ		คาร์โบฟูราน	
ความเข้มข้น(μg)	พื้นที่ผิว	ความเข้มข้น(μg)	พื้นที่ผิว	ความเข้มข้น(μg)	พื้นที่ผิว
0.04125	151991	1.101	516028	1.046	112809
0.06228	232026	2.202	869369	2.092	218932
0.08304	301601	3.303	1231424	4.184	374467
0.10380	365112	4.404	1368277	6.276	528285
0.15570	546275	5.505	1725975	8.368	663741

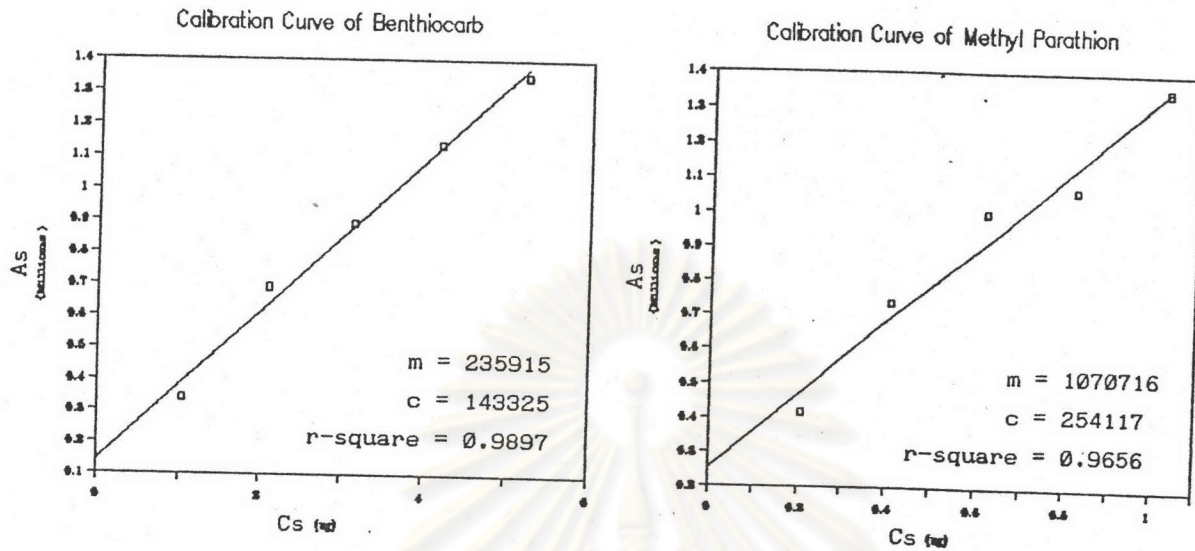
เมธิลพาราโรอน		เมวินฟอส	
ความเข้มข้น(μg)	พื้นที่ผิว	ความเข้มข้น(μg)	พื้นที่ผิว
0.2056	408272	1.189	177607
0.4112	726988	2.378	344702
0.6168	978303	3.567	534011
0.8224	1194732	7.134	1096038
1.0280	1423718	9.512	1412919

ตารางที่ 3.42 (ต่อ)

- development ครั้งที่ 2 ใช้โมบายเฟส เอธิลอะซีเตต

อะมิกริน		คาร์โบฟูราน	
ความเข้มข้น (μg)	พื้นที่ผิว	ความเข้มข้น (μg)	พื้นที่ผิว
0.04152	137743	1.046	77570
0.06228	202355	2.092	147289
0.08304	277214	4.184	309783
0.10380	351348	6.276	462922
0.15570	514715	8.368	599983
โมโนโทปอล		เมวินฟอส	
ความเข้มข้น (μg)	พื้นที่ผิว	ความเข้มข้น (μg)	พื้นที่ผิว
0.2605	146011	1.1890	202421
0.5210	291334	2.3780	395316
1.0420	560587	3.5670	515639
1.5630	797494	7.1340	996773
2.0840	1021443	9.5120	1165262

ศูนย์วิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

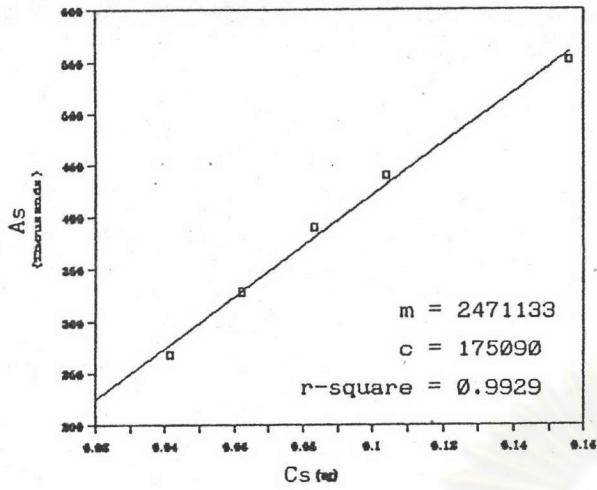


รูปที่ 3.10 Calibration Curve แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้น และ ค่า absorbance ที่วัดได้ของสารกำจัดศัตรูพืชแต่ละชนิดเมื่อทำการ development ด้วยโมบายเฟสชุด ก ตามลำดับดังนี้

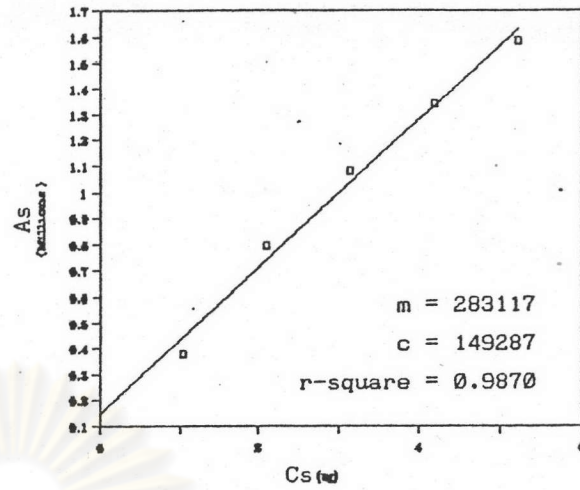
- ก) ทำการ development ครั้งที่ 1 ด้วย เฮกเซน
 ทำการ development ครั้งที่ 2 ด้วย 50% เฮกเซน-เบนซีน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

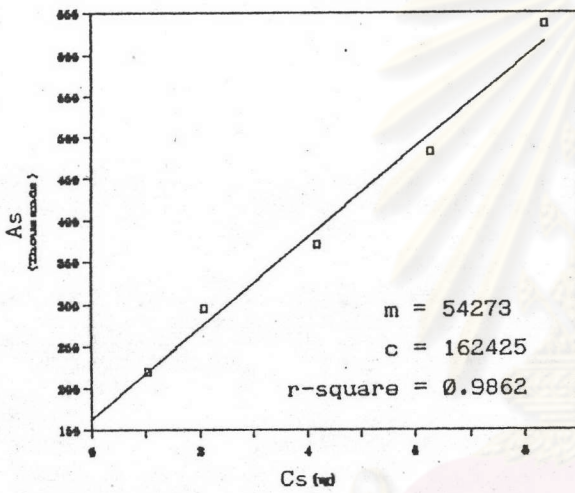
Calibration Curve of Ametryne



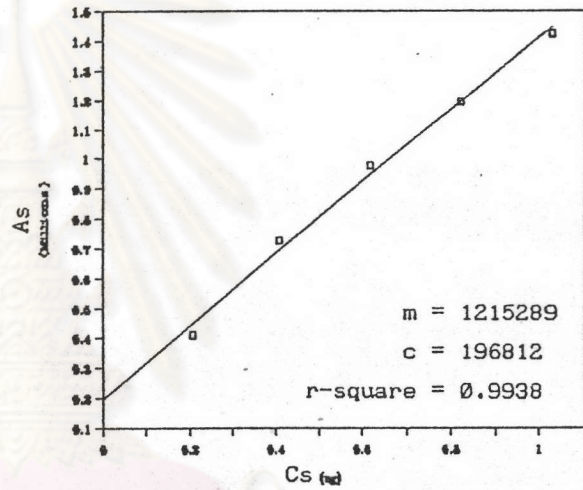
Calibration Curve of Benthicarb



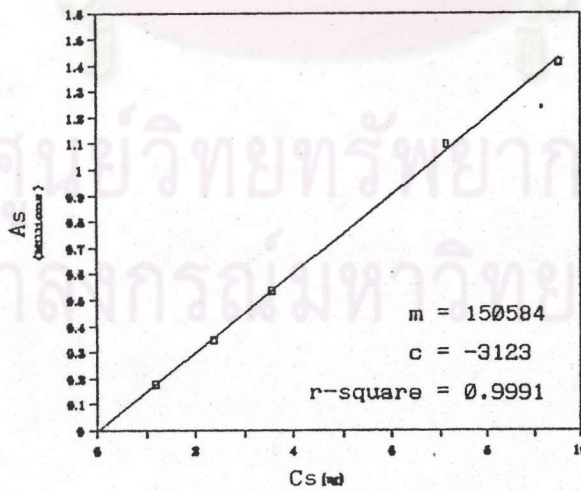
Calibration Curve of Carbofuran



Calibration Curve of Methyl Parathion

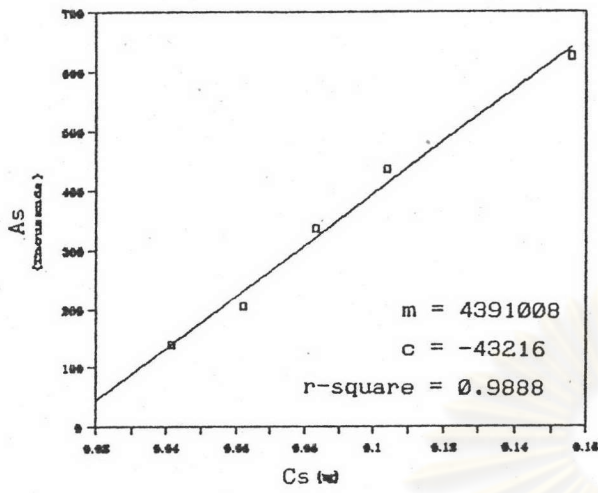


Calibration Curve of Mevinphos

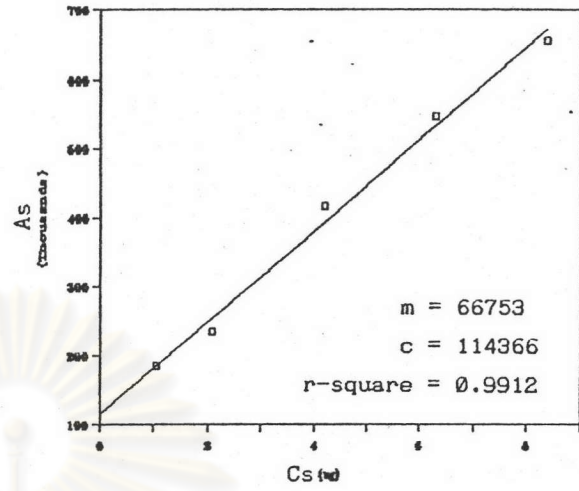


รูปที่ 3.10 (ต่อ) ข) เมื่อทำการ development ครั้งที่ 3 ด้วย เบนซิน

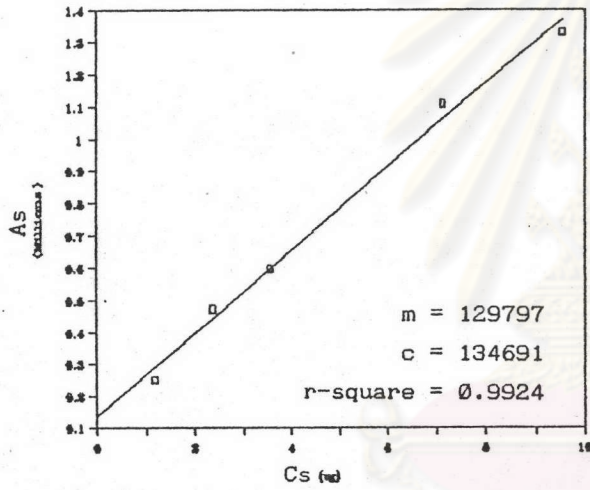
Calibration Curve of Ametryne



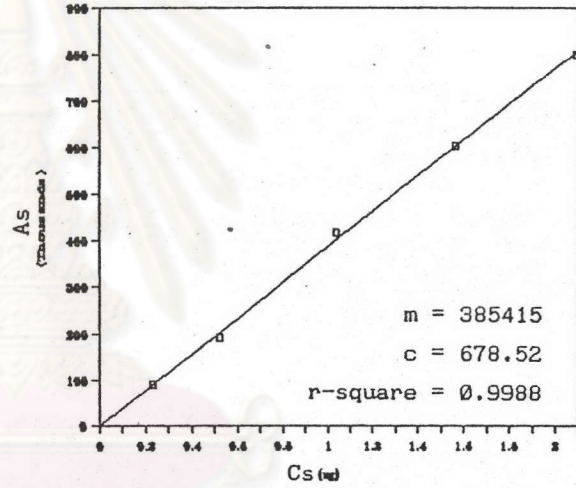
Calibration Curve of Carbofuran



Calibration Curve of Mevinphos



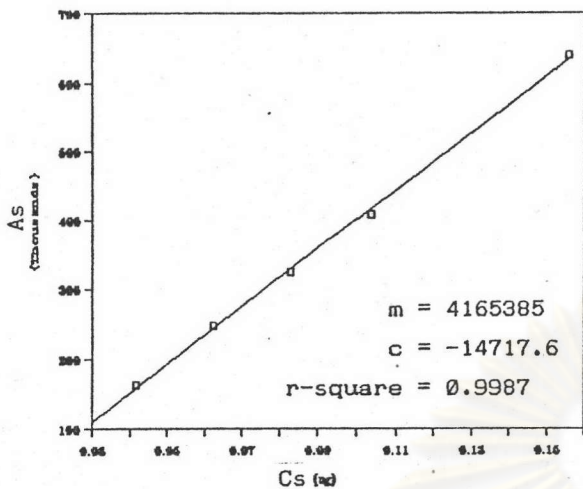
Calibration Curve of Monocrotophos



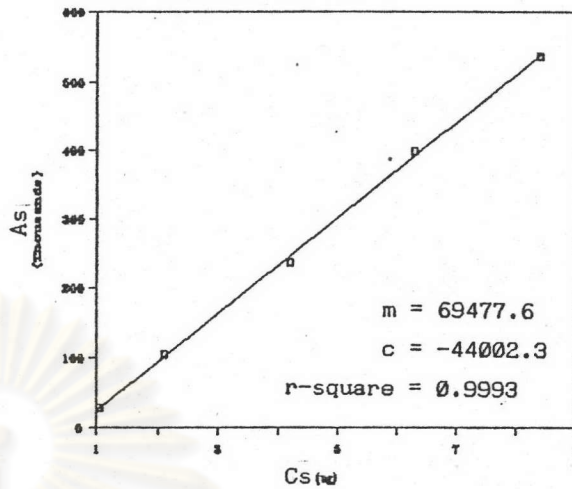
รูปที่ 3.10 (ต่อ) ค) เมื่อทำการ development ครั้งที่ 4 ด้วย 50% เบนซีน-เอธิลอะซีเตต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

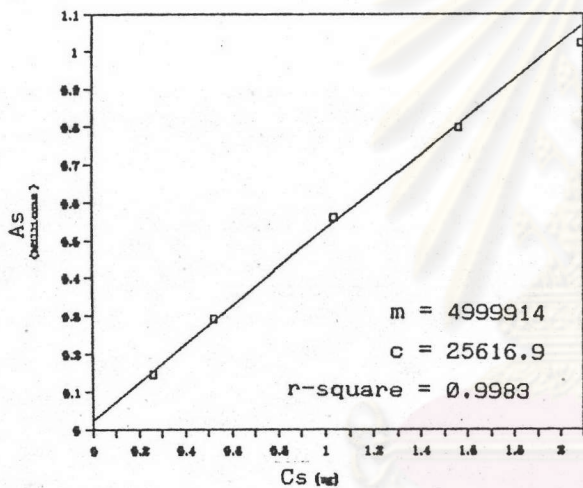
Calibration Curve of Ametryne



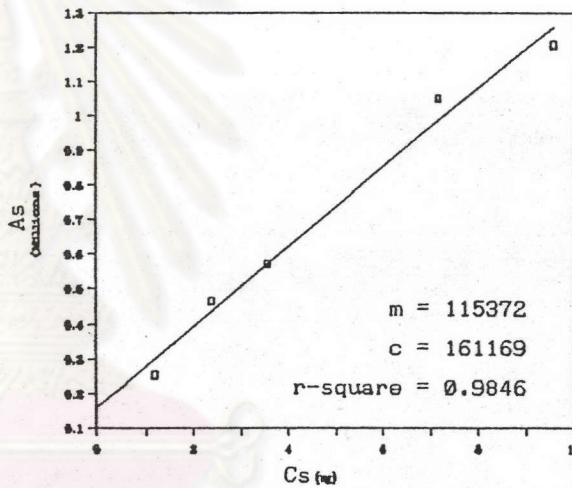
Calibration Curve of Carbofuran



Calibration Curve of Monocrotophos



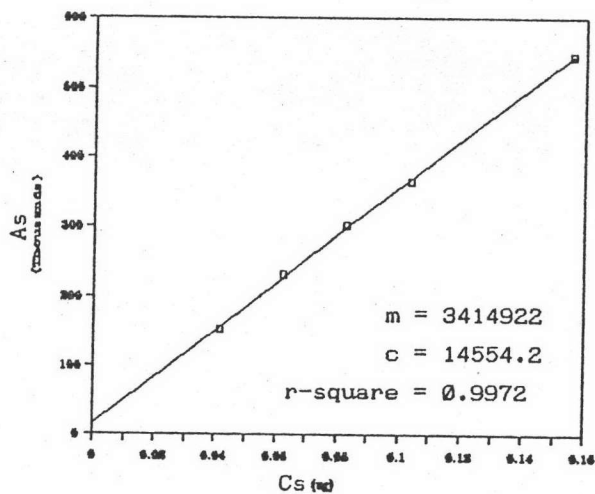
Calibration Curve of Mevinphos



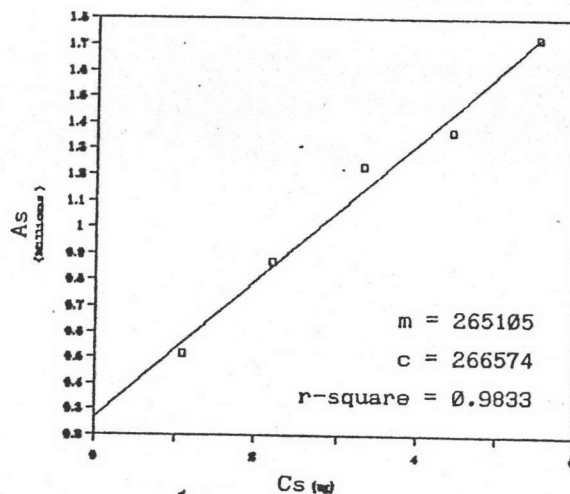
รูปที่ 3.10 (ต่อ) ง) เมื่อทำการ development ครั้งที่ 5 ด้วย เอธิลอะซีเตต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

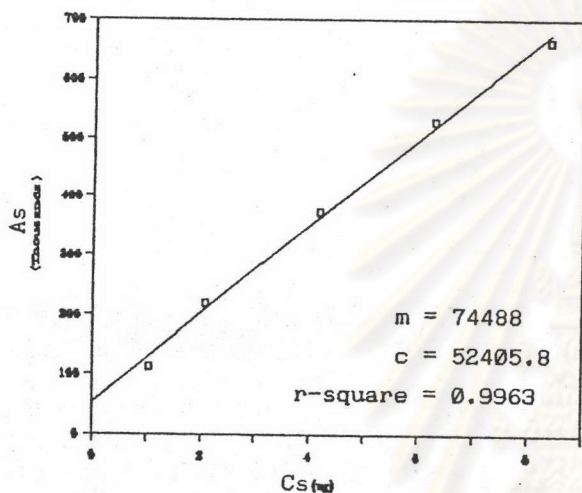
Calibration Curve of Ametryne



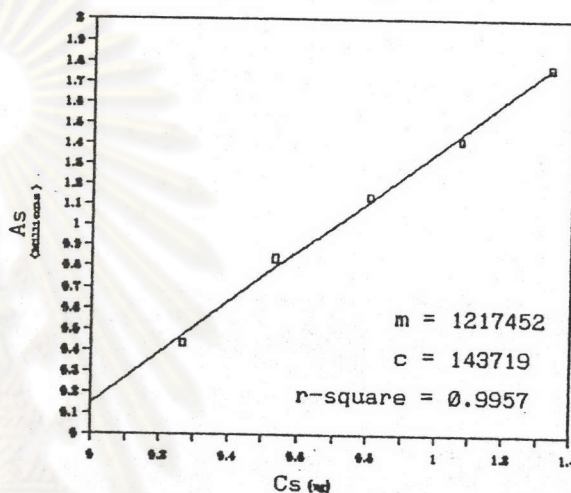
Calibration Curve of Benthicarb



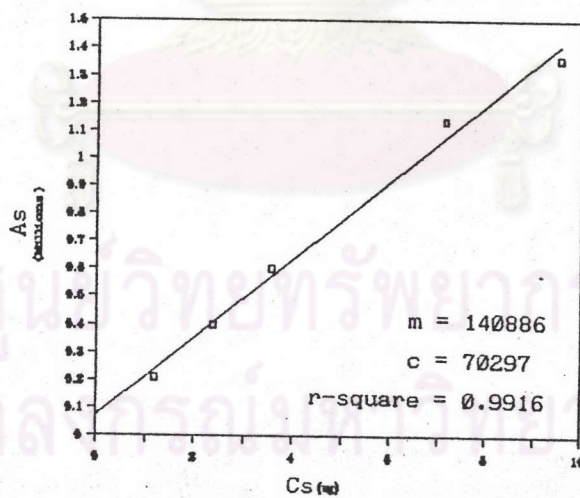
Calibration Curve of Carbofuran



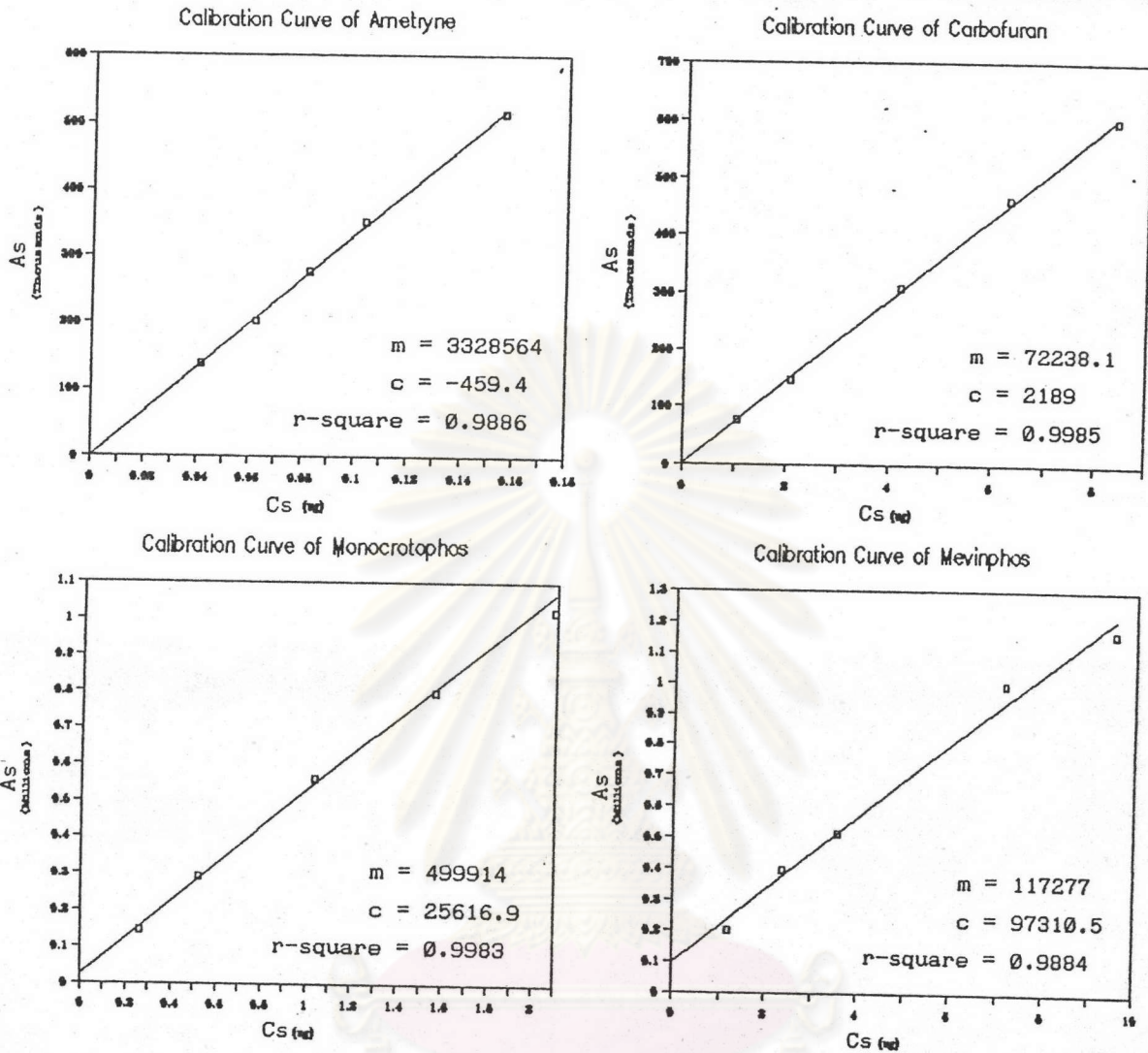
Calibration Curve of Methyl Parathion



Calibration Curve of Mevinphos



รูปที่ 3.11 Calibration Curve แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้น และ ค่า absorbance ที่วัดได้ของสารกำจัดศัตรูพืชแต่ละชนิดเมื่อทำการ development ด้วยโมบายเฟสชุด ข ตามลำดับดังนี้
 ก) ทำการ development ครั้งที่ 1 ด้วย (1:4)2-บิวทานโน-ไซโคลเฮกเซน



รูปที่ 3.11 (ต่อ)

ข) เมื่อทำการ development ครั้งที่ 2 ด้วยโมบายเฟส เอธิลอะซีเตต

3.6.2 การวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชในข้าวสาร

3.6.2.1 วิธีการแยกสกัดสารกำจัดศัตรูพืชที่อยู่ในข้าวสาร (35)

1. ทำการบดข้าวจนเป็นผงละเอียดคล้ายแป้งด้วย Homogenizer
2. นำแป้งที่บดละเอียดแล้วนั้นมาจำนวน 50.0 กรัม ใส่ในขวดก้นกลมคอ ยาว เติมไดคลอโรมีเทนลงไป 200 mL
3. นำขวดก้นกลมนั้นวางลงบนเครื่องเขย่าสาร(shaker) โดยให้ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. นำของผสมไปกรองด้วย Buchner funnel แล้วล้างซ้ำด้วยไดคลอโรมีเทน 2 ครั้งโดยใช้ 30 และ 20 mL ตามลำดับ
5. นำไดคลอโรมีเทนที่ได้ทั้งหมดใส่ลงในกรวยแยกขนาด 1 ลิตร ล้างชั้นของไดคลอโรมีเทนด้วย น้ำ-อะซีโตน(5+2) จำนวน 100 mL
6. ทำซ้ำในข้อ 5 อีก 2 ครั้ง โดยใช้ น้ำ-อะซีโตน(5+2) จำนวน 50 mL
7. นำชั้นของไดคลอโรมีเทนมาทำให้ปราศจากน้ำ โดยแช่ใน $Anh.Na_2SO_4$ จำนวน 20.0 กรัม
8. ทำการระเหยชั้นของไดคลอโรมีเทนด้วยเครื่อง Rotatory Evaporator
9. เมื่อทำการระเหยจนเหลือประมาณ 10 mL จึงเติมเบนซีนลงไปจำนวน 2-3 mL เขย่าให้เข้ากัน แล้วจึงทำการระเหยต่อไปจนเหลือ 2-3 mL
10. นำส่วนที่แยกสกัดได้ 2-3 mL นั้นมาใส่ในขวดมาตรฐานขนาด 5.0 mL ทำให้ปริมาตรเป็น 5 mL ด้วยเบนซีน
11. แบ่งส่วนนี้มาประมาณ 1 mL เป็นส่วนที่ยังไม่ clean-up เก็บไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

3.6.2.2 การวิเคราะห์ส่วนที่แยกสกัดได้เมื่อยังไม่ทำการ clean-up

1. นำสารละลายที่แยกสกัดได้จากข้าวสาร และยังไม่ได้รับการ clean-up มาทำการใส่สารจำนวน 10 μ L บนแผ่น HPTLC ที่ clean-up แล้ว
2. ทำการ develop แผ่น HPTLC นั้นด้วยโมบายเฟส เรียงตามลำดับดังต่อไปนี้
 - development ครั้งแรกด้วยโมบายเฟส เฮกเซน
 - development ครั้งที่ 2 ด้วยโมบายเฟส เฮกเซน-เบนซีน

3. ทำการระเหยโมบายเฟสออกให้หมด แล้วทำการวิเคราะห์สำหรับสารกำจัดศัตรูพืช เมธิลพาราไรออน
 4. ทำการ development ครั้งที่ 3 ด้วยโมบายเฟส เบนซีน
 5. ทำการระเหยโมบายเฟสออกให้หมด แล้วทำการวิเคราะห์สำหรับสารกำจัดศัตรูพืช อะมีทริน เบนโซอิคาร์บ และคาร์โบฟูราน
 6. ทำการ development ครั้งที่ 4 ด้วยโมบายเฟส 50% เบนซีน-เอธิลอะซีเตต
 7. ทำการระเหยโมบายเฟสออกให้หมด แล้วทำการวิเคราะห์สำหรับสารกำจัดศัตรูพืช เมวินฟอส
 8. ทำการ development ครั้งที่ 5 ด้วยโมบายเฟส เอธิลอะซีเตต
 9. ทำการระเหยโมบายเฟสออกให้หมด แล้วทำการวิเคราะห์สำหรับสารกำจัดศัตรูพืช โมโนโครโทฟอส
- โมบายเฟสของการ develop 5 ครั้งนี้เรียกว่า โมบายเฟสชุด ก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการคำนวณค่า % Recovery

เนื่องจากในขั้นตอนนั้นได้เติมสารกำจัดศัตรูพืช แต่ละชนิดลงไปปริมาณที่แตกต่างกัน ดังต่อไปนี้

สารกำจัดศัตรูพืช อะมีทริน จำนวน 0.05205 mg.

สารกำจัดศัตรูพืช เบนโทไธโอคาร์บ จำนวน 2.0920 mg.

สารกำจัดศัตรูพืช คาร์โบฟูราน จำนวน 3.0975 mg.

สารกำจัดศัตรูพืช เมธิลนาราโรออน จำนวน 0.5140 mg.

สารกำจัดศัตรูพืช โมโนโครโทฟอส จำนวน 1.0420 mg.

สารกำจัดศัตรูพืช เมวินฟอส จำนวน 3.1005 mg.

ดังนั้นการคำนวณค่า % Recovery สำหรับสารกำจัดศัตรูพืชในข้าวสารที่ยังไม่ได้ทำการ clean-up ทำดังนี้

เติมสารกำจัดศัตรูพืชลงไป	X	mg
ทำการแยกสกัดเป็นสารละลายส่วนที่ยังไม่ clean-up ได้	5	mL
ดังนั้นจึงมีความเข้มข้น	X	mg/ 5 mL
ทำการใส่สารบนแผ่นจำนวน	10	μ L
ดังนั้นจึงมีความเข้มข้นบนแผ่น	=	X mg x 10 μ L
		5 mL
ปริมาณของสารกำจัดศัตรูพืชบนแผ่น	<u>2X</u>	μ g

ส่วนความเข้มข้นของสารกำจัดศัตรูพืชที่ได้จากการทดลอง หาได้จาก การนำค่าพื้นที่ผิวของสารกำจัดศัตรูพืชที่วิเคราะห์ได้ มาเทียบกับ Calibration Curve ของสารทดลองในหัวข้อ 3.6.1 เพื่อหาความเข้มข้นบนแผ่น

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{ค่าความเข้มข้นที่ได้จากการทดลอง} \times 100}{\text{ค่าความเข้มข้นที่เริ่มต้นใช้}}$$

ตารางที่ 3.38 แสดงปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิดที่เติมลงไปในช่วง และ วิเคราะห์ ได้ภายหลังจากการแยกสกัด และค่า % Recovery ของสารกำจัดศัตรูพืช เมื่อไม่ได้ทำการ clean-up

สารกำจัดศัตรูพืช	ปริมาณสารที่ เติมลงไปบนแผ่น (ug)	ปริมาณสารที่วิเคราะห์ ได้ในข้าว (ug)	% Recovery*
อะมีทรีน	0.1041	0.0375	36
เบนโทไธคาร์บ	4.1840	3.1344	75
คาร์โบฟูราน	6.1950	4.6006	74
เมธิลพาราไธออน	1.0280	0.6629	64
โมโนโครโทฟอส	2.0840	1.4759	71
เมวินฟอส	6.2010	6.2699	101

* Duplicate Analysis

จากตารางที่ 3.38 พบว่าค่า %Recovery ของเมวินฟอสมีค่าสูงสุด คือ 101% เบนโทไธคาร์บ คาร์โบฟูราน โมโนโครโทฟอส และเมธิลพาราไธออน มีค่ารองลงมา คือ 75% 74% 71% และ 64% ส่วนอะมีทรีนมีค่า %Recovery ต่ำที่สุดคือ 36%

3.6.2.3 การ Clean-up ข้าว

1. บีบเปิดส่วนที่แยกสกัดได้นั้นมา 4.00 mL นำไปผ่าน Florisil ซึ่งใช้ในการ clean-up สาร
2. สารจะถูกจับรวมกันอยู่ที่ส่วนบนของคอลัมน์ ดังนั้นจึงต้องชะล้างด้วยตัวทำละลายชะล้าง (eluent) แต่ละชนิด สารส่วนใหญ่จะถูกทำให้เข้มข้นขึ้นแล้วเก็บไว้แยกเป็นส่วนๆ เพื่อนำไปใช้ ตัวทำละลายชะล้างที่ใช้มีดังต่อไปนี้
 - ใช้ตัวทำละลายเบนซีน จำนวน 5 mL ชะล้างและแยกเก็บเป็นส่วนที่ชะล้างได้ครั้งแรก (first eluent)
 - ใช้ตัวทำละลาย 50% เบนซีน-เอธิลอะซีเตต จำนวน 5 mL ชะล้างและแยกเก็บเป็นส่วนที่ชะล้างได้ครั้งที่ 2 (second eluent)

กำหนดให้ความเร็วในการชะล้าง 2 วินาที ต่อหยด

3.6.2.4 การวิเคราะห์ส่วนที่แยกสกัดได้ ภายหลังจากการ clean-up

1. นำส่วนที่ชะล้างได้ครั้งแรก และส่วนชะล้างได้ครั้งที่ 2 มาทำการใส่สาร จำนวนแถบละ 20 μ L บนแผ่น HPTLC ที่ clean-up แล้ว
 - ส่วนที่ชะล้างได้ครั้งแรกนั้น เป็นส่วนที่ใช้ในการวิเคราะห์เบนโซอิคาร์บ และ เมธิลพาราโรออน
 - ส่วนที่ชะล้างได้ครั้งที่ 2 เป็นส่วนที่ใช้ในการวิเคราะห์ อะมีทริน คาร์โบฟูราน โมโนโครโทฟอส และ เมวินฟอส
2. ทำการ develop แผ่น HPTLC ที่ใส่สารแล้วนั้น ด้วยโมบายเฟสชุด ก ดังในการทดลองหัวข้อ 3.3.2.2 ข้อ 1-9
3. นำส่วนที่ชะล้างได้ครั้งแรกและส่วนชะล้างได้ครั้งที่ 2 มาทำการใส่สาร จำนวนแถบละ 20 μ L บนแผ่น HPTLC ที่ clean-up แผ่นใหม่
4. ทำการ develop แผ่น HPTLC ที่ใส่สารแล้วนั้น ด้วยโมบายเฟส (1:4)2-บิวทานอน-ไซโคลเฮกเซน
5. ทำการระเหยโมบายเฟสออกให้หมด แล้วทำการวิเคราะห์สำหรับสารกำจัดศัตรูพืช อะมีทริน เบนโซอิคาร์บ คาร์โบฟูราน เมธิลพาราโรออน และเมวินฟอส
6. ทำการ develop แผ่น HPTLC ที่ใส่สารแล้วนั้น ด้วยโมบายเฟส เอธิลอะซีเตต

7. ทำการระเหยโมบายเฟสออกให้หมด แล้วทำการวิเคราะห์สำหรับสารกำจัดศัตรูพืช โมโนโครโทฟอส

โมบายเฟสของการ develop ใน 2 ครั้งนี้ เรียกว่า โมบายเฟสชุด ข

วิธีการคำนวณค่า % Recovery ของสารกำจัดศัตรูพืช ภายหลังจากการ clean-up

นำส่วนที่แยกสกัดได้มา 4 mL ซึ่งมีความเข้มข้น X mg/ 5 mL มาทำการ clean-up และเก็บเป็นส่วนที่ชะล้างได้ (eluent) จำนวน 5 mL

$$\begin{aligned} \text{ดังนั้นความเข้มข้นของส่วนที่ clean-up} &= X \text{ mg} \times 4 \text{ mL} \\ &= 5 \text{ mL} \times 5 \text{ mL} \\ &= 4X/25 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{ทำการใส่สารบนแผ่นจำนวน} & 20 \text{ } \mu\text{L} \\ \text{ดังนั้นจึงมีความเข้มข้นบนแผ่น} & = 4X/25 \text{ mg/mL} \times 20 \text{ } \mu\text{L} \end{aligned}$$

ความเข้มข้นจากการคำนวณของสารกำจัดศัตรูพืชบนแผ่นของ ส่วนชะล้างได้ภายหลังจากการทำ clean-up จากการคำนวณ = $\frac{16X}{5} \mu\text{g}$

ส่วนการหาความเข้มข้นของสารกำจัดศัตรูพืชที่ได้จากการทดลอง ก็ทำได้เช่นเดียวกัน โดยการนำค่าพื้นที่พิกของสารกำจัดศัตรูพืชที่วิเคราะห์ได้ มาเทียบกับ Calibration Curve ของสารทดลองในหัวข้อ 3.6.1 เพื่อหาความเข้มข้นบนแผ่น

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{ค่าความเข้มข้นที่ได้จากการทดลอง} \times 100}{\text{ค่าความเข้มข้นที่ใช้เริ่มต้น}}$$

ตารางที่ 3.44 แสดงปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิด ที่เติมลงไปในช่วง และวิเคราะห์
ได้หลังจากการแยกสกัด และค่า % Recovery ของสารกำจัดศัตรูพืช
เมื่อทำการ clean-up และใช้โมบายเฟสชุด ก

สารกำจัดศัตรูพืช	ปริมาณสารที่ เติมลงไปบนแผ่น (μg)	ปริมาณสารที่วิเคราะห์ ได้ในข้าว (μg)	% Recovery*
อะมีทริน	0.1666	-	-
เบนไฮโอคาร์บ	6.6944	4.2731	64
คาร์โบฟูราน	9.9120	8.2587	83
เมธิลพาราไธออน	1.6448	1.2374	75
โมโนโครโทฟอส	3.3344	-	-
เมวินฟอส	9.9216	7.1897	72

* Duplicate Analysis

- วิเคราะห์ไม่ได้

จากตารางที่ 3.44 พบว่าค่า %Recovery ของคาร์โบฟูราน มีค่าสูงสุด ส่วนเมธิลพาราไรออน เมวินฟอส และ เบนไรโอคาร์บ มีค่าใกล้เคียงกันคือ 75% 72% และ 64% ตามลำดับ ส่วนอะมีทริน และ โมโนโครโทฟอส ไม่สามารถวิเคราะห์ได้

ในการ clean-up และทำการ develop ด้วยโมบายเฟสหลายชนิดดังนี้ เช่น เอกเซน 50%เอกเซน-เบนซีน เบนซีน 50%เบนซีน-เอธิลอะซีเตต และ เอธิลอะซีเตต นั้น เป็นผลทำให้สารกำจัดศัตรูพืชบางชนิดเช่น อะมีทริน และ โมโนโครโทฟอส ถูก retain ในคอลัมน์ที่ทำการ clean-up นั้น และยังสูญเสียไปเนื่องจากการทำ multiple development อีกด้วย ทำให้ อะมีทริน และ โมโนโครโทฟอส ไม่สามารถวิเคราะห์ได้

คาร์โบฟูรานนั้น ภายหลังจากการทำการ clean-up กลับทำให้มีค่า %Recovery เพิ่มขึ้น ซึ่งน่าจะมีผลมาจากการที่สามารถขจัดเอา interference ออกไปได้มาก ส่วนเมธิลพาราไรออน ก็มีค่า %Recovery ที่เพิ่มขึ้นซึ่งน่าจะมีเหตุผลเช่นเดียวกันนี้

เบนไรโอคาร์บนั้นมีค่า %Recovery ลดลง เนื่องจากมีส่วนหนึ่งถูก retain อยู่ในคอลัมน์ที่ทำการ clean-up ค่า %Recovery ลดลงไปประมาณ 10% ซึ่งเมวินฟอสนั้น ก็มีลักษณะที่คล้ายกันนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.45 แสดงปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิด ที่เติมลงไปในช่วง และวิเคราะห์ ได้ภายหลังจากการแยกสกัด และค่า % Recovery ของสารกำจัดศัตรูพืช เมื่อทำการ clean-up และใช้โมบายเฟสชุด ข

สารกำจัดศัตรูพืช	ปริมาณสารที่ เติมลงไปบนแผ่น (μg)	ปริมาณสารที่วิเคราะห์ ได้ในข้าว (μg)	% Recovery*
อะมีทริน	0.08328	0.0275	33
เบนไรโอคาร์บ	ไม่สามารถวิเคราะห์ได้เนื่องจากตำแหน่งพิกใน sample ตรงกับ พิกใน blank		
คาร์โบฟูราน	4.9560	5.5253	111
เมธิลพาราโรออน	0.8824	0.5827	75
โมโนโครโทฟอส	1.6672	0.5742	34
เมวินฟอส	4.9608	3.7659	76


* Duplicate Analysis

จากตารางที่ 3.40 พบว่า ค่า %Recovery ของคาร์โบฟูราน มีค่าสูงสุดคือ 111% ส่วนรองลงมาคือ เมวินฟอสและเมธิลพาราโรออน มีค่า 76% และ 75% ตามลำดับ อะมีทรินและโมโนโครโทฟอสมีค่า %Recovery ต่ำที่สุดคือ 33% และ 34%

เมื่อเปรียบเทียบตารางที่ 3.44 และตารางที่ 3.45 พบว่า ค่า %Recovery ของเมธิลพาราโรออนและเมวินฟอส มีค่าใกล้เคียงกัน ส่วนค่า %Recovery ของอะมีทริน และโมโนโครโทฟอส ในตารางที่ 3.39 ไม่มี ทั้งนี้เนื่องจากการสูญเสียเพราะการทำ multiple development ดังกล่าว ส่วน เบนไรโอคาร์บนั้น เนื่องจากตำแหน่งของพิกใน sample ตรงกับพิกใน blank จึงไม่สามารถทำการวิเคราะห์ได้เมื่อใช้โมบายเฟสชุด ข

ดังนั้น ในการทำการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิดในข้าวสาร เราสามารถทำการวิเคราะห์โดยใช้ HPTLC และแผ่น HPTLC ยังสามารถช่วยในการ clean-up ตัวอย่างดังกล่าว

จากตารางที่ 3.39 และ 3.40 สามารถสรุปได้ว่า เมื่อต้องการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชในข้าวสาร สารอะมีทรินควาร์ใช้โมบายเฟสชุด ข ในการทำ development สารเบนไดโอคาร์บสามารถใช้โมบายเฟสชุด ก ในการทำ development สารคาร์โบฟูรานควาร์ใช้โมบายเฟสชุด ก ในการทำ development ส่วนสารเมธิลพาราไธออนและเมวินฟอส นั้นสารสามารถใช้ได้ทั้งโมบายเฟสชุด ก และ ข ในการทำ development และสารโมโนโครโทฟอสให้ใช้โมบายเฟสชุด ข ในการทำ development



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.6.3 การวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชในข้าวโพด

3.6.3.1 วิธีการแยกสกัดสารกำจัดศัตรูพืชที่อยู่ในข้าวโพด

1. ทำการบดข้าวโพดเป็นผงละเอียดด้วยเครื่อง Homogenizer
2. นำข้าวโพดที่บดละเอียดแล้วนั้นมาจำนวน 50.0 กรัม ใส่ในขวดก้นกลมคอยาว เติมอะซีโตนลงไป 150 mL.
3. นำขวดก้นกลมนั้นวางลงบนเครื่องเขย่าสาร (shaker) แล้วเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. กรองของผสมในขวดก้นกลมนั้นด้วยกรวย Buchner แล้วล้างซ้ำด้วยอะซีโตน 30 และ 20 mL ตามลำดับ
5. นำส่วนของอะซีโตนที่สกัดได้นั้นใส่ลงในกรวยแยกขนาด 1 L เติมน้ำลงไป 100 mL และ เอกเซน 100 mL เขย่า และแยกชั้นอะซีโตนเก็บไว้
6. เติมเอกเซนลงในชั้นอะซีโตน 50 mL ทำการแยกสกัด ทำเช่นนี้อีก 1 ครั้ง
7. ทำการแยกสกัดสารกำจัดศัตรูพืชออกจากชั้นอะซีโตน โดยใช้ไดคลอโรมีเทน จำนวน 100, 50 และ 50 mL ตามลำดับ เก็บชั้นของไดคลอโรมีเทนไว้
8. นำชั้นของไดคลอโรมีเทนมาทำให้ปราศจากน้ำ โดยเติม $\text{Anh. Na}_2\text{SO}_4$ จำนวน 20 กรัม ลงไป เขย่า และตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2-3 นาที
9. กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 ทำการระเหยชั้นของไดคลอโรมีเทนโดยใช้เครื่อง Rotatory Evaporator
10. เมื่อทำการระเหยจนเหลือประมาณ 10 mL เติมเบนซีนลงไปจำนวน 2-3 mL เขย่าให้เข้ากัน แล้วจึงทำการระเหยต่อไปจนเหลือ 2-3 mL
11. นำส่วนที่แยกสกัดได้ 2-3 mL นั้นมาใส่ในขวดมาตรฐานขนาด 5.0 mL แล้วทำให้ปริมาตรเป็น 5 mL ด้วยเบนซีน
12. แบ่งส่วนนี้มาประมาณ 1 mL เป็นส่วนที่ยังไม่ clean-up ไว้ใช้ในการทดลองต่อไป
13. ส่วนที่เหลือ 4 mL ให้นำไปใช้ในขั้นตอนของการ clean-up ต่อไป

3.6.3.2 การวิเคราะห์ส่วนที่แยกสกัดได้จากข้าวโพด เมื่อยังไม่ได้ทำการ clean-up

ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับการทดลองในหัวข้อ 3.6.2.2

วิธีการคำนวณค่า % Recovery

การคำนวณค่า % Recovery สามารถทำได้เช่นเดียวกันกับ การคำนวณค่า % Recovery ในข้าวสาร แต่ปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชแต่ละชนิดที่เติมลงไป มีปริมาณที่แตกต่างกัน ดังต่อไปนี้

สารกำจัดศัตรูพืช อะมีทรีน จำนวน 0.0519 mg.

สารกำจัดศัตรูพืช เบนไรโอคาร์บ จำนวน 2.1380 mg.

สารกำจัดศัตรูพืช คาร์โบฟูราน จำนวน 3.1380 mg.

สารกำจัดศัตรูพืช เมธิลพาราไรออน จำนวน 0.5100 mg.

สารกำจัดศัตรูพืช โมโนโครโทฟอส จำนวน 1.0120 mg.

สารกำจัดศัตรูพืช เมวินฟอส จำนวน 3.5670 mg.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.46 แสดงปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิดที่เติมลงไปในช่วงโหนดและวิเคราะห์
ได้ภายหลังจากการแยกสกัด และ ค่า % Recovery ของสารกำจัดศัตรูพืช
เมื่อไม่ได้ทำการ clean-up

สารกำจัดศัตรูพืช	ปริมาณสารที่ เติมลงไปบนแผ่น(μg)	ปริมาณสารที่วิเคราะห์ ได้ในข้าวโพด(μg)	% Recovery*
อะมีทริน	0.2076	ไม่ปรากฏผล	-
เบนไรโอคาร์บ	8.5520	1.8419	22
คาร์โบฟูราท	12.5520	11.2225	89
เมธิลพาราไรออน	2.0400	0.6277	31
โมโนโครโทฟอส	4.4048	ไม่ปรากฏผล	-
เมวินฟอส	7.1340	4.6053	65

* Duplicate Analysis

- ไม่มีผลการคำนวณ

จากตารางที่ 3.46 ค่า %Recovery ของสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิด เมื่อ
ไม่ได้ทำการ clean-up พบว่า %Recovery ของคาร์โบฟูราทมีค่ามากที่สุด คือ 89% รองลง
มาคือเมวินฟอส โดยมีค่า 65% ส่วนเบนไรโอคาร์บและเมธิลพาราไรออน มีค่า %Recovery
ใกล้เคียงกันคือ 22% และ 31% ตามลำดับ อะมีทรินและโมโนโครโทฟอสนั้นไม่ปรากฏผล จึง
วิเคราะห์ไม่ได้

3.6.3.3 การ Clean-up ขี้วัวโสด

ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับ การทดลองในหัวข้อ 3.6.2.3

3.6.3.4 การวิเคราะห์ส่วนที่แยกสกัดได้ ภายหลังจากการ clean-up

1. นำส่วนที่ชะล้างได้ครั้งแรก มาทำการใส่สารลงบนแผ่น HPTLC ที่ clean-up แล้ว โดยทำการใส่สารบนแผ่นจำนวนแถบละ 100 μ L

ส่วนที่ชะล้างได้ครั้งแรกนั้น เป็นส่วนที่ใช้ในการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืช เบนโรโอคาร์บ และ เมธิลพาราไรออน

2. นำส่วนที่ชะล้างได้ครั้งที่ 2 มาทำการใส่สารลงบนแผ่น HPTLC จำนวน แถบละ 50 μ L

ส่วนที่ชะล้างได้ครั้งที่สอง เป็นส่วนที่ใช้ในการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืช อะมีทริน คาร์โบฟูราน โมโนโครโทฟอส และ เมวินฟอส

3. ทำการ develop แผ่น HPTLC เช่นเดียวกันกับการทดลองในหัวข้อ 3.6.3.2 ข้อ 1-9

4. นำส่วนที่ชะล้างได้ครั้งแรก และ ครั้งที่ 2 มาทำการใส่สารลงบนแผ่น HPTLC ใหม่ โดยทำการใส่สารจำนวน 100 μ L และ 200 μ L ตามลำดับ

5. ทำการ development ด้วยโมบายเฟส ชุด ข เช่นเดียวกันกับการทดลองในหัวข้อ 3.6.2.4 ข้อ 3-7

การคำนวณค่า % Recovery สารกำจัดศัตรูพืชในขี้วัวโสดที่ clean-up แล้ว

สามารถทำได้เช่นเดียวกันกับ การคำนวณค่า % Recovery ในการทดลองหัว

ข้อ 3.6.2.4

ตารางที่ 3.47 แสดงปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิดที่เติมลงไปในช่วงโหนดและวิเคราะห์ได้ภายหลังจากการแยกสกัด และ ค่า % Recovery ของสารกำจัดศัตรูพืชเมื่อทำการ clean-up และใช้โมบายเฟสชุด ก

สารกำจัดศัตรูพืช	ปริมาณสารที่เติมลงไปบนแผ่น (μg)	ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ในช่วงโหนด (μg)	% Recovery*
อะมีทรีน	0.8304	ไม่ปรากฏผล	-
เบนโทไธโอคาร์บ	34.2080	5.2937	15
คาร์โบฟูราน	48.5520	20.6945	43
เมธิลพาราไรออน	8.1600	1.1158	14
โมโนโครโทฟอส	16.1920	ไม่ปรากฏผล	-
เมวินฟอส	27.5160	7.0787	26

* Duplicate Analysis

- ไม่มีผลการคำนวณ

จากตารางที่ 3.47 ค่า %Recovery ของคาร์โบฟูราน มีค่าสูงสุดคือ 43% รองลงมาคือ %Recovery ของเมวินฟอสคือ 26% ส่วนเบนโทไธโอคาร์บและเมธิลพาราไรออน มีค่าใกล้เคียงกันคือ 15% และ 14% ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลระหว่าง ตารางที่ 3.42 และตารางที่ 3.43 พบว่าค่า %Recovery ของทั้ง 2 ตารางนี้มีแนวโน้มไปทางเดียวกัน แต่ค่า %Recovery ที่ได้ภายหลังจากการ clean-up กลับมีค่าที่น้อยกว่าเมื่อยังไม่ได้รับการ clean-up ทั้งนี้ข้อสรุปที่น่าจะเป็นไปได้คือ ในระหว่างการ clean-up นั้น มีสารกำจัดศัตรูพืช retain อยู่ใน column ที่ clean-up นั้นอยู่ ทำให้มีค่า %Recovery ที่ลดต่ำลง

ตารางที่ 3.48 แสดงปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิดที่เติมลงไปในช่วงโพดและวิเคราะห์ได้ภายหลังจากการแยกสกัด และ ค่า % Recovery ของสารกำจัดศัตรูพืชเมื่อทำการ clean-up และใช้โมบายเฟสชุด ข

สารกำจัดศัตรูพืช	ปริมาณสารที่เติมลงไปบนแผ่น (μg)	ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ในข้าว (μg)	% Recovery*
อะมีทริน	1.6608	ไม่ปรากฏพิก	-
เบนโทโอคาร์บ	34.2080	ไม่ปรากฏพิก	-
คาร์โบฟูราน	97.1040	58.2083	60
เมธิลพาราไรออน	8.1600	1.8916	23
โมโนโครโทฟอส	32.3840	ไม่ปรากฏพิก	-
เมวินฟอส	114.1440	2.0383	2

* Duplicate Analysis

- ไม่มีผลการคำนวณ

จากตารางที่ 3.48 การใช้โมบายเฟสชุด ข ในการวิเคราะห์ค่า % Recovery ของสารกำจัดศัตรูพืชในช่วงโพด เมื่อทำการ clean-up พบว่า % Recovery ของคาร์โบฟูรานยังคงมีค่าสูงสุดคือ 60% แต่รองลงมาคือ เมธิลพาราไรออน มีค่า % Recovery 23% ส่วนเมวินฟอสมีค่า % Recovery 2% แสดงว่าความสามารถในการวิเคราะห์เมวินฟอสโดยใช้โมบายเฟสชุด ข ที่ค่าเกือบเป็น 0 และในขณะที่เดียวกันเบนโทโอคาร์บก็เช่นเดียวกัน เนื่องจากพิกของเบนโทโอคาร์บใน sample ตรงกับพิกใน blank ดังนั้นจึงไม่สามารถวิเคราะห์ได้ การที่ % Recovery ของคาร์โบฟูรานและเมธิลพาราไรออน ของการวิเคราะห์เมื่อใช้โมบายเฟสชุด ข มีค่าสูงกว่า โมบายเฟสชุด ก เนื่องจากไม่มีการสูญเสียไปจากทำ development หลายครั้ง

จากตารางที่ 3.46 ตารางที่ 3.47 และตารางที่ 3.48 ทำให้เราสามารถสรุปได้ว่าถ้าต้องการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชโดยมีค่า %Recovery ที่สูงควรทำการวิเคราะห์โดยการทำการแยกสกัดดังกล่าว ส่วนการ clean-up นั้น สามารถใช้แผ่น HPTLC ในการ clean-up โดยทำ multiple development ของระบบโมบายเฟสดังกล่าว เพื่อเป็นการ clean-up สาร ส่วนสารกำจัดศัตรูพืชอะมีทรินและโมโนโครโทฟอส ในข้าวโพดนั้นไม่สามารถทำการวิเคราะห์โดยวิธีนี้ได้

จากการทดลองในหัวข้อ 3.6.3 นี้ทำให้สามารถสรุปได้ว่า สารกำจัดศัตรูพืชที่ไม่สามารถทำการวิเคราะห์ในข้าวโพดโดยวิธีนี้ไม่ว่าจะใช้โมบายเฟสชุด ก หรือชุด ข คือสารอะมีทริน และ สารโมโนโครโทฟอส ส่วนสารเบนไรโอคาร์บและเมวินฟอส สามารถทำการวิเคราะห์และทำ development โดยใช้โมบายเฟสชุด ก สารคาร์โบฟูรานและเมธิลพาราไรออนสามารถใช้ได้ทั้งโมบายเฟสชุด ก และโมบายเฟสชุด ข แต่ใช้โมบายเฟสชุด ข จะให้ผลที่ดีกว่า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.6.4 การวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชในกระท่อม

3.6.4.1 วิธีการแยกสกัดสารกำจัดศัตรูพืชที่อยู่ในกระท่อม (35)

1. หั่นกระท่อมให้ละเอียดจนเป็นผง
2. นำกระท่อมที่หั่นแล้วนั้นมาชั่งจำนวน 50.0 กรัม แล้วบดให้ละเอียดด้วย Homogenizer ใส่ลงในขวดก้นกลมคอยาว เติมอะซิโตนลงไป 150 mL
3. นำขวดก้นกลมนี้วางลงบนเครื่องเขย่าสารแล้วเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. เทของผสมในขวดก้นกลมนี้ลงในกรวย Buchner แล้วล้างซ้ำด้วยอะซิโตน 30 และ 20 mL ตามลำดับ
5. นำส่วนของอะซิโตนที่สกัดได้นั้นใส่ลงในกรวยแยกขนาด 1 L เติมน้ำซึ่งมี Na_2SO_4 2% ลงไป 450 mL
6. เติมไดคลอโรมีเทน 100 mL แยกสกัด เก็บชั้นของไดคลอโรมีเทน
7. ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 6 โดยใช้ไดคลอโรมีเทน 50 mL อีก 2 ครั้ง
8. นำชั้นของไดคลอโรมีเทนทั้งหมดมารวมกัน และทำให้ปราศจากน้ำโดยการเติม $\text{Anh. Na}_2\text{SO}_4$ จำนวน 30 กรัม
9. นำชั้นของไดคลอโรมีเทน มาทำการระเหย ด้วยเครื่อง Rotary Evaporator จนเหลือประมาณ 10 mL
10. เติมเบนซีนลงไปจำนวน 2-3 mL ทำการระเหยต่อไปจนเหลือ 2-3 mL.
11. นำส่วนที่แยกสกัดได้ 2-3 mL นั้นมาใส่ในขวดปริมาตรขนาด 5.00 mL ทำให้ปริมาตรเป็น 5 mL ด้วยเบนซีน
12. แบ่งส่วนนี้มาประมาณ 1 mL เป็นส่วนที่ยังไม่ clean-up ไว้ใช้ในการทดลองต่อไป
13. ส่วนที่เหลือ 4 mL ให้นำไปใช้ในขั้นตอนของการ clean-up

3.6.4.2 การวิเคราะห์ส่วนที่แยกสกัดได้เมื่อยังไม่ทำการ clean-up

1. นำส่วนที่ไม่ clean-up ที่แยกสกัดได้จากกระท่อม มาทำการใส่สารจำนวน 10 μL บนแผ่น HPTLC ที่ clean-up แล้ว
2. ทำการ develop แผ่น HPTLC นั้นด้วยโมบายเฟส เรียงตามลำดับ

ดังต่อไปนี้

- development ครั้งแรกด้วยโมบายเฟส เอกเซน
 - development ครั้งที่ 2 ด้วยโมบายเฟส 50 % เอกเซน-เบนซีน
 - development ครั้งที่ 3 ด้วยโมบายเฟส เบนซีน
3. ทำการระเหยโมบายเฟสออกให้หมด แล้วทำการวิเคราะห์สำหรับสารกำจัดศัตรูพืช เบนโซอิคาร์บ และเมธิลพาราไรออน
4. ทำการ development ครั้งที่ 4 ด้วยโมบายเฟส 50 % เบนซีน-เอธิลอะซีเตต
5. ทำการระเหยโมบายเฟสออกให้หมด แล้วทำการวิเคราะห์สำหรับสารกำจัดศัตรูพืช อะมีทริน คาร์โบฟูราน และเมวินฟอส
6. ทำการ development ครั้งที่ 5 ด้วยโมบายเฟส เอธิลอะซีเตต
7. ทำการระเหยโมบายเฟสออกให้หมด แล้วทำการวิเคราะห์สำหรับสารกำจัดศัตรูพืช โมโนโครโทฟอส

วิธีการคำนวณค่า % Recovery

ในการหาค่า % Recovery นั้น เมื่อเริ่มต้นได้เติมสารกำจัดศัตรูพืช แต่ละชนิดลงไปในปริมาณที่แตกต่างกัน ดังต่อไปนี้

สารกำจัดศัตรูพืช อะมีทริน จำนวน 0.0521 mg.

สารกำจัดศัตรูพืช เบนโซอิคาร์บ จำนวน 2.0920 mg.

สารกำจัดศัตรูพืช คาร์โบฟูราน จำนวน 3.0975 mg.

สารกำจัดศัตรูพืช เมธิลพาราไรออน จำนวน 0.5140 mg.

สารกำจัดศัตรูพืช โมโนโครโทฟอส จำนวน 1.0420 mg.

สารกำจัดศัตรูพืช เมวินฟอส จำนวน 3.1005 mg.

การคำนวณค่า % Recovery สามารถทำได้เช่นเดียวกันกับ การคำนวณใน

การทดลองหัวข้อ 3.6.2.1

ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.49

ตารางที่ 3.49 แสดงปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิด ที่เติมลงไปนในกระหล่ำปสี และวิเคราะห์ได้ภายหลังจากการแยกสกัด และค่า % Recovery ของสารกำจัดศัตรูพืช เมื่อไม่ได้ทำการ clean-up

สารกำจัดศัตรูพืช	ปริมาณสารที่เติมลงไปบนแผ่น (μg)	ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ในกระหล่ำปสี (μg)	% Recovery *
อะมีทริน	0.1041	0.0433	42
เบนโทโอคาร์บ	4.1840	3.8153	91
คาร์โบฟูราน	6.1950	5.6458	91
เมธิลพาราโรออน	1.0280	0.6131	60
โมนโครโทฟอส	2.0840	0.5150	25
เมวินฟอส	6.2010	4.3081	70

* Duplicate Analysis

ในตารางที่ 3.49 เมื่อไม่ได้ทำการ clean-up สารกำจัดศัตรูพืชในกระหล่ำปสี พบว่า ค่า %Recovery ของคาร์โบฟูราน และเบนโทโอคาร์บมีค่าสูงที่สุด คือสูงถึง 91% รองลงมาคือ เมวินฟอส เมธิลพาราโรออน และอะมีทริน ตามลำดับคือ 70% 60% และ 42% ส่วนโมนโครโทฟอส มีค่าน้อยที่สุดคือ 25% เพราะมีการสูญเสียไปในระหว่างการ development หลายๆ ครั้ง

3.6.4.3 การ Clean-up สารตัวอย่างที่สกัดได้จากกระหล่ำปลี

ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับการทดลองในหัวข้อ 3.6.2.3

3.6.4.4 การวิเคราะห์ส่วนที่แยกสกัดได้ ภายหลังจากการ clean-up

1. นำส่วนที่ชะล้างได้ครั้งแรก และส่วนชะล้างได้ครั้งที่ 2 มาทำการใส่สาร
จำนวนแถบละ 20 μ L บนแผ่น HPTLC ที่ clean-up แล้ว

ส่วนที่ชะล้างได้ครั้งแรกนั้น เป็นส่วนที่ใช้ในการวิเคราะห์เบนโซโธคาร์บอน
และ เมธิลพาราไซออน

ส่วนที่ชะล้างได้ครั้งที่ 2 เป็นส่วนที่ใช้ในการวิเคราะห์ อะมีทริน คาร์โบ
ฟูราน โมโนโครโทฟอส และเมวินฟอส

2. ทำการ develop แผ่น HPTLC ที่ใส่สารแล้วนั้น ด้วยโมบายเฟสชุด ก
เช่นเดียวกันกับการทดลองในหัวข้อ 3.6.4.2 ข้อ 2-9

3. ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับการทดลองในหัวข้อ 3.6.2.4 ข้อ 3-7

การคำนวณค่า % Recovery สำหรับสารละลายที่แยกสกัดได้จากกระหล่ำปลีที่
ทำการ clean-up แล้ว สามารถทำการคำนวณได้เช่นเดียวกันกับ การคำนวณของการทดลอง
ในหัวข้อ 3.6.2.4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.50 แสดงปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิด ที่เติมลงไปในการหล้ำปสี และวิเคราะห์ได้ภายหลังจากการแยกสกัด และค่า % Recovery ของสารกำจัดศัตรูพืช เมื่อทำการ clean-up และ development ด้วยโมบายเฟสชุด ก

สารกำจัดศัตรูพืช	ปริมาณสารที่เติมลงไปบนแผ่น (μg)	ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ในกระหล้ำปสี (μg)	% Recovery*
อะมีทริน	0.1666	ไม่ปรากฏผล	-
เบนไรโอคาร์บ	6.6944	5.7164	85
คาร์โบฟูราน	9.9120	4.7134	48
เมธิลพาราไรออน	1.6448	0.8836	54
โมโนโครโทฟอส	3.3344	ไม่ปรากฏผล	-
เมวินฟอส	9.9216	11.1601	112

* Duplicate Analysis

- ไม่มีผลการคำนวณ

ในตารางที่ 3.50 ภายหลังจากการ clean-up แล้วทำการ develop ด้วยโมบายเฟสชุด ก เช่นเดียวกัน ปรากฏว่าค่า %Recovery ของเมวินฟอสที่ค่าสูงสุดคือ 112% ในขณะที่โมโนโครโทฟอสซึ่งก่อนที่ทำการ clean-up มีค่า %Recovery น้อยอยู่แล้ว ภายหลังจากการทำ clean-up ไม่ปรากฏผลของโมโนโครโทฟอสเลย แสดงว่า โมโนโครโทฟอส ถูก retain อยู่ภายใน clean-up column นั้น ค่า %Recovery ของเบนไรโอคาร์บและเมธิลพาราไรออน มีแนวโน้มทางเดียวกันคือ ลดน้อยลงภายหลังทำการ clean-up เล็กน้อยคือ เบนไรโอคาร์บมีค่า 85% ลดลงจากเดิม 6% และเมธิลพาราไรออนมีค่า 54% ลดลงจากเดิม 6% เช่นเดียวกัน สำหรับคาร์โบฟูรานมีค่า % Recovery ลดลงจาก 91% เหลือเพียง 48% ทั้งนี้เนื่องจากการสูญเสียไปในขณะทำการ clean-up ด้วย Florisil column นั้นมาก

ตารางที่ 3.51 แสดงปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิด ที่เติมลงไปในการหล่าปลี และวิเคราะห์ได้ภายหลังจากการแยกสกัด และค่า % Recovery ของสารกำจัดศัตรูพืช เมื่อทำการ clean-up และ development ด้วยโมบายเฟสชุด ข

สารกำจัดศัตรูพืช	ปริมาณสารที่เติมลงไปบนแผ่น (μg)	ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ในกระหล่าปลี (μg)	% Recovery*
อะมีทริน	0.1666	0.0839	50
เบนไรโอคาร์บ	6.6944	3.6827	55
คาร์โบฟูราน	9.9120	7.2803	73
เมธิลพาราไรออน	1.6448	0.9308	57
โมนิโครโทฟอส	3.3344	ไม่ปรากฏผล	-
เมวินฟอส	9.9216	4.3264	44

* Duplicate Analysis

- ไม่มีผลการคำนวณ

จากตารางที่ 3.51 เมื่อทำการ develop ด้วยโมบายเฟสชุด ข พบว่าคาร์โบฟูรานมีค่า %Recovery สูงสุด รองลงมาคือ เมธิลพาราไรออน เบนไรโอคาร์บ อะมีทริน และเมวินฟอส ตามลำดับ ส่วนโมนิโครโทฟอส ไม่ปรากฏผลเช่นเดียวกับในตารางที่ 3.47 แสดงว่า โมนิโครโทฟอส ได้มีการสูญเสียไปจนหมดในขณะที่ทำการ clean-up จนไม่สามารถทำการวิเคราะห์ได้

%Recovery ของคาร์โบฟูรานของการ develop ด้วยโมบายเฟสชุดนี้มีค่าสูงกว่า เมื่อใช้โมบายเฟสชุด ก เพราะไม่มีการสูญเสียไปเนื่องจากการทำ multiple development ส่วน %Recovery ของเมธิลพาราไรออนของโมบายเฟส 2 ชุดนี้มีค่าใกล้เคียงกัน ส่วนเบนไรโอคาร์บมีค่า %Recovery ที่ลดลงเพราะ ตำแหน่งพิกใน sample ตรงกับพิกใน blank และเมื่อนำมาหักล้างกันทำให้ค่า %Recovery มีค่าลดลงต่ำกว่าปกติ

ในการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า ถ้าต้องการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชใน
กระดาษปสี สารอะมีทรินสามารถใช้โมบายเฟสชุด ข ในการทำ development สารเบนได
โอคาร์บควรรู้ทำ development โดยใช้โมบายเฟสชุด ก สารคาร์โบฟูรานนั้นใช้โมบายเฟส
ชุด ข ได้ดีกว่าโมบายเฟสชุด ก สารเมธิลพาราโรอนใช้โมบายเฟสได้ทั้ง 2 ระบบ แต่
สารโมโนโครโทฟอสนั้นไม่สามารถทำการวิเคราะห์ในกระดาษปสีได้เลย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.7 การวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชในตัวอย่าง

3.7.1 การวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชในตัวอย่างข้าวสาร

1. นำข้าวสารตัวอย่างมาชั่งจำนวน 100.0 กรัม
2. บดข้าวสารที่ชั่งแล้วนั้นเป็นผงละเอียดคล้ายแป้งด้วย Homoginizer
3. นำข้าวสารที่บดละเอียดใส่ในขวดก้นกลมคอยาว เต็มโดคลอโรมีเทนลง

ไป 200 mL.

4. ทำการแยกสกัด เช่นเดียวกันกับการทดลองในหัวข้อ 3.6.2.1 ข้อ 3-11
5. ทำการใส่สาร และ development เช่นเดียวกันกับการทดลองในหัวข้อ

3.6.2.2

6. วิเคราะห์หาปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิด โดยดูจากโครมาโทแกรมของการวิเคราะห์

7. ทำการ clean-up และวิเคราะห์เช่นเดียวกันกับการทดลองในหัวข้อ

3.6.2.3 และ 3.6.2.4

ผลการทดลอง ทำคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์ สารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิดอันได้แก่ อะมีทริน เบนไดโอคาร์บ คาร์โบฟูราน เมธิลพาราไรออน โมโนโครโทฟอส และ เมวินฟอส ปรากฏว่าเมื่อดูจากโครมาโทแกรมพบว่า ไม่สามารถวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิดในข้าวสารได้เพราะไม่ปรากฏพิกบนโครมาโทแกรม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก

1. ปริมาณของสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิดในข้าว น้อยเกินกว่าที่เทคนิคนี้จะนำไปใช้ในการทดสอบ

2. สารตัวอย่างที่นำมาทดสอบไม่มีสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 6 ชนิดนี้

และถึงแม้ว่าจะทำการ clean-up ด้วย florisisil column แล้วก็ตามก็ยังไม่สามารถทำการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชนี้ได้

3.7.2 การวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชในตัวอย่างข้าวโพด

1. นำข้าวโพดตัวอย่างมาซึ่งจำนวน 100.0 กรัม
2. ทำการบดจนเป็นผงละเอียดด้วยเครื่อง Homoginizer
3. นำข้าวโพดที่บดละเอียดแล้วนั้นใส่ในขวดกั้นกลมคอยาว เต็มอะซีโตนลงไป 150 mL
4. ทำการแยกสกัดเช่นเดียวกันกับการทดลองในหัวข้อ 3.6.3.1 ข้อ 3-13 และทำการวิเคราะห์ส่วนที่แยกสกัดนี้เช่นเดียวกันกับการทดลองในหัวข้อ 3.6.2.2
5. ทดลองทำการ clean-up โดยทำการทดลองเช่นเดียวกันกับการทดลองในหัวข้อ 3.6.2.3 และ 3.6.3.4
6. ทำคุณภาพวิเคราะห์ และปริมาณวิเคราะห์ โดยดูจากโครมาโทแกรมของการวิเคราะห์

ผลการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชในข้าวโพดพบว่าไม่สามารถทำการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชในข้าวโพดได้ เนื่องจาก ปริมาณของสารกำจัดศัตรูพืชที่คาดว่าน่าจะมีในข้าวโพดอาจมีน้อยกว่า สารกำจัดศัตรูพืชที่เติมลงไป ในขณะที่ทำการทดลองเรื่อง % Recovery อีกทั้งในข้าวโพดนั้นมี matrix ที่เป็น interference ที่กำจัดออกได้ยากและเห็นเด่นชัดคือ carotene และสารจำพวกไขมัน ซึ่งถึงแม้จะได้กำจัดออกไปแล้วส่วนหนึ่งก็ตาม ก็ยังคงมีหลงเหลืออยู่ในส่วนที่แยกสกัดอยู่มาก ดังนั้นถ้ามีสารกำจัดศัตรูพืชในข้าวโพดอยู่น้อยจะไม่สามารถทำการวิเคราะห์ได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

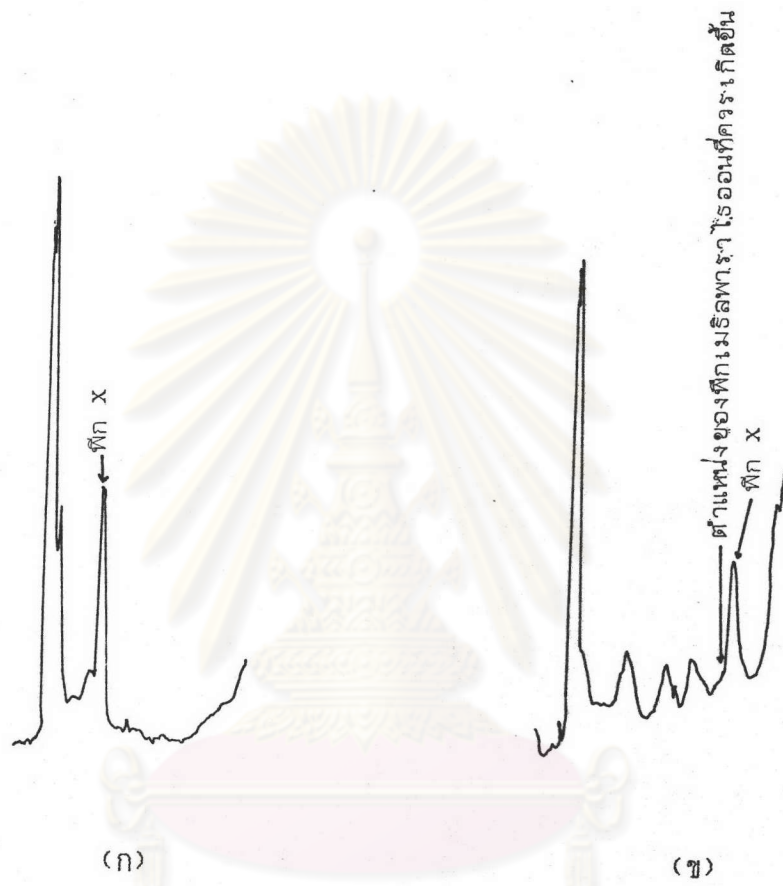
3.7.3 การวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชในตัวอย่างกระหล่ำปลี

1. ชั่งสารตัวอย่างกระหล่ำปลีจำนวน 100.0 กรัม
2. บดกระหล่ำปลีที่ชั่งแล้วนั้นเป็นชิ้นเล็กละเอียดด้วยเครื่อง Homoginizer แล้วนำไปใส่ลงในขวดก้นกลมคอยาว เติมน้ำกลั่นลงไป 150 mL
3. ทำการแยกสกัด เช่นเดียวกับการทดลองในหัวข้อ 3.6.4.1 ข้อ 3-13
4. ทำการวิเคราะห์ส่วนที่แยกสกัดได้นี้ เช่นเดียวกับการทดลองในหัวข้อ 3.6.4.2
5. ทดลองทำการ clean-up และทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการทดลองในหัวข้อ 3.6.4.3 และ 3.6.4.4
6. ทำคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์ โดยดูจากโครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารที่แยกสกัดได้จากตัวอย่างกระหล่ำปลี

จากโครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชในกระหล่ำปลี พบว่าเมื่อทำการ development ด้วยโมบายเฟส เฮกเซน 50% เฮกเซน-เบนซีน นั้นคาดว่าปรากฏฟีกของเมธิลพาราไรออน แต่เมื่อทำการ development ด้วย เบนซีน ต่อไปพบว่า ฟีกที่คาดว่าจะเป็นฟีกของเมธิลพาราไรออนนั้น มิใช่เป็นเมธิลพาราไรออน เนื่องจากตำแหน่งของ retention time ได้เปลี่ยนไป

ดังนั้นในการวิเคราะห์หาสารกำจัดศัตรูพืชในกระหล่ำปลี จึงไม่สามารถทำการวิเคราะห์ได้ เพราะอาจจะไม่มีสารเหล่านี้หรือมีต่ำกว่าขีดจำกัดของการวิเคราะห์ก็ได้ ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชที่สามารถวิเคราะห์ได้โดยใช้เทคนิคชนิดนี้ต้องมีค่าสูงมาก จึงจะทำให้ปรากฏฟีกให้เห็นและสามารถวิเคราะห์ได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



พีก x = พีกที่คาดว่าจะ เป็นพีกของเมธิลพาราไรออน

รูปแสดง โครมาโทแกรมการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชในตัวอย่างกระหล่ำปลี

- (ก) เมื่อทำการ development ครั้งแรก ด้วยโมบายเฟส เฮกเซน และ ครั้งที่ 2 ด้วยโมบายเฟส 50% เฮกเซน-เบนซีน
- (ข) เมื่อทำการ development ครั้งที่ 3 ด้วยโมบายเฟส เบนซีน