

547.07
ส 2460
e 3

การศึกษาหาทรัพยากรและมีประสิทธิภาพในการตรวจวัดคุณภาพที่ตกค้างในผัก

ปริญญานิพนธ์

ของ

สุนัตรา จอมมารวรรณ

ผ่านเอกอภิศตมคกลาง มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ณัฐมวิท ๘๖ พระโขนง กรุงเทพมหานคร ๓ โทร. ๓๘๒๑๖๗๖. ๓๘๑๖๐๘๐

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต

ตุลาคม 2520

67497

110 ม.ค. 2521

คณะกรรมการที่ปรึกษาประจำวันสัต ไคพิจารณาปริญญานิพนธ์ฉบับนี้แล้ว
เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรการศึกษามหาบัณฑิต
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒไค

Prof. Dr. ...

ประธาน

อรรถ ธีราช.

กรรมการ

ตุลาคม , 2520

ประกาศคุณูปการ

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. ประยูร กีมา และอาจารย์อาภรณ์ วีรสาร กรรมการ
ที่ปรึกษา ที่ได้ช่วยเหลือให้คำแนะนำในการค้นคว้าทดลองเป็นอย่างดี และได้กรุณาตรวจ
แก้ปัญญานิพนธ์ฉบับนี้ โดยตลอด

ขอขอบพระคุณ คุณบัณฑิต คำวัณห์ ดร. เทียนชัย ชงสินธุศักดิ์
คุณเลอศักดิ์ จตุรภูษ คุณส่ววิตร วรรณพิน และคุณศิวาภรณ์ สกุดเพียงตรง
นักวิทยาศาสตร์ของตึกวิจัยวัตถุพิษ ที่ได้ให้คำปรึกษา แนะนำเกี่ยวกับวิธีการทดลอง
และการใช้เครื่องมือ

คุณวรารณ จีรวาณิช คุณสุกัญญา ชูเชิดศักดิ์ คุณมานี เกื้อสกุล
คุณลาวัณย์ เฟื่องบุญ คุณมองใส ศรีสำราญ คุณบุญทอง ธวัชสุภา และ
คุณสุรทิน จอมมาวรรณ เป็นผู้ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำ
ปัญญานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลงด้วยดี ขอขอบคุณไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย.

สุมิตรา จอมมาวรรณ

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
คำนำ	1
ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า	3
ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า	3
ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า	3
คำจำกัดความและศัพท์เฉพาะ	4
2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย	7
Thin-Layer Chromatography Technique	7
Organic Reaction Method	13
ทฤษฎี Thin-Layer Chromatography	18
ทฤษฎี Schöenemann Reaction	18
3 วิธีดำเนินการทดลอง	20
กลุ่มตัวอย่าง	20
การดำเนินการทดลอง	20
การทดลองหาวิธีสกัดตัวเจือปนออกจากผัก	21
การทดลองหาวิธีตรวจวัดตัวเจือปนชนิดออร์กาโนฟอสฟอรัส	24
การทดลองหา recovery เพื่อประสิทธิภาพของวิธีทดลอง	33
การทดลองตรวจวัดตัวเจือปนตกค้างในผักคะน้าจากตลาด	34
4 ผลการทดลอง	38

บทที่	หน้า
5 สรุป อภิปรายผล และขอเสนอแนะ	51
สรุปผลการทดลอง	53
อภิปรายผลการทดลอง	56
ขอเสนอแนะเพื่อการศึกษาคนควาต่อไป	58
บรรณานุกรม	59
ภาคผนวก	64
การตรวจวัดปริมาณพวกออร์กาโนฟอสฟอรัสบางชนิด ที่ค่าความปลอดภัย	65
วิธีตรวจวัดปริมาณพวกออร์กาโนฟอสฟอรัสบางชนิดอย่างง่าย- ที่ได้จากการคนควาทดลองครั้งนี้	66
การเตรียม microslide chromatoplate	68
การเตรียม bromphenol blue spray reagent	69
ราคาโดยประมาณของสารเคมีและเครื่องมือ 1 ชุด ที่ใช้ในการตรวจ วัดปริมาณอย่างง่าย	70
คุณสมบัติบางประการของวัดปริมาณพวกออร์กาโนฟอสฟอรัสบางชนิด	72

บทคัดย่อ

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	Rf-values ของวัตถุที่มีพิษพวกออร์กาโนฟอสฟอรัสบางชนิด	9
2	Rf-values ของวัตถุที่มีพิษพวกออร์กาโนฟอสฟอรัสบางชนิด (develop 40 นาทีใน chamber ขนาด 28 x 26.5 x 21 ซม.)	10
3	Sensitivity ที่ได้จาก การตรวจสอบ ประกอบฟอสฟอรัสด้วย Schöenemann Reaction	17
4	ผลการทดลองหาวิธีสกัดวัตถุพิษออกจากผักคะน้า	38
5	ผลการทดลองตรวจสอบวัตถุพิษชนิดออร์กาโนฟอสฟอรัสด้วย Thin-Layer Chromatography	40
6	ผลการตรวจสอบวัตถุพิษด้วย Schöenemann Reaction	45
7	recovery จากการสกัดวัตถุพิษออกจากผักคะน้า	48
8	ผลการตรวจผักคะน้าจากตลาดด้วย TLC	49

บัญชีภาพประกอบ

ภาพ	หน้า
1 GLC-Chromatogram แสดง peak ของพาราไอออน.....	35
2 TLC-Chromatogram แสดงการทำ recovery ของพาราไอออน.....	37
3 chromatogram แสดงผลการตรวจวัดปริมาณที่ตกค้างในผักคะน้า ที่ระดับความปลอดภัย	65
4 การเคลือบ microslide ด้วย silica gel G	68
5 ชุดเครื่องมือที่ใช้ทดลองตรวจวัดปริมาณอย่างง่าย	76
6 microslide ที่เคลือบแล้ว	76
7 การหยดสารตัวอย่างลงบน slide ด้วย capillary tube	77
8 การ develop chromatoplate ด้วย solvent และโบรมีน	77
9 การ spray chromatoplate ด้วย bromphenol blue spray reagent	78
10 TLC-chromatogram ของวัตถุดิบขมิ้นชันคอกอร์กาโนฟอสฟอรัส	78

บทที่ 1

บทนำ

กานำ

การใช้วัตถุมีพิษในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช เป็นสิ่งจำเป็นในทางเกษตรกรรมในปัจจุบัน เพื่อช่วยในการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร โดยลดความเสียหายของผลผลิตจากศัตรูพืช ทั้งนี้มีการใช้อย่างแพร่หลายตั้งแต่หลังสงครามโลกครั้งที่ 2 เป็นต้นมา สารเคมีต่าง ๆ ที่นำมาใช้ในการกำจัดศัตรูพืช และฆ่าแมลงต่าง ๆ มีประสิทธิภาพสูง ให้ผลเด่นชัด จึงทำให้เกษตรกรและประชาชนนิยมใช้กันมาก แต่ก็อาจจะก่อให้เกิดโทษอย่างมหันต์ต่อสุขภาพและอนามัยของประชาชน ถ้าใช้วัตถุมีพิษโดยขาดความระมัดระวังหรือเกินความจำเป็น ก่อนปี พ.ศ. 2483 อันตรายจากการใช้วัตถุมีพิษในการป้องกันกำจัดโรคพืชและศัตรูพืช ไม่เป็นปัญหาสำคัญ เพราะวัตถุมีพิษต่าง ๆ ที่ใช้ในขณะนั้นเป็นสารที่สลายตัวได้เร็ว แต่หลังจากปี พ.ศ. 2483 เป็นต้นมา ปัญหาเกี่ยวกับพิษของวัตถุมีพิษมีมากขึ้น เพราะเกษตรกรนิยมใช้วัตถุมีพิษชนิดคลอรีเนเตดไฮโดรคาร์บอน (Chlorinated Hydrocarbon Compounds) ซึ่งเป็นสารเคมีที่สลายตัวช้า ส่วนสารประกอบฟอสฟอรัส (Organophosphorus Compounds) แม้จะสลายตัวได้เร็วกว่า แต่ก็ยังเป็นสารที่มีอันตรายต่อชีวิตมนุษย์และสัตว์ต่าง ๆ อย่างร้ายแรง

ผลจากการค้นคว้าวิจัยปรากฏแน่ชัดว่าวัตถุมีพิษที่ใช้ป้องกันกำจัดศัตรูพืชในปัจจุบันนี้เป็นอันตรายอย่างร้ายแรงต่อสัตว์เลื้อยคลาน สามารถสะสมในร่างกายมนุษย์และสัตว์ได้ ทำให้กล้ามเนื้อและประสาทอ่อนแอ อวัยวะบางส่วนต้องทำงานหนักกว่าปกติ แพทย์หลายคนเชื่อกันว่าวัตถุมีพิษเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ประชาชนอเมริกันมีอัตราตายด้วยโรคหัวใจวายมากขึ้น และเกิดเจ็บป่วยด้วยโรคต่าง ๆ เช่น โรคทางประสาท ตับโต โลหิตเป็นพิษ ฯลฯ สำหรับวัตถุมีพิษชนิดออร์กาโนฟอสฟอรัส ได้มีผู้ศึกษาจนกระทั่งทราบถึงปฏิกิริยาของสารประกอบชนิดนี้ในร่างกายมนุษย์ คือสามารถยับยั้ง (inhibit) การสร้างเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส

ยิ่งขึ้น เป็นการแบ่งเบาภาระของนักวิทยาศาสตร์และนักวิชาการต่าง ๆ

ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ คือ

1. เพื่อศึกษาหาวิธีการที่ใช้ไล่สะควกและรวกเร็วในการตรวจวัดคุณสมบัติของออร์กาโน-ฟอสฟอรัส ที่ตกค้างในผัก
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการนั้น ๆ โดยการหา sensitivity และ recovery

ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า

1. การค้นคว้าหาวิธีการตรวจหาวัตถุพิษชนิดออร์กาโนฟอสฟอรัสที่ตกค้างในผักที่สะควกและรวกเร็ว จะสามารถค้นพบนำไปใช้ตรวจสอบกับผักหรืออาหารที่บริโภคในชีวิตประจำวันได้ในหมู่ของเกษตรกรและบุคคลทั่วไป
2. ผลการค้นคว้าครั้งนี้ จะเป็นแนวทางสำหรับหาวิธีการตรวจวัดวัตถุพิษชนิดอื่น ๆ เช่น พวงกลอรีเนตเตค ไฮโดรคาร์บอน และพวกคาร์บาเมต เป็นต้น
3. วิธีการและเทคนิคที่ได้จากการศึกษาค้นคว้าและการทดลองต่าง ๆ จะนำไปใช้ในการเรียนการสอนวิชาเคมีในระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย และระดับอุดมศึกษาได้

ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

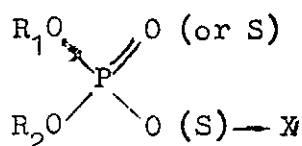
1. ค้นคว้าหาวิธีการตรวจหาวัตถุพิษชนิดออร์กาโนฟอสฟอรัสที่เกษตรกรนิยมใช้ คือ Parathion, Malathion, Ethion, Diazinon และ Bidrin
2. ค้นคว้าหาวิธีการตรวจหาวัตถุพิษเฉพาะที่ตกค้างในผัก
3. ผักที่จะใช้ในการทดลองครั้งนี้ จะใช้ผักกะน้าที่ปลูกขึ้นเอง และไม่ได้ฉีดสารเคมีที่เป็นวัตถุพิษชนิดใด ๆ กับผักกะน้าจากตลาดอมรพันธุ์ บางเขน

คำจำกัดความและศัพท์เฉพาะ

1. วัฏพิษ (pesticides) หมายถึงสารออกฤทธิ์หรือวัฏพิษที่สารออกฤทธิ์ผสมอยู่ ใช้ในการป้องกันและกำจัดศัตรูพืชในทางการเกษตร

2. สารออกฤทธิ์ หมายถึงเคมีภัณฑ์หรือสิ่งที่มีคุณสมบัติอันอาจทำให้เกิดอันตรายแก่มนุษย์ สัตว์ และพืช

✓ 3. สารประกอบออร์กาโนฟอสฟอรัส หมายถึงวัฏพิษที่มีธาตุฟอสฟอรัส เป็นองค์ประกอบสำคัญ มีสูตรทั่วไปดังนี้ (Chilwell, 1961 : 153)



เมื่อ R_1 และ R_2 เป็นหมู่ ethyl ($-C_2H_5$) หรือ methyl ($-CH_3$)

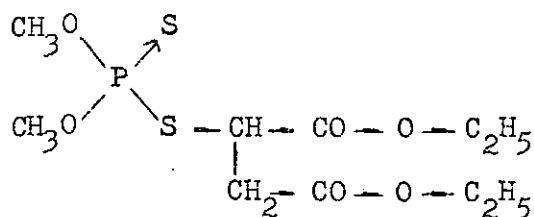
บางที่เป็น isopropyl ($-CH \begin{array}{l} \nearrow CH_3 \\ \searrow CH_3 \end{array}$)

X เป็น organic radical

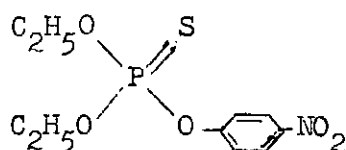
R_1 และ R_2 จะถูก hydrolyze ยากกว่า X

ตัวอย่างสารประกอบออร์กาโนฟอสฟอรัส (WHO, 1962 : 65, 70)

Malathion, $C_{10}H_{19}O_6PS_2$



Parathion, $C_{10}H_{14}NO_5PS$



4. สกัด (extract) หมายถึงวิธีการแยกวัตถุดิบให้หลุดออกจากสารตัวอย่าง โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม
- ✓ 5. adsorbent หมายถึงสารที่ใช้ในการดูดซับสารตัวอย่างในการวิเคราะห์ด้วย Thin-Layer Chromatography. โดยใช้เคลือบ (coat) บนแผ่นกระจก สารที่เป็น adsorbent ที่จะต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่าง
6. clean-up หมายถึงการทำให้สารตัวอย่างบริสุทธิ์ ปราศจากสิ่งเจือปนที่ไม่ต้องการ
7. chemiluminescence หมายถึงการเรืองแสงที่เกิดจากปฏิกิริยาเคมีของ วัตถุพิษกับ indicator
8. chromatographic tank หมายถึงภาชนะสำหรับใส่ mobile solvent หรือ developing solvent ในขณะทำการ develop สารตัวอย่างบน chromatoplate
- ✓ 9. chromatoplate หมายถึงแผ่นกระจกที่เคลือบด้วย adsorbent
- ✓ 10. chromogenic reagent หมายถึงสารเคมีที่ใช้พ่นหรืออบ chromatoplate ที่ถูก developed แล้ว เป็นสารที่จะทำให้เกิดสี มองเห็นตำแหน่งของสารตัวอย่างที่เคลื่อนที่บน chromatoplate ได้
11. develop หมายถึงการแยกของผสมออกจากกัน โดยใช้ mobile solvent ชะของผสมที่หยกบน adsorbent ในขบวนการ thin-layer chromatography
12. fluorescence หมายถึงการเรืองแสงที่เกิดจากการที่สารดูดซับพลังงานจากรังสีอุลตราไวโอเลต แล้วปล่อยพลังงานออกมาในรูปของแสง
13. Gas-Liquid Chromatography (GLC) หมายถึงวิธีการแยกสารให้บริสุทธิ์ โดยมีตัวกลางเป็นของเหลวเคลือบอยู่บนเบ้าของแข็ง ซึ่งบรรจุอยู่ภายในท่อ (column) แล้วใช้ก๊าซเช่น ไนโตรเจน เป็นตัวพาสารผสมให้แยกออกจากกัน

14. indicator หมายถึงสารเคมีที่เมื่อทำปฏิกิริยากับวัตถุพิษ แล้วจะแสดงปรากฏการณ์ที่สามารถสังเกตเห็นได้ง่าย เช่นมีการเรืองแสง, การเกิดสี เป็นต้น

/ 15. mobile solvent หมายถึงสารละลายที่ทำหน้าที่เป็นตัวทำละลายสารตัวอย่างในการวิเคราะห์ด้วย Thin-Layer Chromatography โดยจะชะ (elute) สารตัวอย่างให้เคลื่อนที่ไปบน chromatoplate ทางที่เรียก mobile solvent ว่า developing solvent

16. recovery หมายถึงปริมาณของวัตถุพิษที่สามารถตรวจสอบได้ หลังจากผ่านขั้นตอนการสกัด, clean-up และอื่น ๆ

/ 17. Rf-value หมายถึงอัตราส่วนระหว่างระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่กับระยะทางที่ mobile solvent เคลื่อนที่ โดยวัดจากแนวเริ่มต้นเดียวกัน ซึ่งจะมีค่าคงที่สำหรับสารหนึ่ง ๆ ใน mobile solvent และ adsorbent ชนิดหนึ่ง ๆ

18. sensitivity หมายถึงขีดความสามารถในการตรวจหาวัตถุพิษโดยวิธีต่าง ๆ วัดออกมาเป็นปริมาณต่ำสุดของวัตถุพิษที่สามารถตรวจหาได้

19. solvent front หมายถึงระดับสูงสุดที่ mobile solvent เคลื่อนที่ไปบน chromatoplate ในการทำ Thin-Layer Chromatography

/ 20. Thin-Layer Chromatography (TLC) หมายถึงวิธีการแยกสารให้บริสุทธิ์ โดยมีตัวกลางเช่น silica gel, alumina เคลือบอยู่บนแผ่นกระจก ใช้คุณสมบัติของตัวทำละลายซึ่งสามารถละลายและพาสารตัวอย่างไปได้ในอัตราต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสารนั้น ๆ.

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

1. Thin-Layer Chromatography Technique

แอมบอร์ และทอมสัน (อ้างจาก Abbott and Egan, 1967 : 479)

ได้ทดลองใช้ Thin-Layer Chromatography (TLC) ในการวิเคราะห์วัตถุพิษแทน Paper Chromatography (PC) โดยสกัดวัตถุพิษด้วยตัวทำละลาย และ clean-up ด้วย alumina หรือ florisil column เพื่อแยกเอาไขมันออกจากสารตัวอย่าง ต่อมา เกทซ์ และโคแวตส์ (อ้างจาก Abbott and Egan, 1967 : 475) ได้ขยายการใช้ TLC ในระบบ (system) ที่ใช้ได้กับ ester ที่มีกำหนดเป็น องค์ประกอบ ซึ่งมี sensitivity ระหว่าง 0.1 - 0.5 μg .

พินเซอร์ และคลิงเกลไฮลเลอร์ (อ้างจาก Günther, 1965 : 38)

ได้วิเคราะห์วัตถุพิษชนิดออร์กาโนฟอสฟอรัส โดยใช้เทคนิคของ PC และ TLC เขาได้ สกัดวัตถุพิษออกจากเนื้อเยื่อสัตว์ โดยใช้ ethanolic potash ที่อุณหภูมิการทดลอง ปรากฏว่า Rf-value ยังไม่คงที่ เช่นเมื่อทดลองสกัด malathion จะได้ Rf-value เท่ากับ 0.32 0.44 0.58 และ 0.66 ซึ่งในการทดลองได้ใช้ silica gel G เป็น adsorbent และใช้ methanol : dichloromethane : 10 % ammonia solution ในอัตราส่วน 20 : 80 : 3 เป็น mobile solvent นอกจากนี้ยังได้ ทดลองที่อุณหภูมิสูงประมาณ 30 - 31°C โดยมี solvent front 12 เซนติเมตร (Stahl, 1969 : 639)

นอมเลอร์ และริบส์ไตน์ (อ้างจาก Günther, 1965 : 38 และ Stahl, 1969 : 639) ได้ทดลองเมื่อปี 1961 โดยแยกวัตถุพิษ 7 ชนิด บน silica gel G chromatoplate ใช้ hexane : acetone (4 : 1) เป็น mobile solvent แล้วตรวจสอบด้วย palladium chloride solution แต่การทดลองนี้จะได้ผลไม่คุ้ม

เมื่อใช้ตรวจพาราไรออนและเมทิล - คีมตอน (methyl demeton)

ในปี 1962 เพทซ์ซิก และสเติกเกอร์ (อ้างจาก Günther, 1965 : 38) ได้ใช้แผ่นกระจกเคลือบ alumina โดยมี starch เป็น binder แล้ว develop ด้วย 10:1 n-heptane:acetone ในการวิเคราะห์ aliphatic ester บางชนิดของ thiophosphoric acid ที่อุณหภูมิ 120°C และในปีเดียวกันชาโลและคณะ (อ้างจาก Günther, 1965 : 38) ได้วิเคราะห์พาราไรออน เมทิล - คีมตอน และมาลาไรออน โดยใช้ TLC บน silica gel G แล้ว develop ด้วย toluene เป็นเวลา 20 นาที ปรากฏว่าพาราไรออน - คีมตอน และพาราไรออนจะไหลออกมาเหมือนกัน จึงใช้การทดลองนี้วิเคราะห์สารทั้งสองไม่ได้

อุชิยามา และโอกูอิ (อ้างจาก Günther, 1965 : 38) ได้วิเคราะห์วัตถุที่มีพิษชีวเคมีอินฟอสฟอรัส โดยใช้ silica gel plate และ hexane : acetone เป็น mobile solvent ปรากฏว่าใช้ได้ผลดีกับเมทิล - คีมตอน ในตัวเหลืองไทโอเมทอนไนโบซา และเพนิโตรไรออน จากน้มนมมะกอก ซึ่งได้ผลเกือบ 100 % recovery เมื่อ develop สารตัวอย่างด้วยสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ในน้ำ

การวิเคราะห์ด้วย TLC ได้เข้ามาใช้อย่างแพร่หลายยิ่งขึ้น วอลคเกอร์ และเบอโรซา (อ้างจาก Günther, 1965 : 39) ได้วิเคราะห์สารพาทออร์กาโน-ฟอสฟอรัส จากสารตัวอย่าง 62 ชนิด และใช้ mobile solvent 19 ชนิด สารที่ใช้เป็น solvent มากที่สุดคือ benzene และ chloroform ทั้งนี้ใช้ bromine - fluorescein-silver nitrate เป็น spraying reagent วิธีนี้จะทดลองได้ผลดีกับสารตัวอย่าง 33 ชนิด โดยจะทดลองนำไป irradiate ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต ขั้วระยะหนึ่ง มี sensitivity ระหว่าง 1 - 5 μg . (Stahl, 1969 : 640)

ในปี 1964 บันยัน (อ้างจาก Günther, 1965 : 39) ใช้ benzene และ acetone ในอัตราส่วน 9:1 เป็น mobile solvent ใช้ silica gel H และ alumina เป็น adsorbent ทดลองกับวัตถุพิษหลายชนิด

ผลการทดลองของวอลคเกอร์ กับเบอโรซา และบันยัน เปรียบเทียบกันได้ดังนี้

ตาราง 1 Rf-values ของวัฏพืชพริกออกฤทธิ์ในฟอสฟอรัสบางชนิด
(Günther, 1965 : 40)

pesticides	System no. ^a and Rf-values						
	Walker and Beroza (1963)					Bunyun (1964)	
	1	2	3	4	5	6	7
Azinphos-methyl	0.63	0.65	0.33	0.54	0.10	0.40	0.53
Dimethoate	0.13	0.47	0.02	0.08	0.00	0.03	0.10
Ethion	0.87	0.85	0.71	0.77	0.43	0.62	0.76
Ethion	-	-	-	-	0.54	-	-
Malathion	0.73	0.77	0.46	0.63	0.20	0.45	0.64
Mevinphos	0.17	0.57	0.03	0.09	-	0.10	-
Mevinphos	0.27	0.63	-	0.16	-	-	-
Parathion	0.84	0.86	0.65	0.71	0.31	-	-
Parathion-methyl	0.81	0.84	0.59	0.67	0.21	0.43	0.68
Phenkapton	-	-	-	-	-	0.56	0.75
Phorate	0.86	0.89	0.68	0.75	0.50	0.69	0.73
Phosphamidon	0.09	0.48	0.00	0.05	0.00	0.10	-
Schradan	0.02	-	0.00	0.00	0.00	-	-

^aKey to systems :

System no	Adsorbents	mobile solvent (all 9 : 1 mixture)
1	silica gel G	CHCl ₃ : ethyl acetate
2	silica gel G	CHCl ₃ : acetic acid
3	silica gel G	benzene : ethyl acetate
4	silica gel G	benzene : acetone

5. silica gel G hexane : acetone
 6. silica gel H benzene : acetone
 7. alumina (Woelm) benzene : acetone

ตาราง 2 Rf-values ของวัฏจักรพืชพวกออกาโนฟอสฟอรัสบางชนิด (develop
 40 นาทีใน chamber ขนาด 28 x 26.5 x 21 ซม.)
 (Günther, 1965 : 41)

pesticides	System no. and Rf-values								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Azinphos-methyl	0.05	0.14	0.24	0.00	0.27	0.00	0.03	0.58	0.00
Carbophenothion	0.52	0.66	0.80	0.45	0.96	0.36	0.39	0.92	0.27
Chlorthion	0.16	0.27	0.52	0.11	0.52	0.10	0.12	0.81	0.09
Dichlorvos	0.04	0.10	0.17	0.03	0.23	0.00	0.00	0.03	0.00
Dimethoate	0.02	0.04	0.07	0.00	0.02	0.00	0.00	0.12	0.00
Ethion	0.60	0.82	0.88	0.38	0.96	0.50	0.57	-	0.39
Ethion	0.40	0.60	0.74	0.16	0.90	0.15	0.17	0.90	0.13
Fenchlorphos	0.50	0.68	0.81	0.60	0.96	0.64	0.68	0.93	0.45
Malathion	0.12	0.29	0.45	0.00	0.57	0.00	0.02	0.81	0.00
Parathion	0.37	0.62	0.72	0.14	0.80	0.11	0.18	0.90	0.95
Phenkapton	0.54	0.71	0.84	0.43	0.95	0.43	0.38	0.90	0.30
Phorate	0.60	0.75	0.84	0.33	0.96	0.39	0.44	0.92	0.32
Phosphamidon	0.22	0.44	0.65	0.02	0.00	0.00	0.00	0.78	0.00
Thiometon	0.46	0.61	0.66	0.18	0.90	0.23	0.26	0.90	0.00

<u>System no.</u>	<u>Adsorbents</u>	<u>Mobile solvents</u>
1	silica gel	19:1 hexane:acetone
2	silica gel	9:1 hexane:acetone
3	silica gel	6:1 hexane:acetone
4	1:1 Kieselguhr:silica gel	petroleum ether (40° to 60°C)
5	1:1 Kieselguhr:silica gel	9:1 cyclohexane:acetone
6	1:1 Kieselguhr:alumina	cyclohexane
7	1:1 Kieselguhr:alumina	petroleum ether (40° to 60°C)
8	1:1 Kieselguhr:alumina	9:1 cyclohexane:acetone
9	1:1 Kieselguhr:alumina	20:1 hexane:liquid paraffin

สเตลเลอร์ และเคอร์ (อ้างจาก Günther, 1965 : 39) ได้ใช้ TLC ในอากาศแห้ง โดยใช้ silica gel G., silica gel HF ในอัตราส่วน 1:1 เคลือบหนา 500 ไมครอน แล้ว develop ด้วย acetone:chloroform (3:1) เพื่อที่จะแยก dimethoate และ oxygen analog ของมัน ที่สกัดออกมาจากแอปเปิล, อัลพัลฟา และมะเขือเทศซึ่งไม่แก่จัด การวัดปริมาณในการวิเคราะห์หลังจากเกิดจากปริมาณของ ฟอสฟอรัสทั้งหมดของวัตถุพืชที่ถูกชะออกจาก adsorbent ด้วยกรดไนตริกเจือจาง

เคอร์ชเนอร์ และ ฟลานาแกน (อ้างจาก Kirchner, 1967 : 35) พบว่า การใช้สารเคมีบางชนิด เช่น starch, gypsum ผสมลงไปกับ adsorbent จะทำให้ adsorbent ติดกับแผ่นกระจกแน่นขึ้น และใช้เวลาในการ develop น้อยลง

* ในปี 1951 เคอร์ชเนอร์ และคนอื่น (อ้างจาก Günther, 1965 : 5) พบว่า สารที่ใช้เป็น adsorbent สำหรับการตรวจวิเคราะห์ด้วย TLC มีหลายอย่าง ได้แก่

- | | |
|------------------------|----------------------|
| 1. silica gel | 2. alumina |
| 3. magnesium oxide | 4. calcium hydroxide |
| 5. dicalcium phosphate | 6. bentonite |

7. calcium and magnesium carbonate
8. florisil
9. filtrol
10. talcum
11. starch

ในการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ นิยมใช้ silica gel และ alumina กันมาก ตามสม Kieselguhr G ลงไปเลย จะทำให้ separation และ Rf-value ของสารตัวอย่างต่างกันอย่างชัดเจน และมักใช้ starch 5 % หรือ plaster of Paris 20 % เติมลงไปเป็น binder เพื่อให้ adsorbent ติดแน่นกระจกแน่นยิ่งขึ้น adsorbent พืชอลงท้ายกาย G เป็น adsorbent พืช gypsum 13-15 % ผสมเป็น binder

✓ สแตนเลย์ (อ้างจาก Abbott and Egan, 1967 : 480 และ Stahl, 1969 : 640) ได้ทดลองใช้ micro-plate method โดยใช้เคลือบ silica gel G บน microslide ขนาด 25.4 x 76.2 มิลลิเมตร และให้ solvent front 5 เซนติเมตร ซึ่งทำให้สะดวกรวดเร็วขึ้น เพราะใช้เวลาในการ develop น้อยลงมาก ใช้ mobile solvent จำนวนน้อย และใช้กับ chamber ขนาดเล็ก ๆ ได้

Analtech Incorporation ได้ทดลองเคลือบ adsorbent ลงไปบนแผ่นกระจกเป็นแบบสำเร็จรูปและนำมาใช้ได้ทันที โดยเรียกชื่อว่า "uniplate" หรือ "precoated plate" อนึ่งเมื่อเร็ว ๆ นี้บริษัท A.H. Thomas Co. และ Mallinckrodt Chemical Works ได้เริ่มผลิต precoated plate นี้ออกสู่ตลาดแล้ว ในปี 1962 Applied Science Laboratories Inc. และ The Gelman Instrument Co. ได้ผลิต TLC-plate โดยใช้ glass fiber sheet ที่ชุบด้วย potassium silicate หรือ silicic acid และใช้ชื่อทางการค้าว่า Gelman Instant Thin-Layer Chromatography (ITLC) (Kirchner, 1967 : 24)

plate ที่ผลิตขึ้นใหม่ และออกสู่ตลาดเมื่อไม่นานมานี้ คือ chromatogram sheet ซึ่งผลิตโดย Distillation Products Industries เป็น plate ที่ใช้ silica gel ซึ่ง bound ภาย polyvinyl alcohol เคลือบบน polyethylene —

terephthalate หนา 0.3 มิลลิเมตร ขนาด 20 x 20 เซนติเมตร ซึ่งอาจตัดให้มีขนาดต่าง ๆ ได้ตามต้องการ ความหนาของ adsorbent 100 ไมครอน

2. Organic Reaction Method

โซเนียม (อ้างจาก Poziomek and Crabtree, 1973 : 56) พบว่า cyanophosphates หรือ fluorophosphates จะทำให้ luminol เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีโคสารเคมี (chemiluminescence) และจะเกิดการเปลี่ยนสีเช่นกัน เมื่อเติมของผสมของสารประกอบฟอสฟอรัส กับ o-dianisidine ลงไปใน alkaline peroxide solution

นอกจากนั้นโซเนียม (อ้างจาก Burchfield and Storrs, 1975 : 209) ได้ทดลองวิเคราะห์ nerve gas ในระหว่างสงครามโลกครั้งที่ 2 โดยใช้สารเคมีทดสอบทางพิษพวกฟอสเฟต โดยใช้หลักว่า aromatic amine จะเรืองแสงหรือให้สารเคมีที่คล้ายกับสารออร์แกนิกฟอสฟอรัส เมื่อเติม alkaline peroxide ลงไป peroxide จะไป oxidize phosphate ให้เป็น perphosphonate

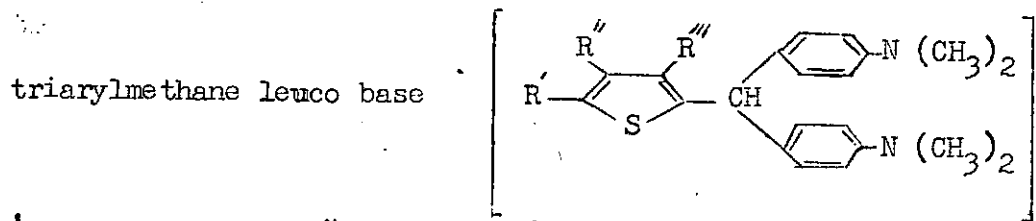
Edgewood Arsenal ในสหรัฐอเมริกา และ Porton Chemical Defense Establishment ในอังกฤษ (Poziomek and Crabtree, 1973 : 56) ได้ใช้ปฏิกิริยาของโซเนียม ในการวิเคราะห์คุณสมบัติพิษของฟอสฟอรัส เช่น ethyl N,N-dimethyl phosphoramido cyanidate (GA หรือ tabun) และ isopropyl methyl phosphonofluoridate (GB หรือ sarin)

ต่อมาเกอเฟและคณะ (Gehauf et al., 1957 : 278) ได้พบว่าสารเคมีที่ใช้ตรวจสอบ tabun และ sarin นั้น สามารถดัดแปลงไปใช้ในการตรวจสอบสารประกอบพวกฟอสฟอรัสได้หลายชนิด ซึ่งเมื่อเติมสารละลายของ alkaline peroxide ลงไป จะมีสารสีเหลืองเกิดขึ้น

แกรนท์และคูมมมาน (Grant et al., 1957 : 40) ได้ทดสอบ anticholinesterase agent ซึ่งเป็นสารที่คล้ายกับ sarin โดยใช้ anticholinesterase

ที่มีความเข้มข้นต่ำถึง 0.1 ppm. ใน 10 ml. aqueous solution ไปทำปฏิกิริยากับ indicator พบว่าการเกิดสีจะขึ้นอยู่กับ pH, ความเข้มข้นของ chloride ion และแพ็คเกจรอน ๆ เช่นที่ pH ต่ำกว่า 8 จะไม่ค่อยเห็นสี เมื่อ pH เพิ่มขึ้น การเกิดสีจะเร็วขึ้นและสีเข้มขึ้น ที่ pH สูงกว่า 12 จะเกิดสีเร็วมากแต่สีจะจางหายไปได้ ในด้านอุณหภูมิพบว่าที่ 10 และ 40°C อุณหภูมิจะมีผลต่ออัตราเร็วของการเกิดสี แต่ไม่มีผลต่อความเข้มของสี การอุณหภูมิสูงการเกิดสีจะเร็วขึ้น แต่จางหายไปได้เร็ว

แกรนท์ (อ้างจาก Poziomek and Crabtree, 1973 : 58) ได้ทดลองแทนที่



ซึ่งเป็น indicator ด้วย group ต่าง ๆ พบว่า dialkyl-substituted dyes จะ sensitive มากกว่า dianisidine และ triarylmethane leuco base จะให้สีม่วง-น้ำเงิน ส่วน dianisidine ให้สีเหลือง - ส้ม

ในปี 1954 เอกเกอร์สเทมและไวส์ (อ้างจาก Poziomek and Crabtree, 1973 : 59) ได้ศึกษาพบว่าใน indicator ที่เป็น amine นั้น oxidation potential ของ indicator จะมีผลต่อความเข้มของสีในการตรวจสอบประกอบพวกฟอสฟอรัส คือถ้า indicator ซึ่งเป็นสารที่ถูก oxidized ในปฏิกิริยามี oxidation potential ต่ำ ก็จะถูก oxidized แล้วให้ product ที่สีเข้ม แต่ที่มี oxidation potential สูง จะได้ product สีจาง ๆ เช่น เมื่อใช้ dianisidine ซึ่งเป็น indicator ที่มี potential ต่ำที่สุดใน benzidine class จะให้ product ที่สีเข้มที่สุด

เกอฮอฟ และโกลเดนสัน (Gehauf and Goldenson, 1957 : 276 - 278)

ได้ทดลองตรวจสอบหาสารพิษจาก nerve gas พบว่า fluorometric method จะได้ผล sensitive กว่า colorimetric method ถึง 50 เท่าเป็นอย่างน้อย วิธีนี้ใช้หลักว่าเมื่อ nerve gas ทำปฏิกิริยากับ indole และ sodium perborate จะทำให้เกิด indoxyl solution ซึ่งเรืองแสงได้มาก อาศัย intensity ของแสงโคโคไซ

เวลช์ และ เวสต์ (Welch and West, 1957 : 876 - 877) ได้ทดลองใช้สารเคมีต่าง ๆ เป็น indicator ในการตรวจสอบอินทรีย์พวกฟอสฟอรัส ดังนี้

1. Sulfuric Acid-Dianisidine Molybdate, Method A.

reflux สารประกอบฟอสฟอรัสด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น โดยมี mercury (II) sulfate เป็นตัวกระตุ้น แล้วใช้ o-dianisidine molybdate reagent เป็น indicator ได้ตะกอนสีน้ำตาลแดงเกิดขึ้น ภายในเวลา 30 วินาที

2. Sulfuric Acid-Hydrazine Molybdate, Method B.

reflux สารประกอบฟอสฟอรัสด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้นเช่นเดียวกับ method A. เติมน้ำ carbonate-acetate-hydrazine solution ลงไป เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำ molybdate solution ลงไป ได้สารละลายสีน้ำเงินภายในเวลา 1 นาที เพราะ hydrazine จะไป reduce phosphomolybdic acid ได้ molybdenum blue เกิดขึ้น

3. Sodium Perborate-Dianisidine Molybdate, Method C.

ใช้ร่วมกับสารประกอบพวกกรด, acyl halides และ anhydrous containing phosphorus โดยใช้ 1% aqueous sodium perborate solution และ dianisidine molybdate reagent เป็น indicator ได้ตะกอนสีน้ำตาลแดง

ตาราง 3 Sensitivity ที่ได้จากการตรวจสอบประกอบฟอสฟอรัสด้วย
 (Schöenemann Reaction (Poziomek and Crabtree,
 1973 : 59))

Method	Indicator	Approx: Limit of sensitivity to G.B. (sarin)
Solution-colorimetric	<u>o</u> -dianisidine	0.1-0.5 μ g
Solution-colorimetric	triarylmethane compound	0.1 μ g
Solution-fluorescence	indole	0.05 μ g
Solution-chemiluminescence	luminol	0.5 μ g
Detector tube	<u>o</u> -dianisidine	0.3 μ g
Detector tube	4-amino-2-ethoxydiphenyl-amine-2-sulfonic acid	0.3-0.4 μ g
Automatic alarm (colored product)	<u>o</u> -dianisidine	0.02 ppm (in air) in 2 min., 2 ppm in 5 sec.
Automatic alarm (fluorescent product)	indole	1 ppm (in air)

ทฤษฎี

1. Thin-Layer Chromatography (TLC)

การวิเคราะห์สารด้วย TLC จะต้องมีแผ่นกระจกที่ทาหน้ด้วยสารที่เป็น adsorbent บาง ๆ จนทั่วแผ่น ใช้หลักเช่นเดียวกับ paper chromatography คือหยดสารตัวอย่างบนแนวที่กะไว้ แล้วจุ่ม plate ลงไปใน solvent ให้ระดับของเหลวอยู่ที่แนวที่หยดตัวอย่าง เมื่อ solvent ซึมขึ้นมาตาม adsorbent บนแผ่นกระจก adsorbent จะดูดซับสารต่าง ๆ ในสารตัวอย่าง และ solvent จะชะสารที่ถูกดูดซับนั้นให้เคลื่อนที่ตามไปด้วยอัตราเร็วต่างกัน จึงทำให้สารตัวอย่างแยกออกจากกันได้ ระดับที่ solvent เคลื่อนที่ไปถึงเรียกว่า solvent front เมื่อ solvent ซึมขึ้นมาถึงขีด solvent front ที่กะไว้ ก็ยก plate ขึ้นจาก solvent แล้วนำไปทำให้แห้ง หลังจากนั้นอาจนำไป develop ด้วยสารบางอย่างเพื่อจะมองเห็นจุดของสารตัวอย่างได้ชัดเจน วัดระยะทางระหว่างจุดที่หยดสารกับจุดนั้น แล้วนำไปเทียบกับระยะ solvent front อัตราส่วนของระยะทั้งสองนี้เรียกว่า Rf-value

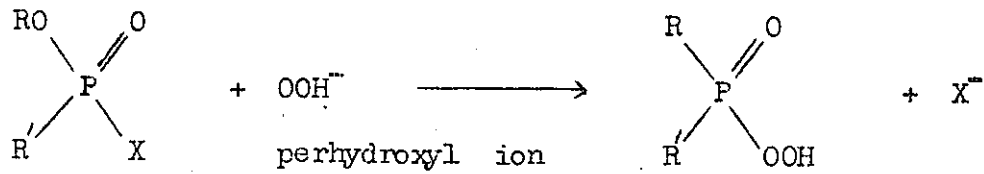
$$\text{Rf-value} = \frac{\text{ระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ solvent เคลื่อนที่}}$$

Rf-value จะคงที่สำหรับสารหนึ่ง ๆ ใน solvent system และ adsorbent หนึ่ง ๆ นอกจากนั้นจะขึ้นอยู่กับแฟกเตอร์หลายอย่าง เช่น เทคนิคการทดลอง ความหนาของ adsorbent ธรรมชาติ และ activity ของ adsorbent ธรรมชาติของ solvent การอิ่มตัวของไอของ solvent ใน tank, อุณหภูมิ เป็นต้น

✓ 2. Schöenemann Reaction

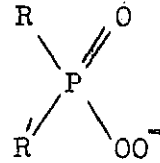
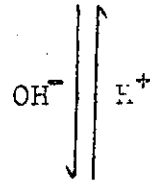
สารประกอบพวกฟอสฟอรัส จะสามารถ oxidize indicator ต่าง ๆ เช่น amines แล้วเกิดเป็นสารที่เปล่งแสง (chemiluminescent compound) หรือสารเรืองแสง (fluorescent compound) ซึ่งถ้าเติม alkaline peroxide ลงไป จะเกิดปฏิกิริยาได้เร็วยิ่งขึ้น ในขั้นแรกจะเกิด perphosphonic acid และ

perphosphonate anion กังสมการ (Poziomek and Crabtree, 1973 : 57)



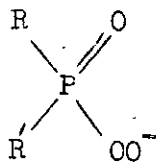
organophosphorus compound

perphosphonic acid



perphosphonate anion

perphosphonate anion ซึ่งอยู่ใน equilibrium กับ perphosphonic acid ใน alkaline solution จะ oxidize indicator ไตสารพิษหรือเรืองแสง กังสมการ



+ indicator $\longrightarrow$ product

เรืองแสงหรือพิษ

วิธีการดำเนินการทดลอง

กลุ่มตัวอย่าง

1. วัตถุประสงค์ที่ใช้ทำการทดลองหาวิธีการตรวจสอบ เป็นยาฆ่าแมลงที่เกษตรกรนิยมใช้ในการป้องกันและกำจัดศัตรูของพืชผักต่าง ๆ คือสารประกอบพวกออร์กาโนฟอสฟอรัส ที่ได้เลือกมาทดลองมี 5 ชนิด ได้แก่ พาราไธออน, มาลาไธออน, อีไธออน, ไดอาซินอน และไอนิน

2. ผักที่ใช้ทดลองคือผักกะน้า ดังนี้

2.1 ผักกะน้าที่ปลูกขึ้นเอง โดยไม่ฉีดยาฆ่าแมลงใด ๆ ได้ทดลองปลูกที่แปลงทดลองของศึกษีวิจัยวัตถุประสงค์ กรมวิชาการเกษตร บางเขน

2.2 ผักกะน้าจากตลาด เก็บตัวอย่างจากตลาดอมรพันธุ์ บางเขน เพื่อนำไปทดลองหาวิธีการตรวจสอบผักที่ได้ออกผลกันนั้นใช้กับตัวอย่างจริง ไหนหรือไม่

✓ การดำเนินการทดลอง

1. อุปกรณ์

1.1 microslide ขนาด 7.5 x 2.5 เซนติเมตร

1.2 chromatoplate ขนาด 20 x 20 เซนติเมตร

1.3 microsyringe

1.4 chromatographic tank

1.5 ขวดแก้วรูปทรงกระบอก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4.5 เซนติเมตร สูงประมาณ 9 เซนติเมตร พร้อมกระจกปิด

1.6 spray bottle

1.7 blender

1.8 blower

- 1.9 เครื่อง sweep co-distiller
- 1.10 เครื่อง Gas Chromatograph with Flame Photometric Detector (FPD)

✓ 2. สารเคมี

- 2.1 silica gel G
- 2.2 extracted reagents
- 2.3 clean-up reagents
- 2.4 chromogenic reagents
- 2.5 bromine
- 2.6 mobile solvents
- 2.7 indole-perborate reagent
- 2.8 o-dianisidine-perborate reagent
- 2.9 sodium perborate-dianisidine molybdate reagent
- 2.10 luminol-perborate reagent

3. วิธีทดลอง

3.1 การทดลองหาวิธีสกัดพิษออกจากผัก

เลือกพาราไรออนเป็นหลักในการทดลอง เพราะเป็นวัตถุพิษที่สำคัญ และนิยมใช้กันมาก

นำเอาผักคะน้าที่ปลูกเองมาหั่นละเอียด ชั่งมา 25 กรัม ในบีกเกอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายของพาราไรออนมาตรฐานซึ่งมีพาราไรออน 1 ppm ลงไป หั่นไว้สักครู่หนึ่ง แล้วสกัดพาราไรออนออกจากผักโดยใช้สารละลายชนิดต่าง ๆ จากนั้นนำไป clean-up เพื่อที่จะฉีดเข้าเครื่อง Gas Chromatograph เอาผลที่ได้ ไปคำนวณหาปริมาณของพาราไรออน และหา percent recovery การ สกัดด้วยสารละลายที่ให้ percent recovery สูง จะเป็นวิธีการสกัดที่มีประสิทธิภาพดี

3.1.1 สารที่ใช้สกัด : ethyl acetate

สารที่ใช้ clean-up : coconut charcoal

เติม ethyl acetate 125 มิลลิลิตร ลงไปในผักที่ทำการ
ทดลอง (มีพาราไธออน 1 ppm) แล้วเติม anhydrous sodium sulfate 25 กรัม
นำไปปั่น (blend) โดยใช้ความเร็วต่ำ 5 นาที และความเร็วสูง 5 นาที กรองผ่าน
ใยแก้วลงไปใน flask ขนาด 125 มิลลิลิตร เติม coconut charcoal ลงไป
ประมาณ 15 กรัม เขย่า แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง จะได้อาหารละลายใส นำไปลดปริมาตร
ด้วย blower ให้เหลือ 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง Gas Chromatograph
ชนิด FPD

3.1.2 สารที่ใช้สกัด benzene

สารที่ใช้ clean-up : coconut charcoal

ทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1 แต่ใช้ benzene สกัด

แทน ethyl acetate

3.1.3 สารที่ใช้สกัด : methylene chloride

วิธี clean-up : TLC-cleaned procedure

เติม methylene chloride 25 มิลลิลิตร ลงไปในผัก
(มีพาราไธออน 1 ppm) 25 กรัม บดด้วยโกร่ง แล้วชิ้นส่วนที่เป็นของเหลว
ออก ทำเช่นนี้อีก 2 ครั้ง โดยใช้ methylene chloride ครั้งละ 15 มิลลิลิตร
รวมของเหลวที่ได้ทั้ง 3 ครั้งรวมกัน แล้วนำไปกรองผ่านกระดาษกรองที่มี anhydrous
sodium sulfate 25 กรัมอยู่ ค่อยๆรินลงไป clean-up โดยใช้ pipet ดูดสาร
ละลายมา 2 มิลลิลิตร หยดลงบน chromatoplate ขนาด 20 x 20 เซนติเมตร
ซึ่งเคลือบด้วย silica gel G หนา 250 ไมครอน ให้แนวที่หยดสารซึ่งหยดเป็นแถบยาว
ขนานกับขอบล่างของ plate นั้น ห่างจากขอบล่างประมาณ 3 เซนติเมตร แล้วนำเอา
plate ไป develop ด้วยสารละลายของ hexane และ acetone (4:1)
จนกระทั่งสารละลายขยับขึ้นไปประมาณ 10 เซนติเมตร ก็เอา plate ออกจาก chroma-
tographic tank พึ่งไว้ให้แห้ง แล้วขูดเอา silica gel บริเวณเดียวกับแนวของวัตถุที่พบ

มาตรฐานนั้น ๆ (เปรียบเทียบจาก Rf-value ของแต่ละชนิด). elute ผ่านกระดาษกรองด้วย สารละลาย hexane : acetone(3:2) (Abbott et al., 1967 : 170 - 175) โดยใส่สารละลาย 10 มิลลิลิตร หลังจากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง Gas Chromatograph ชนิด FPD

3.1.4 สกัดโดยใช้สารละลายชนิดต่าง ๆ คือ benzene, methylene chloride, acetone และสารละลาย acetonitrile (35 % water / acetonitrile) (Batés, 1965 : 453 - 466) ต่อจากนั้นใช้ TLC-cleaned procedure (Abbott et al., 1967 : 170 - 175) แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง Gas Chromatograph ชนิด FPD

3.1.5 ทดลองสกัดและ clean-up โดยใช้วิธีที่ชักนอยู่ในห้องปฏิบัติการของศีกษาวิจัยวัตถุพิษ ซึ่งเป็นวิธีของ AOAC เพื่อเปรียบเทียบผลกับวิธีที่ทดสอบไปแล้ว

สารที่ใช้สกัด : ethyl acetate

clean-up : ใช้เครื่อง sweep co-distiller

ซึ่งผงที่ปนละเอียดแล้ว 25 กรัม เติมสารละลายขี้ผึ้งมาตรฐานอยู่ 1 ppm. ลงไป เติม ethyl acetate 125 มิลลิลิตร และ anhydrous sodium sulfate 25 กรัม นำทั้งหมดนี้ไปปั่นด้วย blender โดยใช้ความเร็วต่ำ 5 นาที และความเร็วสูง 5 นาที กรองผ่านใยแก้ว เก็บของเหลวที่กรองได้ไว้ใน flask ขนาด 125 มิลลิลิตร แบ่งมา 50 มิลลิลิตร นำไปลดปริมาตรด้วย flash evaporator จนเหลือ 5 มิลลิลิตร ต่อจากนั้นนำไป clean-up โดยใช้เครื่อง sweep co-distiller คือใช้ syringe ดูดสารละลายที่จะ clean มา 1 มิลลิลิตร ฉีดเข้าไปใน sample tube ของเครื่อง ฉีดตามด้วย ethyl acetate อีก 7 ครั้ง ๆ ละ 1 มิลลิลิตร ในช่วงเวลาทุก ๆ 3 นาที เพื่อชะล้างวัตถุพิษออกมาให้หมด สารละลายที่ฉีกจะกลายเป็นไอแล้วถูกกักในโตรเจนพาออกไป และถูกควบแน่นเป็นของเหลวที่ใส่สะอาด ปรับปริมาตรให้เป็น 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง Gas Chromatograph ชนิด FPD

3.2 การทดลองหาวิธีตรวจวัดปริมาณฟอสฟอรัส

3.2.1 ใช้ Thin-Layer Chromatography โดยดัดแปลงใช้ เครื่องมือขนาดเล็กสะดวกในการใช้ ง่าย และ ราคาไม่แพงนัก

- อุปกรณ์
1. แผ่นกระจกขนาดเล็ก (microslide chromatoplate) ขนาดประมาณ 7.5 x 2.5 เซนติเมตร
 2. ขวดแก้วรูปทรงกระบอกขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4.5 เซนติเมตร สูงประมาณ 9 เซนติเมตร พร้อมขวดแผนกระจกสำหรับปิด
 3. ขวดพ่นสารเคมี (spray bottle)
 4. microsyringe ขนาด 10 μ l

- สารเคมี
1. mobile solvents
 2. chromogenic reagents
 - bromine
 - spraying reagents

- วิธีทดลอง
1. silica gel G ผสมกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:2 (น.น./ปริมาตร) เคลือบบนแผ่นกระจกขนาดเล็ก ทิ้งไว้สัก 15 นาทีให้แห้งในอากาศ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 30 นาที
 2. หยดสารละลายของวัตถุพืชมามาตรฐาน ได้แก่ พาราไรซอน มาลาไรซอน อีไรซอน ไคอาซินอน และ ไบคริน ลงไปบน chromatoplate โดยใช้ microsyringe

ในปริมาณต่าง ๆ กัน คือปริมาณที่วัดด้วย
ตั้งแต่ $0.1 \mu\text{g}$ ขึ้นไป นำเอาแผ่นกระจก
ไป develop ด้วย mobile solvent
ซึ่งอยู่ในขวดแก้วรูปทรงกระบอก ใช้แผ่นกระจก
ราบปิดปากขวด เมื่อสารละลายขึ้นขึ้นไปบนแผ่น-
กระจกเป็นระยะทาง 5 เซนติเมตร เอาแผ่น-
กระจกออก พักไว้ให้แห้ง หลังจากนั้นนำไป
develop ด้วย chromogenic reagent
ต่าง ๆ จะมองเห็นจุดของสารละลายที่ถูกชะขึ้น
ไปบนแผ่นกระจก

3. ทดสอบ R_f ของวัตถุพิษแต่ละชนิด ในแต่ละ
system ที่ทดลองในข้อ 2
4. หา sensitivity โดยได้จากปริมาณน้อยสุด
ของวัตถุพิษแต่ละชนิด ที่สามารถมองเห็นเป็น
จุดปรากฏบนแผ่นกระจก ใน system ต่าง ๆ
5. เลือก system ที่เหมาะสมที่จะใช้เป็น
วิธีตรวจวัตถุพิษชนิดคอร์กาโนฟอสฟอรัสด้วย TLC
ซึ่งเป็น system ที่ต้องอยู่ในหลักเกณฑ์
ต่อไปนี้ คือ
 - สามารถตรวจวัตถุพิษได้ครบทั้ง 5 ชนิด
 - ค่า R_f ของวัตถุพิษแต่ละชนิดต้องไม่เท่ากัน
หรือใกล้เคียงกันเกินไป
 - sensitivity ที่ต่ำ คือสามารถตรวจ
วัตถุพิษปริมาณน้อย ๆ ได้

หมายเหตุ system ที่ใช้ในการทดลองหาวิธีตรวจวัตถุพิษชนิดคอร์กาโนฟอสฟอรัสด้วย-

Thin-Layer Chromatography มี 20 system ดังนี้

System 1 (Getz and Wheeler, 1968 : 1102 - 1104)

adsorbent : silica gel G
 mobile solvent : cyclohexane/acetone/chloroform
 (70/25/5)
 chromogenic reagent : bromcresol green-silver nitrate
 solution และ acetate buffer
 solution pH 4.4 (Long, 1961 : 31)

System 2 (Getz and Wheeler, 1968 : 1102 - 1104)

adsorbent : silica gel G
 mobile solvent : cyclohexane/acetone/chloroform
 (70/25/5)
 chromogenic reagent : 4-(p-nitrobenzyl) pyridine และ
 tetraethylenepentamine

System 3 (Getz and Wheeler, 1968 : 1102 - 1104)

adsorbent : silica gel G
 mobile solvent : 2,2,4-trimethylpentane/acetone/
 chloroform (70/25/5)
 chromogenic reagent : bromcresol green-silver nitrate
 solution และ acetate buffer
 solution pH 4.4

System 4 (Getz and Wheeler, 1968 : 1102 - 1104)

adsorbent : silica gel G
mobile solvent : 2,2,4-trimethylpentane/acétone/
chloroform (70/25/5)
chromogenic reagent : 4-(p-nitrobenzyl) pyridine and
tetraethylenepentamine

System 5 (Getz and Wheeler, 1968 : 1102 - 1104)

adsorbent : silica gel G
mobile solvent : acetone/isopropyl ether/cyclohexane
(40/40/20)
Chromogenic reagent : bromocresol green-silver nitrate
solution and acetate buffer
solution pH 4.4

System 6 (Getz and Wheeler, 1968 : 1102 - 1104)

adsorbent : silica gel G
mobile solvent : acetone/isopropyl ether/cyclohexane
(40/40/20)
Chromogenic reagent : 4-(p-nitrobenzyl) pyridine and
tetraethylenepentamine

System 7 (Getz and Wheeler, 1968 : 1102 - 1104)

adsorbent : silica gel G
mobile solvent : 2,2,4-trimethylpentane/ethyl
acetate/acetonitrile (50/25/15)
Chromogenic reagent : bromocresol green-silver nitrate
solution $\approx$ acetate buffer
solution pH 4.4

System 8 (Getz and Wheeler, 1968 : 1102 - 1104)

adsorbent : silica gel G
mobile solvent : 2,2,4-trimethylpentane/ethyl acetate/
acetonitrile (50/25/15)
chromogenic reagent : 4-(p-nitrobenzyl) pyridine $\approx$
tetraethylenepentamine

System 9 (Getz and Wheeler, 1968 : 1102 - 1104)

adsorbent : silica gel G
mobile solvent : cyclohexane/ethyl acetate/acetonitrile
(50/20/15)
chromogenic reagent : bromocresol green-silver nitrate
solution $\approx$ acetate buffer
solution pH 4.4

System 10 (Getz and Wheeler, 1968 : 1102 - 1104)

adsorbent : silica gel G
 mobile solvent : cyclohexane/ethyl acetate/
 acetonitrile (50/20/15)
 chromogenic reagent : 4-(p-nitrobenzyl) pyridine and
 tetraethylenepentamine

System 11 วิจัย Kovacs (Kovacs, 1964 : 1097 - 1098
 and Günther, 1967 : 118)

adsorbent : alumina G
 mobile solvent : methyl cyclohexane
 immobile solvent : 15 ml 20 % dimethylformamide
 chromogenic reagent : - tetrabromophenolphthalein ethyl ester
 - silver nitrate solution
 - citric acid solution

System 12 (Zweig, 1973 : 39 ; Günther, 1967 : 117 and Randerath,
 1968 : 242)

adsorbent : silica gel G
 mobile solvent : hexane/acetone (4/1)
 chromogenic reagent : 5 % palladium chloride in
 hydrochloric acid

System 13 (Analytical Abstract, 1975 : 2 G 22)

adsorbent : silica gel G
 mobile solvent : hexane/acetone (4/1)
 chromogenic reagent : potassium permanganate solution

System 14

adsorbent : silica gel G
 mobile solvent : hexane/acetone (4/1)
 benzene/acetone (3/2) สำหรับไบครีน
 chromogenic reagent : phosphorous reagent (Zweig, 1973 : 37)

System 15

adsorbent : silica gel G
 mobile solvent : hexane/acetone, 4/1
 benzene/acetone, 3/2 สำหรับไบครีน
 chromogenic reagent : fluorescein solution และ silver
 nitrate 2-phenoxyethanol reagent
 (อบไบรีนก่อน) (Günther, 1967 : 117)

System 16

adsorbent : silica gel G
 mobile solvent : hexane/acetone, 4/1
 benzene/acetone, 3/2 (สำหรับไบครีน)
 chromogenic reagent : - อบไบรีน
 - fluorescein solution (0.25 % in
 ethanol) (Zweig, 1973 : 39)

System 17

adsorbent : silica gel G
 mobile solvent : 20 % methylene chloride in cyclohexane
 chromogenic reagent : 4-(p-nitrobenzyl) pyridine และ
 tetraethylenepentamine (Zweig, 1973:35)

System 18

adsorbent : silica gel G
 mobile solvent : hexane/acetone, 4/1
 benzene/acetone, 3/2 (สำหรับใบกาน)
 chromogenic reagent : Congo Red reagent (4 % ethanolic
 Congo Red) (Zweig, 1973 : 38)

System 19

adsorbent : silica gel G
 mobile solvent : hexane/acetone, 4/1
 benzene/acetone, 3/2 (สำหรับใบกาน)
 chromogenic reagent : - อมโบรโม
 - bromphenol blue spray reagent
 (Günther, 1967 : 117 - 118)

System 20

adsorbent : silica gel G
 mobile solvent : hexane/acetone, 4/1
 benzene/acetone, 3/2 (สำหรับใบกาน)
 chromogenic reagent : iodine spray reagent
 (Günther, 1967 : 118)

3.2.2 ใช้ Schöenemann reaction ตรวจวัดพิษชนิด ออร์กาโนฟอสฟอรัส ด้วยปฏิกิริยาของสารเคมีต่อไปนี้

1. indole-perborate reagent (Gehauf and Goldenson, 1957 : 277)

- เตรียมสารละลาย sodium perborate ในน้ำกลั่น (2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ผสมกับสารละลายของ indole ใน acetone (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) โดยใช้อัตราส่วน 1:1 จะได้ indole-perborate reagent

- วิธีทดลอง : ใส่ indole-perborate reagent 5 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดทดลอง เติมสารละลายของวัตถุพิษมาตรฐานลงไปในปริมาณต่าง ๆ กัน คือปริมาณที่วัตถุพิษ ตั้งแต่ 0.5 - 10 µg เพื่อตรวจดูว่าสารเคมีชนิดนี้ จะตรวจวัดพิษได้ปริมาณต่ำสุดเท่าไร เป็นการหา sensitivity

2. o-dianisidine-perborate reagent (Gehauf and Goldenson, 1957 : 277)

- เตรียมสารละลาย sodium perborate ในน้ำกลั่น (2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ผสมกับสารละลายของ o-dianisidine ใน acetone (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) โดยใช้อัตราส่วน 1:1 จะได้ o-dianisidine-perborate reagent

- วิธีทดลอง : เช่นเกี่ยวกับการทดลองในข้อ 1

3. sodium perborate-dianisidine molybdate (Welch and West, 1957 : 875) ใช้สารละลาย 2 ชนิด คือ

- สารละลาย 1 % aqueous sodium perborate (เตรียมใหม่ ๆ)

- o-dianisidine molybdate reagent : ละลาย sodium molybdate dihydrate 2.5 กรัม ในน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร และกรดเกลือเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายของ o-dianisidine 0.125 กรัม ใน glacial acetic

acid 2 มิลลิลิตร พืชของผสมไวแก้งคั้นแล้วกรอง เก็บไว้ในขวดแก้วที่สุญญากาศ (จะ stable อยู่ได้ประมาณ 6 - 12 เดือน) เมื่อจะใช้ทำให้เจือจางลงครึ่งหนึ่ง

- วิธีทดลอง : ใส่ aqueous sodium perborate ลงไปในหลอดทดลอง 10 หยด เติมสารละลายของวัตถุพืชมাত্রฐานลงไปปริมาณต่าง ๆ กัน คือปริมาณที่วัตถุพืชตั้งแต่ 0.5 - 10 μg อุ่นหลอดทดลองเพื่อให้ solvent ประมาณ 45 วินาที แล้ว heat กับเปลวไฟประมาณ 30 วินาที พืชไว้ให้เย็น แล้วเอาหลอดทดลองครึ่งล่างจุ่มในน้ำเย็น 10 วินาที หลังจากนั้นเติม dianisidine molybdate reagent 2 หยด

4. luminol-perborate reagent (Goldenson, 1957 : 878)

- ings luminol 0.05 กรัม, sodium perborate 0.01 กรัม และ $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ 0.1 กรัม เอาทั้งหมดนี้ไปละลายในน้ำกลั่น (distilled chlorine-free water) 100 มิลลิลิตร

- วิธีทดลอง : เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 1

3.3 การทดลองหา recovery เพื่อประสิทธิภาพของวิธีการทดลอง

ใช้วิธีการสกัดและ clean-up ที่เลือกมาจากการทดลองในข้อ 3.1 ซึ่งสกัดด้วยพืชที่เติมไปในผักคั้นแล้วสารละลายชนิดต่าง ๆ คือ ethyl acetate, benzene, acetone, methylene chloride, acetonitrile และทดลอง clean-up ด้วย coconut charcoal, TLC-cleaned procedure

วิธีสกัดและ clean-up ที่ให้ percent recovery สูงที่สุด จะเป็นวิธีที่เลือกมาใช้ในการหา recovery ของวัตถุพืชทั้ง 5 ชนิด ที่ทำการทดลอง โดยตรวจสอบวัตถุพืชที่ recover ดังนี้

3.3.1 วิธีตรวจที่เลือกจากการทดลองในข้อ 3.2 คือตรวจด้วย TLC และ Schönemann reaction โดยเลือกวิธีที่ sensitivity ดีที่สุด และตรวจวัตถุพืชโคครบทั้ง 5 ชนิด

3.3.2 ตรวจด้วยเครื่อง Gas Chromatograph ชนิด FPD

3.4 การทดลองตรวจวัดพิษที่ตกค้างในผักคะน้าจากตลาด

ใช้ผักคะน้า 100 กรัม มาทดลองสกัดและ clean-up ด้วยวิธีที่เลือกมาจากการทดลองในข้อ 3.1 และตรวจหาวัฏคุณพิษด้วยวิธีตรวจที่เลือกมาจากการทดลองในข้อ 3.2 และเปรียบเทียบกับผลการตรวจด้วยเครื่อง Gas Chromatograph ชนิด FPD

หมายเหตุ ก. Condition ที่ใช้กับเครื่อง Gas Chromatograph แบบ Tracor 222

1. column เป็นหลอดแก้วรูปตัวยู (U) ขนาดยาว 6 ฟุต เส้นผ่าศูนย์กลาง $\frac{1}{4}$ นิ้ว บรรจุด้วย 10 % DC-200 on GAS-CHROM Q ขนาด 100/120 mesh อุณหภูมิของ column $190^{\circ} - 195^{\circ} \text{C}$
2. detector เป็นชนิด Flame Photometric Detector (FPD) อุณหภูมิของ detector 180°C
3. carrier gas คือก๊าซไนโตรเจน ซึ่งมีอัตราการไหล 90 - 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร/นาที
4. ก๊าซอื่น ๆ ที่ใช้ในการจุด flame
 - ไฮโดรเจน อัตราการไหล 150 ลูกบาศก์เซนติเมตร/นาที
 - อากาศ (air) อัตราการไหล 40 ลูกบาศก์เซนติเมตร/นาที
 - ออกซิเจน อัตราการไหล 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร/นาที

✓ ข. วิธีหา percent recovery

GLC-method

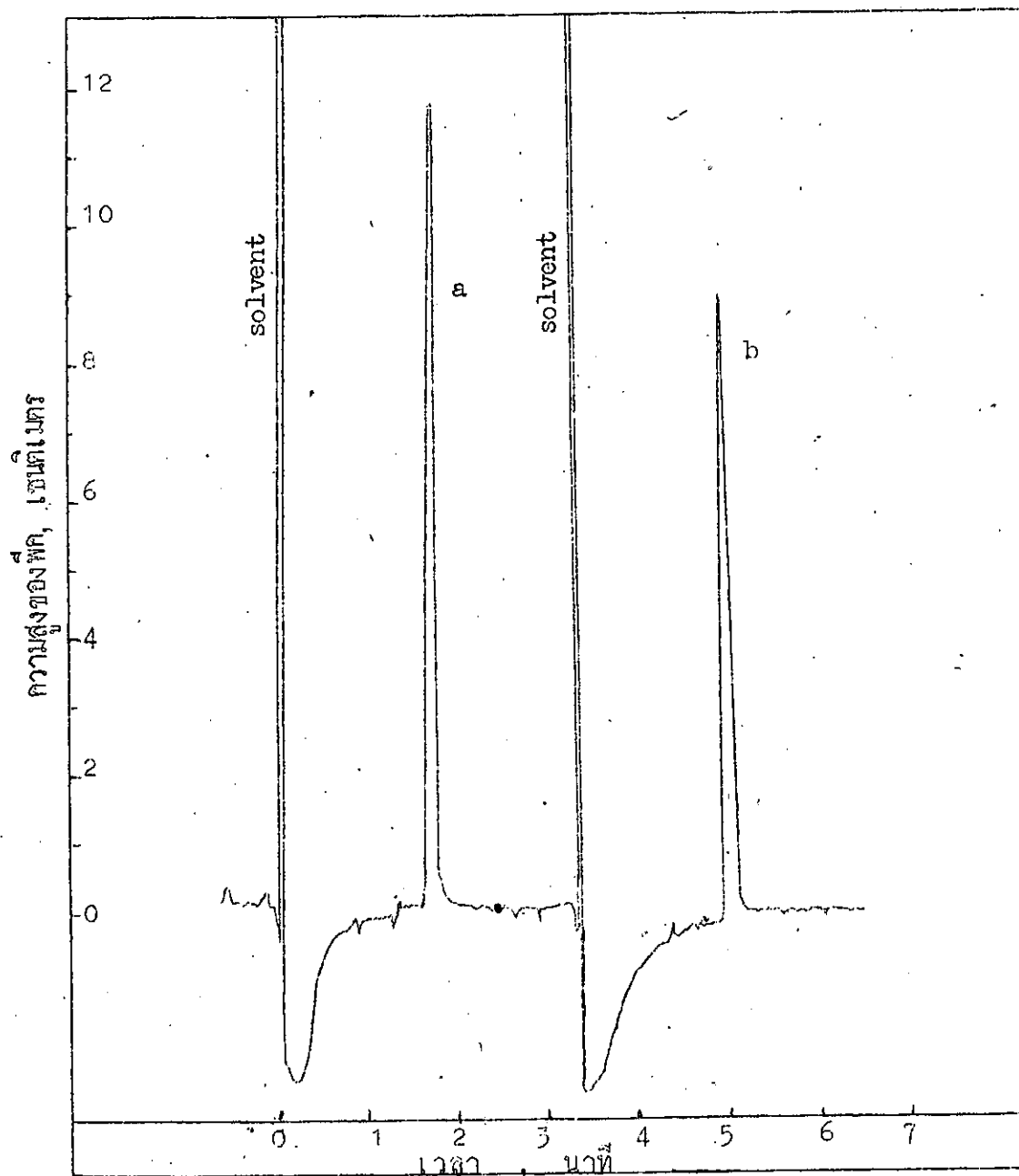
การทดลอง

1. เติมน้ำสารละลายซึ่งมีพาราไรออกสนาตรฐานอยู่ 0.05 มิลลิกรัม ลงไปในผักเมื่อสกัดแล้วสมมุติว่าได้น้ำสารละลาย 150 มิลลิลิตร แบ่งมา 50 มิลลิลิตร นำไปลดปริมาตรเหลือ 5 มิลลิลิตร แบ่งมา clean-up 1 มิลลิลิตร หลังจาก clean-up ทำให้ปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฉีด GLC สมมุติว่าเมื่อฉีด 5 μl จะเกิด peak ที่มีพื้นที่

ได้ peak 0.9 การวางเซนติเมตร

2. นีคสารละลายของพาราไอซอนมาตรฐาน 5 μl สมมุติว่าได้พื้นที่ได้ peak

1.17 การวางเซนติเมตร



ภาพ 1 GLC-chromatogram แสดง peak ของพาราไอซอน

a คือ peak ของพาราไอซอนมาตรฐาน 5 μl .

b คือ peak ของสารตัวอย่าง 5 μl .

✓ วิธีคำนวณ สมมติว่าพาราไซออนมาตรฐาน 5 μl มีตัวยา 2 (ng)

จากสารมาตรฐาน พื้นที่ 1.17 ซม.² เกิดจากตัวยา 2 ng

$$\text{พื้นที่ } 0.9 \text{ ซม.}^2 \text{ เกิดจากตัวยา} = \frac{2 \times 0.9}{1.17} = 1.54 \text{ ng}$$

∴ สารตัวอย่างมีตัวยา 1.54 ng

แสดงว่าสารตัวอย่าง 5 μl มีตัวยา 1.54 ng

$$\therefore \text{สารตัวอย่าง } 10 \text{ มิลลิลิตร มีตัวยา} = \frac{1.54 \times 10000}{5} = 3080 \text{ ng}$$

∴ สารตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร มีตัวยา 3080 ng ด้วย

และสารตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร แบ่งมาจากตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร

$$\therefore \text{สารตัวอย่าง } 5 \text{ มิลลิลิตร มีตัวยา} = 3080 \times 5 = 15400 \text{ ng}$$

สารตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ลดปริมาณจาก 50 มิลลิลิตร

$$\therefore \text{สารตัวอย่าง } 50 \text{ มิลลิลิตร มีตัวยา} = 15400 \text{ ng}$$

$$\text{ถ้าสารตัวอย่างทั้งหมด } 150 \text{ มิลลิลิตร มีตัวยา} = \frac{15400 \times 150}{50} = 46200 \text{ ng}$$

$$= 46.2 \mu\text{g}$$

$$= 0.0462 \text{ mg}$$

เพิ่มตัวยาลงไป 0.05 มิลลิกรัม ตรวจพบ 0.0462 มิลลิกรัม

$$\therefore \text{ถ้าตัวยามีอยู่ } 100 \text{ มิลลิกรัม จะตรวจพบ} = \frac{0.0462 \times 100}{0.05} = 92.4 \text{ มิลลิกรัม}$$

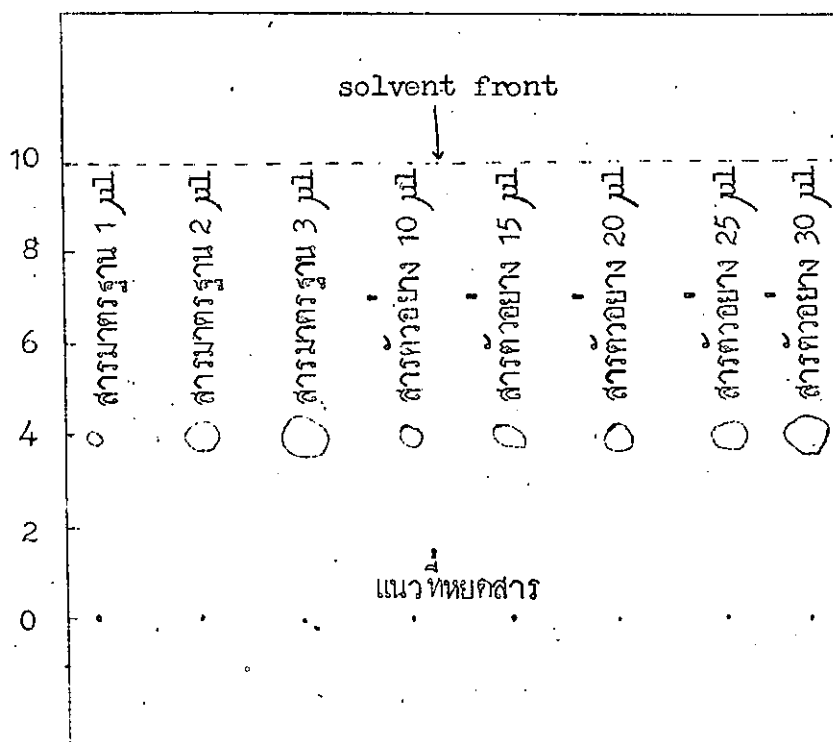
$$\therefore \text{recovery} = 92.4 \%$$

✓ TLC-method

วิธีทดลอง

1. เติม พาราไซออน 2 มิลลิกรัม ลงไปในฉีก แล้วนำไปสกัดด้วยสารละลายที่เหมาะสม หลังจากนั้นนำของเหลวที่สกัดมาได้ไปลดปริมาณให้เหลือ 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปหยดบน chromatoplate ขนาด 20 x 20 เซนติเมตร ในปริมาณต่าง ๆ เทียบกับสารมาตรฐาน จากนั้นนำไป develop ด้วย hexane : acetone (4:1) แล้ว spray ด้วย bromphenol blue reagent สมมติว่าจะได้ผลการทดลองดังภาพ 2

2. สมมุติว่าสารละลายมาตรฐานมีความเข้มข้น $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$
3. จากผลการทดลอง จุดของสารตัวอย่างที่หยดลงไป $25 \mu\text{l}$ จะมีขนาดและความเข้มของสี เท่ากับจุดของสารมาตรฐานซึ่งหยดลงไป $2 \mu\text{l}$



ภาพ 2 TLC-Chromatogram แสดงการหา recovery ของพาราเซโตน
เมื่อใช้ hexane:acetone (4:1) เป็น mobile solvent
และ spray ด้วย bromphenol blue reagent

การคำนวณ สารละลายมาตรฐาน $1 \mu\text{l}$ มีตัวยา $1 \mu\text{g}$

.. สารละลายมาตรฐาน $2 \mu\text{l}$ มีตัวยา $2 \mu\text{g}$

.. สารตัวอย่าง $25 \mu\text{l}$ มีตัวยา $2 \mu\text{g}$ ด้วย

หรือ สารตัวอย่าง 25 มิลลิลิตร มีตัวยา 2 มิลลิกรัม

.. สารตัวอย่าง 20 มิลลิลิตร มีตัวยา $= \frac{2 \times 20}{25} = 1.6$ มิลลิกรัม

เติมตัวยาลงไป 2 มิลลิกรัม ทรวจพบ 1.6 มิลลิกรัม

ถ้าเติมตัวยา 100 มิลลิกรัม จะทรวจพบ $= \frac{1.6 \times 100}{2} = 80$ มิลลิกรัม

.. recovery = 80 %

ผลการทดลอง

1. การทดลองหาวิธีสกัดวัฏมิพิษออกจากผัก

จากการทดลองสกัดวัฏมิพิษออกจากผักคะน้า โดยใช้สารละลายต่าง ๆ และนำไป clean-up เพื่อฉีดเข้าเครื่อง Gas Chromatograph หาปริมาณของวัฏมิพิษ ที่ recover เปรียบเทียบกับปริมาณที่เติมลงไปในผักก่อนการสกัด คำนวณ percent recovery ปรากฏผลดังนี้

✓ ตาราง 4 ผลการทดลองหาวิธีสกัดวัฏมิพิษจากผักคะน้า

การ ทดลองที่	ชนิดของวัฏมิพิษ	สารที่ใช้สกัด	สารที่ใช้ clean-up	percent recovery		
				ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
1	พาราไรดอน	ethyl acetate	cocoanut charcoal	2.4	2.28	2.34
2	พาราไรดอน	benzene	cocoanut charcoal	17.8	17.8	17.8
3	พาราไรดอน	methylene chloride	TLC-cleaned (bromine exposed)	2.03	1.79	1.91
4	พาราไรดอน	methylene chloride	TLC-cleaned (without bromine exposed)	86.96	92.10	89.53
5	พาราไรดอน	benzene	TLC-cleaned	96.10	101.95	99.02
6	พาราไรดอน	acetone	TLC-cleaned	81.19	80.10	80.64

ตาราง 4 (ต่อ)

การ ทดลองที่	ชนิดของวัตถุมีพิษ	สารที่ใช้สกัด	สารที่ใช้ clean-up	percent recovery		
				ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
7	พาราไอซอน	acetonitrile	TLC-cleaned	81.81	81.38	81.59
8	พาราไอซอน	ethyl acetate	ใช้เครื่อง sweep co-distiller	119.35	122.37	120.86
	มาลาไอซอน			93.54	87.96	90.75
	อีไอซอน			104.30	110.34	107.32
	ไดออกซินอน			125.21	117.87	121.54
	ไบทริน			78.57	86.23	82.40

หมายเหตุ การทดลองที่ 8 เป็นวิธีที่ใช้ทดลองในห้องปฏิบัติการ ของที่กวิจัยวัตถุมีพิษ

2. การทดลองหาวิธีตรวจสอบวัตถุมีพิษชนิดออร์กาโนฟอสฟอรัส

2.1 เมื่อใช้ Thin-Layer Chromatography ที่ดัดแปลงเป็น microslide technique ทำการตรวจสอบสารละลายมาตรฐานของวัตถุมีพิษ โดยใช้ solvent และ chromogenic reagent ต่าง ๆ เป็นจำนวน 20 system (ตามวิธีทดลอง ในบทที่ 3) ปรากฏดังนี้

ตาราง 5 ผลการทดลองตรวจสอบวัตถุที่มีพิษชนิดออร์กาโนฟอสฟอรัส
ด้วย Thin-Layer Chromatography

System	วัตถุที่มีพิษ	สี		Rf-value	Sensitivity, μg	หมายเหตุ
		สีของจุด	สีพื้น			
1	พาราไรซอน	เหลือง	น้ำเงิน	.69	5	ตรวจไม่ได้ผล
	มาลาไรซอน	เหลือง	น้ำเงิน	.62	5	
	อีไรซอน	เหลือง	น้ำเงิน	.72	2.5	
	โคอาซิโนน	เหลือง	น้ำเงิน	.85	5	
	ไบกริน	—	—	—	—	
2	พาราไรซอน	เหลือง	ชมพู	.46	2.5	ตรวจไม่ได้ผล
	มาลาไรซอน	น้ำเงิน	ชมพู	.60	2.5	
	อีไรซอน	—	—	—	—	
	โคอาซิโนน	—	—	—	—	
	ไบกริน	—	—	—	—	
3	พาราไรซอน	ฟ้า	น้ำเงิน	.63	2.5	ตรวจไม่ได้ผล
	มาลาไรซอน	ฟ้า	น้ำเงิน	.48	2.5	
	อีไรซอน	ฟ้า	น้ำเงิน	.63	2.5	
	โคอาซิโนน	ฟ้า	น้ำเงิน	.80	2.5	
	ไบกริน	—	—	—	—	
4	พาราไรซอน	เหลือง	ชมพู	.36	2.5	ตรวจไม่ได้ผล
	มาลาไรซอน	น้ำเงิน	ชมพู	.46	2.5	
	อีไรซอน	—	—	—	—	
	โคอาซิโนน	—	—	—	—	
	ไบกริน	น้ำเงิน	ชมพู	.06	2.0	

ตาราง 5 (ต่อ)

System	วัตถุที่มีพิษ	สี		Rf-value	Sensitivity, μg	หมายเหตุ
		สีของจุด	สีพื้น			
5	พาราไอซอน	เหลือง	น้ำเงิน	.87	2.5	ตรวจไม่ได้ผล
	มาลาไอซอน	เหลือง	น้ำเงิน	.88	2.5	
	อีไอซอน	เหลือง	น้ำเงิน	.96	2.5	
	โคอาซิโนน	เหลือง	น้ำเงิน	.94	2.5	
	ไบคริน	—	—	—	—	
6	พาราไอซอน	เหลือง	ชมพู	.80	2.5	
	มาลาไอซอน	น้ำเงิน	ชมพู	.80	2.5	
	อีไอซอน	น้ำเงิน	ชมพู	.94	2.5	
	โคอาซิโนน	น้ำเงิน	ชมพู	.54	5.0	
	ไบคริน	น้ำเงิน	ชมพู	.28	2.5	
7	พาราไอซอน	เหลืองอ่อน	ฟ้า	.50	2.0	
	มาลาไอซอน	เหลืองเข้ม	ฟ้า	.38	2.0	
	อีไอซอน	เหลืองเข้ม	ฟ้า	.54	2.0	
	โคอาซิโนน	เหลืองอ่อน	ฟ้า	.46	2.0	
	ไบคริน	—	—	—	—	
8	พาราไอซอน	เหลือง	ชมพู	.20, .40	2.0	จุดแรกสีเหลือง เข้มกว่าจุดที่ 2
	มาลาไอซอน	น้ำเงิน	ชมพู	.44	2.0	
	อีไอซอน	—	—	—	—	ตรวจไม่ได้ผล
	โคอาซิโนน	—	—	—	—	ตรวจไม่ได้ผล
	ไบคริน	น้ำเงิน	ชมพู	.20	2.0	

ตาราง 5 (ต่อ)

System	วัตถุที่มีพิษ	สี		Rf-value	Sensitivity, μg	หมายเหตุ
		สีของจุด	สีพื้น			
9	พาราไรซอน	ฟ้าอ่อน	น้ำเงิน	.54	2.0	ตรวจไม่ได้ผล
	มาลาไรซอน	ฟ้า	น้ำเงิน	.66	1.0	
	อีไรซอน	เหลืองเข้ม	น้ำเงิน	.48	2.0	
	โคอาซิโนน	ฟ้าอ่อน	น้ำเงิน	.50	2.0	
	ไบคริน	—	—	—	—	
10	พาราไรซอน	เหลือง	ชมพู	.46	2.0	ตรวจไม่ได้ผล
	มาลาไรซอน	น้ำเงิน	ชมพู	.56	2.0	
	อีไรซอน	ฟ้า	ชมพู	.60	2.0	
	โคอาซิโนน	—	—	—	—	
	ไบคริน	น้ำเงิน	ชมพู	.14	3.0	
11	พาราไรซอน	—	—	—	—	ตรวจไม่ได้ผล
	มาลาไรซอน	—	—	—	—	
	อีไรซอน	—	—	—	—	
	โคอาซิโนน	—	—	—	—	
	ไบคริน	—	—	—	—	
12	พาราไรซอน	เทา	ขาว	.64	1.0	ตรวจไม่ได้ผล
	มาลาไรซอน	เทา	ขาว	.34	1.0	
	อีไรซอน	เทา	ขาว	.44	1.0	
	โคอาซิโนน	เทา	ขาว	.55	2.0	
	ไบคริน	—	—	—	—	

ตาราง 5 (ต่อ)

System	วัตถุดิบพืช	สี		Rf-value	Sensitivity, μg	หมายเหตุ
		สีของจุด	สีพื้น			
13	พาราไซออน	เหลือง	ชมพู	.38	1.0	
	มาลาไซออน	เหลือง	ชมพู	.30	1.0	
	อีไซออน	เหลือง	ชมพู	.66	1.0	
	โคอาซิออน	เหลือง	ชมพู	.16	1.0	
	ไบคริน	เหลือง	ชมพู	.24	1.0	
14	พาราไซออน	น้ำเงิน	ขาว	.48	7.0	
	มาลาไซออน	น้ำเงิน	ขาว	.20	6.0	
	อีไซออน	น้ำเงิน	ขาว	.60	5.0	
	โคอาซิออน	น้ำเงิน	ขาว	.64	6.0	
	ไบคริน	น้ำเงิน	ขาว	.18	5.0	
15	พาราไซออน	ขาว	เหลือง	.42	2.0	
	มาลาไซออน	ขาว	เหลือง	.52	1.0	
	อีไซออน	ขาว	เหลือง	.26	1.0	
	โคอาซิออน	ขาว	เหลือง	.78	2.0	
	ไบคริน	ขาว	เหลือง	.28	2.0	
16	พาราไซออน	ขาว	เหลือง	.64	3.0	
	มาลาไซออน	เหลืองแก	เหลือง	.30	3.0	
	อีไซออน	เหลืองแก	เหลือง	.66	3.0	
	โคอาซิออน	ขาว	เหลือง	.58	3.0	
	ไบคริน	ขาว	เหลือง	.27	1.0 - 2.0	

ถ้าอบใบมีนานๆ
จะได้น้ำสีชมพู

ตาราง 5 (ต่อ)

System	วัตถุดิบพืช	สี		Rf-value	Sensitivity, μg	หมายเหตุ
		สีของจุด	สีพื้น			
17	พาราไซซอน	เหลือง	ชมพู	0	2.5	ตรวจไม่ได้ผล ตรวจไม่ได้ผล
	มาลาไซซอน	น้ำเงิน	ชมพู	0	1.0	
	อีไซซอน	—	—	—	—	
	โคอาซินอน	—	—	—	—	
	ไบคริน	น้ำเงิน	ชมพู	0	1.0	
18	พาราไซซอน	ขาว	ชมพู	.66	2.0 — 3.0	
	มาลาไซซอน	ขาว	ชมพู	.34	0.5	
	อีไซซอน	ขาว	ชมพู	.64	1.0	
	โคอาซินอน	ขาว	ชมพู	.57	1.0	
	ไบคริน	ขาว	ชมพู	.28	4.0	
✓ 19	พาราไซซอน	เหลือง	น้ำเงิน	.40	0.4	เป็น system ที่ดีที่สุด ความหลักเกณฑ์ ที่ควรใช้ ในข้อ 3.2.1 บทที่ 3
	มาลาไซซอน	เหลือง	น้ำเงิน	.26	0.4	
	อีไซซอน	เหลือง	น้ำเงิน	.60	0.2	
	โคอาซินอน	เหลือง	น้ำเงิน	.71	1.0	
	ไบคริน	เหลือง	น้ำเงิน	.28	1.5	
20	พาราไซซอน	เหลือง	ขาว	.46	2.0	
	มาลาไซซอน	เหลือง	ขาว	.26	0.5 — 1.0	
	อีไซซอน	เหลือง	ขาว	.74	0.3 — 0.4	
	โคอาซินอน	เหลือง	ขาว	.30	4.0	
	ไบคริน	เหลือง	ขาว	.47	0.5	

2.2 ผลการตรวจสอบวัฏภูมิพิษด้วย Schöenemann Reaction โดยใช้สารเคมี 4 ชนิด คือ indole-perborate reagent, o-dianisidine-perborate reagent, sodium perborate-dianisidine molybdate และ luminol-perborate reagent ทดลองกับสารละลายมาตรฐานของวัฏภูมิพิษในปริมาณต่าง ๆ กันได้ผลดังนี้,

ตาราง 6 ผลการตรวจสอบวัฏภูมิพิษด้วย Schöenemann Reaction

สารเคมีที่ใช้ตรวจสอบ (indicator)	วัฏภูมิพิษ	Sensitivity, μg	สี	หมายเหตุ
1. indole-perborate reagent	พาราไอซอน	5	เหลืองใส	ควบคุมพื้นสีขาว และจะเกิดสีเมื่อทิ้งไว้ข้างคืน
	มาลาไอซอน	—	ไม่มีสี	
	อีไอซอน	—	ไม่มีสี	
	โคอาซินอน	—	ไม่มีสี	
	ไบกริน	—	ไม่มีสี	
	(blank)	—	ไม่มีสี	
2. o-dianisidine-perborate reagent	พาราไอซอน	—	น้ำตาลปนเหลือง	ทดลองทิ้งไว้ข้างคืน
	มาลาไอซอน	—	น้ำตาลปนเหลือง	
	อีไอซอน	—	น้ำตาลปนเหลือง	
	โคอาซินอน	—	น้ำตาลปนเหลือง	
	ไบกริน	—	น้ำตาลปนเหลือง	
	(blank)	—	น้ำตาลปนเหลือง	

ตาราง 6 (ต่อ)

สารเคมีที่ใช้ตรวจสอบ (indicator)	วัตถุดิบพิษ	Sensitivity, µg	สี	หมายเหตุ
3. sodium perborate-dianisidine molybdate reagent	พาราไอซอน	2	เหลืองใส*	
	มาลาไอซอน	—	น้ำตาลปนแดง	
	อีไอซอน	—	น้ำตาลปนแดง	
	โคอาซิโนน	—	น้ำตาลปนแดง	
	ไบคริน	—	น้ำตาลปนแดง	
	(blank)	—	น้ำตาลปนแดง	
4. luminol-perborate reagent	พาราไอซอน	4	เหลืองใส	ทดลองทิ้งไว้ ค้างคืน
	มาลาไอซอน	—	ไม่มีสี	
	อีไอซอน	—	ไม่มีสี	
	โคอาซิโนน	—	ไม่มีสี	
	ไบคริน	—	ไม่มีสี	
	(blank)	—	ไม่มีสี	

* สำหรับพาราไอซอนเมื่อนำไป heat จะได้สารละลายสีเหลืองใส ซึ่งวัตถุดิบพิษอีก 4 ชนิด รวมทั้ง blank จะไม่มีสี แต่เมื่อหยด o-dianisidine molybdate reagent ลงไป 2 หยด สารละลายที่มีพาราไอซอนจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลปนแดงเมื่อทิ้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที ส่วนสารละลายที่มีมาลาไอซอน, อีไอซอน, โคอาซิโนน และไบคริน รวมทั้ง blank เมื่อหยด reagent ลงไป จะเปลี่ยนเป็นสารละลายสีเหลืองใสทันที และเมื่อทิ้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที ก็เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลปนแดงเช่นเดียวกัน

3. การทดลองหา recovery เพื่อประสิทธิภาพของวิธีการทดลอง

จากการทดลองหาวิธีสกัดวัตถุที่มีพิษออกจากผักคะน้าตามการทดลองในบทที่ 3 ข้อ 3.1.4 ปรากฏจากผลการทดลองในบทที่ 4 ตาราง 4 การทดลองครั้งที่ 5 ว่า เมื่อสกัดพาราไซออนด้วย benzene จะได้ percent recovery มากที่สุด (99.02 %) ดังนั้นจึงเลือกการสกัดโดยใช้ benzene เป็นวิธีสกัดที่เหมาะสมสำหรับวัตถุที่มีพิษพวกออร์กาโนฟอสฟอรัส

และจากการทดลองหาวิธีตรวจวัตถุที่มีพิษพวกออร์กาโนฟอสฟอรัสในบทที่ 3 ข้อ 3.2 ปรากฏว่าการตรวจแบบ Thin-Layer Chromatography ใน system ที่ 19 (จากตาราง 5) คือใช้ hexane/acetone (4/1) เป็น mobile solvent แลวนำไปอบด้วยโบรมีน หลังจากนั้น spray ด้วย bromphenol blue spray reagent เป็นวิธีตรวจที่ได้ผลดีที่สุด คือสามารถตรวจวัตถุที่มีพิษได้ทั้ง 5 ชนิด, Rf-value ของวัตถุที่มีพิษแต่ละชนิดไม่เท่ากัน และมี sensitivity ดีที่สุด

เมื่อทดลองสกัดวัตถุที่มีพิษทั้ง 5 ชนิด จากผักคะน้าด้วย benzene แลวนำไปตรวจแบบ TLC system 19 คำนวณหา percent recovery ได้ผลดังนี้

หมายเหตุ ปริมาณน้อยที่สุดของวัตถุมีพิษแต่ละชนิดที่สกัดจากผักคะน้าด้วย benzene และ
ตรวจด้วย TLC system 19 มีดังนี้

พาราไซออน 0.15 ppm

มาลาไซออน 0.10 ppm

อีไซออน 0.07 ppm

ไดอาซินอน 0.19 ppm

ไบคริน 0.25 ppm

4. การทดลองตรวจวัตถุมีพิษที่ตกค้างในผักคะน้าจากตลาด

ปริมาณผักคะน้าที่ใช้ : 100 กรัม

สารที่ใช้สกัด : benzene (100 มิลลิลิตร/ตัวอย่าง 100 กรัม)

ปริมาตรครั้งสุดท้าย : 1 มิลลิลิตร

สารที่ใช้ clean-up : -

วิธีตรวจ : Thin-Layer Chromatography

— mobile solvent : hexane/acetone (4/1)

— chromogenic reagent : อนุพันธ์โบรมีน

แลวพินควาย bromphenol blue spray reagent

ตาราง 8 ผลการตรวจผักคะน้าจากตลาดด้วย TLC

ครั้งที่	ปริมาณสารตัวอย่างที่หยดลงไป	Rf-value
1	40 μ l	.38
2	50 μ l	.43
เฉลี่ย		.405

จากค่า $R_f = .405$ ปรากฏว่าเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับค่า R_f ของพาราไอซอน (ตาราง 5, system 19) เมื่อทดลองแยกตัวอย่างนี้ไป clean-up ด้วย TLC-cleaned procedure แล้วตรวจโดยใช้ GLC ปรากฏว่าตัวอย่างนี้ก็มีพาราไอซอนอยู่ เป็นการยืนยันผลการตรวจด้วย TLC

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

การทดลองศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ คือ

1. เพื่อศึกษาหาวิธีการที่ใช้ได้สะดวกรวดเร็วในการตรวจวัดปริมาณฟอสฟอรัสในพืชผักในผัก
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการนั้น ๆ โดยการหา sensitivity และ recovery

วิธีดำเนินการทดลอง

1. กลุ่มตัวอย่าง

- 1.1 วัตถุดิบพืชที่นำมาทดลองหาวิธีตรวจสอบ คือสารประกอบพวกออร์กาโน-ฟอสฟอรัส 5 ชนิด ได้แก่ พาราไรออน มาลาไรออน อีไรออน ไดอาซินอน และไบกริน
- 1.2 ผักที่ใช้ทดลองคือผักคะน้า ซึ่งปลูกขึ้นเองโดยไม่ฉีดยาฆ่าแมลงใด ๆ และผักที่เก็บตัวอย่างจากตลาดอมรพันธ์ บางเขน เพื่อทดลองหาวิธีตรวจวัดปริมาณฟอสฟอรัสในผักนั้นใช้กับตัวอย่างจริงได้หรือไม่

2. เครื่องมือที่ใช้

- 2.1 การตรวจวัดด้วย Thin-Layer Chromatography ใช้เครื่องมือขนาดเล็ก คือ

- chromatographic tank ใช้ขวดแก้วรูปทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร สูง .9 เซนติเมตร
- chromatoplate ใช้ microslide ขนาด 7.5 x 2.5 เซนติเมตร
- capillary tube ใช้หยดสารตัวอย่างลงบน chromatoplate

- spray bottle ใช้ขวดฉีดน้ำที่ทำด้วย polyethylene (ที่ใช้ฉีดน้ำกล้วยไม้) แทนได้

2.2 การตรวจเพื่อยืนยันผลการตรวจด้วย TLC ใช้วิธีตรวจด้วยเครื่อง Gas Chromatograph ชนิด flame photometric detector (FPD) ซึ่งมี column บรรจุด้วย 10 % DC-200 on 100/120 mesh GAS-CHROM Q อุณหภูมิของ column $190^{\circ} - 195^{\circ}\text{C}$ อุณหภูมิของ detector 180°C carrier gas คือไนโตรเจน ซึ่งมีอัตราการไหล $90 - 100 \text{ cm}^3/\text{นาที}$ ก๊าซที่ใช้ในการจุดเปลวไฟคือ

- ไฮโดรเจน อัตราการไหล $150 \text{ cm}^3/\text{นาที}$
- อากาศ อัตราการไหล $40 \text{ cm}^3/\text{นาที}$
- ออกซิเจน อัตราการไหล $20 \text{ cm}^3/\text{นาที}$

3. การดำเนินการทดลอง ทดลองเป็นขั้น ๆ ดังนี้

3.1 ทดลองหาวิธีสกัดวัตถุที่มีพิษออกจากผัก โดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ทดลองจนหาวิธี clean-up ที่เหมาะสม แล้วตรวจวัตถุที่มีพิษที่ recover ด้วยเครื่อง Gas Chromatograph ชนิด FPD

3.2 ทดลองหาวิธีตรวจสอบวัตถุที่มีพิษพวกออร์กาโนฟอสฟอรัส

3.2.1 ใช้ TLC โดยคัดแปลงใช้เครื่องมือที่มีขนาดเล็ก สะดวกในการใช้ ง่าย และราคาไม่แพงนัก

3.2.2 ใช้ Schöenemann reaction โดยใช้ปฏิกิริยาเคมีของสารบางชนิดที่จะเกิดสีกับสารอินทรีย์พวกฟอสฟอรัส

3.3 ทดลองหา recovery เพื่อหาประสิทธิภาพของวิธีทดลอง โดยเติมวัตถุที่มีพิษที่ทราบปริมาณลงไปในผักคะน้า แล้วใช้วิธีสกัดและ clean-up ที่เลือกมาจากการทดลองในข้อ 3.1 ตรวจสอบวัตถุที่มีพิษที่ recover โดยใช้วิธีตรวจที่เลือกมาจากการทดลองในข้อ 3.2 เปรียบเทียบกับการตรวจด้วยเครื่อง Gas Chromatograph ชนิด FPD

3.4 ทดลองกับตัวอย่างผักคะน้าจากตลาด นำผักคะน้ามา 100 กรัม สกัดและ clean-up ด้วยวิธีที่เลือกมาจากการทดลองในข้อ 3.1 ตรวจด้วยวิธีที่เลือกมาจากการทดลองในข้อ 3.2 แล้วเปรียบเทียบกับผลการตรวจด้วยเครื่อง Gas Chromatograph ชนิด FPD

4. การวิเคราะห์ข้อมูลจากการทดลอง

4.1 การเลือกวิธีสกัดวัฏุมิพิษออกจากผัก เลือกจากวิธีที่ให้ recovery สูงที่สุด

4.2 การเลือกวิธีตรวจวัดวัฏุมิพิษชนิดออร์กาโนฟอสฟอรัส เลือกวิธีที่มี sensitivity ที่สูงที่สุดคือสามารถตรวจในปริมาณที่น้อยที่สุด และใช้ตรวจวัดวัฏุมิพิษได้ครบทั้ง 5 ชนิดที่ทำการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

1. จากการทดลองหาวิธีสกัดวัฏุมิพิษออกจากผักกะน้า ปรากฏผลดังนี้

1.1 จากการทดลองใช้ตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ คือ ethyl acetate, benzene, methylene chloride, acetone และ acetonitrile สกัดพาราไรซอนออกจากผัก เพื่อดูว่าสารเคมีชนิดใดที่จะสกัดพาราไรซอนออกจากผักกะน้าได้ดีที่สุด ปรากฏว่าการสกัดด้วย benzene ให้ recovery สูงสุดคือ 99.02 % รองลงมาคือ methylene chloride (89.53 %)

1.2 การทดลอง clean-up

1.2.1 clean-up ด้วย coconut charcoal

ก. เมื่อทดลองสกัดด้วย ethyl acetate จะได้ recovery ค่ามากที่สุด 2.34 % (ตาราง 4 การทดลองครั้งที่ 1)

ข. เมื่อเปลี่ยนมาสกัดด้วย benzene ซึ่งจะช่วยให้สารเคมีในวัฏุมิพิษ stable มากขึ้น แต่ก็ยังได้ recovery ไม่ดีนัก โดยเฉพาะพาราไรซอนซึ่งเป็นวัฏุมิพิษที่สำคัญและใช้กันแพร่หลาย มี recovery เพียง 17.8 % เท่านั้น

1.2.2 clean-up ตามวิธีของ Abbott (Abbott, 1967:170-175) คือใช้ TLC-cleaned procedure

ก. สกัดด้วย methylene chloride แล้วใช้ TLC-cleaned procedure จากนั้นนำไปอบด้วยโบรมีน เพื่อดูว่าวัฏุมิพิษแต่ละชนิดถูก elute ขึ้นไปอยู่ในระดับใด แล้วหุ้กเอา silica gel บริเวณนั้นไป elute ด้วยสารละลายของ hexane/acetone นำไปฉีด GLC ปรากฏว่าได้ recovery เพียง 1.91 %

ข. สกัดด้วย methylene chloride แล้วใช้ TLC-cleaned procedure แต่ไม่นำไปอบไบรมีน โดยชุดเอา silica gel บริเวณใกล้เส้นกับระยะที่สารมาตรฐานถูก elute (เปรียบเทียบกับค่า Rf ของสารมาตรฐาน) ผลการทดลองจะได้ recovery สูงขึ้นมาก คือ 89.53 % แสดงว่าการ clean-up ด้วย TLC โดยไม่อบไบรมีนช่วยให้ percent recovery คี้น

สรุปได้ว่าการทดลองสกัดและ clean-up ด้วยวิธีต่าง ๆ วิธีสกัดด้วย benzene เป็นวิธีที่จะนำไปใช้สกัดที่มีพิษชนิดออร์กาโนฟอสฟอรัสออกจากผัก ซึ่งจะตรวจโดยวิธี TLC ได้โดยไม่ต้องมีการ clean-up ส่วน TLC-cleaned procedure นั้นจะใช้เมื่อต้องการตรวจด้วย GLC เท่านั้น

2. จากการทดลองตรวจวัตถุที่มีพิษชนิดออร์กาโนฟอสฟอรัส 2 วิธี คือ

2.1 ใช้ microslide technique ของ Thin-Layer Chromatography

ผลปรากฏว่าการทดลองตรวจด้วย TLC จำนวน 20 system เลือกได้ system ที่ดีที่สุดคือ system 19 (ตาราง 5) ซึ่งใช้ silica gel G เป็น adsorbent, hexane/acetone (4/1) และ benzene/acetone (3/2) เป็น mobile solvent ส่วน chromogenic reagent ใช้ย้อมด้วยโบรมีน ตามด้วย bromphenol blue spray reagent ซึ่ง system นี้จะตรวจวัตถุที่มีพิษได้ทั้ง 5 ชนิด ให้จุดสีเหลืองบนพื้นสีน้ำเงินชัดเจน มี Rf-value ต่างกัน และมี sensitivity ที่ดีที่สุด ดังนี้

	พาราไรซอน	มาลาไรซอน	อีไรซอน	ไดอาซินอน	โบควิน
sensitivity, μg	0.4	0.4	0.2	1.0	1.5
percent recovery	99.02	56.86	96.94	69.45	65.79

2.2 ใช้ Schöenemann reaction

การทดลองใช้ Schöenemann reaction นั้น ได้ผลกับพาราไรซอนเพียงชนิดเดียว และ sensitivity ไม่ดีเท่าการตรวจด้วย GLC

3. จากการทดลองหา recovery ที่ใช้ benzene สกัดวัฏมีพิษออกจากผัก แล้วนำไปตรวจสอบด้วย TLC system 19 และตรวจด้วยเครื่อง Gas Chromatograph ชนิด FPD (โดยก่อนฉีด GLC ใช้ TLC-cleaned procedure เป็นการ clean-up เสียก่อน) ปรากฏว่าเมื่อเทียบผลการทดลองกับวิธีการที่ใช้ในห้องปฏิบัติการของศีกวิจัยวัฏมีพิษ ได้ผลต่ำกว่าเล็กน้อย ดังนี้ (คัดจากราง 7)

	percent recovery จากการตรวจด้วย TLC		percent recovery จากการตรวจด้วย GLC	
	a *	b **	a *	b **
พาราไอซอน	97.56	106.6	99.02	120.86
มาลาไอซอน	83.33	90.0	56.86	90.75
อีไอซอน	65.00	96.0	96.94	107.32
ไดออกซินอน	94.91	100	69.45	121.54
ไบครีน	85.71	66.6	65.79	82.40

* a หมายถึง ตัวอย่างจากการสกัดด้วย benzene และหาตรวจด้วย GLC ต้องนำไป clean-up ด้วย TLC-cleaned procedure เสียก่อน

** b หมายถึง ตัวอย่างจากการสกัดและ clean-up โดยใช้วิธีการที่ใช้อยู่เป็นประจำที่ศีกวิจัยวัฏมีพิษ

4. เมื่อทดลองสกัดและตรวจวัฏมีพิษกับตัวอย่างผักคะน้าจากตลาด ผลปรากฏว่าสามารถตรวจพบพาราไอซอนโดยใช้วิธีที่ไดจากการค้นคว้าทดลองครั้งนี้ (ตาราง 8) คือ สกัดด้วย benzene และตรวจด้วย TLC ใช้ hexane/acetone (4/1) เป็น mobile solvent, อบด้วยไอรอน แล้ว spray ด้วย bromphenol blue spray reagent

อภิปรายผลการทดลอง

1. ไบครินมี Rf-value = 0 เมื่อใช้ hexane/acetone เป็น mobile solvent แสดงว่า solvent นี้ไม่สามารถ elute ไบครินได้ เพราะไบครินไม่ละลายใน hexane แต่จะละลายได้ใน benzene ดังนั้นเมื่อเปลี่ยนไปใช้ benzene/acetone เป็น mobile solvent จึงสามารถ elute ไบครินได้ มี Rf-value .28 ซึ่งถ้าใช้ hexane/acetone ก็ไม่ทราบว่าจะเป็นไบครินจริงหรือไม่ เพราะอาจมีวัตถุดิบพิษชนิดอื่นที่ hexane/acetone ไม่สามารถ elute ได้เช่นเดียวกับไบคริน
2. การใช้ cocoanut charcoal ในการ clean-up จะได้ recovery ต่ำมาก เพราะนอกจากจะดูดสีได้แล้ว cocoanut charcoal ยังมีคุณสมบัติในการดูดสารเคมีซึ่งอยู่ในวัตถุดิบพิษนั้น ๆ ได้
3. ในการอบ chromatoplate ด้วยโบรมีน เป็นการทำให้ sulfur analog ของสารเคมีในวัตถุดิบพิษถูกโบรมีน oxidized ให้กลายเป็น oxon (El-Rafai and Hopkins, 1965 : 479)
ดังนั้นเมื่ออบด้วยโบรมีนจะทำให้เกิด oxidation ทำให้ sulfur analog เปลี่ยนเป็น oxygen analog เมื่อตรวจด้วยเครื่อง Gas Chromatograph จึงพบว่ามี recover น้อยได้ percent recovery ต่ำมาก
4. การตรวจวัตถุดิบพิษพวกออร์กาโนฟอสฟอรัสที่เลือกได้จากการค้นคว้าทดลองครั้งนี้ แม้จะเป็นวิธีที่ตรวจไม่ได้ละเอียดมากเหมือนกับการตรวจด้วย GLC คือมี sensitivity ของพาราไอซอน = 0.4 μg , ของมาลาไอซอน = 0.4 μg , อีไอซอน = 0.2 μg , ไดอาซินอน = 1 μg และไบคริน = 1.5 μg แต่ก็นับว่าเป็นวิธีตรวจที่มี sensitivity เพียงพอที่จะใช้ตรวจวัตถุดิบพิษได้ตามขีดความจำเป็นของการใช้ในชีวิตประจำวันตามความมุ่งหมายที่ทั้งไว้ เพราะยังสามารถตรวจถึงระดับค่าความปลอดภัย (Tolerance) ของวัตถุดิบพิษแต่ละชนิดได้
5. สำหรับ Schöenemann reaction นั้น จากการทดลองพบว่าใช้ตรวจได้เฉพาะพาราไอซอนเท่านั้น ทั้งนี้เนื่องมาจากการควบคุมปฏิกิริยาทำได้ยาก เพราะปฏิกิริยานี้ขึ้นอยู่กับ condition หลายอย่าง เช่น (Foziomak and Crabtree, 1973 : 60)

- pH ของสารละลาย pH ที่เหมาะสมที่จะให้สีชัดเจนคือ 9.0 - 11.5 โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้ o-dianisidine เป็น indicator ระดับ pH มีความสำคัญมาก

- ความเข้มข้นของ indicator จะต้องเหมาะสม และมีจำนวน mole พอติดกับสารที่จะตรวจ เช่นถ้าใช้ o-dianisidine ตรวจ GB (sarin) ก็จะต้องให้ dianisidine มีจำนวน mole เป็น 4 เท่าของ GB จึงจะเกิดสีได้

- solvent effect ปกติปฏิกิริยานี้จะมี sensitivity ที่ขึ้นเมื่อทดลองใน acetone ได้มีนักวิทยาศาสตร์หลายคนได้ศึกษาเกี่ยวกับเรื่องนี้ และได้สรุปต่าง ๆ กันออกไป ในปี 1956 D.N. Kramer และผู้ร่วมงานคือ B.W. Fromm และ T. Golstein ได้สรุปว่า เมื่อเกิด interaction ระหว่าง perhydroxyl ion (OOH^-) จาก alkaline peroxide และ carbonyl group ของ acetone จะเกิด acetone-peroxide complex ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับสารประกอบพวกออร์กาโน-ฟอสฟอรัสได้เร็วกว่า peroxide ท่อมา H.F. Bell แห่งมหาวิทยาลัยเคเลาแวร์ ได้ทำวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาเอก ในปี 1968 พบว่า acetone จะเป็นสารที่กระตุ้นปฏิกิริยาได้เกิดทั้ง formation และ decomposition ของ intermediate peroxyphosphonate จึงทำให้เกิดสีได้ดีขึ้น

ดังนั้นการที่จะทดลอง Schöenemann reaction ให้ได้ผลดีจะต้องทดลองด้วยความระมัดระวังเป็นพิเศษ ซึ่งอาจเป็นวิธีการที่ยุ่งยากเกินไปในอันที่จะนำมาใช้ในชีวิตประจำวัน

6. ในการทดลองบางครั้งปรากฏว่าได้ percent recovery เกิน 100 % ทั้งนี้เนื่องจากในระหว่างการทดลองจะเกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ เช่น oxidation, reduction ระหว่างวัตถุมีพิษกับสารเคมีที่ใช้สกัดหรือสารเคมีที่ใช้ในการ clean-up ทำให้เกิด product ที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับวัตถุมีพิษนั้น ๆ เมื่อตรวจดูจึงพบว่าปริมาณที่ recover มีมากกว่าปริมาณที่เติมลงไป

ข้อเสนอแนะเพื่อการศึกษาคนควาต่อไป

1. ควรจะได้มีการศึกษาคนควาวิธีทดลองสกัดและวิธีตรวจอย่างง่าย ๆ ที่จะใช้กับวัตถุที่มีพิษชนิดอื่น ๆ ที่นิยมใช้เป็นยาฆ่าแมลง เช่นสารประกอบคลอรีนไฮโดรคาร์บอน เพื่อจะได้นำไปใช้ตรวจวัตถุที่มีพิษได้กว้างขวางขึ้น
2. ควรมีการทดลองนำวิธีสกัดและวิธีตรวจที่ได้จากการศึกษาคนควาครั้งนี้ไปทดลองกับตัวอย่างจริง คือ ผักจากตลาดหลาย ๆ แห่ง เพื่อจะได้ทดลองว่าวิธีนี้ใช้กับวัตถุที่มีพิษชนิดอื่นซึ่งตกค้างในผักได้ผลหรือไม่ เนื่องจากตัวอย่างที่นำมาจากตลาดคอมพิวเตอร์ตรวจพบพาราไซออนแต่เพียงอย่างเดียว
3. นอกจากจะทดลองสกัดวัตถุที่มีพิษจากผักคะน้า ควรจะได้มีการทดลองสกัดจากผักชนิดอื่น ๆ ตลอดจนผลไม้ต่าง ๆ ด้วย
4. benzene มีกลิ่นฉุนแรง และค่อนข้างจะเป็นพิษหากใช้อย่างไม่ระมัดระวัง ดังนั้นอาจจะเปลี่ยนไปใช้ methylene chloride ในการสกัดแทน benzene ได้ เพราะการสกัดพาราไซออนด้วย methylene chloride จากที่ได้ทดลองไปแล้วนั้น ก็มี recovery สูงพอควรคือ 89.53 % จึงควรมีการทดลองใช้ methylene chloride สกัดวัตถุที่มีพิษชนิดอื่น ๆ เพื่อความี recovery สูงพอหรือไม่ โดยลดมากน้อยเพียงใด

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

จิตระการ เอกกมลกุล การตรวจหาปริมาณวัตถุมีพิษชนิดออร์แกนโนฟอสเฟตบางชนิด
ที่ตกค้างในผักกาดหอม ผักคะน้า และผักง้วน ปริญญาโท กศ.ม.
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร 2518, 75 หน้า.

ชัยโณ เพ็ญชาติ และคนอื่น ๆ "อภิปรายเรื่องพิษ" วารสารกรมการแพทย์และอนามัย
4(3) : 311 - 330, พฤษภาคม - มิถุนายน 2517.

ประยูร กีมา วัตถุมีพิษที่ใช้ในการเกษตรและสาธารณสุข พระนคร 2517, 513 หน้า.

วิเชียร ณัฐวัฒนานนท์ "ค่าความปลอดภัยของวัตถุมีพิษในผลิตภัณฑ์เกษตรกรรมและอาหาร"
เอกสารการทบทวนวิจัยวัตถุมีพิษ 3 : 10 - 17, เมษายน 2520.

สงวน หอมไกลลาศ "การควบคุมยาปราบศัตรูพืชกับสุขภาพของประชาชน" เอกสารวิจัย
ส่วนบุคคล กองทัพอากาศ คอนเมือง พระนคร 2509 - 2510, 47 หน้า.

อมรา วงศ์พิทักษ์ "ยาฆ่าแมลงในอาหาร" วารสารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
15 (1 - 2) : 1 - 19, 2516.

Abbott, D.C., and Egan, H., "Determination of Pesticides of Organo-
phosphorus Pesticide on Food, A review", The Analyst 92
(1097) : 475 - 489, August, 1967.

Abbott, D.C., and others, "A Thin-Layer Chromatographic Screening
Test for Organophosphorus Pesticide Residues", The Analyst
92 (1092) : 170 - 175, March, 1967.

Akhrem, Afanasil Andreevich, and Kuznetsova, A.I., Thin-Layer
Chromatography, A practical laboratory handbook, Israel
Program for Scientific Translations, Jerusalem, 1965, 120 pp.

Analytical Abstracts (issued by The Society of Analytical Chemistry),
"Determination of Some Organophosphorus Insecticide by TLC",
W. Heffer & Sons Ltd., Cambridge England, 13 (11) : Abstr.
6602, November, 1966.

- Analytical Abstracts, "Spectrophotometric determination of organophosphorus pesticides after separation by thin-layer chromatography", The Chemical Society, 28(2) : 2 G 22, 1975.
- Bates, J.A.R., "A General Method for the Determination of Organophosphorus Pesticide Residues in Foodstuffs", The Analyst 90 (1073) : 453 - 466, August, 1965.
- Burchfield, H.P., and Storrs, Eleanor E., "Analysis for Organophosphorus Insecticides and Metabolites", Journal of Chromatographic Science 13(5) : 209, May, 1975.
- Canada Food and Drug Directorate, Analytical Methods for Pesticide in Foods, The Honourable Marc Lalonde Minister of National Health and Welfare, 1973, (loose leaf).
- Chilwell, E.D., and Hartley, G.S., "Methods for Determination of Residual Organophosphorus Insecticide", Analyst 86 (1019) : 153, February, 1961.
- CIPAC handbook, Analysis of Technical and Formulated Pesticides, compiled by Ashworth, R.DEB, Henriot, J., and Lovett, J.F., Collaborative International Pesticides Analytical Council Limited, 1970, 1079 pp.
- El-Rafai, A., and Hopkins, T.L., "Thin-Layer Chromatography and Cholinesterase Detection of Several Phosphorothiono Insecticides and Their Oxygen Analogs", Journal of Agricultural Food Chemistry 13(5) : 479, September-October, 1965.
- Food and Drug Administration (U.S. Department of Health Education and Welfare), "Microslide Technique" and "Organophosphate Residue", Pesticide Analytical Manual Volume I, Section 413.1 and 431.2 b, 1969, (loose leaf).
- Gehauf, Bernard, and Goldenson, Jerome, "Detection and Estimation of Nerve Gases by Fluorescence Reaction", Analytical Chemistry 29(2) : 276 - 278, February, 1957.
- Gehauf, Bernard, and others, "Reaction for Colorimetric Estimation of Some Phosphorus Compounds", Analytical Chemistry 29 (2) : 278, February, 1957.
- Getz, Melvin E., and Wheeler, Helen G., "Thin-Layer Chromatography of Organophosphorus Insecticides with Several Adsorbents and Ternary Solvent System", Journal of Association Official Analytical Chemists 51(5) : 1101 - 1107, September, 1968.
- Goldenson, Jerome, "Detection of Nerve Gases by Chemiluminescence", Analytical Chemistry 29(6) : 877 - 878, June, 1957.

- Grant, G.A., Blandchfield, R., and Smith, D. Morison, "Triarylmethane Compounds as Redox Indicators in the Schöenemann Reaction", Canadian Journal of Chemistry 35(1) : 40 - 47, January, 1957.
- Guilfrida, L., and Ives, Fred, "Investigation of Two Gas Chromatographic Techniques for the Determination of Organophosphate Pesticides", Journal of Association Official Analytical Chemists 47(6) : 1112 - 1116, December, 1964.
- Günther, Francis A. ed., Residue Review Volume 11, Springer-Verlag New York Inc., 1967, 164 pp.
- Günther, Francis A. ed., Residue Review Volume 18, Springer-Verlag New York Inc., 1967, 227 pp.
- Kirchner, Justus G., Thin-Layer Chromatography (T.O.C., V 12), Interscience Publishers, 1967, 788 pp.
- Kovacs, Martin F., Jr., "Thin-Layer Chromatography for Organophosphate Pesticide Residue Determination", Journal of Association Official Analytical Chemists 47(6) : 1097 - 1098, December, 1964.
- Long, Cyril, Biochemists' Handbook, D. Van Nostrand Company Inc., Princeton, New Jersey, 1961, 1192 pp.
- Martin, Hubert, Pesticide Manual, British Crop Protection Council, 1st ed., 1968, 464 pp.
- Pardue, John R., "Recovery of Organophosphates by Using the AOAC Method", Journal of Association Official Analytical Chemists 54(2) : 359 - 360, February, 1971.
- Poziomok, Edward J., and Crabtree, Eleanor V., "Organic Reaction", Journal of Association Official Analytical Chemists 56(1) : 56 - 62, January, 1973.
- Prayoon Deema, Pesticide Dictionary, Department of Agriculture, 1967, 157 pp.
- Randerath, Kurt, Thin-Layer Chromatography, Verlag Chemie Academic Press, New York and London, 1968, 285 pp.
- Smith, Ivor, Paper & Thin-Layer Chromatography and Electrophoresis, Shandon Scientific Company Ltd., London N.W. 10 England, 1965, 241 pp.
- Stahl, Egon, TLC, a laboratory Handbook, translated by MRF Ashworth, Springer-Verlag, 1965, 553 pp.

Stahl, Egon, Thin-Layer Chromatography, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1969, 1041 pp.

The Hague, Report of the Eighth Session of the Codex Committee on Pesticide Residue, Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Alimentarius Commission, Eleventh Session 1976, 3 - 8 March, 1975, 91 pp.

Trutet, E. Vernon, Thin Film Chromatography, Interscience Publishers, New York 16 N.Y., 1963, 205 pp.

Versino, B., Vander, M-TH, and Vissers, H., "Comparison of Some Clean-up Columns for Residue Analysis of Chlorinated and Phosphorus Containing Pesticides", Journal of Association Official Analytical Chemists 54(1) : 147 - 149, January, 1971.

Walker, K.C., and Beroza, M., "Thin-Layer Chromatography for Insecticide Analysis", Journal of Association Official Analytical Chemists 46(2) : 250 - 261, April, 1963.

Welch, Clark M., and West, Philip W., "Qualitative Microdetermination of Organic Phosphorus Compounds", Analytical Chemistry 29(6) : 874 - 877, June, 1957.

World Health Organization, Specifications for Pesticides, WHO Geneva, 1962, 527 pp.

Zweig, Günther, Analytical Methods for Pesticides and Plant Growth Regulators Vol. 7 (Thin-layer and liquid Chromatography), Academic Press, 1973, 729 pp.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

1. การตรวจวัดปริมาณพลาสมาในหลอดบางชนิดที่ตกค้างในผักคะน้า ที่ค่าความ
ปลอดภัย (Tolerance)

จำนวนตัวอย่าง 100 กรัม

สารที่ใช้สกัด benzene

ปริมาตรครั้งสุดท้าย 1 มิลลิลิตร

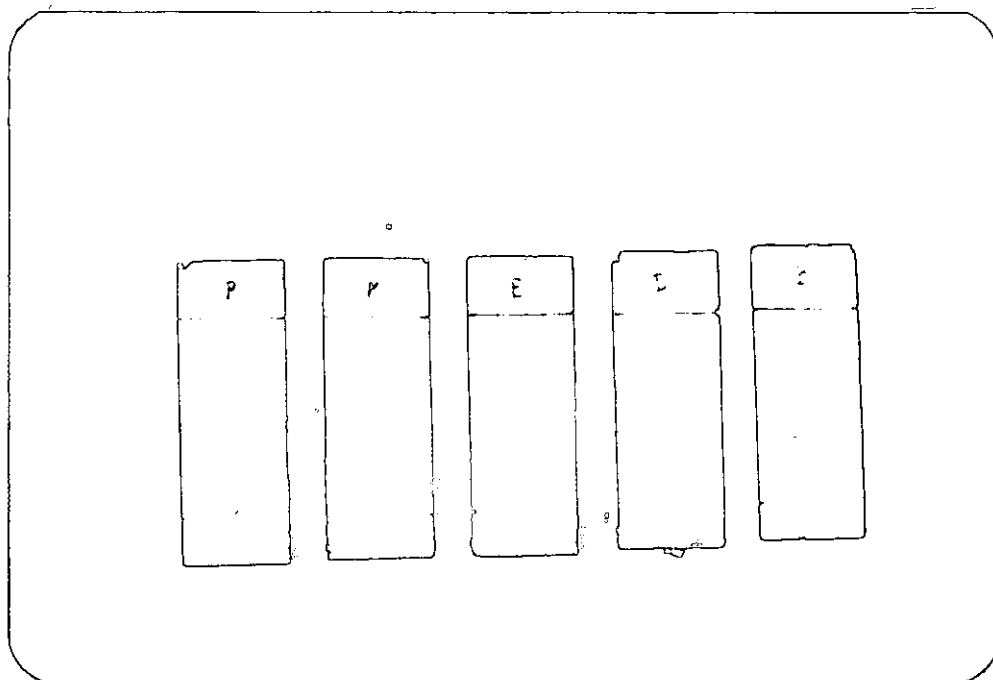
วิธีตรวจ TLC, mobile solvent : hexane/acetone

chromogenic reagent : อบด้วยโบรมีน และใช้

bromphenol blue spray reagent

dropper capillary tube

ปริมาณที่หยด 5 , 2 , 2 , 5 , 5 หยด ตามลำดับ



ภาพ 3 ผลการตรวจวัดปริมาณที่ตกค้างในผักคะน้า ที่ระดับค่าความปลอดภัย

P = พาราไซออน, M = มาลาไซออน, E = อีไซออน,

D = ไดอาซินอน, B = ไบคริน

หมายเหตุ ค่าความปลอดภัยของวัตถุมีพิษที่ตกค้างในผัก (Residue Tolerance) เป็นปริมาณสูงสุดของวัตถุมีพิษที่อาจยอมให้ตกค้างอยู่ในผลิตภัณฑ์เกษตรกรรมโดยไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ค่านี้กำหนดขึ้นโดย United States Department of Agriculture (U.S.D.A.)

ค่าความปลอดภัยของวัตถุมีพิษบางชนิดที่ตกค้างในผักคะน้า (วีเจียร ณัฐวัฒนานนท์, 2520 : 10 - 17 และ The Hague, 1975 : 4 - 9) มีดังนี้

พาราไธออน	0.7	ppm
มาลาไธออน	3	ppm
อีไธออน	1	ppm
ไดอาซินอน	0.7	ppm
ไบคริน	1	ppm

2. วิธีตรวจวัตถุมีพิษพวกออร์กาโนฟอสฟอรัสบางชนิดอย่างง่าย ที่ได้จาก การค้นคว้าทดลอง
ครั้ง

สารเคมีที่ใช้ benzene
sodium sulfate, anhydrous
hexane
acetone
bromine
bromphenol blue spray reagent

เครื่องมือและวัสดุ beaker ขนาด 1000, 500, 250 มิลลิลิตร

stirring rod

microslide chromatoplate

ขวดรูปทรงกระบอก ขนาด ϕ 4.5 ซม. สูง 9 ซม. พร้อมแผ่นกระดาษปิด

spray bottle

funnel

กระดาษกรอง, Ø 18.5 ซม.

capillary, tube

blower

โกร่ง

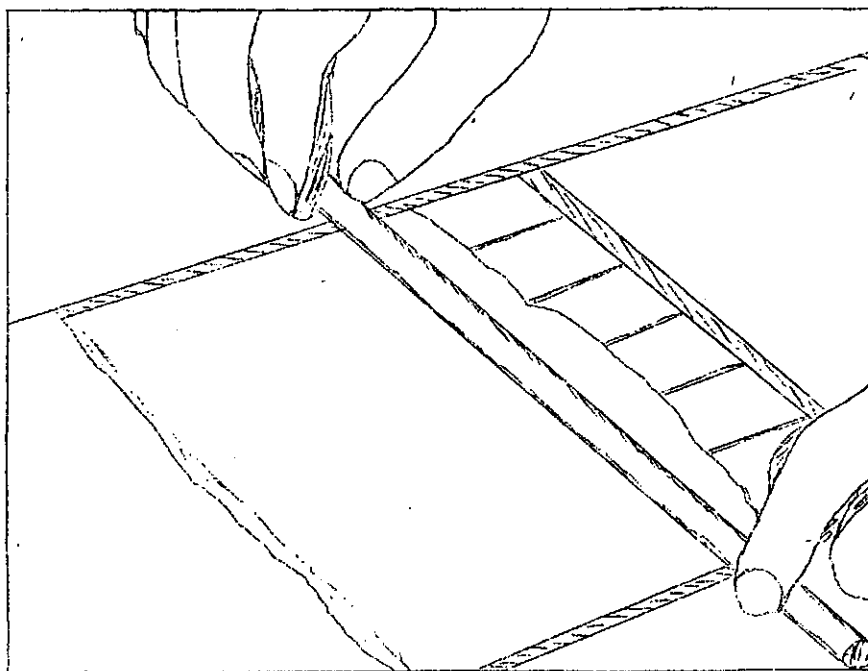
วิธีทดลอง

1. เลือกผักคะน้าเอาเฉพาะใบและก้านส่วนที่รับประทานได้ นำมาตำให้ละเอียด ซึ่งผักที่ตำแล้วนี้ 40 กรัม ใส่ใน beaker ขนาด 500 มิลลิลิตร เติม benzene ลงไป 40 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที แล้วคนด้วย stirring rod ใช้โกร่งบดจนหมดแล้วคั้นเอาแต่ส่วนที่เป็นของเหลว ใส่ใน beaker ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วใช้ benzene 30 มิลลิลิตร ล้างกากอีก 2 ครั้ง คั้นเอาของเหลวรวมกับที่คั้นไว้ตอนแรก (ถ้ามี blender ก็อาจจะนำไปปั่นแทนการบดและคั้นได้ ทั้งนี้ใส่ sodium sulfate, anhydrous ลงไปปั่นด้วย เป็นเวลาประมาณ 5 นาที)
2. เติม sodium sulfate, (anhydrous) 20 กรัม ลงไปในส่วนที่เป็นของเหลวซึ่งได้จากการสกัดใน beaker, เขย่า นำไปกรอง เก็บ filtrate ใน beaker ขนาด 250 มิลลิลิตร
3. นำเอา filtrate ไปทำให้ solvent ระเหย โดยใช้ blower ให้เหลือปริมาณประมาณ 1 มิลลิลิตร
4. ใช้ capillary tube ดูดเอาสารตัวอย่าง (จากข้อ 3) มาหยดลงไปใน microslide chromatoplate 5 หยด (หยดทีละหยด รอให้แห้งแล้วจึงหยดซ้ำได้ ให้เส้นผ่าศูนย์กลางของหยดไม่เกิน 5 มิลลิเมตร)
5. นำ chromatoplate ไป develop ด้วยสารละลาย hexane/acetone (4/1) ซึ่งอยู่ในขวด ไซแนมกระจากปิดไว้ จนสารละลายซึมขึ้นไปประมาณ 5 ซม. นำเอา chromatoplate ออกมาทิ้งไว้ให้สารละลายระเหยราว 5 นาที
6. เอา chromatoplate ไปอบด้วยไอรอนในขวดลักษณะเดียวกับขวดในข้อ 5 ประมาณ 1 นาที แล้วทิ้งไว้ให้ไอรอนระเหยอีก 2 นาที
7. spray chromatoplate ด้วย bromphenol blue spray reagent
8. พิจารณา spot ที่เกิดขึ้น หา Rf-value ก็จะทราบชนิดของวัตถุที่มีอยู่ที่ตกค้างในผักตัวอย่างนั้น

หมายเหตุ ในการตรวจวัดนี้ในแต่ละครั้ง เพื่อหาว่ามี พาราไซออน มาลาไซออน อีไซออน ไดอะซินอน และโบครินตกค้างในผักหรือไม่ จะใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง คือใช้เวลาในการสกัดประมาณ 15 นาที ลบปริมาตรประมาณ 35 นาที และตรวจด้วย TLC ประมาณ 10 นาที

3. การเตรียม microslide chromatoplate

1. ใช้แผ่นกระจกขนาด 20 x 20 เซนติเมตร วางแผ่น slide เรียงลงไปบนแผ่นกระจก แล้วใช้กระดาษกาวปิดทับ slide แผ่นรอบนอกให้ติดกับแผ่นกระจก 3 ด้าน ดังรูป



ภาพ 4 การเคลือบ microslide ด้วย silica gel G

2. ทำความสะอาด slide ด้วย acetone และ ethyl ether โดยเช็ดด้วยกระดาษพิษชู

3. ผสม silica gel G (with calcium sulfate binder) 20 กรัม กับน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ

4. วิธีเคลือบมี 2 วิธี คือ

ก. เท silica gel ที่ผสมแล้วลงไปในแผ่น slide ด้านหนึ่ง แล้วใช้ stirring rod ยาว 30 เซนติเมตร ปาดไปยังอีกด้านหนึ่ง โดยเร็ว (จะได้ adsorbent ที่มีความหนาเท่ากับความหนาของกระดาษกาว) ทิ้งไว้ในแนวในอากาศ

ข. ใช้แผ่น slide ที่สะอาด 2 แผ่น ประกบกัน จุ่มลงใน silica gel ที่ผสมแล้ว ยกขึ้นโดยเร็ว และออกจากกันนำไปวางเรียงให้แห้ง วิธีนี้จะทำได้ทีละ 2 แผ่น

นำเอา slide ที่เคลือบแล้วนี้ไปอบที่ 110°C เป็นเวลา 30 นาที ถ้ายังไม่ให้นำไปเก็บไว้ใน desicator หรือภาชนะที่มีสารดูดความชื้น

4. การเตรียม bromphenol blue spray reagent

1. ชั่ง bromphenol blue 0.05 กรัม ละลายใน acetone 10 มิลลิลิตร
2. ละลาย acetone 25 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร
3. ชั่ง silver nitrate 1 กรัม แล้วเติมสารละลายของ acetone

(ข้อ 2) ลงไป

4. ผสมสารละลาย bromphenol blue (ข้อ 1) กับสารละลาย silver nitrate (ข้อ 3) 90 มิลลิลิตร (ควรผสมก่อนจะใช้ spray แต่ละครั้ง)

หมายเหตุ 1. reagent ที่เตรียมในอัตราส่วนข้างบน จะมีปริมาณ 100 มิลลิลิตร และจะใช้ spray ได้ประมาณ 20 ครั้ง

2. จากการทดลอง แม้จะผสมสารละลาย bromphenol blue กับสารละลาย silver nitrate แล้วเก็บไว้ในขวดสีน้ำตาลไว้นานถึง 3 เดือน ก็ยังใช้ได้ผลดี

5. ราคาโดยประมาณของสารเคมีและเครื่องมือ 1 ชุด ที่ใช้ตรวจวัดมีพิษอย่างง่าย

<u>รายการสารเคมี</u>	<u>จำนวน</u>	<u>ราคา, บาท</u>
benzene	350 มิลลิลิตร	70
hexane	16 มิลลิลิตร	2
anhydrous sodium sulfate	100 กรัม	48
silver nitrate	1 กรัม	18
acetone	4 มิลลิลิตร	1
bromine	5 มิลลิลิตร	4
bromphenol blue	0.05 กรัม	2
<u>รายการเครื่องมือและวัสดุ</u>		
coated microslide	5 แผ่น	8
beaker, 1000 ml.	1 ใบ	30
beaker, 500 ml.	1 ใบ	30
beaker, 250 ml	1 ใบ	16
funnel, 90 mm.	1 อัน	40
filter paper No.1, ϕ 18.5 cm.	5 แผ่น	20
capillary tube	5 อัน	2
รวมราคาทั้งหมด		<u>291</u>

- หมายเหตุ 1. สารเคมีจำนวนดังกล่าว ใช้ตรวจสารตัวอย่างได้ 5 ตัวอย่าง
2. ไม่คิดรวมราคาของ blower, blender และ spray bottle

ราคาโดยประมาณของสารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ตรวจวัดภูมิพิษ สำหรับแม่บ้าน

<u>รายการ</u>	<u>จำนวน</u>	<u>ราคา, บาท</u>
1. benzene	350 มิลลิลิตร	70
2. hexane	16 มิลลิลิตร	2
3. anhydrous sodium sulfate	100 กรัม	48
4. silver nitrate	1 กรัม	18
5. acetone	4 มิลลิลิตร	1
6. bromine	5 มิลลิลิตร	4
7. bromphenol blue	0.05 กรัม	2
8. coated microslide	5 แผ่น	8
9. filter paper No.1, ϕ 18.5 cm.	5 แผ่น	20
10. capillary tube	5 อัน	<u>2</u>
รวมราคา		<u>175</u>

- หมายเหตุ 1. สารเคมีนี้ใช้ตรวจสอบตัวอย่างได้ 5 ตัวอย่าง ซึ่งใช้อัตราส่วนของสารเคมีตามวิธีทดลองในภาคผนวกข้อ 2 (หน้า 67)
2. ของใช้ภายในบ้าน เช่น เครื่องปั่น เครื่องเป่าลม (แทน blower) ขวดพ่นสารเคมี (ใช้ขวดฉีดน้ำกล้วยไม้แทนได้) ครก (ใช้แทนโกร่ง) กรวยกรอง และภาชนะที่ทำด้วยแก้ว เช่น ถ้วยแก้ว แก้วน้ำ ขวดแก้ว (ใช้แทน beaker) ไม่คิดราคารวมในรายการนี้
3. ถ้าจะมีการผลิตเครื่องมือนี้สำหรับใช้กับบุคคลทั่วไป อาจมีการทำแผ่นเทียบสีของวัตถุที่มีปรากฏเป็นจุดบน chromatoplate เป็นแผ่นสำเร็จรูปเพื่อใช้เทียบสีและความเข้มของสีว่าปริมาณวัตถุที่มีพิษที่ตรวจพบนั้น มีมากน้อยแค่ไหน เกินขีดค่าความปลอดภัยหรือไม่ โดยไม่ต้องใช้สารมาตรฐานเปรียบเทียบ เป็นการสะดวกและประหยัดยิ่งขึ้น

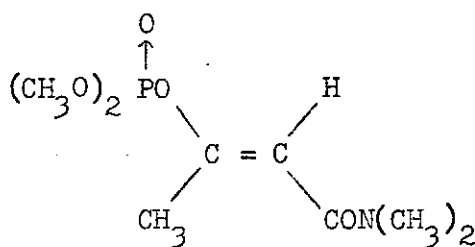
6. คุณสมบัติบางประการของวัตถุมีพิษชนิดออร์กาโนฟอสฟอรัสบางชนิด

Bidrin

ชื่ออื่น ๆ Carbicron, Ektafos, SD 3562, Dicrotophos.

Systematic name O,O-Dimethyl-O-(2,2-dimethylcarbamoyl-1-methylvinyl) phosphate

Structure



Formula $C_8H_{16}NO_5P$

M.W. 237.20

State Liquid

ความเป็นพิษ พิษเฉียบพลันโดยทางปากสำหรับหนู (mice) มีค่า LD_{50} 22 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม สำหรับพิษเฉียบพลันโดยทางผิวหนังสำหรับกระต่าย มีค่า LD_{50} ประมาณ 225 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัวสัตว์ 1 กิโลกรัม

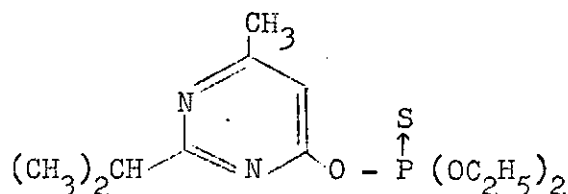
คุณสมบัติเฉพาะตัว ของเหลวสีน้ำตาล กลิ่นหอม ไม่ละลายตัวถ้าเก็บไว้ในขวดแก้วหรือภาชนะที่ทำด้วย polyethylene ไม่ละลายในน้ำ ในอะซิโตน และในซายลีน (xylene) ละลายได้เล็กน้อยในน้ำมันก๊าด และน้ำมันดีเซล

Diazinon

ชื่ออื่น ๆ Basudin, Diazajet, Diazide, Dazzed, G-24480

Systematic name O,O-Diethyl O-(2-isopropyl-6-methyl-4-pyrimidinyl) phosphorothioate

Structure



Formula $C_{12}H_{21}N_2O_3PS$

M.W. 304.35

State Liquid

ความเป็นพิษ พิษเฉียบพลันทางปากที่มีต่อหนูเพศผู้ (male rat) นั้นมีค่า LD_{50} 465 ± 87 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม มีพิษอย่างร้ายแรงต่อผึ้ง
คุณสมบัติเฉพาะตัว ของเหลว ถ้าบริสุทธิ์จะมีสีขาว ชนิดเทคนิคอลมีสีน้ำตาลเข้ม
ทำปฏิกิริยากับกรดและด่าง มีจุดเดือดที่ $83 - 84^\circ C$ ละลายน้ำได้เพียง
 0.004% ในอุณหภูมิห้อง ผสมกับแอลกอฮอล์ ไซลีน อะซีโตน และ
น้ำมันไตรคลอโรเอทิล

Ethion

ชื่ออื่น ๆ Ethodan, Kwit, Niolate

Systematic name O,O,O',O'-tetraethyl S,S'-methylene
bisphosphorodithioate

Structure
$$(C_2H_5O)_2\overset{\overset{S}{\uparrow}}{P} - S - CH_2 - S - \overset{\overset{S}{\uparrow}}{P}(OC_2H_5)_2$$

Formula $C_{12}H_{22}O_4P_2S_4$

M.W. 384.48

State Liquid

ความเป็นพิษ ชนิดบริสุทธิ์ พิษเฉียบพลันโดยทางปากกับหนู (rat) นั้นมีค่า LD_{50} 280 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม ชนิดเทคนิคอล มีค่า LD_{50} 96 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม

คุณสมบัติเฉพาะตัว ของเหลวสีขาว หรือสีชมพูอ่อน ๆ ชนิดบริสุทธิ์ไม่มีกลิ่น เมื่อถูก
อากาศจะค่อย ๆ สลายตัวและเมื่ออยู่ในอุณหภูมิที่สูงกว่า $150^\circ C$ แล้ว
จะเกิดการสลายตัวโดยอย่างรวดเร็ว ไม่เกิดกร่อนภาชนะบรรจุ
แต่ไม่ควรผสมกับกรดหรือด่าง ละลายได้เล็กน้อยในน้ำ แต่ละลายได้ดี-

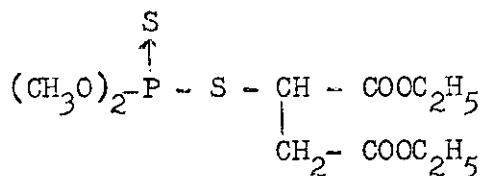
ในชายต้น คลอโรฟอร์ม และอะซีโตน ถาผสม methyl ethyl ketone หรือ benzene ลงในวัตถุมีพิษนี้ประมาณ 1 % แล้ว
ถ้าจะทำให้วัตถุมีพิษชนิดนี้ละลายได้ในน้ำมันก๊าด

Malathion

ชื่ออื่น ๆ Cythion, Malathon, Chemathion, Malaspray

Systematic name O-O-Dimethyl dithiophosphate of diethyl mercaptosuccinate

Structure



Formula $\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{O}_6\text{PS}_2$

M.W. 330.36

State Liquid

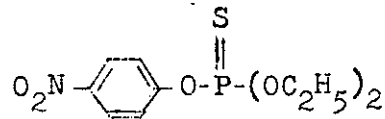
ความเป็นพิษ พิษเฉียบพลันโดยทางปากที่มีต่อหนู (rat) หนักมีค่า LD_{50} 1375 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม และพิษเฉียบพลันโดยทางผิวหนังที่มีต่อกระต่าย มีค่า 8100 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัวสัตว์ 1 กิโลกรัม

คุณสมบัติเฉพาะตัว ของเหลว ไม่มีสีหรือมีสีน้ำตาลอ่อน จะคงสภาพเมื่อมีความเป็นกรด - ด่าง ระหว่าง pH 5-7 สลายตัวเมื่อ pH มากกว่า 7 หรือเมื่อได้รับความร้อนสูง มีจุดเดือดที่ $156 - 157^\circ\text{C}$ ละลายน้ำได้ 145 ส่วนในน้ำล้านส่วน และละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ เอสเทอร์ เฮกเซน และ high aromatic solvents

Parathion

Systematic name O,O-Diethyl O-p-nitrophenyl phosphorothioate

Structure



Formula $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{NO}_5\text{PS}$

M.W. 291.26

State Liquid

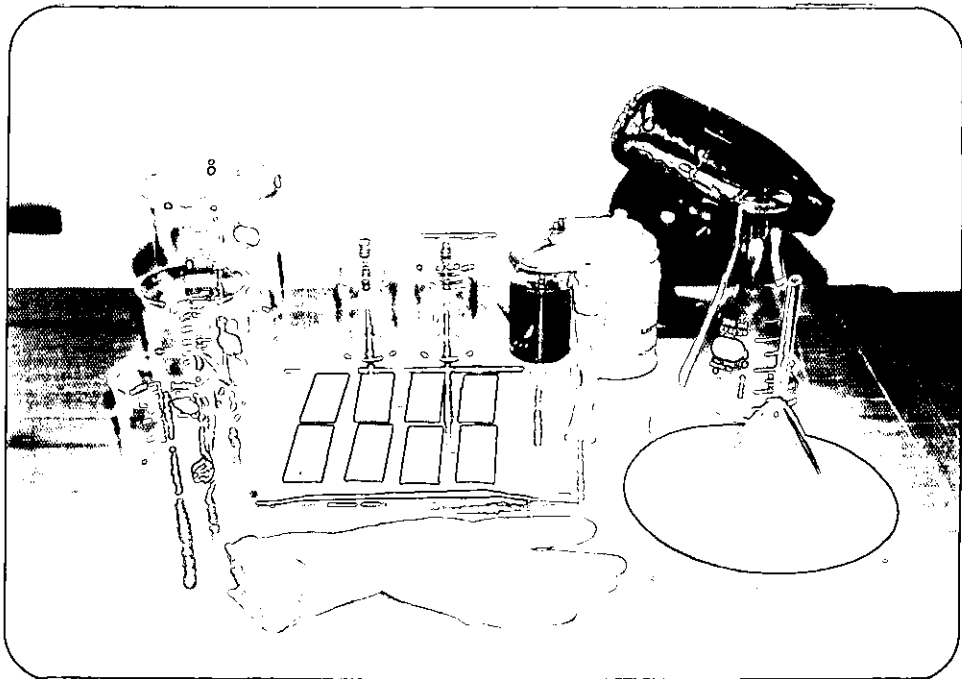
ความเป็นพิษ พิษเฉียบพลันโดยทางปากที่มีต่อหนูเพศผู้ (male rat) และหนูเพศเมีย (female rat) นั้นมีค่า LD_{50} 13 และ 3.6 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม ตามลำดับ พิษเฉียบพลันโดยทางผิวหนังที่มีต่อหนูเพศเมีย มีค่า LD_{50} 6 - 8 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม

คุณสมบัติเฉพาะตัว ของเหลว สีน้ำตาลอ่อนหรือน้ำตาลเข้ม ถ้าอยู่ในด่าง (pH 10) จะสลายตัวครึ่งหนึ่งในเวลา 120 วัน ถ้าอยู่ในกรด (pH 7 หรือต่ำกว่า) จะค่อย ๆ สลายตัว กัดกร่อนภาชนะบรรจุได้น้อยมาก มีจุดเดือดที่ $157 - 162^\circ\text{C}$ ละลายน้ำได้ 20 ส่วนในน้ำล้านส่วน แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

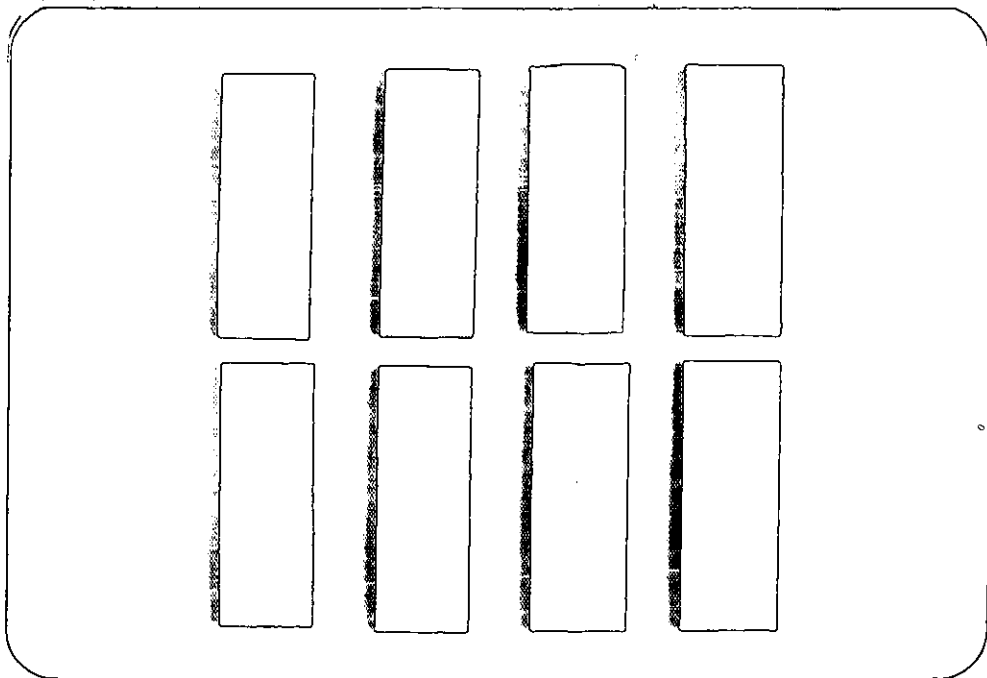
หมายเหตุ LD_{50} หมายถึงค่าหรือขนาดเฉลี่ยโดยวิธีวัดสถิติของวัตถุมีพิษ (Median Lethal Dosage) ที่ทำให้สัตว์ที่ใช้ในการทดลองเสียชีวิตครึ่งหนึ่ง (50 %) ของจำนวนสัตว์ทดลองทั้งหมด

ค่า LD_{50} นี้จะมีหน่วยเป็นค่ามิลลิกรัมของวัตถุมีพิษต่อน้ำหนัก 1 กิโลกรัมของตัวสัตว์ที่ใช้ในการทดลอง.

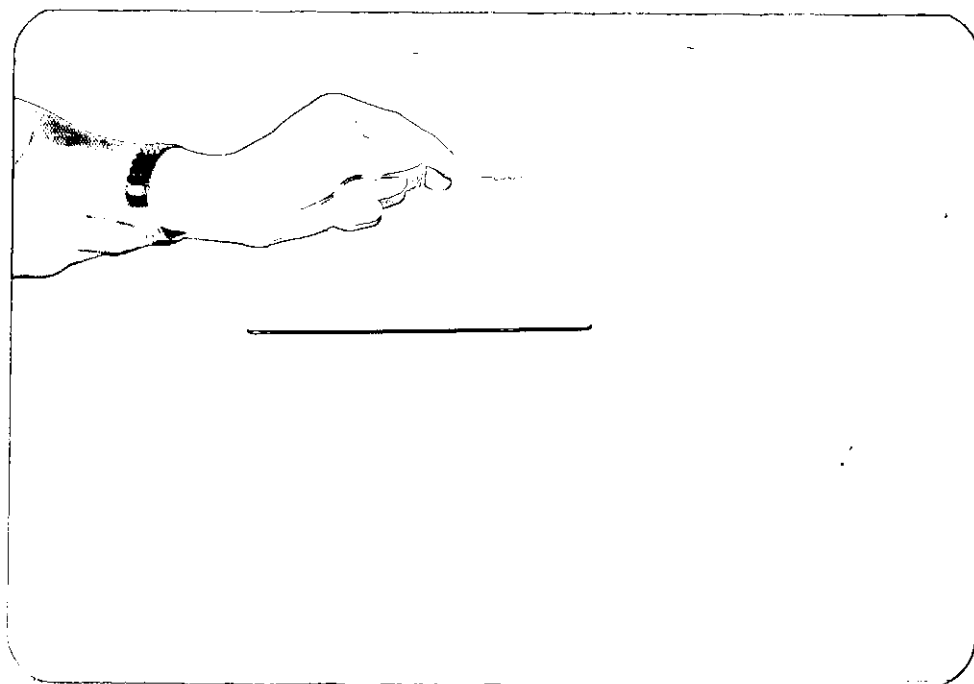
7. ภาพประกอบจากการทดลอง



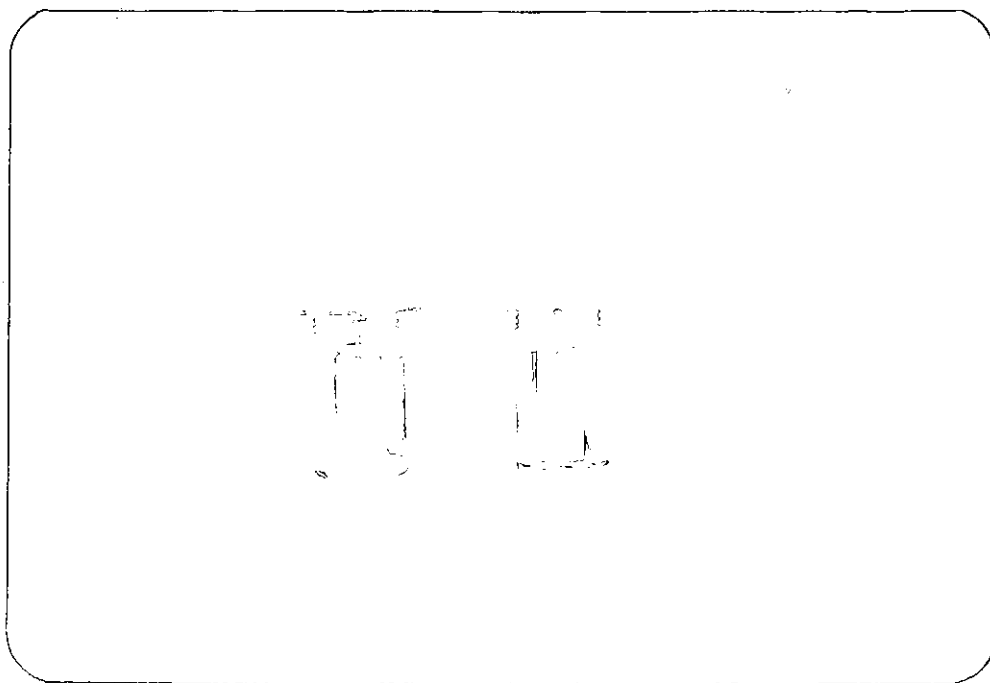
ภาพ 5 ชุดเครื่องมือที่ใช้ทดลองการจลน์วิทยาอย่างง่าย



ภาพ 6 microslide ที่เคลือบแล้ว



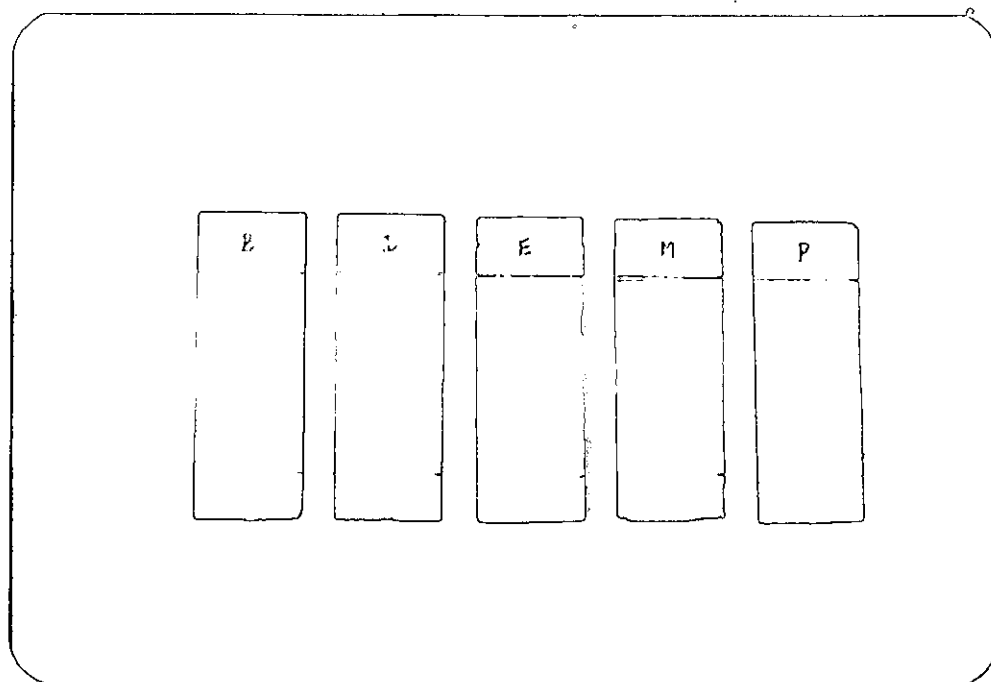
ภาพ 7 การหยดสารตัวอย่างลงโพลีน slide ด้วย capillary tube



ภาพ 8 การ develop chromatoplate ด้วย solvent และโพรตีน



ภาพ 9 การ spray chromatoplate ด้วย chromogenic reagent



ภาพ 10 TLC-Chromatogram ของวัตถุดิบพืชชนิดออร์กานอฟอสเฟต

mobile solvent : hexane/acetone, 4/1

chromogenic reagent : โบรโมน และ bromphenol blue spray reagent

(P = พาราไซออน, M = มาลาไซออน, E = อีไซออน, D = ไดอาซินอน, B = ไบกรีน)