

การวิเคราะห์ปริมาณสารกำจัดวัชพืชกลุ่มคลอโรฟีนอกซีอะซีติกแอซิด

โดยแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส

Determination of Chlorophenoxyacetic Acid Herbicide by Capillary Electrophoresis

สุรัตดา ศรีสุวรรณ (Suratda Srisuwan)* ดร.จันทร์เพ็ญ อินทรประเสริฐ (Dr. Janpen Intaraprasert)**

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์หาปริมาณสารกำจัดวัชพืชกลุ่มคลอโรฟีนอกซีอะซีติกแอซิด ได้แก่ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T), 4-chloro-2-methoxyphenoxyacetic acid (MCPA) และ 2-(2,4-dichlorophenoxy)-propionic acid (dichloroprop.) ด้วยเทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณ ได้แก่ ชนิดของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ ความเข้มข้นของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ พีเอช(pH) สารเติมแต่ง ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการแยกสาร และเวลาในการฉีดสาร เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ ซึ่งพบว่าสภาวะที่ให้ผลดีที่สุดในการทดลองคือ การใช้ fused-silica capillary 50 μm i.d. x 64.5 cm (56 cm effective length) 50 mM phosphate buffer และ 100 mM sodium lauryl sulfate ที่ pH 7.0 เวลาที่ใช้ในการฉีดสารตัวอย่าง 5 วินาที ศักย์ไฟฟ้า +30 kV อุณหภูมิ 25 °C ตรวจวัดสัญญาณด้วย UV-Visible detector ที่ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร และความยาวคลื่นอ้างอิง 280 นาโนเมตร โดยค่า limit of detection (LOD) ของสารกำจัดวัชพืชทั้ง 4 ชนิด คือ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ABSTRACT

Determination of chlorophenoxyacetic acid herbicide such as 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T), 4-chloro-2-methoxyphenoxyacetic acid (MCPA) and 2-(2,4-dichlorophenoxy)-propionic acid (dichloroprop.) were studied using capillary electrophoresis (CE). The optimum analytical conditions were involved type of buffer solution, concentration of buffer solution, pH, buffer additive, separation voltage and sample injection time. The experiment results indicated that the optimum condition were fused-silica capillary 50 μm i.d. x 64.5 cm (56 cm effective length), 50 mM phosphate buffer solution and 100 mM sodium lauryl sulfate, pH 7.0, sample injection times 5 sec., separation voltage +30 kV, temperature at 25 °C, UV-Visible detector, signal wavelength at 214 nm and reference wavelength at 280 nm. The limit of detection for these herbicides were 0.5 mg/l.

คำสำคัญ: แคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส สารกำจัดวัชพืช คลอโรฟีนอกซีอะซีติกแอซิด

Key Words: Capillary Electrophoresis, Herbicide, Chlorophenoxyacetic Acid

* นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

บทนำ

การทำเกษตรกรรมในประเทศไทย มีการใช้ยาฆ่าแมลง (pesticides) และสารกำจัดวัชพืช (herbicides) อย่างกว้างขวาง ข้อมูลที่แสดงให้เห็นถึงการใช้สารกำจัดวัชพืชที่มีปริมาณมากในประเทศไทย พบว่าการนำเข้าสารกำจัดวัชพืช ในปี พ.ศ.2552 ปริมาณ 85,821 ตัน คิดเป็นมูลค่า 9,338 ล้านบาท และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2554) การใช้สารเคมีประเภทต่างๆ เหล่านี้ โดยที่ไม่ได้รับคำแนะนำที่ถูกต้อง เช่น การใช้ในปริมาณที่มากเกินไปเพื่อที่จะเร่งให้ได้ผลผลิตที่ดี มีคุณภาพ และมีจำนวนมาก ซึ่งบางครั้งเกษตรกรไม่ได้ทิ้งระยะเวลาให้นานพอก่อนการเก็บเกี่ยว และจำหน่ายต่อผู้บริโภค ซึ่งอาจทำให้สารเคมีเหล่านี้ตกค้างอยู่ในผลผลิต ในดิน และบางส่วนถูกชะล้างสู่แหล่งน้ำ เป็นสาเหตุให้เกิดผลกระทบต่อผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงต้องมีการตรวจสอบปริมาณการตกค้างของสารกำจัดวัชพืช ทั้งในผลผลิตทางการเกษตรและสิ่งแวดล้อม

การตรวจหาปริมาณสารกำจัดวัชพืชที่ตกค้างในผลผลิตทางการเกษตร หรือในสิ่งแวดล้อม ที่มีระดับความเข้มข้นต่ำ (ppm) ส่วนใหญ่ใช้เครื่องมือ high performance liquid chromatography (HPLC) และ gas chromatography (GC) แต่อย่างไรก็ตาม HPLC และ GC มีข้อจำกัดหลายด้าน เช่น เทคนิคการวิเคราะห์ด้วย HPLC นั้น ต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณที่มาก ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน และการเสื่อมสภาพของ HPLC คอลัมน์ ซึ่งมีราคาสูง และไม่สามารถใช้เทคนิค HPLC ในการวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงที่ไม่มี chromophore หรือ fluorophore บางชนิดได้ ส่วนในการวิเคราะห์สารฆ่าแมลงและสารกำจัดวัชพืชบางชนิดด้วย GC นั้น มีขั้นตอนที่ยุ้งยากมากขึ้นในขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่าง คือ การทำให้เกิดสารอนุพันธ์ (derivatization) เพื่อเพิ่มความสามารถในการระเหยของสารตัวอย่าง ทำให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน และสารรีเอเจนต์ที่ใช้ทำปฏิกิริยา ส่วนใหญ่มีราคาสูงและเป็นพิษ

ข้อดีของ CE เมื่อเปรียบเทียบกับ HPLC คือ CE เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพการแยกสูงกว่า HPLC (Yu et al., 2005) ในการวิเคราะห์โดยใช้ CE จะใช้สารเคมีสารละลาย และตัวทำละลายในปริมาณที่น้อยมาก (ระดับ μL) ทำให้ปริมาณของเสียจากห้องปฏิบัติการน้อย นอกจากนี้แล้ว CE ยังเป็นวิธีที่สะดวก ใช้ง่าย เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์สั้น ต้นทุนการวิเคราะห์ต่อหน่วยต่ำ CE ประกอบด้วยชนิดของการแยก (separation mode) หลายชนิด เช่น capillary zone electrophoresis (CZE) ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายที่สุด เหมาะสำหรับการแยก และวิเคราะห์สารที่มีประจุขนาดเล็กและ micellar electrokinetic chromatography (MEKC) สามารถใช้แยกสารได้ทั้งที่มีประจุและเป็นกลางทางไฟฟ้าได้ (Zhu et al., 2002) โดยการเติมสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ลงในสารละลายอิเล็กโทรไลต์เพื่อให้เกิดเป็นไมเซลล์ (micelle) กลไกการแยกสารที่เป็นกลางทางไฟฟ้าเกิดจากอันตรกิริยาระหว่างสารกับไมเซลล์ เป็นต้น

จากข้อดีของ CE ทำให้ CE เป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมในการแยกและวิเคราะห์หาปริมาณสารกำจัดวัชพืช (Silva et al., 2003; Zerbinati et al., 2000) ซึ่งดูจากมีรายงานการใช้ CE ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารกำจัดวัชพืชอย่างมากมา อาทิเช่น จากรายงานการวิจัยของ Mechref et al. (1997) ได้ศึกษาการแยกและวิเคราะห์สารกำจัดวัชพืชที่เป็น enantiomeric โดยการเติมสารลดแรงตึงผิว (surfactants) เพื่อช่วยในการแยกสารอย่างสมบูรณ์โดยใช้ CE นอกจากนี้มีรายงานการใช้ CE ในการวิเคราะห์หาสารตกค้างในสิ่งแวดล้อม เช่น Fu et al. (2009) ได้ใช้ CE ในการวิเคราะห์หาสถานะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณสารที่ปนเปื้อนในดิน เพื่อคัดกรองการย่อยสลายของสาร 2,4-D และ MCPA-sodium ในดิน Dinelli et al. (1995) ได้ศึกษาหาปริมาณการปนเปื้อนซัลโฟนิลยูเรีย (sulfonyleurea) ในดินโดยใช้เทคนิค MEKC ซึ่งสามารถวิเคราะห์สารที่มีความเข้มข้นต่ำๆ ได้ถึง 10 ppb เป็นต้น

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณสารกำจัดวัชพืช กลุ่มคลอโรฟีนอกซีอะซีติกแอซิด 4 ชนิด ได้แก่ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) 4-chloro-2-methoxyphenoxyacetic acid (MCPA) 2-(2,4-dichlorophenoxy) - propionic acid (dichloroprop.)

เครื่องมือ และสารเคมี

เครื่องมือ ^3D Capillary electrophoresis Instrument (Agilent Technologies, Deutschland, Germany) equipped with a UV detector, Fused silica capillary 50 μm i.d. x 64 cm (Polymicro Technologies, Arizona, USA)

สารเคมี 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) 4-chloro-2-methoxyphenoxyacetic acid (MCPA) 2-(2,4-dichlorophenoxy) -propionic acid (dichloroprop.) Acetic acid glacial (CH_3COOH) Sodium acetate (CH_3COONa) Boric acid (H_3BO_3) Sodium tetraborate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) Sodium di-hydrogen phosphate (NaH_2PO_4) Di-sodium hydrogen phosphate anhydrous (Na_2HPO_4) Sodium lauryl sulfate ($(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$, (SDS)) Sodium hydroxide anhydrous pellets (NaOH) Methanol (CH_3OH) Orthophosphoric acid 85% (H_3PO_4)

การเตรียมสารละลายมาตรฐานที่ใช้ในการทดลองเตรียมสารละลาย stock standard แต่ละชนิดให้มีความเข้มข้น 1000 ppm โดยใช้ methanol เป็นตัวทำละลาย รักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เตรียมสารละลาย working ที่เป็นสารละลายผสมของ standard แต่ละชนิดให้มีความเข้มข้นชนิดละ 20 ppm โดยการนำสารละลาย stock standard แต่ละชนิดมา 1 ml ผสมกันและปรับปริมาตรด้วยสารละลายอิเล็กโทรไลต์ให้เป็น 10 ml เมื่อนำเข้าเครื่อง CE จะต้องกรองด้วย 0.45 μm nylon

filter membrane ใส่ใน CE Vials จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง ultrasonic เพื่อไล่ฟองอากาศ

การเตรียมสารละลาย stock buffer ให้มีความเข้มข้น 200 mM เตรียมสารละลายอิเล็กโทรไลต์ให้มีความเข้มข้นชนิดละ 50 mM โดยเปิดสารละลาย stock buffer มา 6.25 ml ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 ml เติมน้ำ DI ลงไปประมาณ 10 ml ปรับ pH ให้ได้ 7.00 ด้วย 1 M NaOH จากนั้นเทสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จนครบปริมาตร เมื่อนำเข้าเครื่อง CE จะต้องกรองและไล่ฟองอากาศเช่นเดียวกับตัวอย่าง

วิธีการวิจัย

วิธีวิเคราะห์สารกำจัดวัชพืชโดยใช้เครื่อง CE ก่อนทำการวิเคราะห์จะต้องล้างแคปิลลารีคอลัมน์ใหม่ด้วยสารละลาย 1 M NaOH เป็นเวลา 30 นาที เพื่อเป็นการ regenerate SiO^- groups บนผิวภายในของแคปิลลารีคอลัมน์ เพื่อให้ EOF คงที่ภายหลังการล้างด้วยสารละลาย แล้วล้างด้วยน้ำ DI เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อล้างเบสออก จากนั้นทำการ equilibrate แคปิลลารีคอลัมน์ใหม่ด้วยสารละลายอิเล็กโทรไลต์เป็นเวลา 20 นาที โดยใช้ความต่างศักย์ +25 kV อุณหภูมิ 25 °C เพื่อให้มีสารละลายอิเล็กโทรไลต์อยู่ในแคปิลลารี และทำให้เกิดสมดุลบนผิวภายในของแคปิลลารี เกิดเป็น double layer เพื่อให้ได้ EOF ที่คงที่ ภายหลังการวิเคราะห์ครั้งสุดท้ายในแต่ละวัน จะต้องล้างด้วยน้ำ DI เป็นเวลา 5 นาที และผ่านอากาศเข้าไปในแคปิลลารีเป็นเวลา 3 นาที การเก็บแบบนี้จะช่วยให้แคปิลลารีมีอายุการใช้งานที่ยาวนาน และให้ผลการทดลองที่แม่นยำ

การทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารกำจัดวัชพืช กลุ่ม คลอโรฟีนอกซีอะซีติกแอซิด 4 ชนิด ดังนี้

ศึกษาผลของชนิด พีเอช ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ ศึกษาสารละลายอิเล็กโทรไลต์ 3 ชนิด ได้แก่ Acetate buffer Borate buffer และ Phosphate buffer

โดยใช้ความเข้มข้น 50 mM ความต่างศักย์ที่ใช้ +30 kV อุณหภูมิ 25 °C ที่ pH ต่างๆ ดังนี้ acetate buffer pH 3.5 4.0 4.5 5.0 borate buffer pH 7.5 8.0 8.5 9.0 phosphate buffer pH 2.5 6.0 7.0 8.0

ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลาย phosphate buffer คือ 25 50 และ 75 mM

ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารเติมแต่ง (SDS) คือ 25 50 75 และ 100 mM

การระบุตำแหน่งพีคของสารกำจัดวัชพืช โดยทำการ spiking สารละลายมาตรฐานผสม คือ การเติมสารละลายมาตรฐานลงในสารละลายมาตรฐานผสมที่ละลายแล้ว

ศึกษาผลของเวลาในการฉีดสารตัวอย่าง คือ 5 10 และ 20 วินาที

ศึกษาผลของความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ คือ +10 +20 และ +30 kV

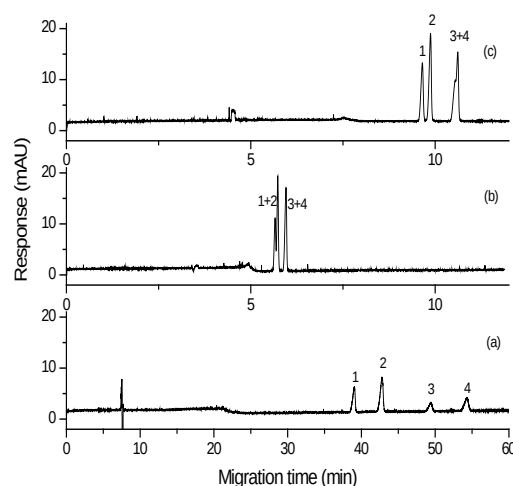
หาค่า Limit of detection

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

ผลของชนิดของสารละลายอิเล็กโทรไลต์

การเลือกสารละลายอิเล็กโทรไลต์เป็นสิ่งที่สำคัญอย่างยิ่งต่อการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยจะต้องพิจารณาถึงพีเอช ความเข้มข้นหรือความแรงไอออนของสารละลายอิเล็กโทรไลต์และสารเติมแต่งที่เติมในสารละลายอิเล็กโทรไลต์เนื่องจากองค์ประกอบเหล่านี้มีผลโดยตรงต่อประสิทธิภาพการแยกสาร และความเฉพาะต่อสาร (selectivity) สารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่ดีควรให้ผลการแยกที่ดีและไม่รบกวนการแยกสาร มีความจุบัฟเฟอร์สูง (buffer capacity) ในช่วงพีเอชที่กว้าง ไม่เปลี่ยนแปลงพีเอชเมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนแปลง ไม่รบกวนการตรวจหา มีความสามารถในการเคลื่อนที่ภายใต้สนามไฟฟ้าใกล้เคียงกับสาร และสามารถละลายสารตัวอย่างได้ดี (ลิณา, 2550)

ในการทดลองได้ทำการทดลองโดยใช้สารละลายอิเล็กโทรไลต์ 3 ชนิด ได้แก่ Phosphate buffer, Borate buffer และ Acetate buffer ผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้ Acetate buffer สามารถแยกสารได้ทั้งหมด แต่ใช้เวลาในการแยกนานและรูปร่างของพีคจะมีฐานกว้าง Borate buffer สามารถแยกสารได้ 3 พีค และลักษณะของพีคจะซ้อนทับกันอยู่ไม่สามารถแยกได้อย่างชัดเจน ส่วน Phosphate buffer สามารถแยกสารทั้ง 4 ชนิดได้ แต่พีคของ 2,4-D และ 2,4,5-T ยังซ้อนทับกันอยู่เนื่องจากมีโครงสร้างที่ใกล้เคียงกันจึงแยกได้ยาก แต่มี migration time ที่สั้น และฐานพีคแคบ แสดงดังรูปที่ 1 ดังนั้นจึงเลือก phosphate buffer เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่จะใช้ในการทดลองต่อไป

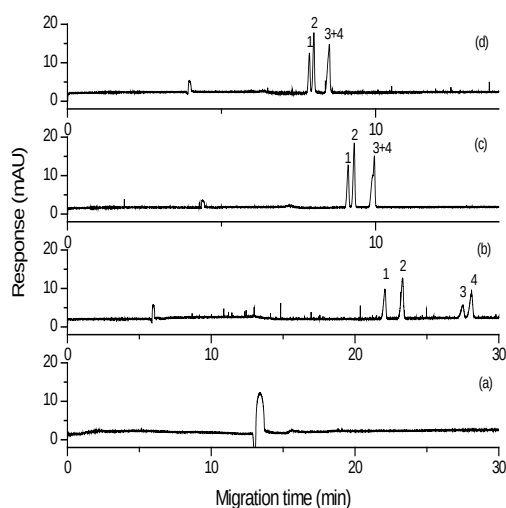


รูปที่ 1 Electropherograms แสดงผลการผลการแยกของสารละลายมาตรฐานในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ทั้ง 3 ชนิด

Condition: buffer composition; (a) 50 mM acetate buffer ; pH 4.5 (b) 50 mM borate buffer ; pH 9.0 (c) 50 mM phosphate buffer ; pH 7.0 , separation voltage +30kV, temperature 25 °C, sample injection time (50mbar) 5 sec. ,capillary length 64.5 cm X 50 μ m i.d., effective length 56 cm, **Peak identification:** 1 = Dichloroprop, 2 = MCPA, 3 = 2,4-D, 4 = 2,4,5-T

ผลของพีเอช (pH) ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์

พีเอชของสารละลายอิเล็กโทรไลต์มีผลต่อการแตกตัวเป็นไอออนของสาร เนื่องจากสารจะแตกตัวให้ประจุไม่เท่ากันที่พีเอชแตกต่างกัน จึงทำให้ผลรวมของประจุแตกต่างกันที่แต่ละพีเอช ซึ่งมีผลต่อความสามารถในการเคลื่อนที่ภายใต้สนามไฟฟ้าของสาร การเพิ่มพีเอชของสารอิเล็กโทรไลต์ทำให้การไหลอิเล็กโทรออสโมติกเพิ่มขึ้น ในทางตรงกันข้ามหากลดพีเอชของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ การไหลของอิเล็กโทรออสโมติกจะลดลงจากการทดลองสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่พีเอช 2.5 6.0 7.0 และ 8.0 อธิบายผลการทดลองดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 Electropherograms แสดงการแยกของสารละลายมาตรฐานในสารละลาย phosphate buffer ที่พีเอชต่างๆ

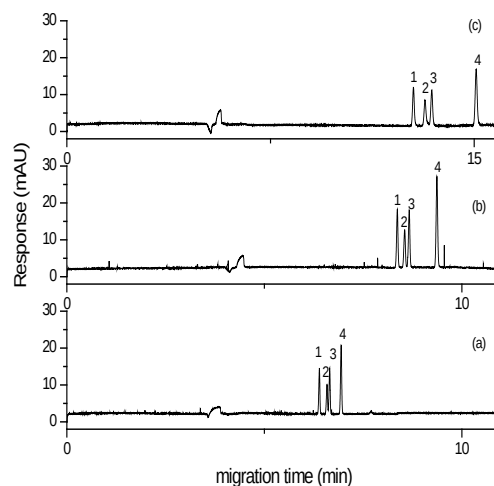
Condition: buffer composition; (a) 50 mM phosphate buffer; p H (a) 2.5 , (b) 6.0 , (c) 7.0 , (d) 8.0 ,separation voltage +30kV, temperature 25 °C, sample injection time (50mbar) 5 sec. ,capillary length 64.5 cm X 50 μ m i.d., effective length 56 cm, **Peak identification :**
1 = Dichloroprop, 2 = MCPA, 3 = 2,4-D, 4 = 2,4,5-T

จากรูปที่ 2 พบว่า ที่ pH 6.0 พีคของสารเกิดการแยกอย่างชัดเจน แต่มี migration time ของสารที่นานเกินไป ส่วนที่ pH 7.0 และ 8.0 จะเกิดการแยกที่คล้ายกันและมี migration time ที่ใกล้เคียงกัน แต่พีค 2,4-D และ 2,4,5-T จะซ้อนทับกันและรวมเป็นพีคเดียวกันที่ pH 8.0

ดังนั้นจึงเลือกสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่มี pH 7.0 เนื่องจากมีฐานพีคที่แคบ มี migration time ที่ไม่นานเกินไป และเกิดการแยกให้เห็นทั้ง 4 พีค แต่ก็ยังมีบางส่วนที่ซ้อนทับกัน ซึ่งจะทำให้การทดลองในขั้นต่อไปเพื่อให้เกิดการแยกอย่างชัดเจน

ผลของความเข้มข้นหรือความแรงไอออนของสารละลายอิเล็กโทรไลต์

ความแรงไอออนของสารละลายอิเล็กโทรไลต์มีผลต่อประสิทธิภาพในการแยกสาร การแยกชัด และสภาพไวของวิธีวิเคราะห์ การเปลี่ยนความแรงไอออนของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ทำได้โดยการเปลี่ยนความเข้มข้นหรือชนิดของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ ซึ่งมีผลต่อการไหลอิเล็กโทรออสโมติกและความสามารถในการเคลื่อนที่ภายใต้สนามไฟฟ้าตามลำดับ



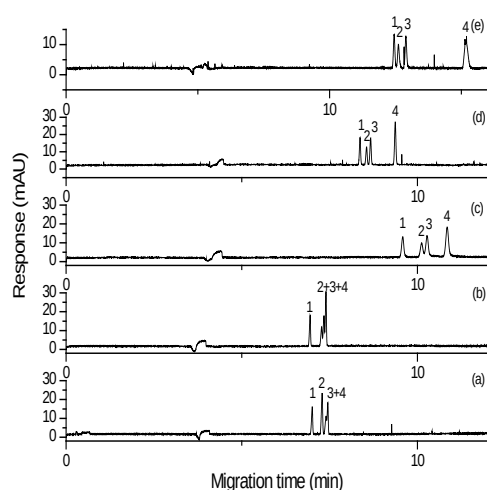
รูปที่ 3 Electropherograms แสดงการแยกของสารละลายมาตรฐานในสารละลาย phosphate buffer ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Condition: buffer composition; phosphate buffer; p H 7.0 : (a) 25 mM , (b) 50 mM , (c) 75 mM, separation voltage +30kV, temperature 25 °C, sample injection time (50mbar) 5 sec. ,capillary length 64.5 cm X 50 μ m i.d., effective length 56 cm, **Peak identification:** 1 = Dichloroprop, 2 = MCPA, 3 = 2,4-D, 4 = 2,4,5-T

รูปที่ 3 แสดงผลการทดลองที่ได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลาย Phosphate buffer ที่ความ

เข้มข้น 25 50 และ 75 mM พบว่าค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 50 mM ที่ให้ผลการทดลองที่ดีที่สุด คือสามารถแยกได้อย่างชัดเจน พิกมิจานแคบ และใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้นหรือมี migration time ที่ไม่นานเกินไป เมื่อเทียบกับความเข้มข้นที่ 25 และ 75 mM ซึ่งทั้งสองความเข้มข้นก็สามารถแยกสารได้ทั้ง 4 ชนิดเช่นกัน แต่ที่ 25 mM พิกที่ 2,3 เกิดการซ้อนทับกันบางส่วน ส่วนที่ 75 mM ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน และมีฐานพิกที่กว้าง

ผลของความเข้มข้นของสารเติมแต่ง (Buffer Additive (Sodium lauryl sulfate; SDS))



รูปที่ 4 Electropherograms แสดงการแยกของสารละลายมาตรฐาน โดยเติมสาร buffer additive (SDS) ลงในสารละลาย phosphate buffer ที่ความเข้มข้นต่างๆ

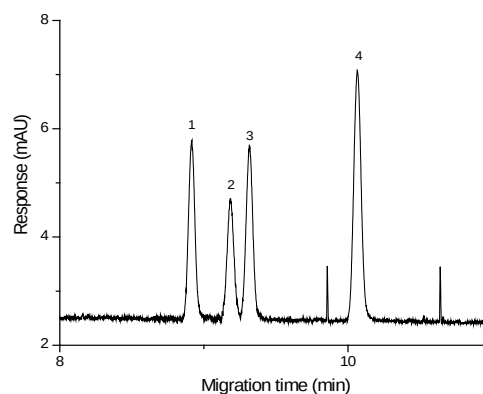
Condition: buffer composition; 50 mM phosphate buffer ; p H 7.0 : add SDS (a) 25 mM , (b) 50 mM , (c) 75 mM , (d) 100 mM and (e) 125 mM , separation voltage +30kV, temperature 25 °C, sample injection time (50mbar) 5 sec. , capillary length 64.5 cm X 50 µm i.d., effective length 56 cm, **Peak identification:** 1 = Dichloroprop, 2 = MCPA, 3 = 2,4-D, 4 = 2,4,5-T

การเติม SDS ลงในสารละลาย phosphate buffer เพื่อควบคุมการไหลอิเล็กโตรออสโมติก เพิ่มประสิทธิภาพและความเฉพาะต่อสาร ลอดอันตรกิริยาระหว่างสารและผนังด้านในแคปิลลารี ช่วยเพิ่มการละลาย

ของสารตัวอย่างและเพิ่มการแยกชัด จากการทดลองที่ผ่านมาพบว่า 2,4-D กับ MCPA จะแยกจากกันได้ยาก ดังนั้นจึงต้องเติมสารเติมแต่งลงไปในการละลายอิเล็กโตรโไลต์เพื่อช่วยให้เกิดการแยกได้อย่างชัดเจน ซึ่งในการทดลองนี้ได้ศึกษาผลของสารเติมแต่งที่ความเข้มข้น 25 50 75 100 และ 125 mM ดังรูปที่ 4 พบว่าที่ความเข้มข้นของ SDS ที่ 100 mM จะสามารถแยกสารตัวอย่างทั้ง 4 พิก ได้อย่างชัดเจน พิกฐานแคบ และใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น

การระบุ (identify) ตำแหน่งของสารตัวอย่าง

การระบุตำแหน่งของสารตัวอย่างทำได้ 2 วิธี คือการเปรียบเทียบเวลาของการเคลื่อนที่ของสาร (migration time) และการทำ spiking ซึ่งในการทดลองนี้ได้ระบุด้วย การทำ spiking เนื่องจากสามารถระบุตำแหน่งที่แน่นอน และให้ความแม่นยำของข้อมูลมากกว่าการเปรียบเทียบเวลาของการเคลื่อนที่ของสาร (migration time) การทำ spiking สารตัวอย่างผสม ด้วยสารเติม stock standard solution ของสารแต่ละชนิดลงในสารละลายตัวอย่างผสม แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแคปิลลารีอิเล็กโตรโฟรีซิส พิกจะมีขนาดใหญ่ขึ้นซึ่งหมายถึงปริมาณสารที่มากขึ้น แต่ไม่มีผลต่อพิกตำแหน่งอื่น



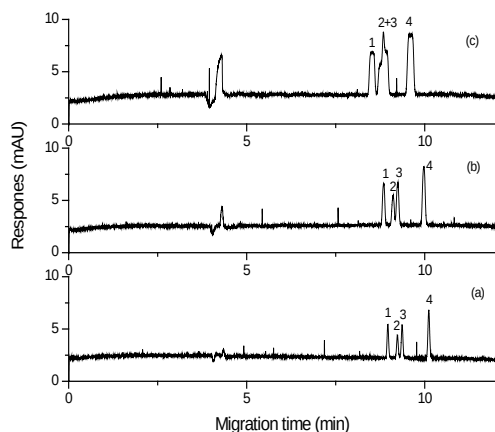
รูปที่ 5 Electropherograms แสดงการแยกของสารละลายมาตรฐานระบุตำแหน่งของสารแต่ละชนิด

Condition: buffer composition; 50 mM phosphate buffer + 100 mM SDS ; p H 7.0 , separation voltage +30kV, temperature 25 °C, sample injection time (50mbar) 5 sec. ,capillary length 64.5 cm X 50 µm i.d., effective length 56 cm, **Peak identification:**
1 = Dichloroprop, 2 = MCPA, 3 = 2,4-D, 4 = 2,4,5-T

จากการทำ spiking สามารถทราบตำแหน่งของสารทั้ง 4 ชนิด คือ Dichloroprop(1) MCPA(2) 2,4-D(3) และ 2,4,5-T (4) ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 5

ผลของเวลาในการฉีดสาร (Injection time)

ผลของเวลาในการฉีดสาร มีผลต่อการกระจายของพีค และประสิทธิภาพของการวิเคราะห์ หากเวลาในการฉีดสารเพิ่มขึ้นจะกระจายมากขึ้นและประสิทธิภาพในการแยกลดลง ในการทดลองนี้ได้ศึกษาผลของการฉีดสารที่เวลา 5 10 และ 20 นาที พบว่าที่เวลา 5 วินาที สารตัวอย่างจะแยกกันได้อย่างชัดเจน เมื่อเพิ่มเวลาการฉีดสารนานขึ้น จะทำให้สารที่ 2,3 เริ่มซ้อนทับกัน และจะซ้อนทับกันได้อย่างชัดเจนเมื่อฉีดสารเป็นเวลา 20 วินาที ดังนั้นจึงเลือกเวลาการฉีดสารที่ 5 วินาที แสดงดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 Electropherograms แสดงการแยกของสารละลายมาตรฐาน ที่ใช้เวลาในการฉีดสารตัวอย่างต่างกัน

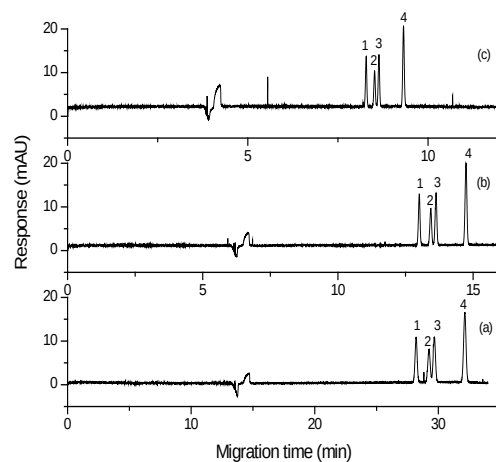
Condition: sample injection time (50mbar) : (a) 5 sec. (b) 10 sec. and (c) 20 sec.; buffer composition: 50 mM phosphate buffer + 100 mM SDS ; p H 7.0 , separation voltage +30kV, temperature 25 °C, capillary length 64.5

cm X 50 µm i.d., effective length 56 cm,

Peak identification: 1 = Dichloroprop, 2 = MCPA, 3 = 2,4-D, 4 = 2,4,5-T

ผลของความต่างศักย์ไฟฟ้า (Applied Voltage)

ความต่างศักย์ไฟฟ้ามีผลต่อประสิทธิภาพในการแยกสาร เมื่อเพิ่มความต่างศักย์ไฟฟ้าสารจะเคลื่อนที่ออกจากแคปิลลารีเร็วขึ้น เนื่องจากความเร็วในการไหลเล็กโตรออสโมติกและความเร็วเล็กโตรโฟรีติกเป็นปฏิภาคโดยตรงกับความแรงของสนามไฟฟ้า รวมทั้งทำให้การแพร่ของสารลดลง ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น จากการศึกษาค่าผลของศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ตั้งแต่ +10 +20 และ +30 kV แสดงดังรูปที่ 7 พบว่า ทั้งสามความต่างศักย์ไฟฟ้าสามารถแยกสารได้อย่างชัดเจน แต่ที่ +30 kV จะใช้เวลาในการเคลื่อนที่ของสารน้อยกว่า และพิคฐานแคบ ดังนั้นจึงเลือกความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ +30 kV



รูปที่ 7 Electropherograms แสดงการแยกของสารละลายมาตรฐาน ที่ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าต่างๆ

Condition separation voltage (a) +10 kV (b) +20 kV (c) +30 kV ; buffer composition: 50 mM phosphate buffer + 100 mM SDS ; p H 7.0 , sample injection time (50mbar) 5 sec. , temperature 25 °C, capillary length 64.5 cm X 50 µm i.d., effective length 56 cm,

Peak identification: 1 = Dichloroprop, 2 = MCPA, 3 = 2,4-D, 4 = 2,4,5-T

ผลการหาค่า Limit of detection (LOD)

การหาค่า Limit of detection (LOD) หาจากสภาวะการทดลองที่ดีที่สุด โดยทำการลดความเข้มข้นของสารตัวอย่างลงเรื่อยๆ เพื่อหาขีดจำกัดต่ำสุดที่เครื่องสามารถวิเคราะห์ได้ ผลการศึกษาที่ได้จากการทดลองนี้คือ 0.5 mg/l

สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดลองสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์หาสารกำจัดวัชพืช ประเภท คลอโรฟีนอกซีอะซิติกแอซิด ได้แก่ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid (MCPA) 2-(2,4-dichlorophenoxy)-propionic acid (dichloroprop.) คือ fused-silica capillary 50 μ m i.d. x 64.5 cm (56 cm effective length) สารละลาย 50 mM phosphate buffer ผสมกับ 100 mM sodium lauryl sulfate pH 7.0 เวลาในการฉีดสารตัวอย่าง 5 วินาที ความต่างศักย์ไฟฟ้า +30 kV อุณหภูมิ 25 °C ตรวจวัดสัญญาณด้วย UV-Visible detector ที่ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร และความยาวคลื่นอ้างอิง 280 นาโนเมตร ค่า Limit of detection คือ 0.5 mg/l

การวิเคราะห์โดยแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสสามารถทำการทดลองได้สะดวก มีความรวดเร็วเนื่องจากสามารถวิเคราะห์สารได้ภายใน 10 นาที และนอกจากนี้ยังใช้ปริมาณสารตัวอย่างและสารละลายอิเล็กโทรไลต์ในปริมาณที่น้อย ทำให้ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ต่ำ และก่อให้เกิดของเสียน้อย และไม่เพิ่มปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม ดังนั้นแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสจึงเป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่เหมาะสมในการนำมาประยุกต์ใช้วิเคราะห์สารตัวอย่าง

ข้อเสนอแนะ

ผลการทดลองที่ได้จะนำไปใช้เป็นสถานะเริ่มต้นในการพัฒนาเทคนิคการเพิ่มความเข้มข้นของสารตัวอย่าง เช่น sample stacking, field-amplified sample injection (FASI) และ anion selective

exhaustive injection (ASEI) และนำผลการทดลองที่ได้ไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างจริงต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.จันทร์เพ็ญ อินทรประเสริฐ อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ประจำหลักสูตรเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม อาจารย์เจ้าหน้าที่ รุ่งที่ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่คอยช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการวางแผนงานวิจัยในครั้งนี้ ตลอดจนให้คำปรึกษาตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ

เอกสารอ้างอิง

- ลีณา สุนทรสุข. 2550. ตำราแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร.2545. ปริมาณและมูลค่าการนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืชปี 2545-2552. ค้นเมื่อ 10 กุมภาพันธ์ 2554, จาก <http://www.oae.go.th>
- Dinelli, G., Vicari, A., Brandolini,V. 1955. Detection and quantitation of sulfonylurea herbicides in soil at the ppb level by capillary electrophoresis. Journal of Chromatography A.700: 201-207.
- Fu,F.,Xiao,L.,Wang,W.,Xu,X.,Xu,L.,Qi,G.,Chen,G. 2009. Study on the Degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2-methyl-4-chloro-phenoxyacetic sodium (MCPA - sodium) in natural agriculture-soils of Fuzhou, China using capillary electrophoresis. Science of the Total Environment. 407:1998-2003.
- Mechref,Y.,Rassi,Z.E. 1997.Capillary electrophoresis of herbicides II. Evaluation of alkylglucoside chiral surfactants in the enantiomeric separation of phenoxy acid herbicides. Journal of Chromatography A. 757: 263-273.

Silva, C.L.D., Lima, E.C.D., Tavares, M.F.M. 2003.

Investigation of Preconcentration strategies for the trace analysis of multi-residue pesticides in real by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 1014: 109-116.

Yu, L., Qin, W., Li, S.F.Y. 2005. Ionic liquids as additives for separation of benzoic acid and chlorophenoxy acid herbicides by capillary electrophoresis. *Analytical Chimica Acta*. 547: 165-171.

Zerbinati, O., Trotta, F., Giovannoli, C. 2000.

Optimization of the cyclodextrin-assisted capillary electrophoresis separation of the enantiomers of phenoxy acid herbicide. *Journal of Chromatography A*. 875: 423-430.

Zhu, L., Tu, C., Lee, H.K. 2002. On-Line Concentration of Acidic Compounds by Anion-selective Exhaustive Injection- Sweeping – Micellar Electrokinetic Chromatography. *Analytical Chemistry*. 74: 5820-5825.