มูลนิธิโครงการหลวง

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ตามโครงการวิจัยที่ 3150

งบประมาณปี 2543

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างในพืชผักผลไม้โดยวิธีแคปิลารีอิเลคโตโฟเรซีส

Development of the Analysis of Residual Pesticide in Vegetable and Fruits by Capillary Electrophoresis

รายชื่อคณะทำงาน

นางดุจดาว	เดชดำรงวุฒิ	Mrs. Dujdao Dechdamrongwut
รศ.ดร.นุชนารถ	จงเลขา	Assoc.Prof.Dr.Nuchnart Jonglaekha
ผศ.ดร.สุรพล	นธการกิจกุล	Asst.Prof.Dr.Surapol NathaKarnkijkul
นางสุธีวรรณ	ศรีอุปโย	Mrs. Sutivan Siaupayo
นางสาวนงคราญ	เรืองประพันธ์	Miss NongKlan Rangprapan
นายเจริญ	พิชัย	Mr. Jaran Pichai
นางสาวปิ่นนรี	ชินวรรณวงศ์	Miss pinnari chinvanavong

ศูนย์อารักขาพืช มูลนิธิโครงการหลวง

บทคัดย่อ

วิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผลผลิตทางการเกษตรที่เป็นที่ยอมรับในระบบสากล คือ การวิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือมาตรฐาน เช่น การวิเคราะห์โดยใช้ Gas Chromatograph (GC) และ High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) แต่การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC และ HPLC นั้น การเตรียมตัวอย่าง มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก ต้องใช้สารละลายอินทรีย์ปริมาณมาก ซึ่งทำให้เกิดเป็นของเสีย (waste) ที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม วิธีแคปิลารีอิเล็กโทรโฟเรซิส (Capillary Electophoresis, CE) เป็นอีกวิธีการหนึ่ง ที่ได้รับการยอมรับ และมีการใช้กันในต่างประเทศ วิธีนี้สามารถลดปัญหาเรื่องขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่าง และเป็นวิธีการที่ปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม จึงได้นำเอาวิธีการนี้มาทดลองใช้เพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารตกค้างในผลิตผลของโครงการหลวง

จากการทดลองเบื้องต้น พบว่าระบบที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารกำจัดแมลง สองชนิด คือ การใช้แคปิลารีที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 75 ไมโครเมตร ความยาวทั้งหมดของแคปิลารีเท่ากับ 50.2 เซนติเมตร และ ความยาวถึงจุดจับวัดเท่ากับ 40.2 เซนติเมตร กำหนดให้มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่องตรวจวัดแสงยูวี ที่ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ก่อนเริ่มฉีดตัวอย่างล้างแคปิลารีด้วย 0.01 N NaOH เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยบัฟเฟอร์บอเรต pH 8 เป็นเวลา 3 นาที บัฟเฟอร์บอเรตประกอบด้วย 5 mM $Na_2B_4O_7$ และ 30 mM SDS ให้แรงดันไฟฟ้า 20 กิโลโวลล์ ทำการฉีดตัวอย่างเป็นเวลา 5 วินาที ใช้เวลาวิเคราะห์ 10 นาที วิธีการนี้สามารถวิเคราะห์ carbofuran และ parathion methyl ได้ในระดับ 1 ppm และ 0.5 ppm ตามลำดับ ผลจากการทดลองนี้สามารถนำไปใช้เป็นความรู้พื้นฐานในการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงชนิดอื่นๆต่อไป

ABSTRACT

Analysis of pesticide residue in agricultural produce by using Gas Chromatograph (GC) and High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) is well accepted as an international standard. But the two methods take a lot of organic solvents and left much hazardous waste to the environment. An acceptable method which has been used in foreign countries is capillary Electrophoresis (CE).This method can reduce the problem. It was considered to find a more suitable method and capillary electrophoresis (CE) is believed to be the desirable one for analysis.

A possible system for analysis of two insecticides was found in this preliminary test : Using capillary size of 75 μm internal diameter, 50.2 cm total length, 40.2 cm to detection point at 25°C, using UV detector at 214 nm wave length . Before injecting the sample, the capillary was washed with 0.01 N NaOH for 1 min followed by borate buffer at pH 8 for 3 min . The buffer consists of $Na_2B_4O_7$ and 30 mM SDS giving 20 KV electric pressure. The injection time was 5 sec, analysis timing was 10 min. This method could be used for analysis of carbofuran and parathion methyl at 1 ppm and 0.5 ppm respectively . Results from this test could be used as a basic knowledge for analysis of other pesticides.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
สารบัญ	ค
บทนำ	1
อุปกรณ์และวิธีการ	2
ผลการทดลอง	6
สรุปและวิจารณ์ผล	7
กิตติกรรมประกาศ	8
เอกสารอ้างอิง	9
ภาคผนวก	10
งบประมาณ	18

โครงการหลวง

บทนำ

ในการวิเคราะห์สารตกค้างในผลผลิตทางการเกษตรนั้น นับเป็นปัญหาที่พบในห้องปฏิบัติการทุกแห่ง เนื่องจากสารพิษหรือสารเคมีที่เกษตรกรใช้มีมากมายหลายชนิด และมีชนิดใหม่ ๆ เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว การตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการมีวิธีการแตกต่างกัน ตั้งแต่วิธีการง่าย ๆ จนถึงวิธีการที่ซับซ้อน เช่น การตรวจโดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมี โดยการเทียบสี การตรวจด้วยวิธี Scanning UV-spectrophotometry , การวิเคราะห์โดยใช้ Thin Layer Chromatography (TLC) ,วิธี Gas Chromatography (GC) , วิธี High performance Liquid Chromatography (HPLC) และการใช้เอนไซม์หรือทางชีววิทยา เป็นต้น การวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารพิษตกค้างในพืชผักผลไม้ของมูลนิธิโครงการหลวง ให้มีความถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็ว ทำให้ผลผลิตของมูลนิธิปลอดภัยจากสารพิษมากยิ่งขึ้น

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิควิธีแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Capillary Electrophoresis) หรือ CE เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หลายด้าน อาทิเช่น การวิเคราะห์ยา การวิเคราะห์อาหาร การวิเคราะห์สารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม การวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืช และการวิเคราะห์สารกำจัดวัชพืช เนื่องจากเป็นวิธีที่ได้ผลแม่นยำ สะดวก รวดเร็ว มีประสิทธิภาพสูง สามารถใช้ในปริมาณสารตัวอย่างน้อย และสามารถฉีดสารตัวอย่างโดยวิธีอัตโนมัติ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะพัฒนาเทคนิคนี้ เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะใช้ในการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผลผลิตทางการเกษตร

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมสารเคมี

1.1 เตรียม Stock solution ของ NaOH 0.1 M ปริมาตร 500 ml

มวลโมเลกุลของ NaOH = 40.00 g

ในปริมาตร 1000 ml จะต้องชั่ง NaOH = 40.00 x 0.1 g

หากเตรียม 500 ml จะต้องชั่ง NaOH = $\frac{40.00 \times 0.1 \times 500}{1000}$ = 2.00 g

จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 500 ml ด้วย DI water

1.2 เตรียม NaOH 0.01 M ปริมาตร 100 ml

นำ Stock solution ของ NaOH มา 10.0 ml

ปรับปริมาตรด้วย DI water ให้ครบ 100 ml

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$0.1X10 = 100X$

$X = \frac{0.1X10}{100} = 0.01$ M

จะได้ NaOH 0.01 M ปริมาตร 100 ml

1.3 เตรียม 5 mM sodium tetraborate ปริมาตร 200 ml

มวลโมเลกุลของ sodium tetraborate = 381.37

ในปริมาตร 1000 ml จะต้องชั่ง sodium tetraborate = 0.005 x 381.37 g

หากเตรียม 200 ml จะต้องชั่ง sodium tetraborate = $\frac{0.005 \times 381.37 \times 200}{1000}$ = 0.3184 g

ปรับปริมาตรด้วย DI water จนครบปริมาตร 200 ml

1.4 **เตรียม** 30 mM sodium dodecyl sulfate (SDS) **ปริมาตร** 200 ml pH 8.0

มวลโมเลกุลของ SDS = 288.4

ในปริมาตร 1000 ml จะต้องชั่ง SDS = 0.03x 288.4

หากเตรียม 200 ml จะต้องชั่ง SDS = $\frac{0.03 \times 288.4 \times 200}{1000}$ = 1.7304 g

จากนั้นปรับปริมาตรด้วย5 mM sodium tetraborate ให้ครบปริมาตร 200 ml แล้วปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 8.0 ด้วย boric acid

1.5 **เตรียมสารมาตรฐาน** carbofuran **และ** parathion methyl

1.5.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานสต๊อก carbofuran และ parathion methyl เข้มข้น 100 ppm ชั่งสารมาตรฐาน carbofuran 10 mg ละลายใน methanol จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 100 mL ใน volumetric flask จากนั้นชั่งสารมาตรฐาน parathion 10 mg ละลายใน n-hexane จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 100 mL ในขวด volumetric flask

1.5.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน carbofuran เข้มข้น 50 ppm
ปิเปตสารละลายมาตรฐานสต๊อก carbofuran มา 5.0 mL ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 10 mL ปรับปริมาตรให้ครบ 10 mL ด้วย methanol

1.5.3 เตรียมสารละลายมาตรฐาน parathion methyl เข้มข้น 50 ppm
ปิเปตสารละลายมาตรฐานสต๊อก parathion มา 5.0 mL ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 10 mL ปรับปริมาตรให้ครบ 10 mL ด้วย n-hexane

1.5.4 เตรียมสารละลายมาตรฐาน carbofuran pH 8.0 เข้มข้น 0.5, 1, 2 ,3 ,4 และ 5 ppm
ปิเปตสารละลายมาตรฐานสต๊อก 50ppm carbofuran มา 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 mL ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 10 mL ปรับปริมาตรให้ครบ 10 mL ด้วย 30 mM SDS

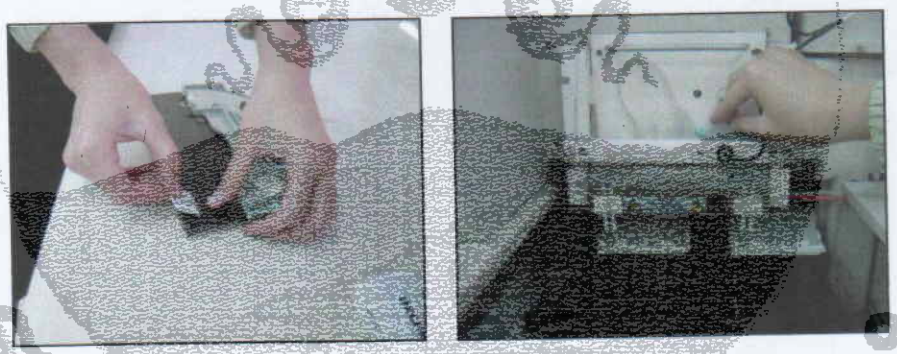
1.5.5 เตรียมสารละลายมาตรฐาน parathion methyl pH 8.0 เข้มข้น 0.5, 1, 2 ,3 ,4 และ 5 ppm ปิเปตสารละลายมาตรฐานสต๊อก 50 ppm parathion methyl มา 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 mL ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 10 mL ปรับปริมาตรให้ครบ 10 mL ด้วย30 mM SDS

เก็บสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้ทั้งหมดในตู้เย็นและไม่ให้ถูกแสง

วิธีการทดลอง

1. **เตรียมและติดตั้งแคปิลารีคอลัมน์**

ทำการเตรียมแคปิลารีคอลัมน์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 75 ไมโครเมตร ตัดให้ได้ความยาวทั้งหมดของแคปิลารีเท่ากับ 50.2 เซนติเมตร โดยมีความยาวถึงจุดจับวัด 40.2 cm จากนั้นประกอบลงใน cartridge ที่ใช้สำหรับบรรจุคอลัมน์ จากนั้นจึงติดตั้งลงในเครื่อง CE ดังรูป



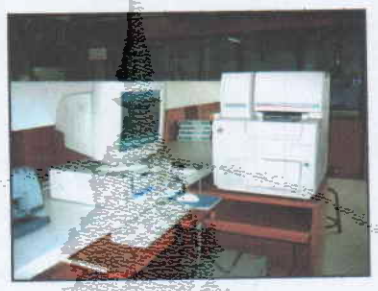
รูป 1 การเตรียมและการติดตั้งแคปิลารีคอลัมน์

2. **ปรับสมดุลของคอลัมน์ด้วยบอเรตบัฟเฟอร์** pH 8.0

ทำการล้างแคปิลารีด้วย 0.01 N NaOH เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยบัฟเฟอร์บอเรต pH 8 เป็นเวลา 3 นาที

3. **ปรับสภาวะเครื่อง CE ให้เหมาะสมสำหรับการแยก**

กำหนดให้มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่องตรวจวัดแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร และกำหนดให้แรงดันไฟฟ้า 20 กิโลโวลต์



รูป 2. การปรับสภาวะเครื่อง

4. **ขั้นตอนการทดลอง**

4.1 ทำการล้างแคปิลารีคอลัมน์ด้วย 0.01 N NaOH เป็นเวลา 1 นาที

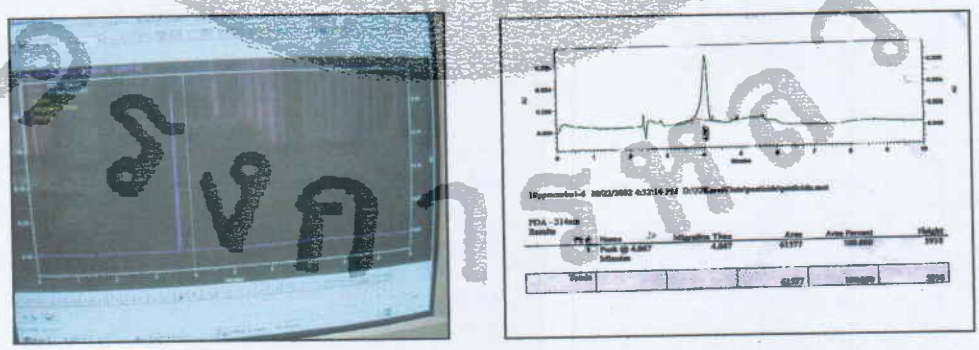
4.2 Rinse แคปิลารีคอลัมน์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 3 นาที

4.3 Equilibrate คอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์เป็นเวลา 10 นาที

4.4 กำหนดแรงดันไฟฟ้าที่ 20 kV อุณหภูมิ 25 $^{\circ}$C และ ตั้งค่าการดูดกลืนแสงที่ 214 nm

4.5 ฉีดสารมาตรฐาน carbofuran และ parathion เป็นเวลา 5 วินาที

4.6 ประเมินผล electropherogram โดยพิจารณาจากค่า retention time, peak area และ peak height และหาค่า %CV เพื่อคำนวณค่า precision ของการทดลอง



รูป 3 electropherogram ที่ได้จากการฉีดสารมาตรฐาน

ผลการทดลอง

ได้ทำการฉีดสารละลายมาตรฐาน carbofuran และ parathion ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 ppm โดยกำหนดให้มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ใช้เครื่องตรวจวัดแสงยูวี ที่ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร ให้แรงดันไฟฟ้า 20 กิโลโวลต์ ทำการฉีดตัวอย่างเป็นเวลา 5 วินาที ได้ผลดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณสาร carbofuran และ parathion methyl ที่ตรวจพบ

สารมาตรฐาน	**ความเข้มข้น (ppm)**					
	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
carbofuran	ND	Found	Found	Found	Found	Found
parathion methyl	Found	Found	Found	Found	Found	Found

ND = Non Detect หมายถึงตรวจไม่พบ

สรุปและวิจารณ์ผล

1. ระบบที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ carbofuran และ parathion methyl คือ การใช้แคปิลารีคอลัมน์แบบ fused silica column ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน = 75 μm ความยาวทั้งหมด ของแคปิลารีคอลัมน์ (Total length) = 50.2 cm ความยาวถึงจุดตรวจวัด (to detection point) = 40.2 cm และใช้ 5 mM $Na_2B_4O_7$ และ 30 mM SDS, pH 8.0 เป็นสารละลายอิเล็กโตรไลต์ (electrolyte) กำหนดให้อุณหภูมิ = 25 องศาเซลเซียส ให้แรงดันไฟฟ้า 20 กิโลโวลต์และใช้เครื่องตรวจวัดแสง ยูวี ที่ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร ก่อนเริ่มฉีด carbofuran และ parathion methyl ทำการล้างแคปิลารีด้วย 1 M HCl เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย 1 M NaOH เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยน้ำ DI เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการล้างด้วย 0.01 M NaOH เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยบอเรตบัฟเฟอร์ pH 8.0 เป็นเวลา 3 นาที ทุกครั้งก่อนเริ่มฉีดสารในครั้งต่อไป ทำการฉีดสารเป็นเวลา 5 วินาที ใช้เวลาในการวิเคราะห์ 10 นาที สามารถวิเคราะห์ carbofuran ได้ในระดับ 1 ppm และวิเคราะห์ parathion methyl ได้ในระดับ 0.5 ppm

2. เครื่องแคปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส สามารถวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่ม organophosphate และ carbarmate ได้พร้อมกันทำให้ สิ้นเปลืองเวลาและค่าใช้จ่ายน้อยกว่าการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC และ HPLC

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้มีส่วนร่วมในงานวิจัยนี้เป็นอย่างมาก ได้แก่ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ศูนย์เครื่องมือวิจัย คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ เชียงใหม่ ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในเรื่องการใช้เครื่องแคปิลารีอิเล็กโทรโฟเรซิส และท้ายที่สุดขอขอบคุณคณะกรรมการวิจัย มูลนิธิโครงการหลวง ที่ได้อนุมัติทุนวิจัยสำหรับงานนี้

คณะผู้วิจัย

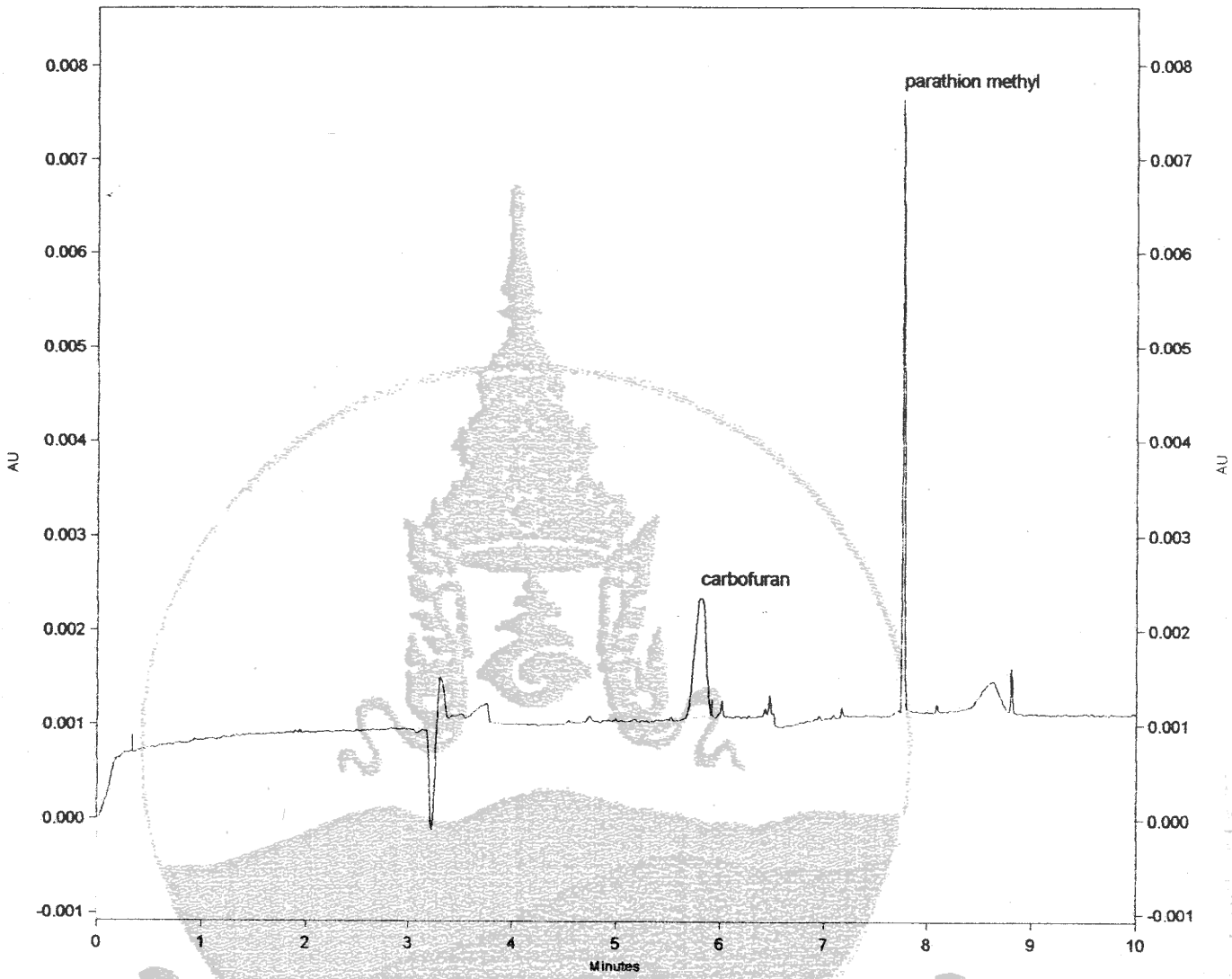
มูลนิธิโครงการหลวง

เอกสารอ้างอิง

1. ลีนา สุนทรสุข. 2544. แคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสเทคนิคใหม่สำหรับการวิเคราะห์ยาอาหารและสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม.นิวไทยมิตรการพิมพ์ กรุงเทพฯ.
2. D. Martinez, M.J. Cugat, F. Borrull, M. Calull. 2000. Solid-phase extraction coupling to capillary electrophoresis with empasis on environmental analysis. J. Chromatogr. A 902 : 65-89.
3. F. Menzinger, Ph. Schmitt-Kopplin, D. Freutag, A. Kettrup. 2000. Analysis of arochemicals by capillary electrophoresis. J. Chromatogr. A 891 : 45-47.
4. Hong-Ping Li, Gwo-Chen Li, Jen-Fon Jen. 2003. Determination of organochlorine pesticide in water using microwave assisted headspace solid-phase microextration and gas chromatography. J. Chromatogr. A 1012 : 129-137.
5. Y. Wigfield, K. A. Mccormack, R. Grant, 1996. Simultaneous determination of residues of paraquat and diquat in potatoes using high performance capillary electrophoresis with a ultraviolet detection.J. Agri. Food Chem. 41 : 2315-2318.
6. A.J.Krytinsky, D.M. Swineford, 1995. Dertermination of sulfonylurea of herbicides in grans by capillary electrophoresis. J. AOAC Int.78 : 1091-1096.
7. G. Dinelli, A. Vicari, V. Brandoline. 1995. Detection and quantitation of sulfonylurea herbicides in soil at the ppb level by capillary electrophoresis. J. Chromatogr. A 700 : 201-207.
8. M.Rossi, D. Rotilio. 1997. Analysis of carbamate pesticides by micellar electrokinetic chromatograph. J. High Resolut. Chromatogr. 20 : 265.
9. M. T. Galceran, M.C. Carneiro, M. Diez, L. Puifnou. 1997. Separation of quatemary ammonium herbicides by capillary electrophoresis with indirect UV detection. Chromatogr. A 782 : 289 - 295.
10. M.Molina, D. Perez-Bendito, M. Silva. 1999.Multi-residue of N-methylcarbamate pesticide their hydrolytic metabolites in environmental waters by solid – phase extraction and micellar electrokinetic chromatography. Electrophore. 20 : 3439 - 3449.

ภาคผนวก

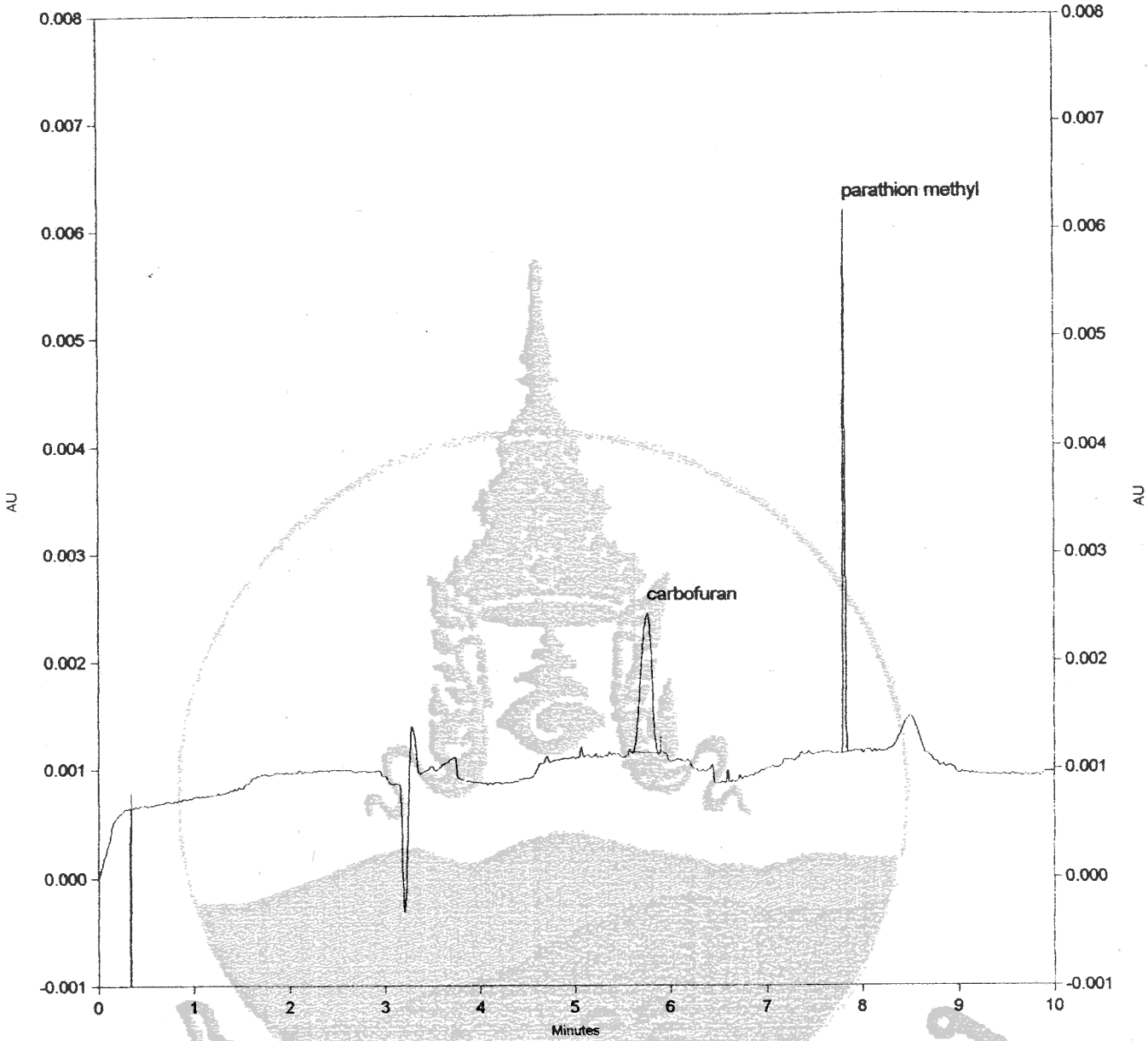
โครงการหลวง



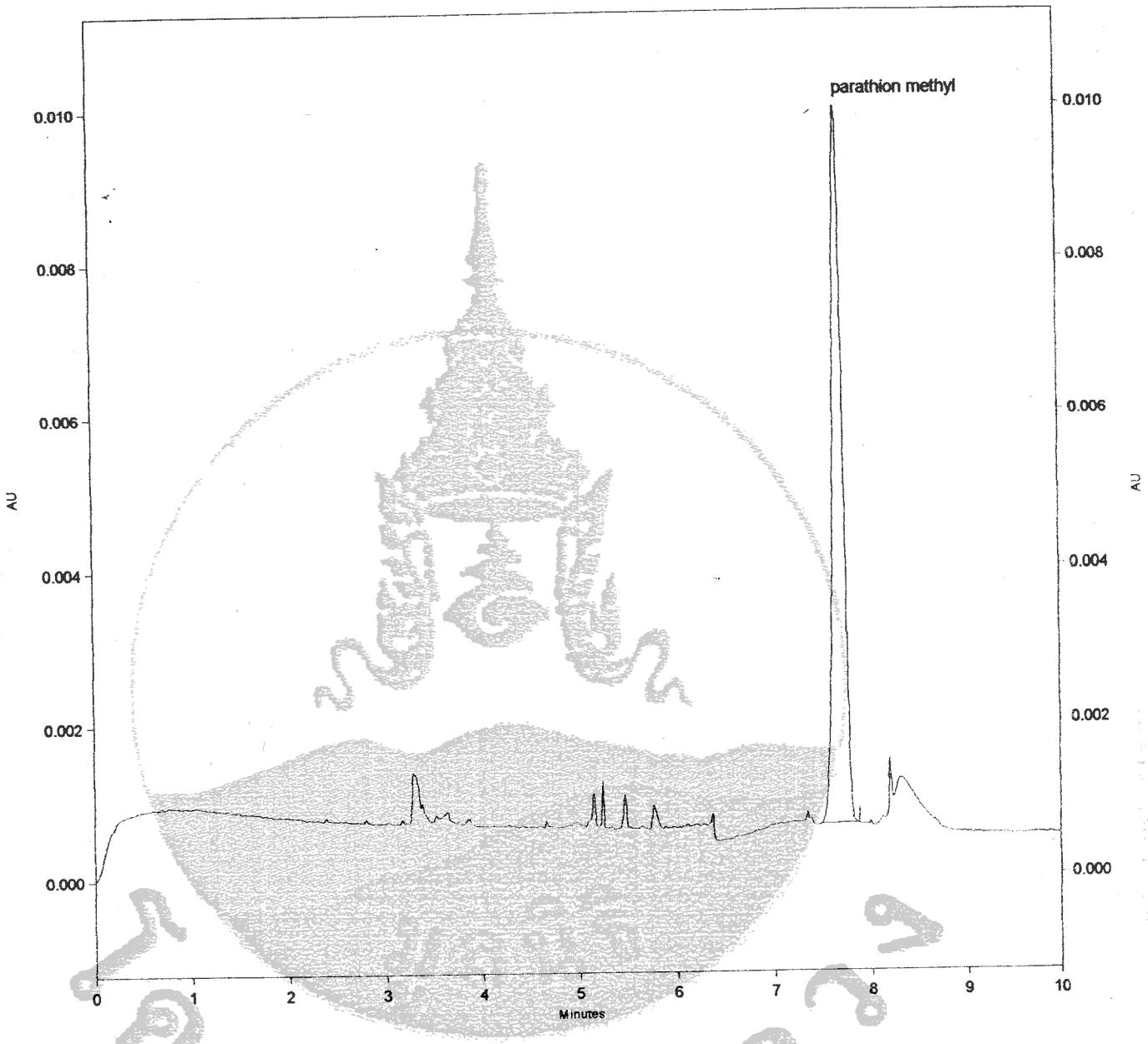
mix4 D:\32Karat\Data\pesticide\mix46-10-2004 4-07-31 PM

PDA - 214nm
Results

Name	Migration Time	Area	Area Percent	Height
carbofuran	5.813	9452	53.990	1264
parathion methyl	7.767	8055	46.010	6480
Totals		17507	100.000	7744



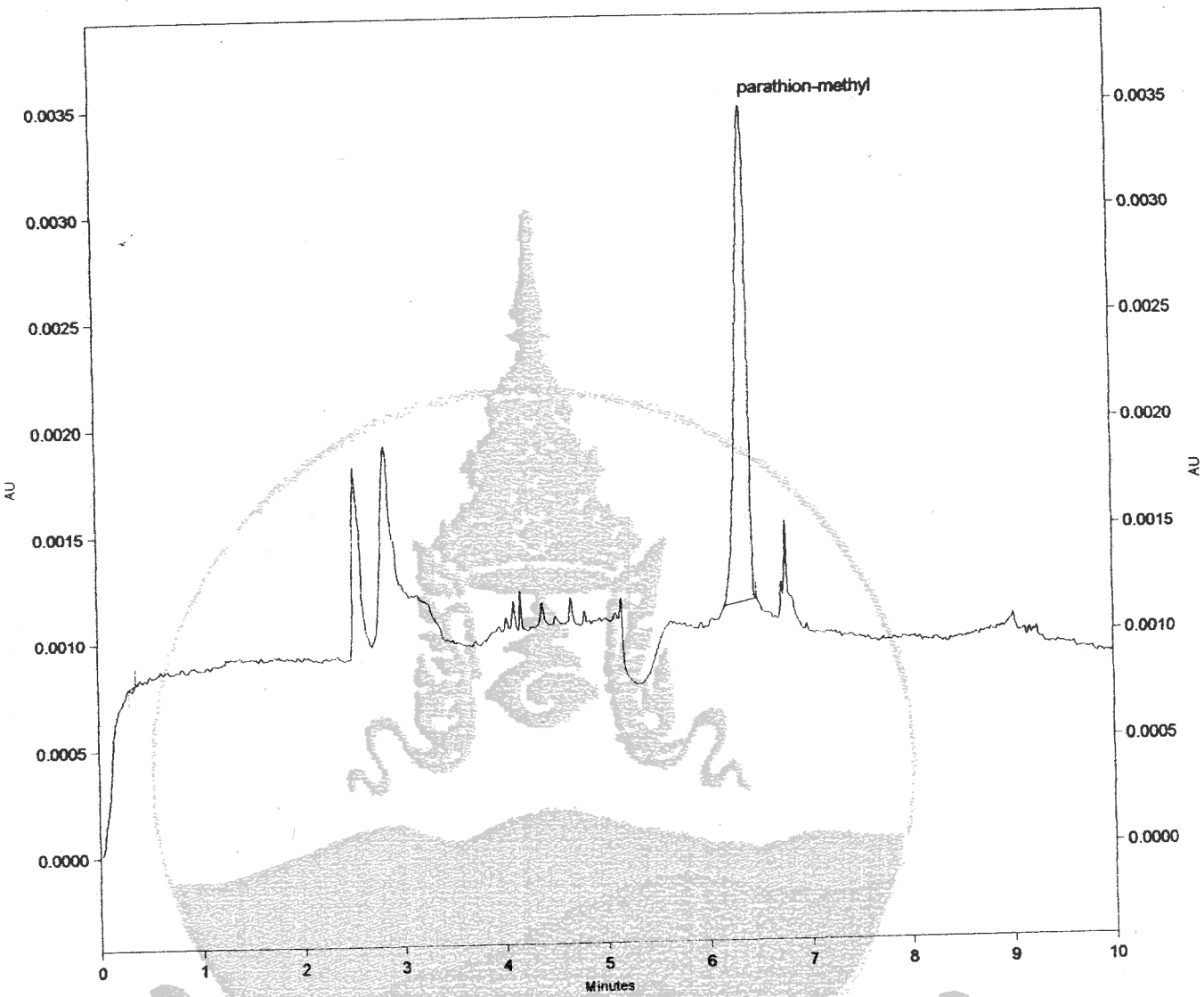
D:\32Karat\Data\pesticide\mix36-10-2004 3-45-44 PM, PDA - 214nm



para1 D:\32Karat\Data\pesticide\para16-10-2004 12-49-43 PM

PDA - 214nm
Results

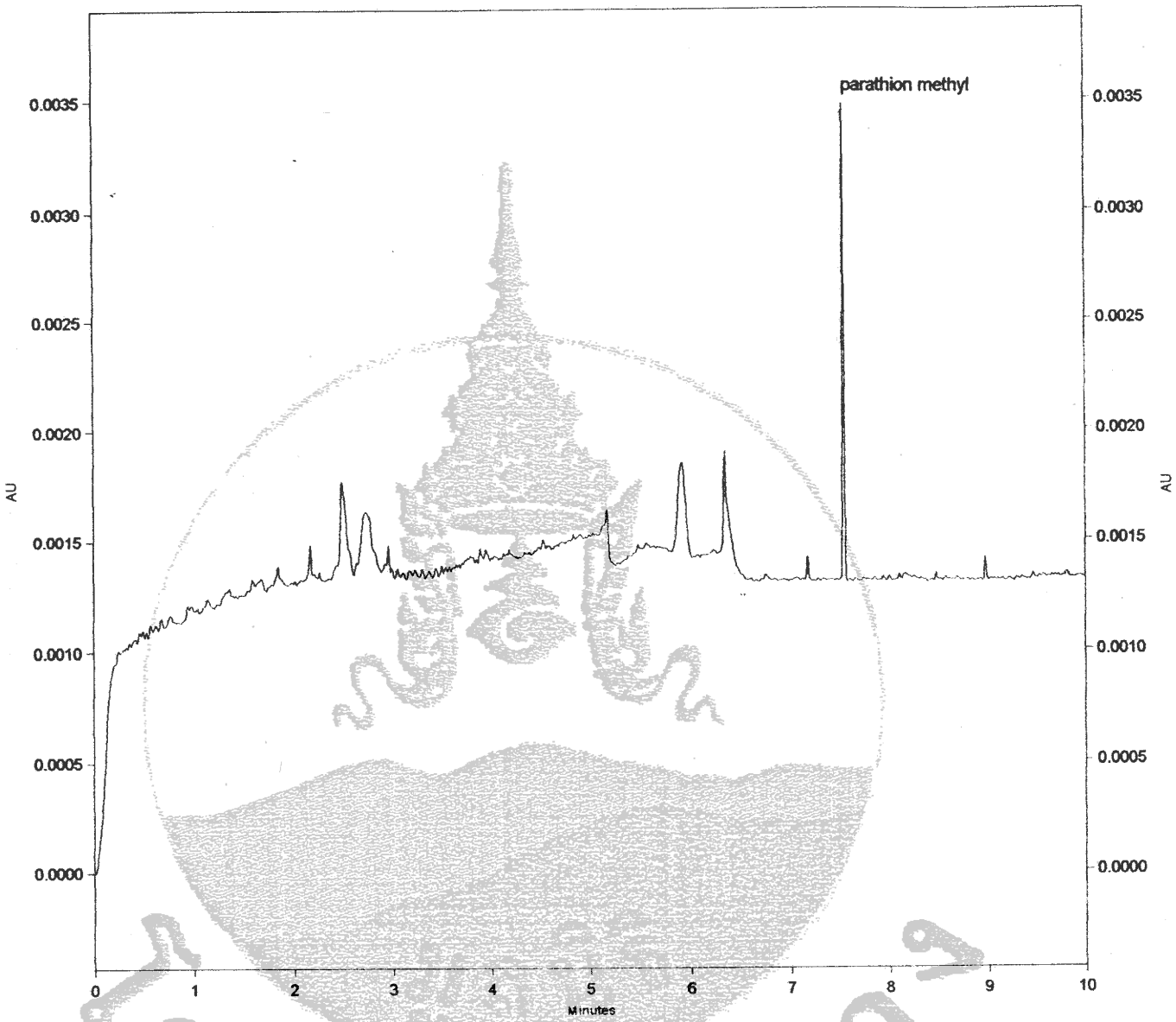
Name	Migration Time	Area	Area Percent	Height
parathion methyl	7.704	69498	100.000	9309
Totals		69498	100.000	9309



para-2 D:\32Karat\Data\pesticide\para-26-17-2004 1-16-50 PM

PDA - 214nm
Results

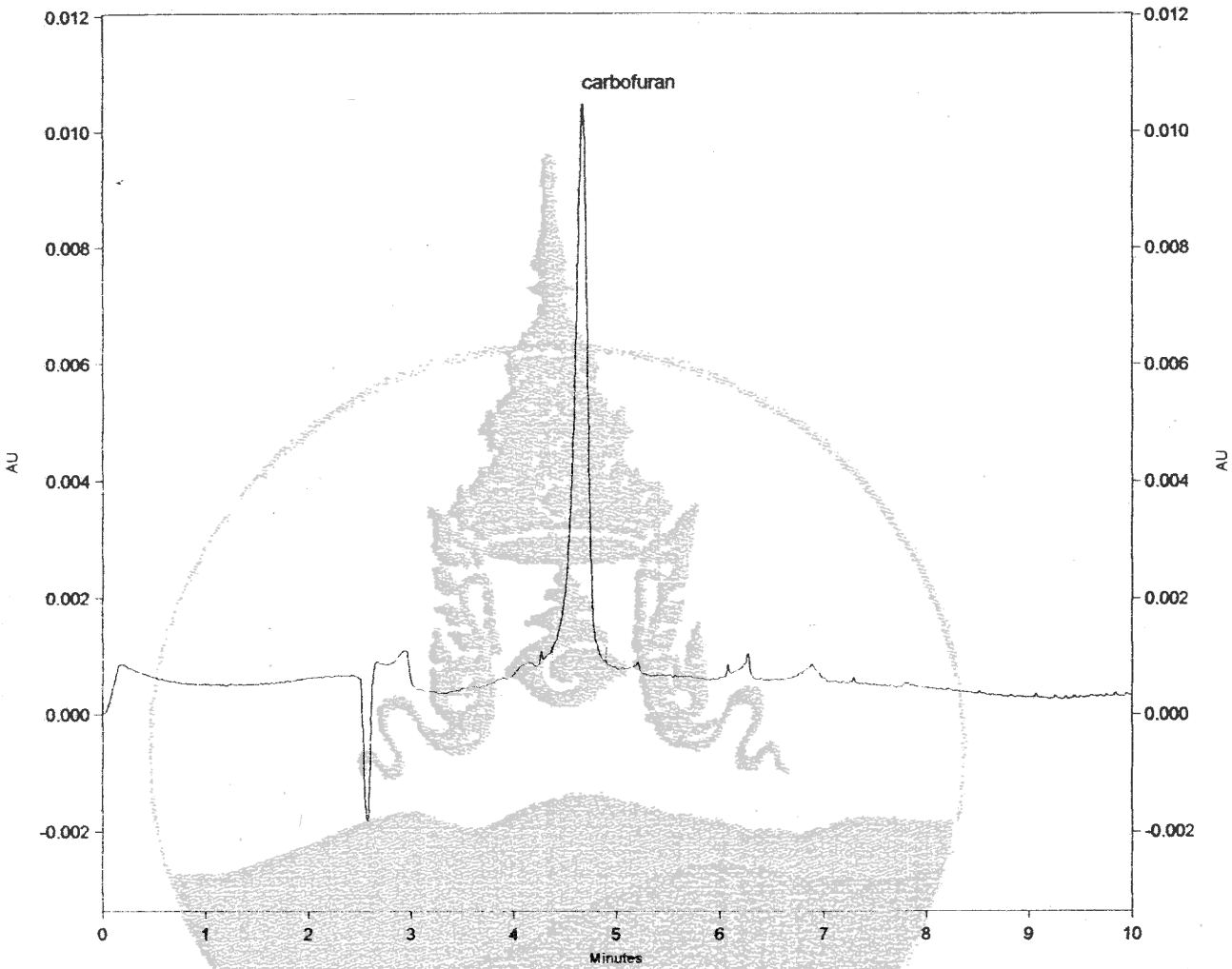
Name	Migration Time	Area	Area Percent	Height
parathion-methyl	6.404	17664	99.752	2330
Totals		17664	99.752	2330



para-m1 D:\32Karat\Data\pesticide\para-m16-15-2004 4-55-32 PM

PDA - 214nm
Results

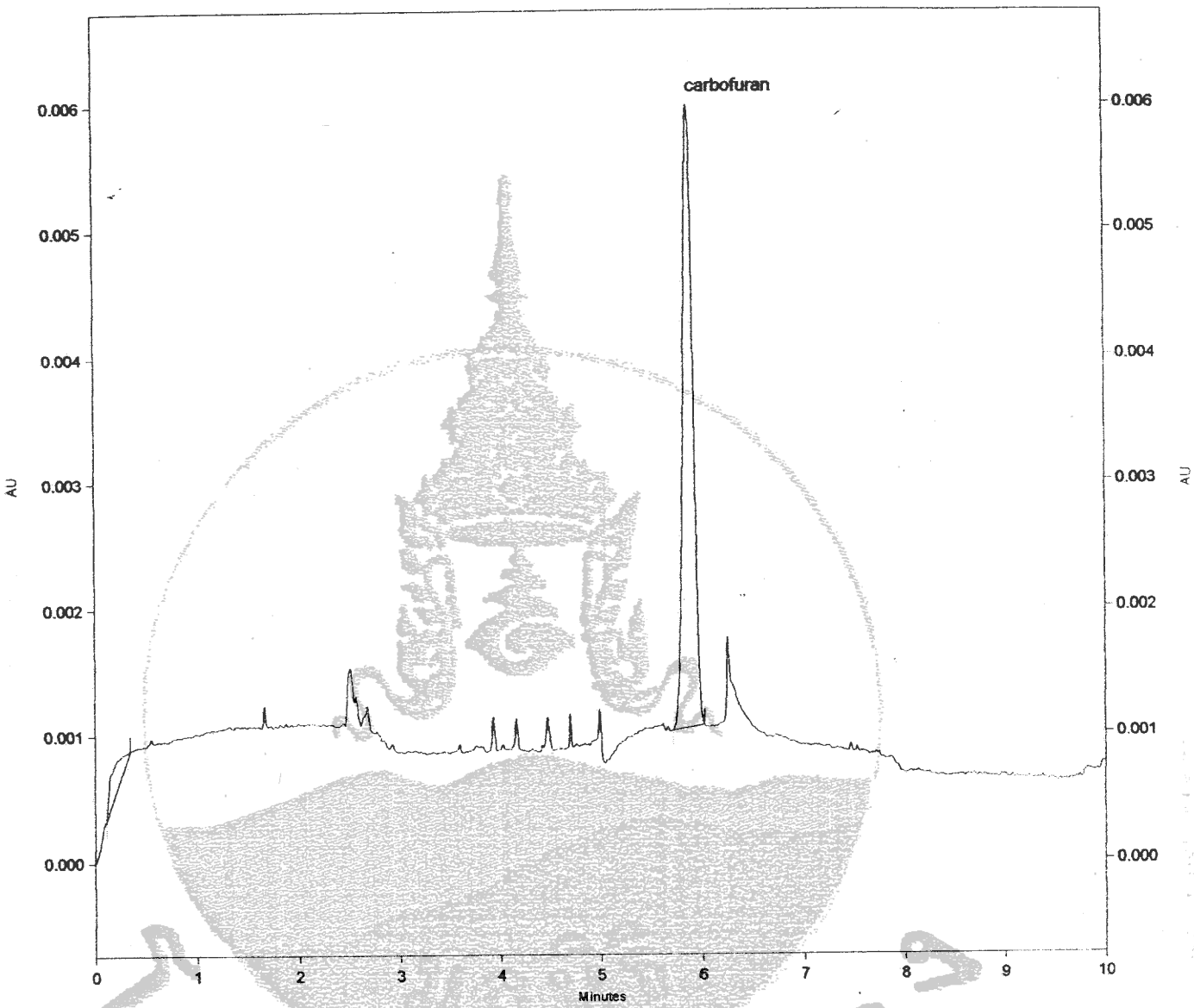
Name	Migration Time	Area	Area Percent	Height
parathion methyl	7.550	2591	100.000	2156
Totals		2591	100.000	2156



10ppmcarbo1-2 D:\32Karat\Data\pesticide\10-14-2002 2-08-58 PM10ppmcarbo1-2

PDA - 214nm
Results

Pk #	Name	Migration Time	Area	Area Percent	Height
1	carbofuran	4.671	81649	100.000	9497
Totals			81649	100.000	9497



para-m1 D:\32Karat\Data\pesticide\para-m16-15-2004 4-14-58 PM

PDA - 214nm
Results

Name	Migration Time	Area	Area Percent	Height
carbofuran	5.888	33963	93.823	4945
Totals		33963	93.823	4945

งบประมาณ

งบประมาณที่ได้รับจากฝ่ายวิจัย มูลนิธิโครงการหลวง 50,000 บาท

มูลนิธิโครงการหลวง