การพัฒนาการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

สายรุ้ง อวยพรกชกร

DEVELOPMENT FOR PESTICIDE ANALYSIS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Sairoong Ouypornkochagorn

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 65000

Department of Chemistry, Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

E-mail address: sairoongo@nu.ac.th (S. Ouypornkochagorn)

บทคัดย่อ

สารกำจัดแมลงกลุ่มออแกโนคลอรีนเป็นสารที่มีการใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช แต่สารเหล่านี้มีความคงทนในสิ่งแวดล้อมสูง โดยทั่วไปแล้วการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่มออแกโนคลอรีนมักใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี แต่เทคนิคดังกล่าวมีการเตรียมตัวอย่างยุ่งยาก ดังนั้นจึงมีการพัฒนาการวิเคราะห์หาปริมาณออแกโนคลอรีนโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงก็เป็นเทคนิคหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารเหล่านี้ การพัฒนาการวิเคราะห์หาปริมาณ 4,4′ DDT และ 4,4′ DDE ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงด้วยคอลัมน์ μBondapak C_{18} (3.9x300 ม.ม.) โดยทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 226 นาโนเมตรนั้น แบ่งออกเป็น 2 ระบบ ระบบแรกเป็นระบบไอโสเครติก ซึ่งมี 65.0% เป็นเฟสเคลื่อนที่ ส่วนในระบบที่สองซึ่งเป็นระบบเกรเดียนที่มีการเปลี่ยนสัดส่วนความเข้มข้นของอะซีโตไนไตรล์จาก 75.0% เป็น 60.0% ภายในเวลา 15 นาที จากการทดลองพบว่า ระบบเกรเดียนเป็นระบบที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารประกอบ 4,4′ DDT และ 4,4′ DDE โดยมีขีดจำกัดการตรวจวัดของ 4,4′ DDT เท่ากับ 0.12 ส่วนในล้านส่วน และมีขีดจำกัดการตรวจวัดสำหรับ 4,4′ DDE เท่ากับ 0.05 ส่วนในล้านส่วน

คำสำคัญ : 4,4′ DDT/ 4,4′ DDE/ HPLC/ โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง/ สารกำจัดแมลงกลุ่มออแกโนคลอรีน

ABSTRACT

Organochlorine pesticides were used for agricultural pest control but their persistence in the environment was very long. The most common method for identifying organochlorine pesticides was gas chromatography that used the complicated sample preparation technique. High performance liquid chromatography was the another interesting technique that could be used for analysing them. Determination of 4,4′ DDT and 4,4′ DDE by high performance liquid chromatography were employed on μ-Bondapak C_{18} column (3.9x300 mm.) at 226 nm. The organochlorine pesticide speciations were carried out by using two systems. The first one was the isocratic system that used 65.0% acetonitrile as mobile phase, whereas the last system was the gradient system that varied acetonitrile concentration from 75.0% to 60.0% within 15 minutes. From the experiment, the gradient system was found to be more appropriate for separating 4,4′ DDT and 4,4′ DDE. Limits of detections were 0.12 ppm for 4,4′ DDT and 0.05 ppm for 4,4′ DDE, respectively.

Keywords: 4,4′ DDT/ 4,4′ DDE/ HPLC/ high performance liquid chromatography/ organochlorine pesticides

---

บทนำ

ดีดีที(1,5) (Dichlorodiphenyl trichloroethane, DDT) เป็นสารกำจัดแมลงที่มีการใช้อย่างแพร่หลายทั่วโลกในช่วงเวลาที่ผ่านมา เนื่องจากกำจัดแมลงได้มากชนิด สังเคราะห์ได้ง่าย ราคาถูก และมีฤทธิ์อยู่นาน โดยนำมาใช้เป็นสารกำจัดพาหะนำโรคมาลาเรีย ไข้เหลืองและไข้รากสาด โดยเฉพาะอย่างยิ่งใช้กำจัดแมลงวันและยุง แต่สารกำจัดแมลงชนิดนี้มีความคงทนและสะสมในสิ่งแวดล้อมได้นาน ปัจจุบันจึงยังพบว่ามีการปนเปื้อนสารกำจัดแมลงกลุ่มออแกโนคลอรีน โดยเฉพาะดีลดรินและดีดีทีในผลผลิตทางการเกษตรและอาหารที่ใช้ในการบริโภค และเมื่อสารกำจัดแมลงกลุ่มนี้เข้าสู่ร่างกายจะเก็บสะสมในไขมันและเนื้อเยื่อไขมัน จึงมีการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสารดังกล่าวและอนุพันธ์ของมันด้วยเทคนิคต่างๆ โดยเฉพาะเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีเพื่อวิเคราะห์สารกลุ่มนี้ในตัวอย่างต่างๆ เช่น อวัยวะภายในสุนัขป่า(3) น้ำนม(2,7,8) เนื้อเยื่อตับ(7) พืชสมุนไพร(6) และดิน(4) เป็นต้น ในการศึกษานี้จึงสนใจพัฒนาการแยกสารประกอบดีดีทีและดีดีอี (Dichlorodiphenyl dichloroethane, DDE) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของดีดีทีด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ไม่เพิ่มมลพิษให้กับอากาศและมีค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ต่ำกว่าการวิเคราะห์โดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี

สารเคมี อุปกรณ์ และวิธีการ

เครื่อง HPLC ประกอบด้วยปั๊มพ์ของ Waters รุ่น 510 ซึ่งต่อกับเครื่องฉีดสารตัวอย่างของ Rheodyne รุ่น 7125 โดยควบคุมปริมาตรเข้าสู่คอลัมน์เท่ากับ 20 μl และตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดสัญญาณชนิดวัดการดูดกลืนแสงของ Waters รุ่น 486 คอลัมน์ที่นำมาใช้แยกสารดังกล่าวได้แก่ คอลัมน์ μBondapak C_{18} ขนาด 3.9x300 ม.ม. ของ Waters สารเคมีที่นำมาใช้ แบ่งออกเป็นสารมาตรฐาน 4,4′ DDT และ 4,4′ DDE เป็นผลิตภัณฑ์จากบริษัท Supelco (USA) และอะซีโตไนไตรล์ (HPLC grade) เป็นผลิตภัณฑ์จากบริษัท Ajax chemical (Australia) ในการเตรียมสารมาตรฐาน 4,4′ DDT และ 4,4′ DDE จะเตรียมให้มีความเข้มข้น 100 ppm โดยใช้อะซีโตไนไตรล์เป็นตัวทำละลาย

การแยกสารประกอบ 4,4′ DDT และ 4,4′ DDE ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง แบ่งออกเป็น 2 ระบบ คือ ระบบไอโสเครติกและระบบเกรเดียน โดยระบบไอโสเครติกใช้อะซีโตไนไตรล์และน้ำในอัตราส่วน 65:35 โดยปริมาตรเป็นเฟสเคลื่อนที่ ส่วนระบบเกรเดียน ซึ่งแบ่งออกเป็น ระบบที่มีการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนความเข้มข้นของอะซีโตไนไตรล์จาก 75.0% เป็น 60.0% ในเวลา 15 นาที และระบบที่มีการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนความเข้มข้นของอะซีโตไนไตรล์จาก 75.0% เป็น 65.0% ในเวลา 15 นาที โดยควบคุมอัตราการเคลื่อนที่ของเฟสเคลื่อนที่เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที แล้วทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 226 นาโนเมตร และฉีดสารละลายมาตรฐานผสมระหว่างสารประกอบ 4,4′ DDT และ 4,4′ DDE เข้มข้น 6.00 ppm และ 3.00 ppm ตามลำดับเข้าสู่ระบบ HPLC หลังจากนั้นคำนวณหาค่า capacity factor (k') แล้วเลือกระบบที่เหมาะสม เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานและหาค่าขีดจำกัดการตรวจวัดของสารทั้ง 2 ชนิด โดยฉีดสารละลายมาตรฐานแต่ละขวดจำนวน 3 ครั้ง

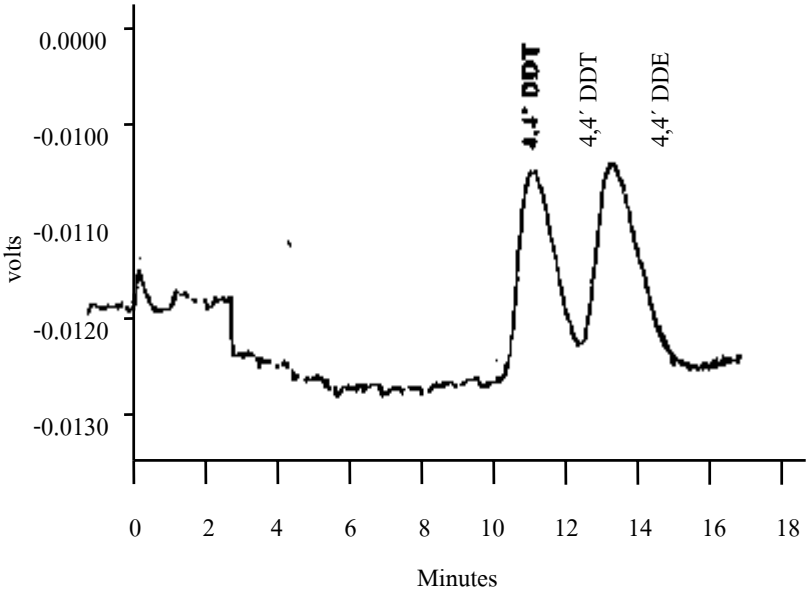
ผลการทดลองและการวิจารณ์

1. การเปรียบเทียบการแยกสารประกอบ 4,4′ DDT และ 4,4′ DDE ด้วยระบบไอโสเครติกและระบบเกรเดียน

เมื่อฉีดสารละลายมาตรฐานผสมระหว่างสารประกอบ 4,4′ DDT และ 4,4′ DDE เข้มข้น 6.00 ppm และ 3.00 ppm ตามลำดับ ในระบบไอโสเครติกและในระบบเกรเดียนทั้ง 2 ระบบ และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 226 นาโนเมตร ได้ผลการทดลอง ดังตารางที่ 1 และรูปที่ 1-2

ตารางที่ 1 ค่า capacity factor ของสารประกอบ 4,4′ DDT และ 4,4′ DDE ในระบบไอโสเครติกและระบบ เกรเดียน เมื่อ เฟสเคลื่อนที่ของระบบไอโสเครติก คือ อะซีโตไนไตรล์และน้ำในสัดส่วน 65:35 (v/v) ระบบ เกรเดียน 1 คือ การเปลี่ยนความเข้มข้นของอะซีโตไนไตรล์จาก 75.0% เป็น 60.0% ภายใน 15 นาที และระบบเกรเดียน 2 คือ การเปลี่ยนความเข้มข้นของอะซีโตไนไตรล์จาก 75.0% เป็น 65.0% ภายใน 15 นาที โดยตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 226 นาโนเมตร

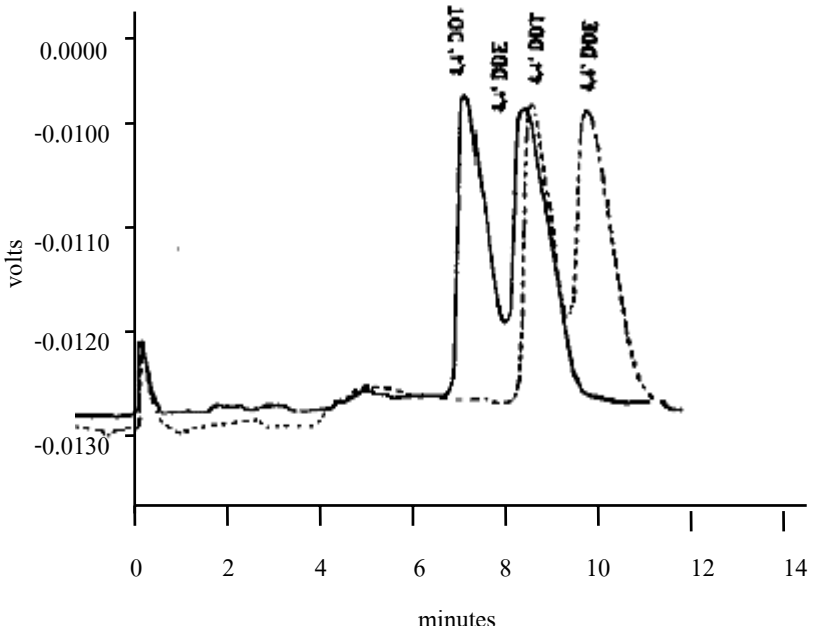
สารประกอบ	capacity factor (k')		
	ไอโสเครติก	เกรเดียน 1	เกรเดียน 2
4,4′ DDT	5.30	3.58	4.13
4,4′ DDE	6.39	4.22	5.08



รูปที่ 1 โครมาโทแกรมแสดงการแยกสารประกอบ 4,4′ DDT และ 4,4′ DDE เข้มข้น 6.00 ppm และ 3.00 ppm ตามลำดับ โดยเฟสเคลื่อนที่ คือ อะซีโตไนไตรล์:น้ำ ในอัตราส่วน 65:35 (v/v)

จากตารางที่ 1 รูปที่ 1 และรูปที่ 2 จะเห็นได้ว่าทั้ง 3 ระบบสามารถทำการแยกสารละลายผสมระหว่างสารประกอบ 4,4′ DDT และ 4,4′ DDE ได้ แต่เนื่องจากสารประกอบ 4,4′ DDE เป็นอนุพันธ์ของสารประกอบ 4,4′ DDT ดังนั้นการแยกของสารประกอบทั้งสองจึงไม่สามารถแยกจากกันได้อย่างชัดเจน ถึงแม้จะทำการแยกโดยระบบไอโสเครติกหรือทำการเปลี่ยนสัดส่วนความเข้มข้นของเฟสเคลื่อนที่ก็ไม่สามารถทำการแยกสารประกอบทั้งสองได้ โดยระบบไอโสเครติกที่สามารถแยกสาร

ประกอบทั้งสองได้ดีที่สุด คือ อะซีโตไนไตรล์:น้ำ ในอัตราส่วน 65:35 (v/v) ดังรูปที่ 1 นอกจากนี้การแยกในระบบไอโสเครติกจะใช้เวลาในการแยกสารประกอบทั้งสองมากกว่าระบบเกรเดียน ถ้าพิจารณาความสูงของสัญญาณทั้งสองด้วยระบบไอโสเครติกจะพบว่า สัญญาณของสารประกอบทั้งสองจะต่ำกว่าการแยกด้วยระบบเกรเดียน ดังนั้นจึงควรพัฒนาการวิเคราะห์สารประกอบ 4,4′ DDT และ 4,4′ DDE ด้วยระบบเกรเดียน เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยระบบเกรเดียน 1 ซึ่งเป็นการเปลี่ยนความเข้มข้นของอะซีโตไนไตรล์จาก 75.0% เป็น 60.0% สามารถทำการแยกสารเหล่านี้ได้ในเวลาไม่นานนัก มีค่า capacity factor ไม่สูงมาก ถึงแม้การแยกของสารประกอบ 4,4′ DDT และ 4,4′ DDE จะไม่สามารถแยกได้ถึงฐานพีค แต่ความแตกต่างของค่า retention time ก็มีค่ามากพอ ดังนั้นระบบนี้ควรเป็นระบบที่เหมาะสมที่สุดสำหรับทำการแยกสารประกอบ 4,4′ DDT และ 4,4′ DDE คือใช้เวลาในการแยกสารประกอบ 4,4′ DDT และ 4,4′ DDE เป็น 10.07 นาทีและ 11.49 นาทีตามลำดับ



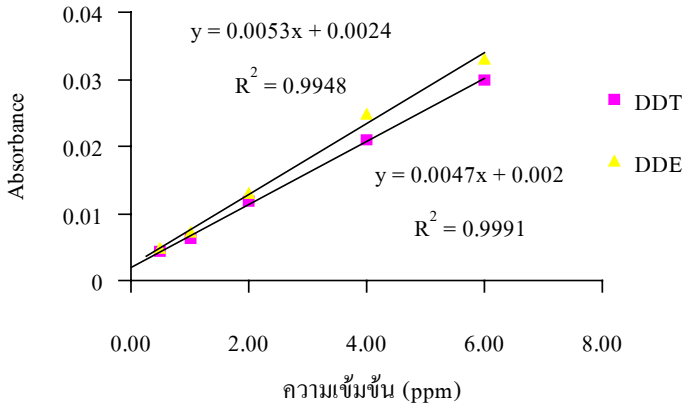
รูปที่ 2 โครมาโทแกรมแสดงการแยกสารประกอบ 4,4′ DDT และ 4,4′ DDE เข้มข้น 6.00 ppm และ 3.00 ppm ตามลำดับในระบบเกรเดียน ภายในเวลา 15 นาที เมื่อ

—— คือ การเปลี่ยนความเข้มข้นของอะซีโตไนไตรล์จาก 75.0% เป็น 60.0%

----- คือ การเปลี่ยนความเข้มข้นของอะซีโตไนไตรล์จาก 75.0% เป็น 65.0%

2. กราฟมาตรฐานและขีดจำกัดของการตรวจวัด

เมื่อนำระบบเกรเดียน 1 ที่มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของอะซีโตไนไตรล์จาก 75.00% เป็น 60.00% ภายในเวลา 15 นาที เป็นเฟสเคลื่อนที่ สำหรับการแยกสารประกอบ 4,4′ DDT และ 4,4′ DDE ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 226 นาโนเมตร มาสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายผสมระหว่างสารประกอบ 4,4′ DDT และ 4,4′ DDE ในช่วงความเข้มข้น 0.25-6.00 ppm ได้กราฟดังรูปที่ 3 โดยมีขีดจำกัดการตรวจวัดดังตารางที่ 2



รูปที่ 3 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานผสมระหว่างสารประกอบ 4,4′ DDT และ 4,4′ DDE

ตารางที่ 2 ขีดจำกัดการตรวจวัดของสารละลายมาตรฐานผสมระหว่างสารประกอบ 4,4′ DDT และ 4,4′ DDE ที่ความยาวคลื่น 226 นาโนเมตร

สารประกอบ	ขีดจำกัดการตรวจวัด (ppm)
4,4′ DDT	0.12
4,4′ DDE	0.05

S/N=2 (n=3)

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองพบว่า เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบ 4,4′ DDT และ 4,4′ DDE ได้ด้วยคอลัมน์ μBondapak c_{18} ขนาด 3.9x300 ม.ม. ที่ความยาวคลื่น 226 นาโนเมตร เมื่อเปรียบเทียบการแยกสารดังกล่าวด้วยระบบไอโสเครติกและระบบเกรเดียน พบว่า ระบบที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารประกอบทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ ระบบเกรเดียนที่มีการเปลี่ยนความเข้มข้นของอะซีโตไนไตรล์จาก 75.0% เป็น 60.0% ภายในเวลา 15 นาที ซึ่งใช้เวลาในการแยกสารประกอบ 4,4′ DDT และ 4,4′ DDE เป็น 10.07 นาทีและ 11.49 นาทีตามลำดับ โดยมีขีดจำกัดของการตรวจวัดของการวิเคราะห์สารประกอบ 4,4′ DDT และ 4,4′ DDE เท่ากับ 0.12 ppm และ 0.05 ppm ตามลำดับ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ความอนุเคราะห์ทางด้านเครื่องมือและอุปกรณ์ และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้เงินทุนสนับสนุนงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

พาลาภ สิงหเสนีย์. 2529. *พิษของยาฆ่าแมลงต่อผู้ใช้และสิ่งแวดล้อม* ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย 71-78.

Çok,İ., Biligili A., Yarsan E., et. al. 1998. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 311-316.

Dua, V.K., Kumari, R., Sharma, V.P. 1996. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57, 568-574.

Hartonen, K., BΦwadt, S., Hawthorne, B., et. al. 1997. *J. Chromatogr. A*, 774, 229-242.

Kamrin, M.A. Pesticide *Profiles :Toxicity, Environmental Impact, and Fate*. New York: CRC Press LLC, 1997, p.239-295.

Lino, C.M., Silverira, M.I.N.D. 1997. *J. Chromatogr. A,* 769, 275-283.

Luden A., Noren K. 1998. *Arch. Environ. Contamina. Toxicol.* 34: 414-423.

Sharifi, M, Connell, D.W. 1997. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. 59, 665-670.