การศึกษาเปรียบเทียบวิธีเตรียมตัวอย่างข้าวเพื่อทดสอบสารหนูอนินทรีย์

A Study on the method comparison of rice sample preparation for inorganic arsenic analysis

น.ส. สวรินทร์ สินะวิวัฒน์[1*], นงนุช เมธียนต์พิริยะ[1**]

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมเพื่อหาปริมาณสารหนูอนินทรีย์ ในข้าว การวัดปริมาณสารหนูอนินทรีย์จะใช้เทคนิค speciation ด้วยเครื่อง HPLC-ICP-MS วิธีดังกล่าว ใช้คอลัมน์แบบ ion exchange และสารเคลื่อนที่เป็นสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมฟอสเฟต ความเป็นกรด-ด่าง 6.3 เตรียมตัวอย่างโดยนำข้าวหอมมะลิมาสกัดสารหนูด้วย 2 วิธี คือ วิธีสกัดด้วยกรดไตรฟลูออโรอะซิติกกับกรดไนตริก (Trifluoroacetic acid, TFA) และวิธีการสกัดด้วยเครื่องแยกสารด้วยเสียงที่มีความถี่สูง (Solvent extraction with sonication) พบว่า การเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีสกัดด้วยเครื่องแยกสารด้วยเสียงที่มีความถี่สูงให้ผลการวิเคราะห์มีระดับความเที่ยง ของการวิเคราะห์ตัวอย่างสูงกว่าวิธีสกัดด้วยกรดไตรฟลูออโรอะซิติก ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากโครมาโตแกรมของสารหนูอนินทรีย์ (as As^{+5}) ด้วยวิธีดังกล่าวมีสิ่งรบกวน (Interference) มาก จึงใช้วิธีเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีสกัดด้วยเครื่องแยกสารด้วยเสียง ที่มีความถี่สูงสำหรับการศึกษาหาปริมาณสารหนูในข้าว และจากการศึกษาหาปริมาณสารหนูในข้าวหอมมะลิเบื้องต้น พบว่า ตัวอย่างข้าวหอมมะลิมีปริมาณสารหนูทั้งหมดอยู่ช่วง 0.072–0.075 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และปริมาณสารหนูอนินทรีย์ อยู่ในช่วง 0.032-0.039 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

Abstract

The aim of this research is to compare the sample preparation for inorganic arsenic analysis in rice. The measurement of inorganic arsenic in rice using speciation technique with high performance liquid chromatography coupled to inductively plasma mass spectrometry (HPLC-ICP-MS) is described. Arsenic species were separated and determined by chromatographing extracts on ion exchange column with ammonium phosphate buffer as the mobile phase at a pH 6.3. Jasmine rice was extracted by 2 methods, treatment with Trifluoroacetic acid (TFA) and solvent extraction with sonication. The study showed that the sample treatment by solvent extraction with sonication gave the better accuracy than the sample treatment with TFA. It may be resulted from the interference on inorganic arsenic (as As(V)) chromatogram in the sample treatment with TFA. Then the preliminary study for total arsenic and inorganic arsenic in rice was done by using the samples prepared from solvent extraction with sonication method. The results showed that the total arsenic in jasmine rice samples ranged from 0.072 to 0.075 mg/kg whereas the inorganic arsenic ranged from 0.032 to 0.039 mg/kg.

คำสำคัญ : ข้าว, สารหนูอนินทรีย์, สารหนูอินทรีย์

Keywords : Rice, Inorganic arsenic, Organic arsenic, Speciation

[1]กรมวิทยาศาสตร์บริการ

*E-mail address: savarin@dss.go.th

**corresponding author E-mail address : nmaytee@dss.go.th

1. บทนำ (Introduction)

ผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรเป็นสินค้าสำคัญสำหรับประเทศในเขตภูมิภาคอาเซียน โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้าวซึ่งเป็นอาหารหลักของประชาชนในหลายๆ ประเทศ การเติบโตของการค้าของเหล่าประเทศอาเซียนมีผลมาจากการเพิ่มศักยภาพทางการค้าขายผลผลิตทางการเกษตรในตลาดนานาชาติ ในแต่ละปีประเทศไทยมีการส่งออกข้าวในปริมาณมาก แต่ก็ยังมีปัญหาด้านคุณภาพสินค้าเกิดขึ้นเป็นระยะ เช่น การปนเปื้อนของสารพิษหรือสารปนเปื้อนต่างๆ ในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรเหล่านั้น สารปนเปื้อนหนึ่งที่สำคัญได้แก่ สารหนู มีการรายงานอยู่เป็นระยะถึงการปนเปื้อนของสารหนูในข้าวส่งออก โดยพบว่าปริมาณสารหนูทั้งหมดที่ปนเปื้อนในข้าวโดยเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.004 - 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ในบางส่วนพบปริมาณสูงถึง 150 - 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สาเหตุของการปนเปื้อนคาดว่ามาจากดินและนาข้าว ซึ่งเมล็ดข้าวสามารถสะสมสารหนู (bio-accumulation) ไว้ได้มากกว่าธัญพืชชนิดอื่น และส่งผลกระทบอันตรายต่อสุขภาพของประชาชน แต่ละประเทศจึงมีเกณฑ์กำหนดปริมาณการปนเปื้อนของสารหนูไว้และหลายประเทศมีการกำหนดค่าปริมาณสูงสุด (Maximum Level : ML) ของสารหนู

สารหนูที่พบในธรรมชาติแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มสารหนูอินทรีย์ และสารหนูอนินทรีย์ ซึ่งสารหนูในกลุ่มอนินทรีย์เป็นสารหนูที่มีพิษมากกว่าสารหนูกลุ่มอินทรีย์ สารหนูอนินทรีย์ที่มีพิษมากที่สุดได้แก่ Arsenite [As(III)] และ Arsenate [As(V)] ซึ่งส่วนใหญ่พบได้ในดินตะกอนต่างๆ และน้ำ แหล่งเพาะปลูกพืชรวมถึงมาจากการใช้ยาฆ่าแมลงด้วย ในสาหร่ายและสัตว์ทะเลมีการสะสมสารหนูในปริมาณสูงโดยอยู่ในช่วง 1-100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สารหนูในกลุ่มเมธิลเลชั่น (Methylation compound) ได้แก่ Monomethyl arsenic acid(MMA) และ Dimethyl arsenic acid(DMA) ซึ่งมีพิษน้อยและพบในปริมาณไม่มากในผลิตภัณฑ์อาหารทะเล ส่วน Arsenocholine(AC), Arsenobetaine(AB), Trimethylarsine oxide(TMAO), Tetramethylarsonium ion(TMI) และ Arsenosugars อยู่ในกลุ่มสารหนูอินทรีย์ที่ไม่ก่อให้เกิดสารพิษ ในอาหารจะพบสารหนูอนินทรีย์ 2 ชนิดที่สำคัญคือ Arsenite และ Arsenate ซึ่งเกิดพันธะจับกับกลุ่ม thio- ของเปปไตท์ หรือโปรตีนในอาหารนั้นๆเอง เนื่องจากสารหนูมีหลากหลายชนิด(species) และต้องมีกระบวนการวิเคราะห์ที่ซับซ้อน การวิเคราะห์หาปริมาณสารหนูโดยทั่วไปจึงตรวจวิเคราะห์ในรูปของสารหนูทั้งหมด ในปี ค.ศ. 1983 สถาบัน International Programme on Chemical Safety (IPCS) ได้ประเมินพบว่าหากในน้ำดื่มมีปริมาณสารหนู 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร จะนำไปสู่ความเสี่ยงการเกิดมะเร็งผิวหนังได้เพิ่มขึ้นถึง 5% ดังนั้น The United State Agency for Toxic Substances and Disease Registry, European Food Safety Authority (EFSA) และ International Agency for Research on Cancer (IARC) สรุปว่าสารหนูที่ปนเปื้อนในน้ำดื่มเป็นสาเหตุให้เกิดมะเร็งในกระเพาะปัสสาวะ มะเร็งปอด มะเร็งผิวหนังได้ โดยการรับสารหนูเข้าสู่ร่างกายได้โดยทางการหายใจ การกินอาหารและน้ำดื่มที่ปนเปื้อนสารหนู ในร่างกายคนเราจะดูดซึมสารหนูผ่านระบบทางเดินอาหารได้มากกว่าวิธีอื่น สารหนูจะมีผลกระทบต่อเซลล์ และเกิดการยับยั้งเอนไซม์ที่จำเป็นในกระบวนการเมตาบอลิซึม ผู้ได้รับสารหนูเข้าสู่ร่างกายจะเกิดอาการอาเจียน ท้องเสีย ปวดท้อง กล้ามเนื้อเกร็ง รวมทั้งปัสสาวะเป็นเลือด ตะคริวผมร่วง การสะสมสารหนูในร่างกายทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของเล็บ (leukonychia) ผิวหนังมีลักษณะเป็นจุดสีน้ำตาลกระดำกระด่างหรือเป็นจุดขาว ๆ กระจัดกระจาย ผื่นที่ตุ่มตามฝ่ามือฝ่าเท้า มีปัญหาทางระบบเส้นโลหิต ระบบประสาท ระบบเลือด ระบบอื่นๆ รวมทั้งมะเร็งอวัยวะภายใน ในประเทศไทยมีรายงานว่าพบผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งผิวหนังโดยมีสาเหตุมาจากการดื่มน้ำที่ปนเปื้อนสารหนูเข้าไป และมีการตรวจพบสารหนูในตัวอย่างเส้นผม เล็บ เลือดและปัสสาวะ และยังรายงานอีกว่า เด็กมีโอกาสที่จะรับสารหนูจากมารดาในช่วงตั้งครรภ์และช่วงการดื่มนมแม่

หลายประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น เวียดนาม กัมพูชา มีสภาพแวดล้อมทางธรณีวิทยาที่เป็นแหล่งกำเนิดน้ำใต้ดินที่มีสารหนูในปริมาณมาก และในประเทศไทยเองเมื่อปี พ.ศ. 2530 มีรายงานการเกิดโรคที่เกิดจากสารหนู (Arsenicosis) ที่นครศรีธรรมราช และในแม่น้ำเจ้าพระยาก็มีสารหนูละลายปนเปื้อนอยู่ในปริมาณสูง แต่ยังไม่มีรายงานปัญหาสุขภาพจากผู้ใช้น้ำดื่มบรรจุขวดบริโภค[2]

ในปี ค.ศ. 2005 มีการศึกษาปริมาณสารหนูในตัวอย่างข้าวจากไทยโดยใช้วิธีสกัดตัวอย่างด้วยกรดไตรฟลูออโรอะซิตริก (Trifluoroacetic acid หรือ TFA) และกรดไนตริก[3] พบว่า ข้าวมีปริมาณสารหนูทั้งหมด 0.11 ไมโครกรัม/กรัมและมีสารหนูอนินทรีย์ 0.08 ไมโครกรัม/กรัม และในปี ค.ศ. 2006 มีการศึกษาปริมาณสารหนูในข้าวในเอเชียแปซิฟิคและเอเชีย[4] พบว่า ข้าวจากประเทศไทยมีปริมาณสารหนูทั้งหมดอยู่ในช่วง 0.06-0.14 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ในขณะที่มีการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดตัวอย่างข้าวเพื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง IC-ICP-MS 4 วิธี[1] คือ การสกัดด้วยสารละลายเมทานอล 50%, ใช้สารละลายเมทานอลในอัตราส่วนต่างๆและสกัดด้วยเครื่อง Accelerated Solvent Extraction (ASE), สกัดด้วยเอนไซม์และสารละลายเมทานอล 50%, และสกัดด้วยกรดไตรฟลูออโรอะซิตริก โดยพบว่าการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีสกัดด้วยกรดไตรฟลูออโรอะซิตริกที่ 100ºC นาน 6 ชั่วโมงให้ผลการสกัดที่ดีที่สุด นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่เปรียบเทียบวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อหาสารหนูต่างๆ ในแป้งข้าว ด้วยเครื่องHPLC-ICP-MS ซึ่งเตรียมตัวอย่างด้วยการใช้สารละลายเมทานอลในอัตราส่วนต่างๆ และสกัดด้วยวิธีต่างๆ 4 วิธี[5] ได้แก่ การสกัดด้วยการเขย่า, การสกัดด้วยเครื่องแยกสารด้วยเสียงที่มีความถี่สูง (Ultrasonic extraction), การสกัดด้วยเครื่อง Accelerated Solvent Extraction (ASE) และการสกัดด้วยเครื่อง Microwave-assisted extraction โดยพบว่า ตัวอย่างที่สกัดด้วยวิธีการเขย่าและการสกัดด้วยเครื่องแยกสารด้วยเสียงที่มีความถี่สูง (Ultrasonic extraction) ปริมาณสารหนูที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันถึงแม้จะใช้อัตราส่วนสารละลายเมทานอลต่างกัน ในขณะที่การสกัดด้วยเครื่อง Microwave-assisted extraction พบว่าการใช้อัตราส่วนสารละลายเมทานอลในปริมาณสูงขึ้นจะทำให้ประสิทธิภาพการสกัดลดลง

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาเทคนิคการเตรียมตัวอย่างข้าวเพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารหนูอินทรีย์และสารหนูอนินทรีย์ในข้าวภายในห้องปฏิบัติการซึ่งเป็นการเพิ่มศักยภาพด้านการวิเคราะห์ให้กับห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ยังเป็นการเตรียมการเพื่อเก็บข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการกำหนดค่าปริมาณสูงสุดของสารหนูอนินทรีย์ เนื่องจากประเทศไทยยังไม่ได้กำหนดค่าดังกล่าวในข้าว

2. วิธีการวิจัย(Experimental)

2.1 สารเคมี

2.1.1. สารละลายมาตรฐานสารหนูอนินทรีย์ 2 ชนิด ได้แก่ As(III) ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ± 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ As(V) ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ± 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2.1.2. Tunning solution ที่มีส่วนประกอบของธาตุ Barium, Beryllium, Cerium, Cobalt, Indium, Lead, Magnesium, Thallium และ Thorium ความเข้มข้นธาตุละ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2.1.3. สารละลายมาตรฐานสารหนูทั้งหมด (Total arsenic) ความเข้มข้น 1001±3 มิลลิกรัม/ลิตร

2.1.4. Quality Control Standards ที่ประกอบด้วยธาตุ Arsenic ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร

2.1.5. สารละลายแอมโมเนีย (Ammonia solution; Super pure grade) ความเข้มข้นร้อยละ 25

2.1.6. เมทานอล (Methanol; HPLC grade)

2.1.7. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide; AR grade) ความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 30

2.1.8. กรดไนตริก (Nitric acid; Ultra pure & AR grade) ความเข้มข้นร้อยละ 20 และ 65

2.1.9. กรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid; AR grade) ความเข้มข้นร้อยละ 85

2.1.10.กรดไตรฟลูออโรอะซิตริก (Trifluoroacetic acid; AR grade) ความเข้มข้นร้อยละ 99

2.1.11.กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid; AR grade) ความเข้มข้นร้อยละ 10

2.1.12.แมกนีเซียมไนเตรท (Magnesiumnitrate; AR grade) ความเข้มข้นร้อยละ 50

2.1.13.โซเดียมโบโรไฮไดรด์ (Sodiumborohydride; AR grade) ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ใน โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 0.05

2.1.14.โพแทสเซียมไอโอไดด์ (Potassiumiodide; AR grade) ความเข้มข้นร้อยละ 5

2.1.15.กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid; AR grade) ความเข้มข้นร้อยละ 5

2.1.16.สารละลายแอมโมเนียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.3 (Ammonium phosphate buffer pH 6.3)

2.1.17.อาร์กอนแก๊ส (Ultra High Purity 99.999%)

2.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

2.2.1. เครื่อง HG-AAS (Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry), AAnalyst 800, Perkin Elmer

2.2.2. เครื่อง HPLC-ICP-MS (High Performance Liquid Chromatography coupled with Inductivity Coupled Plasma Mass Spectrometry), Varian-820MS and Prostar HPLC

2.2.3. คอลัมน์ชนิด Anion exchange (Hamilton PRP X-100) ขนาด 250 x 4.1 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 10 ไมครอน

2.2.4. เครื่องชั่งความละเอียด 4 ตำแหน่ง

2.2.5. เตาไฟฟ้า (hot plate)

2.2.6. Muffle Furnace with temperature regulation

2.2.7. Polyethylene tube

2.2.8. Vycor basin, capacity 100 มิลลิลิตร

2.2.9. เครื่องแยกสารด้วยเสียงที่มีความถี่สูง (Sonicator)

2.2.10. เครื่องระเหยแห้ง (Evaporator)

2.2.11. เครื่องตกตะกอนสาร (Centrifuge)

2.2.12. ตู้อบ (Oven)

2.2.13. ตู้เย็น

2.3 การศึกษาทดลองวิธีการทดสอบสารหนูทั้งหมดและสารหนูอนินทรีย์ในตัวอย่างข้าวหอมมะลิ

2.3.1. การเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี Dry Ashing เพื่อทดสอบหาสารหนูทั้งหมด (Total arsenic) ด้วยเครื่อง HG-AAS

ชั่งตัวอย่างข้าวที่บดละเอียดแล้วประมาณ 5 กรัมลงใน Vycor โดยชั่งตัวอย่างทั้งหมด 5 ซ้ำ เติมแมกนีเซียมไนเตรทความเข้มข้นร้อยละ 50 ลงไป 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเผาบนเตาไฟฟ้าจนหมดควันแล้วจึงนำไปเผาต่อใน Muffle โดยตั้งอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 100 องศาเซลเซียสไปจนถึง 450 องศาเซลเซียส (โดยค่อยๆเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเรื่อยๆทีละ 50 องศาเซลเซียส) จนกระทั่งได้เถ้าเป็นสีขาวหรือสีเทา (ใช้เวลาประมาณ 15 ชั่วโมง) ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นละลายเถ้าที่ได้ด้วยการเติมกรดไนตริกความเข้มข้นร้อยละ 20 ลงไป 5 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเตาไฟฟ้า จนเถ้าละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับกรดไนตริกแล้วจึงถ่ายใส่ขวดปรับปริมาตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตรด้วยน้ำปราศจากอิออน (Deionized water 18 mΩ) กรองสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษกรอง Whatman No.42 เก็บสารละลายไว้ใน Polyethylene tube ปิเปตสารละลายที่ได้ 2 มิลลิลิตรลงใน Polyethylene tube จากนั้นเติมโพแทสเซียมไอโอไดด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 และกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น อย่างละ 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 30 นาที แต่ไม่ควรเกิน 60 นาที จากนั้นเติมกรดแอสคอร์บิกความเข้มข้นร้อยละ 5 ลงไป 1 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นร้อยละ 10 จนมีปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตรแล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารหนูทั้งหมด (Total Arsenic) ด้วยเครื่อง HG-AAS

2.3.2. การเตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบหาสารหนูอนินทรีย์ (Inorganic arsenic)

2.3.2.1 การเตรียมตัวอย่างข้าวโดยวิธีการสกัดด้วยเครื่องแยกสารด้วยเสียงที่มีความถี่สูง (Solvent extraction with sonication)

ชั่งตัวอย่างข้าวที่บดละเอียดแล้วประมาณ 0.5 กรัมลงใน Polyethylene tube โดยชั่งทั้งหมด 5 ซ้ำ เติมเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 ลงไป 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปผสมให้เข้ากันดีด้วยเครื่องแยกสารด้วยเสียงที่มีความถี่สูง (Sonicator) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที ต่อด้วยการปั่นแยกด้วยเครื่องตกตะกอนสาร (Centrifuge) ที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เก็บสารละลายใสส่วนบนนำส่วนที่เหลือไปสกัดซ้ำอีกครั้ง

นำสารละลายทั้งหมดที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้ง (Evaporator) จากนั้นละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากอิออน (Deionized water 18 mΩ) จนครบ 10 มิลลิลิตร ชั่งน้ำหนัก(a) ปิเปตสารละลายที่ได้ปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงใน Polyethylene tube แล้วนำไปชั่ง(b) จากนั้นเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปชั่งอีกครั้ง(c) เก็บสารละลายที่ได้ที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน (Overnight) แล้วนำไปวิเคราะห์หาสารหนูอนินทรีย์ ด้วยเครื่อง HPLC-ICP-MS

2.3.2.2 การเตรียมตัวอย่างข้าวโดยวิธีการสกัดด้วยกรดไตรฟลูออโรอะซิตริก (Treatment with Trifluoroacetic acid)

ชั่งตัวอย่างข้าวที่บดละเอียดแล้วประมาณ 0.5 กรัมลงใน Polyethylene tube โดยชั่งทั้งหมด 5 ซ้ำ จากนั้นเติม 2M กรดไตรฟลูออโรอะซิตริก (TFA) ลงไป 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เก็บสารละลายชั้นบน แล้วปรับปริมาตรจนครบ 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปชั่งน้ำหนักเพื่อวัดเป็น final volume(a) ปิเปตสารละลายที่ได้ปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงใน Polyethylene tube แล้วนำไปชั่ง(b) จากนั้นเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 2 มิลลิลิตรแล้วนำไปชั่งอีกครั้ง(c) เก็บสารละลายที่ได้ที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน (Overnight) แล้วนำไปวิเคราะห์หาสารหนูอนินทรีย์ ด้วยเครื่อง HPLC-ICP-MS

2.3.3. ทดสอบหาปริมาณสารหนูอนินทรีย์ด้วยเครื่อง HPLC-ICP-MS

นำสารละลายตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์หาสารหนูอนินทรีย์ (Inorganic Arsenic) ด้วยเครื่อง HPLC-ICP-MS โดยใช้คอลัมน์ Hamilton PRP X-100 (Anion exchange column) และใช้สารละลายแอมโมเนียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.3 เป็นสารละลายเคลื่อนที่ (Mobile phase) อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตร/นาที ใช้อาร์กอนแก๊สอัตราการไหล 16 ลิตร/นาที และ Monitoring ion(หรือ Mass) เท่ากับ 75 m/z

2.3.4. ทดสอบหาปริมาณสารหนูอนินทรีย์โดยวิธีการสกัดด้วยเครื่องแยกสารด้วยเสียงที่มีความถี่สูงเพื่อทดสอบความเที่ยงของวิธี

ชั่งตัวอย่างข้าวที่บดละเอียดแล้วประมาณ 0.5 กรัมลงใน Polyethylene tube โดยชั่งทั้งหมด 7 ซ้ำ เติมเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 ลงไป 10 มิลลิลิตรแล้วนำไปผสมให้เข้ากันดีด้วยเครื่องแยกสารด้วยเสียงที่มีความถี่สูง (Sonicator) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที ต่อด้วยการปั่นแยกด้วยเครื่องตกตะกอนสาร (Centrifuge) ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เก็บสารละลายใสส่วนบนนำส่วนที่เหลือไปสกัดซ้ำอีกครั้ง

นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่อง Evaporator จากนั้นละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากอิออน (Deionized water 18 mΩ) จนครบ 10 มิลลิลิตร (ชั่งน้ำหนัก(a)) ปิเปตสารละลายที่ได้ปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงใน Polyethylene tube แล้วนำไปชั่ง(b) จากนั้นเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 2 มิลลิลิตรแล้วนำไปชั่งอีกครั้ง(c) เก็บสารละลายที่ได้ที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วนำไปวิเคราะห์หาสารหนูอนินทรีย์ (Inorganic Arsenic) ด้วยเครื่อง HPLC-ICP-MS ตามข้อ 2.3.3

3. ผลและวิจารณ์ (Results and Discussion)

3.1 มื่อนำตัวอย่างข้าวที่เตรียมด้วยวิธี Dry ashing ไปหาปริมาณสารหนูทั้งหมดด้วยเครื่อง HG-AAS ได้ผลดังนี้

Table 1 แสดงปริมาณสารหนูทั้งหมด ตัวอย่างข้าวหอมมะลิ ที่เตรียมตัวอย่างด้วยวิธี Dry Ashing

ตัวอย่างข้าวหอมมะลิ	น้ำหนักตัวอย่าง (g)	ค่าที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน (ug/L)	ปริมาณที่พบในตัวอย่าง (mg/kg)
1	5.6467	3.3884	0.0750
2	5.3574	3.1225	0.0729
3	5.1397	2.9877	0.0727
4	5.8512	3.5172	0.0751
5	5.4142	3.1424	0.0725
Mean			0.0736
SD			0.0013
%RSD			1.7807

โดยคำนวณจากปริมาณสารหนูทั้งหมด = $\frac{(\text{ค่าที่ได้จากกราฟ} \times \text{Dilution factor} \times \text{Final Volume}) / \text{Weight}}{1{,}000}$

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณสารหนูทั้งหมด

ในตัวอย่างที่ 1 เท่ากับ = $\frac{(3.3884 \times 5 \times 25) / 5.6467}{1{,}000}$ = 0.0750 mg/kg

จากตารางที่1 พบว่ามีค่าเฉลี่ยของปริมาณสารหนูทั้งหมดเท่ากับ 0.0736 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และมีระดับความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์ (%RSD) อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ โดยที่ผลการวิเคราะห์ที่มีหน่วยการวิเคราะห์อยู่ในระดับหนึ่งส่วนในล้านส่วน (ppm) ควรมีค่า %RSD อยู่ในช่วง 1-10% [6]

3.2 เมื่อนำตัวอย่างข้าวที่เตรียมด้วยวิธีการสกัดด้วยเครื่องแยกสารด้วยเสียงที่มีความถี่สูง แล้วนำไปหาปริมาณสารหนู อนินทรีย์ (Inorganic Arsenic, as As(V)) ด้วยเครื่อง HPLC-ICP-MS ได้ผลดังนี้

Table 2 แสดงปริมาณสารหนูอนินทรีย์ (Inorganic Arsenic, as As(V))ในตัวอย่างข้าวหอมมะลิที่เตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการสกัดด้วยเครื่องแยกสารด้วยเสียงที่มีความถี่สูง

ตัวอย่างข้าวหอมมะลิ	น้ำหนักตัวอย่าง (g)	ค่าที่วัดได้ใน Blank (ng/g)	ค่าที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน (ng/g)	น้ำหนักหลังปรับปริมาตร(a) (g)	น้ำหนัก สารสกัดที่ใช้ (b) (g)	น้ำหนักหลังเติมH_2O_2 (c) (g)	ปริมาณที่พบในตัวอย่าง (mg/kg)
1	0.5230	0.77	1.67	9.6992	2.0093	4.2134	0.0350
2	0.4943	0.77	1.64	9.1453	2.0306	4.2336	0.0336
3	0.4856	0.77	1.62	9.5843	2.0174	4.2182	0.0351
4	0.5802	0.77	1.69	10.2953	2.0536	4.2451	0.0337
5	0.5665	0.77	1.62	10.2308	2.0176	4.2782	0.0326
Mean							0.0340
SD							0.0011
%RSD							3.1282

โดยคำนวณจากปริมาณอนินทรีย์ (as As(V)) = $\frac{\{(\text{ค่าที่ได้จากกราฟ-ค่า Blank}) \times \text{Dilution factor} \times \text{Final Volume}\}/\text{Weight}}{1{,}000}$

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณสารหนูอนินทรีย์ (as As(V))

ในตัวอย่างที่ 1 เท่ากับ = $\frac{\{(1.67 - 0.77) \times (4.2134/2.0093) \times 9.6992\} / 0.5230}{1{,}000}$ = 0.0350 mg/kg

จากตารางพบว่า มีค่าเฉลี่ยของสารหนูอนินทรีย์ (Inorganic Arsenic as As(V))เท่ากับ 0.0340 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ซึ่งมีระดับความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์ (%RSD) อยู่ในระดับสูง โดยที่ผลการวิเคราะห์มีหน่วยการวิเคราะห์อยู่ในระดับหนึ่งส่วนในล้านส่วน (ppm) ควรมีค่า %RSD อยู่ในช่วง 1-10%[6] ลักษณะโครมาโตแกรมของตัวอย่างที่ได้จากการสกัดวิธีนี้ให้ลักษณะพีคที่ไม่มีสิ่งรบกวน ดังรูปที่ 1 และ 2

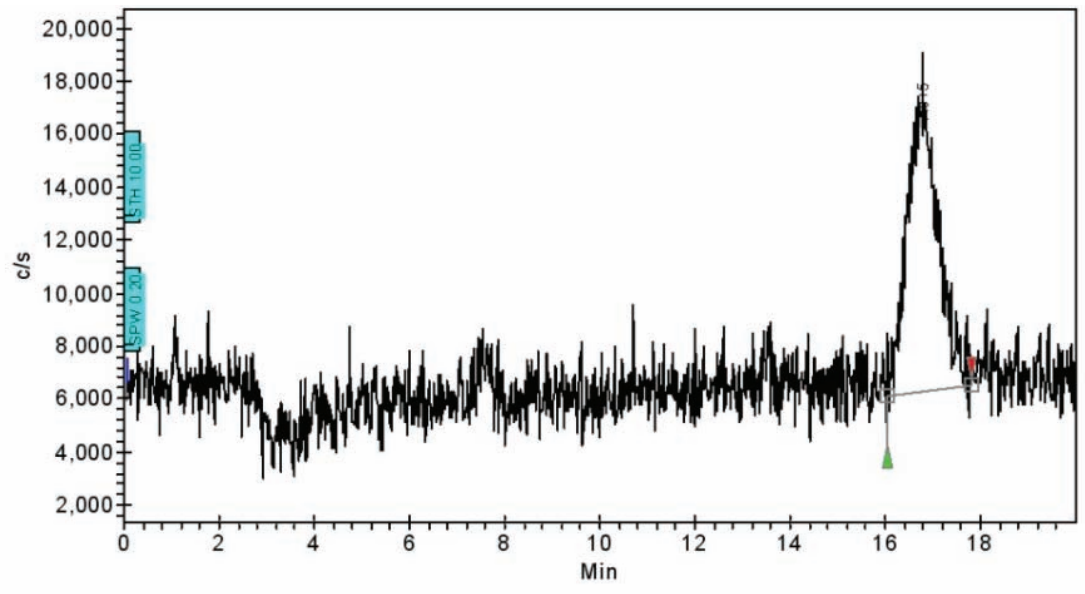

Figure 1 โครมาโตแกรมของสารสกัดสารหนูอนินทรีย์ที่สกัดจากตัวอย่างข้าวหอมมะลิ

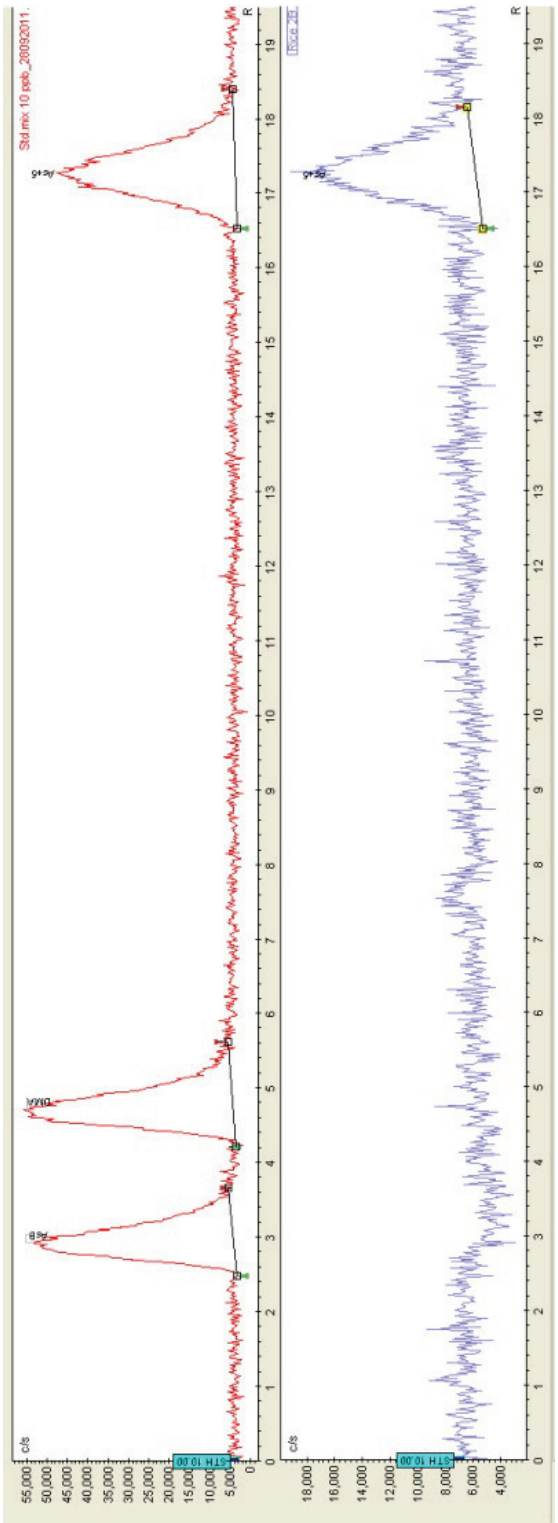

Figure 2 โครมาโตแกรมของสารสกัดสารหนูอนินทรีย์ที่สกัดจากตัวอย่างข้าวและสารมาตรฐาน As(III), DMA, As(V)

3.3 เมื่อนำตัวอย่างที่เตรียมด้วยวิธีสกัดด้วยกรดไตรฟลูออโรอะซิตริกไปหาปริมาณสารหนูอนินทรีย์ (Inorganic Arsenic (as As(V)) ด้วยเครื่อง HPLC-ICP-MS ได้ผลดังนี้

Table 3 แสดงปริมาณสารหนูอนินทรีย์ (Inorganic Arsenic (as As(V))ในตัวอย่างข้าวหอมมะลิ ที่เตรียมตัวอย่างด้วยวิธีสกัดด้วยกรดไตรฟลูออโรอะซิตริก

ตัวอย่างข้าวหอมมะลิ	น้ำหนักตัวอย่าง (g)	ค่าที่วัดได้ใน Blank (ng/g)	ค่าที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน (ng/g)	น้ำหนักหลังปรับปริมาตร[a] (g)	น้ำหนัก สารสกัดที่ใช้[b] (g)	น้ำหนักหลังเติม H_2O_2[c] (g)	ปริมาณที่พบในตัวอย่าง (mg/kg)
1	0.4810	2.29	2.44	5.8376	2.0526	4.2777	0.0038
2	0.4716	2.29	2.47	5.8585	2.0578	4.2644	0.0046
3	0.5117	2.29	2.31	5.8641	2.0642	4.2727	0.0005
4	0.5518	2.29	2.96	5.6813	2.0651	4.2521	0.0142
5	0.5561	2.29	2.44	5.8689	2.0528	4.2325	0.0033
Mean							0.0053
SD							0.0052
%RSD							99.1715

$$\text{โดยคำนวณจากปริมาณอนินทรีย์ (as As(V))} = \frac{\{(\text{ค่าที่ได้จากกราฟ-ค่า Blank}) \times \text{Dilution factor} \times \text{Final Volume}\}/\text{Weight}}{1{,}000}$$

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณสารหนูอนินทรีย์ (as As(V))

$$\text{ในตัวอย่างที่ 1 เท่ากับ} = \frac{\{(2.44 - 2.29) \times (4.2777/2.0526) \times 5.8376\} / 0.4810}{1{,}000} = 0.0038 \text{ mg/kg}$$

จากตารางพบว่า มีค่าเฉลี่ยของสารหนูอนินทรีย์ (as As(V)) เท่ากับ 0.0053 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ซึ่งมีระดับความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์ (%RSD) อยู่ในระดับต่ำ[6] โดยผลการวิเคราะห์มีหน่วยการวิเคราะห์อยู่ในระดับหนึ่งส่วนในล้านส่วน (ppm)ควรมีค่า %RSD อยู่ในช่วง 1-10%[6] แต่ในการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีนี้ให้ค่า %RSD มากกว่า 35% แสดงว่ามีผลความเที่ยงไม่ผ่านเกณฑ์การยอมรับ

3.4 เมื่อเปรียบเทียบวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาสารหนูอนินทรีย์ ทั้ง 2 วิธี พบว่า วิธีสกัดด้วย กรดไตรฟลูออโรอะซิตริก มีระดับความเที่ยงของการวิเคราะห์ตัวอย่าง (%RSD) ต่ำกว่าวิธีที่สกัดด้วยวิธีการสกัดด้วยเครื่องแยกสารด้วยเสียงที่มีความถี่สูงค่อนข้างมาก ซึ่งอาจมีสาเหตุจากการที่มีสิ่งรบกวน (Interference) ในโครมาโตแกรมของสารหนูอนินทรีย์ (as As(V)) ค่อนข้างมาก ทำให้เส้นฐาน (Baseline) ค่อนข้างสูงและไม่เรียบ (ดังรูปที่ 3) ค่าที่ได้อาจจะไม่ใช่ค่าที่แท้จริง ดังนั้นการสกัดตัวอย่างด้วยวิธีกรดไตรฟลูออโรอะซิตริก จึงเป็นวิธีที่ไม่เหมาะสมกับการวิเคราะห์หาสารหนูอนินทรีย์ในข้าว

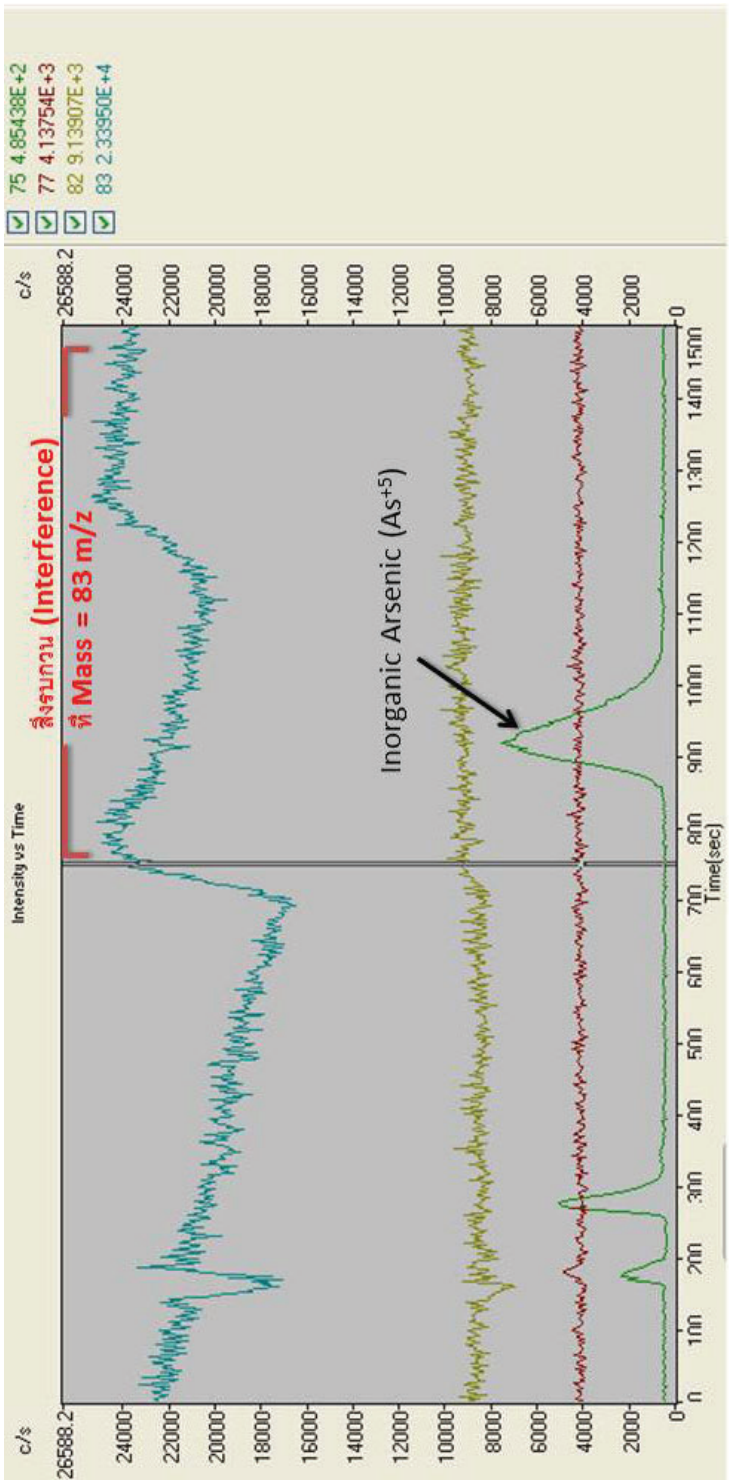

Figure 3 โครมาโตแกรมแสดงถึงสัญญาณรบกวนบริเวณโครมาโตแกรมของ Inorganic Arsenic (As(V))

3.5 ผลการทดสอบหาปริมาณสารหนูอนินทรีย์ในตัวอย่างข้าวโดยวิธีการสกัดด้วยเครื่องแยกสารด้วยเสียงที่มีความถี่สูง

Table 4 แสดงปริมาณสารหนู (Inorganic Arsenic (as As(V))ในตัวอย่างข้าวหอมมะลิ ที่เตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการสกัดด้วยเครื่องแยกสารด้วยเสียงที่มีความถี่สูง

ตัวอย่างข้าวหอมมะลิ	น้ำหนักตัวอย่าง (g)	ค่าที่วัดได้ใน Blank (ng/g)	ค่าที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน (ng/g)	น้ำหนักหลังปรับปริมาตร[a] (g)	น้ำหนัก สารสกัดที่ใช้[b] (g)	น้ำหนักหลังเติมH_2O_2[c] (g)	ปริมาณที่พบในตัวอย่าง (mg/kg)
1	0.4754	0.77	1.69	9.6975	2.0043	4.1948	0.0393
2	0.5230	0.77	1.67	9.6992	2.0093	4.2134	0.0350
3	0.4943	0.77	1.64	9.1453	2.0306	4.2326	0.0336
4	0.4856	0.77	1.62	9.5843	2.0174	4.2182	0.0351
5	0.5802	0.77	1.69	10.2953	2.0536	4.2451	0.0337
6	0.5665	0.77	1.62	10.2308	2.0176	4.2782	0.0326
7	0.5415	0.77	1.76	9.8545	2.0306	4.2314	0.0375
Mean							0.0352
SD							0.0024
%RSD							6.7535

โดยคำนวณจากปริมาณอนินทรีย์ (as As(V)) = $\frac{\{(\text{ค่าที่ได้จากกราฟ-ค่า Blank}) \times \text{Dilution factor} \times \text{Final Volume}\}/\text{Weight}}{1{,}000}$

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณสารหนูอนินทรีย์ (as As(V))

ในตัวอย่างที่ 1 เท่ากับ = $\frac{\{ (2.44 - 2.29) \times (4.2777/2.0526) \times 5.8376 \} / 0.4810}{1{,}000}$ = 0.0393 mg/kg

4. สรุป(Conclusion)

การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์สารหนูอนินทรีย์ในข้าวทำได้โดยด้วยวิธีการสกัดตัวอย่างข้าว 2 วิธี คือ วิธีการสกัดด้วยเครื่องแยกสารด้วยเสียงที่มีความถี่สูง (Solvent extraction with sonication) และวิธีสกัดด้วยกรดไตรฟลูออโรอะซิติก (Treatment with TFA) แต่พบว่าวิธีการเตรียมตัวอย่างโดยการสกัดด้วยเครื่องแยกสารด้วยเสียงที่มีความถี่สูง (Solvent extraction with sonication) มีความน่าเชื่อถือมากกว่า เนื่องจากให้ค่าระดับความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ ในขณะที่วิธี สกัดด้วยกรดไตรฟลูออโรอะซิติก มีค่าระดับความเที่ยงไม่ผ่านเกณฑ์การยอมรับ ซึ่งจะต้องมีการพัฒนา ปรับปรุงต่อไป ทั้งนี้อาจมีสาเหตุเนื่องมาจากการสกัดด้วยวิธีนี้ไม่สามารถกำจัดสิ่งรบกวน (Interference) ในตัวอย่างสารสกัดข้าวได้หมด และจากการสำรวจข้อมูลเบื้องต้นของปริมาณสารหนูอนินทรีย์ในข้าวพบว่า ข้าวหอมมะลิในท้องตลาดที่ได้จากการสุ่มและนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีสารหนูอนินทรีย์อยู่ในช่วง 0.032 – 0.039 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

5. เอกสารอ้างอิง (References)

[1] Douglas T. Heitkemper, Nohora P. Vela, Kristen R. Stewart and Craig S. Westphal. 2001. Determination of total and speciated arsenic in rice by ion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. Journal Anal. At. Spectrom. 16, 299-306.

[2] Kohnhorst, Andrew; Laird, Allan; Prayad, Pokethitiyoke; Suthida, Anyapo. 2002. "Groundwater arsenic in central Thailand". 28th WEDC Conference Calcutta. http://wedc.lboro.ac.uk/conferences/pdfs/28/Kohnhorst.pdf. Retrieved 2009-01-29

[3] Williams P.N., A.H. Price, A. Raab, S.A. Hossain, J. Feldmann and A.A. MeHarg. 2005. Variation in Arsenic Speciation and concentration in paddy rice related to dietary exposure. Environmental Science and Technology. Vol.39, 5531-5540

[4] Williams P.N., M.R. Islam, E.E. Adomako, A. Raab, S.A. Hossain, Y.G. Zhu, J. Feldmann and A.A. MeHarg. 2006. Increase in rice grain arsenic for regions of Bangladesh irrigating paddies with elevated arsenic in groundwaters. Environmental Science and Technology. Vol.40, 4903-4908

[5] Tomohiro Narukawa, Kazumi Inagaki, Takayoshi Kuroiwa, Koichi Chiba. 2008. The extraction and speciation of arsenic in rice flour by HPLC-ICP-MS. Talanta, Vol. 77, 427-432

[6] ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 123