

การพัฒนาการวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกในปลาด้วยวิธี HPLC/ICP-OES



นางสาว วราภรณ์ ศรีมูล

สถาบันวิทยบริการ
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-53-2639-9

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF ARSENIC SPECIATION ANALYSIS IN FISH USING HPLC/ICP-OES



Miss Waraporn Srimoon

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Marine Science

Department of Marine Science

Faculty of Science

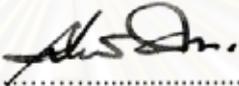
Chulalongkorn University

Academic Year 2005

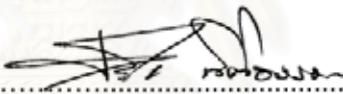
ISBN 974-53-2639-9

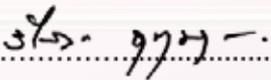
หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาการวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกในปลาด้วยวิธี HPLC/ICP-OES
โดย	นางสาว วราภรณ์ ศรีมูล
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ทางทะเล
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิไลวรรณ อุทุมพฤษพร
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ อิ่มยิ้ม

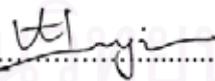
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

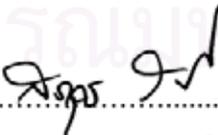

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมณะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เจริญ นิตินรมยง)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิไลวรรณ อุทุมพฤษพร)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ อิ่มยิ้ม)


..... กรรมการ
(ดร. สราวุธ รัตนจงเกียรติ)

วารสารณ์ ศรีมูล : การพัฒนาการวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกในปลาด้วยวิธี HPLC/ICP-OES. (DEVELOPMENT OF ARSENIC SPECIATION ANALYSIS IN FISH USING HPLC/ICP-OES) อ. ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. วิไลวรรณ อุทุมพุกษ์พร, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร. อภิชาติ อิมย์ม. 78หน้า. ISBN 974-53-2639-9.

การพัฒนาการวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกในปลา ใช้วิธีการสกัดแบบ solvent extraction แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC/ICP-OES จากการทดลองพบว่า สารผสมระหว่างเมทานอลกับน้ำในอัตราส่วน 3 : 1 โดยปริมาตร สามารถสกัดอาร์เซนิกจากเนื้อปลาได้สูงถึง 91.6% โดยขั้นตอนการสกัดประกอบไปด้วย pre-extraction, sonication และ centrifugation การวิเคราะห์ด้วย HPLC/ICP-OES ใช้ sodiumdihydrogenphosphate เข้มข้น 5 และ 50 mmol/l เป็น mobile phase ทำการชะแบบ three-step elution สามารถแยกอาร์เซนิกได้ 3 รูปแบบ คือ arsenobetaine (AsB) , monomethylarsonic acid (MMA) และ inorganic arsenic เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ด้วย certified reference material : DORM-2 (dogfish muscle) พบว่า มีค่าเปอร์เซ็นต์กลับคืนเท่ากับ 86.9% ซึ่งจากผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่า วิธีการที่พัฒนาได้สามารถนำไปวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกในปลาได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เมื่อนำวิธีการที่ได้ไปวิเคราะห์ตัวอย่างปลาทะเลและปลาน้ำจืดที่เก็บมาจากจังหวัดจันทบุรี, สมุทรปราการ และ กรุงเทพมหานคร พบว่า ปริมาณอาร์เซนิกรวมมีค่าอยู่ระหว่าง 3.7 – 29.0 µg/g dry weight โดย arsenobetaine เป็นรูปแบบที่พบในสัดส่วนสูงที่สุด คือ อยู่ระหว่าง 62.8 – 95.7% ส่วน MMA และ inorganic arsenic พบในปลาน้ำจืดเป็นส่วนใหญ่ อยู่ระหว่าง 3.7 – 10.9 และ 1.7 – 20.3% ตามลำดับ ปริมาณอาร์เซนิกรวมและสัดส่วนของ AsB ในปลาทะเลมีค่าสูงกว่าในปลาน้ำจืด แต่ MMA และ inorganic arsenic จะพบในปลาน้ำจืดมากกว่า เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณและรูปแบบของอาร์เซนิกที่พบกับพฤติกรรมการกินอาหารและแหล่งที่อยู่ของปลา พบว่า ปลาที่กินพืชหรือกินซากพืชซากสัตว์เป็นอาหาร และอาศัยอยู่บริเวณพื้นที่ตื้นน้ำมีแนวโน้มที่จะพบ MMA และ inorganic arsenic ได้มากกว่า ซึ่งทั้งสองรูปแบบมีความเป็นพิษสูง อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบปริมาณอาร์เซนิกรวมในน้ำและในปลาจากจังหวัดจันทบุรี พบว่า ปริมาณอาร์เซนิกรวมในน้ำมีค่าต่ำกว่าในปลา 2 – 6 เท่า และส่วนใหญ่เป็น inorganic arsenic มากกว่า 80% แต่จากค่า bioconcentration factor ชี้ให้เห็นว่า ปลาสะสม inorganic arsenic ในเนื้อเยื่อได้ต่ำมาก แต่จะสะสมอาร์เซนิกอินทรีย์ได้ดีที่สุด ทั้งนี้จากการศึกษารูปแบบทางเคมีในปลาพบว่า อาร์เซนิกอินทรีย์เกือบทั้งหมดอยู่ในรูป arsenobetaine

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล.....ลายมือชื่อนิสิต วารสารณ์ ศรีมูล
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา 3/5 - 9/2 ๗ -
ปีการศึกษา2548.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม et al y i

##4772457823 : MAJOR MARINE SCIENCE

KEY WORD: SPECIATION / ARSENIC / HPLC/ICP-OES

WARAPORN SRIMOON : DEVELOPMENT OF ARSENIC SPECIATION ANALYSIS IN FISH USING HPLC/ICP-OES. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. WILAIWAN UTOOMPRURKPORN, Ph.D., THESIS COADVISOR : ASSIST. PROF. APICHAT IMYIM, Ph.D., 78 pp. ISBN 974-53-2639-9.

Development of arsenic speciation analysis in fish was performed using solvent extraction with methanol and water mixture, and then analyzed with HPLC/ICP-OES. The result showed high extraction efficiency (91.6%) while the ratio of methanol : water 3 : 1 by volume was used. Extraction procedure consisted of pre-extraction, sonication and centrifugation. Extracted solution was further separated and determined by HPLC/ICP-OES using two concentrations of sodiumdihydrogenphosphate (5 and 50 mmol/l) as mobile phase with three-step elution. HPLC chromatogram showed successful separation of three arsenic species; arsenobetaine (AsB), monomethylarsonic acid (MMA) and inorganic arsenic. Validation for the procedure was carried out using certified reference material : DORM-2 (dogfish muscle) with high extraction recovery (86.9%). In conclusion, the developed method can be used to analyze arsenic species in fish tissues effectively.

Fish samples from Chanthaburi, Samuthprakarn and Bangkok contained total arsenic whose concentration ranging between 3.7 – 29.0 $\mu\text{g/g}$ dry weight. AsB was the major arsenic species in all samples, while the trace amount of MMA and inorganic arsenic in some freshwater fish was found (3.7 – 10.9 and 1.7 – 20.3%, respectively). Total arsenic concentration and AsB in marine fish were significantly higher than these in freshwater fish, in contrast, MMA and inorganic arsenic were found in most of freshwater fish. The analysis result showed the relationship between concentration and speciation of arsenic found in fish and its feeding behavior and habitat. Herbivorous or scavenger and demersal fish accumulated probably higher amount of MMA and inorganic arsenic, which were the more toxic forms. Total concentration of arsenic that 80% was inorganic arsenic in water samples from Chanthaburi showed 2 – 6 times less than that of fish samples. However, bioconcentration factor indicates that fish accumulate AsB better than inorganic arsenic.

DepartmentMarine ScienceStudent's signature *Waraporn Srimoon*
 Field of studyMarine ScienceAdvisor's signature *W. Utoomprurkporn*
 Academic year ...2005Co-advisor's signature *Apichat Imyim*

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความอนุเคราะห์จากบุคคลหลายท่าน ข้าพเจ้าจึงขอกราบขอบพระคุณอย่างสูง มา ณ โอกาสนี้ ดังรายนามต่อไปนี้

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิไลวรรณ อุทุมพุกษ์พร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ อิมยิ้ม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำและคำปรึกษาต่างๆ ตลอดการทำวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เจริญ นิตติธรรมยง ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ ปิยะธีระธิติวรกุล ที่กรุณาให้ยืมเครื่อง freeze dry และ รองศาสตราจารย์วิมล เหมะจันทร์ สำหรับคำแนะนำเรื่องปลา

ขอขอบพระคุณ ดร.สราวุธ รัตนงเกียรติ ที่กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำในเรื่องการวิเคราะห์ รวมทั้งสละเวลามาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณนนทนา ชูฉัตร เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการเคมีอินทรีย์ ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความสะดวกในการใช้เครื่อง HPLC และ ICP-OES คุณนภฤกษ์ วัฒนวิฑูกร ที่ช่วยสอนการใช้เครื่อง HG-AAS คุณสุจารี บุรีกุล และคุณวิราลี ไตรทรัพย์ สำหรับคำปรึกษาและกรุณาให้ยืมอุปกรณ์บางส่วน

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณครอบครัว ที่คอยให้การสนับสนุนในทุกๆ ด้าน และเป็นกำลังใจตลอดการศึกษา

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนการศึกษาเนื่องในวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุ 72 พรรษา ปีการศึกษา 2547 และทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ ปีการศึกษา 2548 จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 อาร์เซนิก.....	3
2.2 ที่มาของอาร์เซนิกในทะเล.....	4
2.3 รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิก.....	5
2.4 ความเป็นพิษของอาร์เซนิก.....	7
2.5 รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกในทะเล.....	8
2.6 วิธีการวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกในสัตว์.....	13
2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิก ด้วยวิธี HPLC/ICP-OES.....	17
บทที่ 3 วิธีดำเนินการศึกษา.....	20
3.1 การประยุกต์ใช้ระบบ HPLC/ICP-OES.....	20
3.2 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์.....	20
3.3 ตัวอย่างปลา.....	22
3.4 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์อาร์เซนิกในห้องปฏิบัติการ.....	22
3.5 การพัฒนาขั้นตอนการวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกในปลา.....	24
3.6 การวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกในตัวอย่างปลา.....	27
3.7 การวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำ.....	27

บทที่ 4 ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล	31
4.1 การทดสอบการแยกสารละลายมาตรฐานอาร์เซนิก ด้วยระบบ HPLC/ICP-OES.....	31
4.2 การทดสอบการแยกสารสกัดจากปลาที่เติมสารละลายมาตรฐานอาร์เซนิก.....	38
4.3 การทดสอบหาค่าทำลายที่เหมาะสมในการสกัดอาร์เซนิกในปลา.....	40
4.4 การวิเคราะห์ certified reference materials (CRM).....	41
4.5 การวิเคราะห์ Limit of detection (LOD) และ Limit of quantitation (LOQ).....	44
4.6 Recovery ของสารละลายมาตรฐานอาร์เซนิก.....	45
4.7 การวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกในตัวอย่างปลา.....	47
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ.....	59
5.1 สรุปผลการศึกษา.....	59
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	60
รายการอ้างอิง.....	61
ภาคผนวก.....	67
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	78

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1	ค่า LD ₅₀ ของสารประกอบอาร์เซนิกรูปแบบที่สำคัญ.....7
ตารางที่ 2.2	ความเข้มข้นของอาร์เซนิกรูปแบบต่างๆในน้ำทะเล.....9
ตารางที่ 2.3	ความเข้มข้นของอาร์เซนิกรูปแบบต่างๆในตะกอน.....9
ตารางที่ 2.4	เปอร์เซ็นต์ของ arsenobetaine ในสัตว์ทะเลชนิดต่างๆ.....12
ตารางที่ 2.5	ค่า pKa ของสารประกอบอาร์เซนิกรูปแบบต่างๆ.....18
ตารางที่ 4.1	สถานะของระบบ HPLC/ICP-OES ที่ใช้ในการศึกษา.....32
ตารางที่ 4.2	ประสิทธิภาพของตัวทำละลายที่ใช้สกัดอาร์เซนิกจากเนื้อปลา.....40
ตารางที่ 4.3	การวิเคราะห์ปริมาณ total arsenic ใน DORM-2 และ MA-M-3/TM.....43
ตารางที่ 4.4	ความเข้มข้นของอาร์เซนิกรูปแบบต่างๆ ใน DORM-2.....44
ตารางที่ 4.5	Limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ) ของการวิเคราะห์.....44
ตารางที่ 4.6	เปอร์เซ็นต์ recovery ของสารละลายมาตรฐานอาร์เซนิก.....45
ตารางที่ 4.7	ปริมาณอาร์เซนิกรูปแบบต่างๆที่พบในตัวอย่างปลา.....49
ตารางที่ 4.8	ปริมาณอาร์เซนิกในน้ำทะเลและน้ำจืด จาก จ. จันทบุรี.....50
ตารางที่ 4.9	Bioconcentration factor ของอาร์เซนิกในตัวอย่างปลาและน้ำ จาก จ. จันทบุรี.....55

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 2.1	ความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH และ E_{H} ต่อรูปแบบของอาร์เซนิก ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความดัน 1 บาร์.....	3
รูปที่ 2.2	วัฏจักรของอาร์เซนิกในสิ่งแวดล้อม.....	4
รูปที่ 2.3	รูปแบบทางเคมีที่สำคัญของอาร์เซนิก.....	6
รูปที่ 2.4	arsenosugar ที่พบมากในพืชและสาหร่าย.....	10
รูปที่ 2.5	การเปลี่ยนแปลงจาก arsenosugar ไปเป็น arsenobetaine.....	12
รูปที่ 2.6	ระบบของ HPLC/ICP-MS.....	16
รูปที่ 2.7	ผลของ pH ของ mobile phase ต่อการแตกตัวของสารประกอบอาร์เซนิก.....	18
รูปที่ 3.1	แผนผังการวิเคราะห์อาร์เซนิกในปลา.....	29
รูปที่ 3.2	แผนผังการวิเคราะห์ Certified Reference Materials.....	30
รูปที่ 4.1	โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานอาร์เซนิก ความเข้มข้น 250 $\mu\text{g/l}$ โดยใช้ 5 และ 50 mmol/l NaH_2PO_4 เป็น mobile phase.....	33
รูปที่ 4.2	โครมาโทแกรมของสารผสมระหว่าง arsenobetaine , MMA และ inorganic arsenic ความเข้มข้นชนิดละ 250 $\mu\text{g/l}$ โดยใช้ 5 และ 50 mmol/l NaH_2PO_4 เป็น mobile phase.....	34
รูปที่ 4.3	โครมาโทแกรมของสารผสมระหว่าง arsenobetaine , MMA และ inorganic arsenic โดยใช้ mobile phase คือ NaH_2PO_4 ความเข้มข้นเดียวตลอดการแยก.....	35
รูปที่ 4.4	การแยก AsB, DMA, MMA และ As^{V} เข้มข้น 200 $\mu\text{g/l}$ โดยใช้ mobile phase แบบ Three step elution ซึ่งแปรผันเวลาที่ใช้ในขั้นตอน แรก (mobile phase ความเข้มข้นต่ำ) และวิเคราะห์ด้วย ICP-MS.....	36
รูปที่ 4.5	โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานอาร์เซนิก ความเข้มข้น แต่ละชนิด 250 $\mu\text{g/l}$ โดยใช้ flow rate ของ HPLC ที่แตกต่างกัน.....	37
รูปที่ 4.6	โครมาโทแกรมของสารสกัดจากปลากะพงแดง.....	38
รูปที่ 4.7	โครมาโทแกรมของสารสกัดจากปลากะพงแดงที่เติม MMA และ inorganic arsenic.....	39
รูปที่ 4.8	โครมาโทแกรมของสารสกัดจาก DORM-2.....	42
รูปที่ 4.9	calibration curve ของสารละลายมาตรฐานอาร์เซนิก.....	46

รูปที่ 4.10	ปริมาณอาร์เซนิกในปลาทะเลและปลาน้ำจืด.....	51
รูปที่ 4.11	สัดส่วนของอาร์เซนิกรูปแบบต่างๆ ในปลาที่มีแหล่งที่อยู่แตกต่างกัน.....	52
รูปที่ 4.12	สัดส่วนของอาร์เซนิกรูปแบบต่างๆ ในปลาที่มีพฤติกรรมกรกินอาหารแตกต่างกัน.....	53
รูปที่ 4.13	S-adenosylmethionine (AdoMet).....	54
รูปที่ 4.14	กระบวนการเปลี่ยนแปลงของ arsenate ไปเป็น arsenosugar ในพืช.....	56
รูปที่ 4.15	กระบวนการเกิด arsenobetaine จาก arsenosugar.....	57
รูปที่ 4.16	การขับ arsenite และ DMA ออกจากเซลล์ของสิ่งมีชีวิต.....	58



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อาร์เซนิก (Arsenic ; As) หรือ สารหนู เป็นธาตุที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ รวมถึงสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ทั้งบนบกและในทะเล เป็นที่ทราบกันดีว่าอาร์เซนิกเป็นสารที่มีความเป็นพิษสูง แต่ความเป็นพิษของมันจะแตกต่างกันไปในแต่ละรูปแบบทางเคมี (chemical speciation) ที่พบ สารประกอบของอาร์เซนิกอนินทรีย์ ได้แก่ arsenite และ arsenate มีความเป็นพิษสูงและจัดเป็นสารก่อมะเร็ง (US-EPA, 2003) ในขณะที่อาร์เซนิกอินทรีย์จะมีความเป็นพิษน้อยกว่า โดยเฉพาะอย่างยิ่งในรูปแบบ arsenobetaine ที่มีความเป็นพิษต่ำมากจนอาจกล่าวได้ว่าเป็นรูปแบบที่ไม่เป็นพิษเลย (Francesconi และ Edmonds, 1998) ทำให้การวิเคราะห์ปริมาณอาร์เซนิกรวมไม่สามารถบ่งบอกระดับความเป็นพิษที่แท้จริงของมันได้ อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์ปริมาณอาร์เซนิกก็ยังนิยมทำกันในรูปของปริมาณรวม เนื่องจากสะดวก รวดเร็ว และมีวิธีการไม่ยุ่งยาก แต่จากการพัฒนาเครื่องมือวิเคราะห์ทางสเปกโตรเมตรี ทำให้ขีดจำกัดของการวิเคราะห์ (detection limit) ต่ำลง จนสามารถวิเคราะห์สารที่มีปริมาณต่ำมากๆ ได้ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาทางด้านรูปแบบทางเคมีในปัจจุบัน

การวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกมีความจำเป็นอย่างยิ่งต่ออุตสาหกรรมส่งออกผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งปลาซึ่งมีปริมาณการส่งออกสูง และเป็นอาหารที่คนนิยมบริโภคกันมาก เนื่องจากบางครั้งพบว่าปริมาณอาร์เซนิกรวมในปลาที่มีค่าที่เกินค่ามาตรฐาน ทั้งที่รูปแบบส่วนใหญ่อยู่ในรูปอาร์เซนิกอินทรีย์ซึ่งไม่เป็นพิษ โดยรูปแบบที่เป็นพิษ คือ อาร์เซนิกอนินทรีย์มีเพียงปริมาณน้อยเท่านั้น ทำให้เกิดผลเสียต่อการส่งออกผลิตภัณฑ์ปลาไปยังต่างประเทศ ดังนั้น จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพ เพื่อให้สามารถนำไปใช้กับงานวิเคราะห์ที่มีจำนวนตัวอย่างมากๆ หรืองานที่ต้องทำเป็นประจำในห้องปฏิบัติการทั่วไปได้ นอกจากนี้ข้อมูลความเข้มข้นของอาร์เซนิกรูปแบบต่างๆ ยังสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการวางมาตรฐานระดับการปนเปื้อนของอาร์เซนิกในปลาแทนที่มาตรฐานเดิมที่ใช้ปริมาณรวมได้ในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. พัฒนาวิธีการวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกในปลา
2. วิเคราะห์ปริมาณ arsenobetaine และ inorganic arsenic ในปลาชนิดต่างๆ ด้วยวิธีการที่พัฒนาได้

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

พัฒนาวิธีการวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกอย่างน้อย 2 รูปแบบ คือ arsenobetaine และ inorganic arsenic ในปลา ด้วยวิธี HPLC/ICP-OES

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้วิธีวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกที่ประหยัดและมีประสิทธิภาพ ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหรือการตรวจสอบคุณภาพสัตว์น้ำได้
2. ข้อมูลปริมาณของอาร์เซนิกในแต่ละรูปแบบในปลาซึ่งสามารถใช้เป็นแนวทางในการวางมาตรฐานของอาร์เซนิกได้ในอนาคต

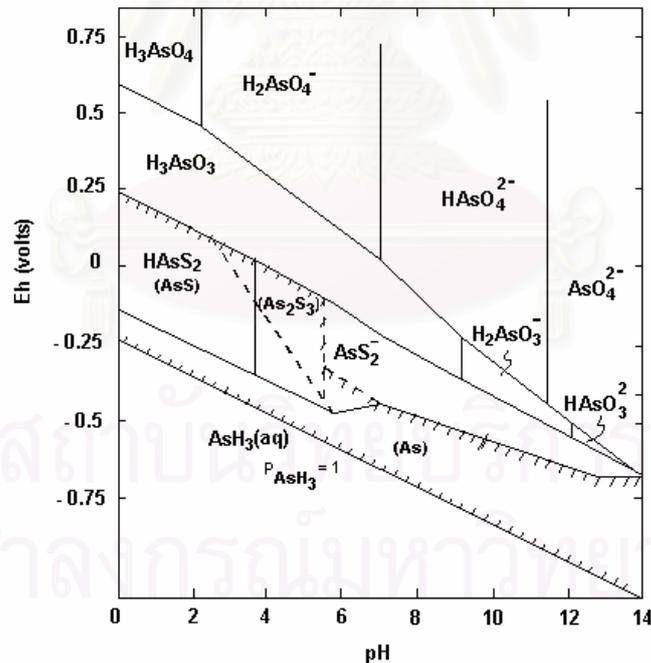
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อาร์เซนิก

อาร์เซนิก (Arsenic, As) หรือสารหนู เป็นธาตุกึ่งโลหะอยู่ในหมู่ที่ 5 ของตารางธาตุ มีเลขอะตอม 33 มวลอะตอม 74.92 จุดหลอมเหลว 817 องศาเซลเซียส และระเหิดที่อุณหภูมิ 613 องศาเซลเซียส อาร์เซนิกมีได้หลายออกซิเดชันสเตต ตั้งแต่ -3 , 0 , $+3$ ไปจนถึง $+5$ สำหรับในทะเลพบว่า arsenate (As^{V}) เป็นรูปแบบที่เสถียรที่สุดในสภาวะที่มีออกซิเจน ส่วน arsenite (As^{III}) จะพบในบริเวณที่มีออกซิเจนต่ำๆ (McSheehy *et al.*, 2003) สำหรับ metallic arsenic (As^0) ไม่ละลายน้ำจึงพบยากในน้ำทะเล เกล็ดของอาร์เซนิกส่วนใหญ่จะละลายน้ำได้ดี โดยความสามารถในการละลายขึ้นกับ pH สภาพประจุไฟฟ้า และ redox potential (E_h) ดังรูปที่ 2.1

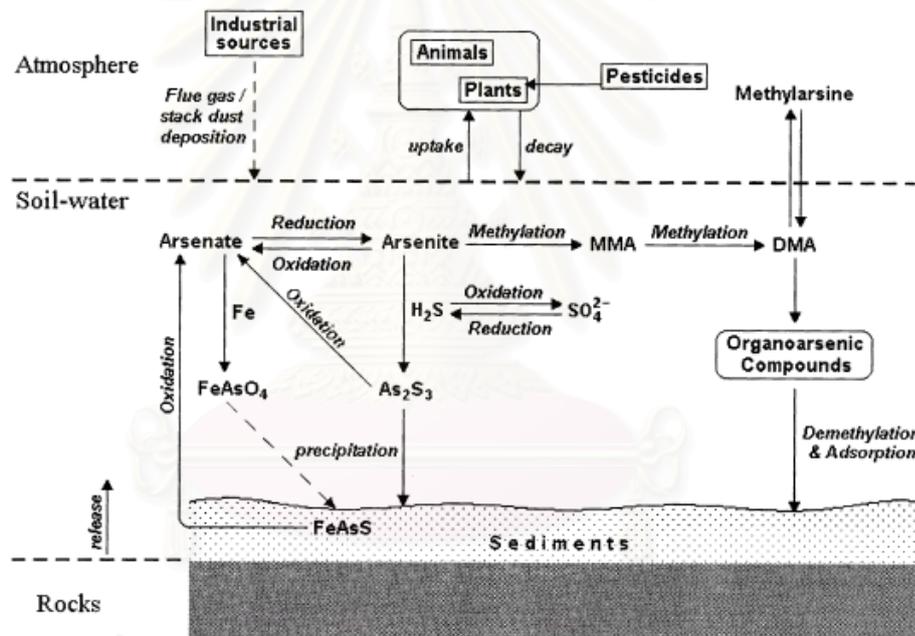


รูปที่ 2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH และ E_h ต่อรูปแบบของอาร์เซนิก ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความดัน 1 บาร์

(ที่มา : Gomez-Camirero *et al.*, 2001)

2.2 ที่มาของอาร์เซนิกในทะเล

อาร์เซนิกในทะเลมีที่มาจากธรรมชาติ (natural sources) และจากกิจกรรมของมนุษย์ (anthropogenic sources) อาร์เซนิกในธรรมชาติพบในรูปของแร่ arsenopyrite (FeAsS) โดยมีปริมาณเฉลี่ย 2 mg/kg ของเปลือกโลก (Lobinski *et al.*, 1996) นอกจากนี้ยังพบ $\text{As}^{\text{III}}\text{O}_3$ ในสารประกอบ arsenite เช่น armangite [$\text{Mn}_{26}\text{As}_{18}\text{O}_{50}\text{CO}_3(\text{OH})_4$] และ $\text{As}^{\text{IV}}\text{O}_4$ ในสารประกอบ arsenate เช่น adelite [$\text{CaMg}(\text{As}^{\text{IV}}\text{O}_4)_2(\text{OH})$] ในบางบริเวณอาจมีการระเบิดของภูเขาไฟ (volcanic eruption) และ submarine hydrothermal vent เป็นแหล่งกำเนิดร่วมด้วย (รูปที่ 2.2)



รูปที่ 2.2 วัฏจักรของอาร์เซนิกในสิ่งแวดล้อม

(ที่มา : Roy และ Saha, 2002)

ปัจจุบันกิจกรรมของมนุษย์เป็นตัวการสำคัญที่ช่วยเพิ่มอาร์เซนิกจากปริมาณเดิมที่มีอยู่ตามธรรมชาติ เนื่องจากได้ถูกนำมาใช้ในกิจกรรมหลายประเภท ไม่ว่าจะเป็นการผสมลงในยากำจัดศัตรูพืช และสารรักษาเนื้อไม้ ผสมลงในโลหะเจือเพื่อเพิ่มความแข็งแรงและความสามารถในการทนความร้อน (Ellenhorn, 1997) หรือใช้ผสมในอาหารสัตว์ในรูปของ arsanilic acid (4-aminobenzenearsonic) เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโต อาร์เซนิกยังเป็นผลพลอยได้จากการทำเหมืองแร่ เช่น ทองแดง ตะกั่ว และดีบุก ดังจะเห็นได้จากการปนเปื้อนใน อ.ร่อนพิบูลย์ จ. นครศรีธรรมราช ซึ่งมีที่มาจากน้ำที่ชะล้างผ่านบริเวณที่เคยทำเหมืองแร่ดีบุก ก๊าซ arsine (AsH_3) จัดเป็นก๊าซพิษที่ใช้ในโรงงานผลิตสารกึ่งตัวนำ metallic arsenic ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอิเล็กทรอนิกส์ นอกจากนี้ยังพบว่ามีการใช้ arsenous acid (As_2O_3 ในน้ำ) เพื่อการรักษาแบบเคมีบำบัดในโรค acute promyelocytic leukemia (APL) อีกด้วย (Le *et al.*, 2004)

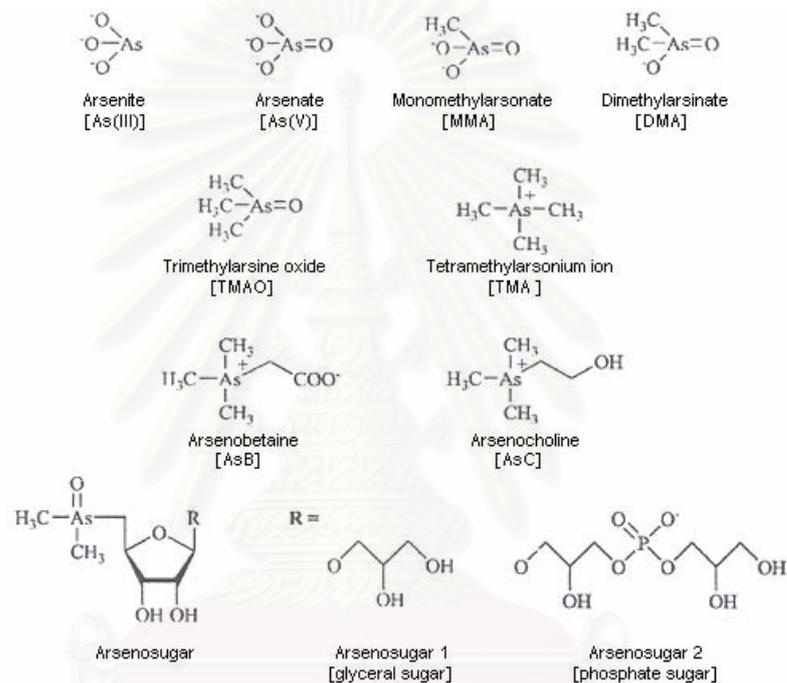
2.3. รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิก

เราอาจจำแนกสารประกอบของอาร์เซนิกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ ดังรูปที่ 2.3 ได้แก่ สารประกอบอาร์เซนิกอนินทรีย์ (inorganic arsenic) และสารประกอบอาร์เซนิกอินทรีย์ (organic arsenic) ซึ่งแต่ละตัวก็จะมีโครงสร้างที่ซับซ้อนแตกต่างกันออกไป ทำให้พฤติกรรมและความเป็นพิษของมันแตกต่างกันด้วย

สารประกอบอาร์เซนิกอนินทรีย์ที่พบทั่วไปในทะเลได้แก่ arsenate (As^V) และ arsenite (As^{III}) ในสภาวะที่มีออกซิเจน อาร์เซนิกจะอยู่ในรูป arsenate มากกว่า แต่ในสภาวะไร้ออกซิเจน arsenate จะถูกรีดิวซ์ไปเป็น arsenite ทั้งสองรูปแบบละลายน้ำได้ดีจึงพบมากในน้ำทะเล ตะกอนและน้ำที่แทรกอยู่ระหว่างตะกอน (sediment porewater) ด้วย และยังเป็นสารประเภท biologically active คือ สิ่งมีชีวิตสามารถรับเข้าสู่ร่างกายได้ดี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำหรับสารประกอบอาร์เซนิกอินทรีย์ในทะเลมีด้วยกันหลายรูปแบบ ที่สำคัญ ได้แก่ monomethylarsonate (MMA), dimethylarsinate (DMA), trimethylarsine oxide (TMAO), tetramethyl arsonium ion (TMA⁺), arsenobetaine (AsB), arsenocholine (AsC) และ arsenosugar (AsS) ซึ่งรูปแบบที่พบบ่อยในสิ่งมีชีวิตได้แก่ arsenobetaine, arsenocholine และ arsenosugar โครงสร้างต่างๆ แสดงดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 รูปแบบทางเคมีที่สำคัญของอาร์เซนิก

(ที่มา : Francesconi และ Edmonds, 1998)

2.4 ความเป็นพิษของอาร์เซนิก

จากการศึกษาความเป็นพิษของสารประกอบอาร์เซนิกพบว่า อาร์เซนิกอินทรีย์ จะมีความเป็นพิษสูงกว่าอาร์เซนิกอนินทรีย์กว่า 1000 เท่า และจัดเป็นสารก่อมะเร็งระดับ A – class ของ US-EPA (group A-human carcinogen) (US-EPA, 2003) ซึ่งความเป็นพิษจะขึ้นกับรูปแบบที่พบ โดย arsenite จะมีความเป็นพิษมากกว่า arsenate ในขณะที่อาร์เซนิกอินทรีย์เช่น MMA และ DMA มีความเป็นพิษปานกลางและจัดเป็นสารที่ส่งเสริมการเกิดมะเร็ง (cancer promoter) โดย MMA จะมีความเป็นพิษมากกว่า DMA สำหรับ arsenobetaine มีค่า LD₅₀¹ สูงมาก จนอาจกล่าวได้ว่าเป็นเป็นอาร์เซนิกรูปแบบที่ไม่เป็นพิษ สำหรับค่า LD₅₀ ของสารประกอบอาร์เซนิกรูปแบบที่สำคัญ แสดงไว้ในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ค่า LD₅₀ ของสารประกอบอาร์เซนิกรูปแบบที่สำคัญ (ทำการทดลองในหนู) (ที่มา : US-EPA, 2003)

รูปแบบของอาร์เซนิก	LD ₅₀ (mg/kg body weight)
<u>อาร์เซนิกอนินทรีย์</u>	
Arsenite	15 – 30
Arsenate	20 – 200
<u>อาร์เซนิกอินทรีย์</u>	
MMA	700 – 1800
DMA	1200 – 2600
Arsenocholine	6500
Arsenobetaine	> 10000

¹ LD₅₀ หรือ lethal dose เป็นความเข้มข้นของสารที่ทำให้สัตว์ทดลองตายไปครึ่งหนึ่งภายในเวลาที่กำหนด ซึ่งอาจเป็น 24, 48 หรือ 72 ชั่วโมง ค่า LD₅₀ ถ้ามีค่าต่ำ แสดงว่าสารนั้นมีความเป็นพิษสูง

อาการเป็นพิษเฉียบพลัน (acute toxic) ของอาร์เซนิก ได้แก่ ความผิดปกติของระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ ท้องเสีย กล้ามเนื้อท้องปวดเกร็ง มีอาการผิดปกติของระบบประสาทและการทำงานของหัวใจจนถึงขั้นเสียชีวิตได้ แต่อาการพิษเรื้อรัง (chronic toxic) จะเกิดความผิดปกติของผิวหนัง เช่น เกิดจุดสีน้ำตาลหรือสีขาวยกระจายทั่วไปบนฝ่ามือ ฝ่าเท้า มีเนื้อตะปุ่มตะป่ำหรือเรียกว่าโรคไขดำ (hyperkeratosis) เป็นต้น และเกิดโรคมะเร็งผิวหนังได้นอกจากนี้จะมีปัญหาเกี่ยวกับระบบประสาทและระบบเลือดอีกด้วย (US-EPA, 2003) ทางองค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) ได้กำหนดระดับอาร์เซนิกในน้ำดื่มเพื่อความปลอดภัยไว้ที่ความเข้มข้นไม่เกิน 10 $\mu\text{g/l}$ ส่วนการได้รับอาร์เซนิกอินทรีย์ต่อวันจะต้องไม่เกิน 2 $\mu\text{g/kg}$ body weight

สำหรับในอาหารนั้น โดยความร่วมมือขององค์การอนามัยโลกและองค์การอาหารและเกษตรกรรมแห่งสหประชาชาติ (WHO/FAO) ได้กำหนดระดับอาร์เซนิกที่คนปกติสามารถทนทานได้เมื่อได้รับจากอาหารต่อหนึ่ง สัปดาห์ (provisional tolerable weekly intake, PTWI) เมื่อคิดในรูปของอาร์เซนิกอินทรีย์ ไร่ไม่เกิน 15 $\mu\text{g/kg}$ body weight (WHO, 1992 อ้างจาก Sanz *et al.*, 2005) เมื่อคำนวณปริมาณอาร์เซนิกที่คนน้ำหนักเฉลี่ย 70 กิโลกรัม ได้รับแล้วเกิดพิษถึงขั้นเสียชีวิต จะเท่ากับ 1.5 mg โดยคิดในรูปของ arsenite

2.5 รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกในทะเล

2.5.1 น้ำทะเลและตะกอน

การศึกษารูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกในน้ำทะเลเริ่มขึ้นโดย Atkins และ Wilson ในปี ค.ศ. 1926 (Francesconi และ Edmonds, 1998) ผลการศึกษาของทั้งคู่ยืนยันว่าในน้ำทะเลที่มีออกซิเจนสูงจะมี arsenate เป็นรูปแบบที่สำคัญโดยเฉพาะน้ำทะเลที่ผิว แต่เมื่อความลึกเพิ่มขึ้นพบว่า arsenate ยังคงพบมากอยู่แต่ arsenite จะมีปริมาณเพิ่มขึ้น เนื่องจากการรีดิวซ์ arsenate ไปเป็น arsenite ส่วนอาร์เซนิกอินทรีย์ที่พบในน้ำทะเลได้แก่ MMA และ DMA โดยทั้งสองรูปแบบเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของ arsenate โดยแพลงก์ตอนพืช (Howard *et al.*, 1982 และ Howard และ Comber, 1989) ส่วนรูปแบบที่พบในตะกอนและน้ำที่แทรกอยู่ระหว่างตะกอน จะมีความคล้ายคลึงกับที่พบในน้ำทะเล ดังที่แสดงในตารางที่ 2.2 และ 2.3

ตารางที่ 2.2 ความเข้มข้นของอาร์เซนิกรูปแบบต่างๆในน้ำทะเล (ng/l)

ตัวอย่าง	สถานที่	Inorganic As	Organic As	ที่มา
Surface water	North-West Pacific	1483	59.5	
Surface water	Central-North Pacific Gyre	1110	200.4	a
Surface water	Central-Pacific Equatorial	1450	65.7	
น้ำที่ผิว	ปากแม่น้ำเจ้าพระยา	3800	400	b
	ปากแม่น้ำบางปะกง	2800	700	
น้ำที่ผิว	ชายฝั่งนิคมอุตสาหกรรม	3100	1000	
น้ำใกล้พื้น	มาบตาพุด	2900	1000	

หมายเหตุ a ข้อมูลจาก Santosa *et al.* (1997)

b ข้อมูลจาก รุ่งฟ้า อินทจักร (2545)

ตารางที่ 2.3 ความเข้มข้นของอาร์เซนิกรูปแบบต่างๆในตะกอน ($\mu\text{g/g}$ dry weight)

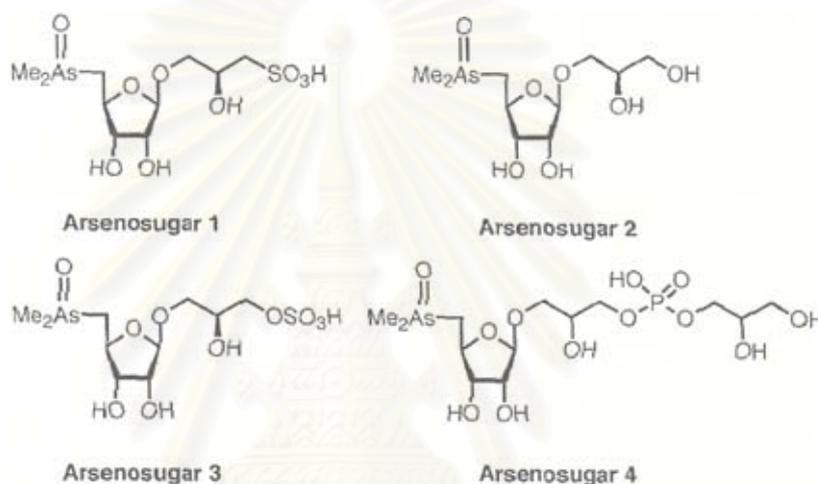
ตัวอย่าง	สถานที่	Inorganic As	Organic As	ที่มา
Surface sediment	Northern New South Walse, Australia	495.0	40.0	a
Surface sediment	Pak Pa-Nang Estuary, Thailand	10.8	ND	b
Sub – surface sediment		11.0	ND	

หมายเหตุ a ข้อมูลจาก Chappell *et al.* (1995)

b ข้อมูลจาก Rattanachongkiat (2004)

2.5.2 พืชและสาหร่ายทะเล

สารประกอบอาร์เซนิกที่พบในพืชและสาหร่าย (หมายรวมถึงแพลงก์ตอนพืชด้วย) จะอยู่ร่วมกับโครงสร้างคาร์โบไฮเดรตที่เรียกว่า arsenoriboside หรือ arsenosugar (AsS) ซึ่งมีโครงสร้างได้หลายแบบ ในปัจจุบันพบ arsenosugar ประมาณ 15 ชนิด แต่ที่พบมากมีอยู่ 4 ชนิด ดังรูปที่ 2.4 โดยโครงสร้างของ arsenosugar ได้จากการวิเคราะห์โดย NMR (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy) และ MS (Mass Spectrometry)



รูปที่ 2.4 arsenosugar ที่พบมากในพืชและสาหร่าย

(ที่มา : Francesconi และ Edmonds, 1998)

โดยทั่วไปจะพบ arsenosugar แตกต่างกันตามชนิดของพืชและสาหร่าย เช่น ในสาหร่ายสีน้ำตาลจะพบ arsenosugar 1 และ 3 มาก ในขณะที่สาหร่ายสีแดงและสาหร่ายสีเขียวจะพบ arsenosugar 2 และ 4 มากกว่า (Francesconi และ Edmonds, 1998) เป็นต้น นอกจากนี้จาก arsenosugar แล้ว ยังพบ arsenate และ DMA ด้วยแต่ปริมาณน้อยมาก

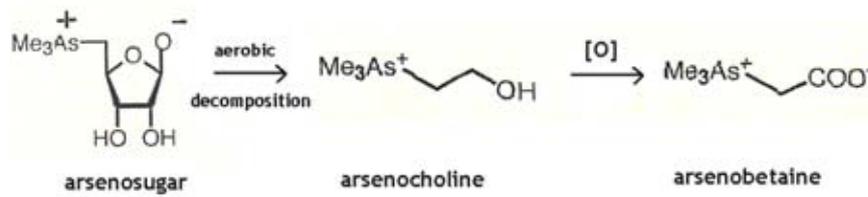
2.5.3 สัตว์ทะเล

สารประกอบอาร์เซนิกแตกต่างจากสารพิษชนิดอื่นๆ คือ ไม่พบการสะสมปริมาณตามลำดับชั้นของการกินในห่วงโซ่อาหาร (biomagnification) (Mace, 2003 และ ชัยเทพ วิริยะนิกกรณ์, 2547) เนื่องจากพบว่าสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในลำดับชั้นการกินต่ำกว่าอาจมีปริมาณอาร์เซนิกมากกว่าสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในลำดับชั้นการกินสูงกว่าได้ นอกจากนี้ยังพบว่า มีความหลากหลายของรูปแบบทางเคมีมากกว่าด้วย ซึ่งสาเหตุก็เชื่อกันว่าเกิดจากกระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของอาร์เซนิกในสิ่งมีชีวิต หรือ biotransformation (Gailer *et al.*, 1995, De Bettencourt *et al.*, 1997 และ Francesconi และ Edmonds, 1998)

รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกที่พบมากที่สุดในสัตว์ คือ arsenobetaine เช่น ในปลา หอย ฉลาม หรือ แพลงก์ตอนสัตว์ โดยทั่วไปสัดส่วนของ arsenobetaine จะเกิน 80–90 % ดังตารางที่ 2.4 โดยเฉพาะในสัตว์ที่กินเนื้อเป็นอาหาร (carnivore) และอาจพบอาร์เซนิกรูปแบบอื่นๆ เช่น monomethylarsonate, dimethylarsinate, trimethyl arsine oxide, arsenosugar และ อาร์เซนิก อนินทรีย์ได้บ้าง แต่ก็มีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับ arsenobetaine

สำหรับสัตว์ที่กินพืชเป็นอาหาร (herbivore) เช่น หอยสองฝาบางชนิดซึ่งเป็น planktonic feeders จะพบ arsenosugar และ tetramethylarsonium ion ในสัดส่วนที่สูงขึ้น เนื่องจากอาหารที่กินเป็นพวกแพลงก์ตอนสัตว์ ตัวอย่างเช่น การศึกษาใน *Tapes japonica* พบ arsenosugar 0.74 µg/g ส่วน arsenobetaine มีเพียง 0.63 µg/g (Shibata และ Morita, 1992) อย่างไรก็ตามสัดส่วนของ arsenosugar จะลดลงจนอาจตรวจวัดไม่พบในสัตว์ที่อยู่ในลำดับชั้นการกินอาหารที่สูงขึ้นไป (Howard และ Comber, 1989)

เนื่องจาก arsenobetaine มักจะไม่พบในน้ำและตะกอน ดังนั้นสิ่งมีชีวิตจึงไม่น่าจะได้รับจากบริเวณที่มันอาศัย จึงอาจสรุปได้ว่าการสะสม arsenobetaine ในสิ่งมีชีวิตไม่ขึ้นกับถิ่นที่อยู่ (Gailer *et al.*, 1995) สันนิษฐานกันว่า arsenobetaine อาจเปลี่ยนแปลงมาจากสารประกอบอาร์เซนิกอื่นๆ เช่น อาร์เซนิกอนินทรีย์หรือ arsenosugar และ arsenocholine โดยเฉพาะ arsenocholine ที่เชื่อกันว่าน่าจะเป็น precursor หลักของการเกิด arsenobetaine (De Bettencourt *et al.*, 1997 และ Pellerito *et al.*, 2002) โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น เป็นดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 การเปลี่ยนแปลงจาก arsenosugar ไปเป็น arsenobetaine

(ที่มา : Francesconi และ Edmonds, 1998)

ตารางที่ 2.4 เปอร์เซ็นต์ของ arsenobetaine ในสัตว์ทะเลชนิดต่างๆ

(ที่มา : Edmonds และ Francesconi, 1993 อ้างจาก Francesconi และ Edmonds, 1998)

animal	type	จำนวน species	Total As (mg/kg dw)	% arsenobetaine
Fish	Elasmobranch	7	3.1-44.3	94-95
	Teleost	17	0.1-166	48-95
Crustacean	Lobster	4	4.7-26	77-95
	Prawn/Shrimp	5	5.5-20.8	55-95
	Crab	6	3.5-8.6	79-95
Mollusc	Bivalve	11	0.7-2.8	12-88
	Gastropod	6	3.1-116.5	58-95
	Cephalopod	3	49.0	72-95
Echinoderm		1	12.4	60
Coelenterate		1	7.5	15
Porifera		1	3.2-6.8	13-15

หมายเหตุ dw = dry weight

2.6 วิธีการวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกในสัตว์

ในอดีตการวิเคราะห์โลหะปริมาณน้อยนิยมทำกันในรูปของปริมาณรวม แต่ต่อมาในช่วงทศวรรษที่ 60 ได้เริ่มมีความสนใจอย่างจริงจังต่อการศึกษาทางด้านรูปแบบทางเคมีของโลหะ เนื่องจากโลหะที่มีรูปแบบแตกต่างกันจะมีความเป็นพิษแตกต่างกันด้วย (Francesconi และ Kuenelt, 2004) นอกจากนี้การพัฒนาขีดความสามารถของเครื่องมือวิเคราะห์ทางสเปกโตรเมตรี (atomic และ mass spectrometry) ทำให้ขีดจำกัดของการวิเคราะห์ (detection limit) ต่ำลงมาก สามารถวิเคราะห์สารที่มีปริมาณต่ำๆ ได้ดี ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาทางด้านรูปแบบทางเคมีของโลหะปริมาณน้อยในปัจจุบัน และก็ยังมีการพัฒนาวิธีการและประยุกต์ใช้เครื่องมือต่างๆ อย่างต่อเนื่องเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการวิเคราะห์ให้ดียิ่งขึ้น

2.6.1 การสกัดอาร์เซนิกจากตัวอย่างสิ่งมีชีวิต

ในการสกัดอาร์เซนิกออกจากตัวอย่างให้มีประสิทธิภาพนั้น จะต้องคำนึงถึงชนิดของตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ เนื่องจากตัวอย่างที่เป็นน้ำ ตะกอน และสิ่งมีชีวิต จะมีวิธีการสกัดที่เหมาะสมแตกต่างกันออกไป ตัวทำละลายที่ใช้สกัดจึงแตกต่างกันด้วย หลักการทั่วไปในการเลือกตัวทำละลายที่ใช้สกัด คือ ตัวทำละลายนั้นจะต้องสามารถสกัดอาร์เซนิกออกจากตัวอย่างได้มากที่สุดโดยไม่เปลี่ยนแปลงรูปแบบของสารที่เราต้องการ

เป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่า การสกัดด้วยเอนไซม์ (enzymatic extraction) มีประสิทธิภาพสูงมากในการสกัดอาร์เซนิกจากตัวอย่างที่เป็นสิ่งมีชีวิต (Branch *et al.*, 1994 และ Le *et al.*, 2004) เนื่องจากสามารถทำลายพันธะภายในเนื้อเยื่อของตัวอย่างได้ดี ไม่ว่าจะเป็นเอนไซม์ trypsin ในกรณีที่เป็นตัวอย่างสัตว์ โดย trypsin จะเข้าไปทำลายพันธะเพปไทด์ที่เชื่อมระหว่างกรดอะมิโนในโปรตีน สำหรับตัวอย่างที่เป็นพืชหรือสาหร่ายจะใช้เอนไซม์ cellulase ในการย่อยพันธะไกลโคไซด์ในโครงสร้าง cellulose แต่เนื่องจากเอนไซม์ส่วนใหญ่มีราคาแพง จึงไม่เหมาะกับการวิเคราะห์ที่มีจำนวนตัวอย่างมากหรืองานที่ต้องทำเป็นประจำได้ วิธีที่นิยมรองลงมาจากเอนไซม์ คือ การสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction) โดยใช้เมทานอลกับน้ำ ซึ่งประสิทธิภาพในการสกัดขึ้นกับอัตราส่วนของสารทั้งสองที่ใช้ (McSheehy *et al.*, 2003 และ Francesconi และ Kuehnelt, 2004) และประสิทธิภาพจะแตกต่างกันถ้าตัวอย่างเป็นคนละชนิด ถึงแม้ว่าจะเป็นสัตว์หรือพืชเหมือนกันก็ตาม (Tukai *et al.*, 2002)

นอกจากนี้ ยังมีตัวทำละลายชนิดอื่นที่ใช้ในการสกัดอาร์เซนิกด้วย เช่น อะซิโตน ของผสมระหว่างเมทานอลกับคลอโรฟอร์ม (ใช้ในปลาและหอยสองฝาบางชนิด) เอทานอล (ใช้ในพืชทนเค็มจากพื้นที่ชุ่มน้ำ) และ phosphoric acid ซึ่งนิยมใช้สกัดตัวอย่างตะกอนดิน (Branch *et al.*, 1994, De Bettencourt *et al.*, 1997, Hanaoka *et al.*, 1999 และ Rattanachongkiat, 2004)

สำหรับขั้นตอนของการสกัดโดยทั่วไปจะประกอบไปด้วย ขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่าง (sample preparation) ในขั้นตอนนี้ต้องระมัดระวังไม่ให้เกิดการปนเปื้อนหรือการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของอาร์เซนิกได้ โดยนิยมนำตัวอย่างไปทำให้แห้งด้วยวิธี freeze drying ขั้นตอนที่สองคือ การสกัดอาร์เซนิกออกจากตัวอย่าง ซึ่งมีหลายวิธีไม่ว่าจะเป็น sonication, centrifugation, shaking, soxhlet extraction, microwave-assisted digestion หรือ accelerated solvent extraction (ASE) ซึ่งจากการศึกษาพบว่าวิธีการที่กล่าวมาสามารถสกัดรูปแบบของอาร์เซนิกออกมาได้โดยไม่มี ความแตกต่างทางสถิติ (Brisbin และ Caruso, 2002) แต่ส่วนใหญ่นิยมใช้วิธีการที่ง่ายและสภาพไม่รุนแรงในการสกัดและอาจใช้หลายวิธีการร่วมกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ แต่เนื่องจากความหลากหลายของชนิดตัวอย่างจึงไม่มีวิธีการสกัดใดเพียงวิธีการเดียวที่จะเหมาะสมกับตัวอย่างทุกชนิดได้ ที่สำคัญก็คือ การหาวิธีที่เหมาะสมกับแต่ละกลุ่มตัวอย่าง เช่น กลุ่มของปลา กลุ่มของหอย หรือ กลุ่มของคริสต์เตียน ที่เป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่นิยมรับประทานกันมาก ซึ่งพอจะใช้เป็นแนวทางของการวิเคราะห์ให้ได้

2.6.2 โครมาโทกราฟีในการแยกรูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิก

High performance liquid chromatography หรือ HPLC ได้ถูกนำมาใช้ในการแยกอาร์เซนิกรูปแบบต่างๆ ที่สกัดได้จากตัวอย่าง เนื่องจากอาร์เซนิกส่วนใหญ่ที่พบจะอยู่ในรูปที่ละลายได้ นอกจากนี้ HPLC ยังสามารถนำไปเชื่อมต่อกับระบบตรวจวัดธาตุต่างๆ ได้ง่าย เช่น atomic absorption, hydride generation หรือ inductively coupled plasma spectrometry

ชนิดของคอลัมน์ที่นิยมใช้ในการแยกรูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิก คือ ion-exchange column (ทั้ง anionic และ cationic column) โดยอาศัยหลักการแลกเปลี่ยนไอออนที่จำเพาะเจาะจงในสารละลายตัวอย่างกับ counter-ion ที่เคลือบอยู่บนผิวของ stationary phase (Skoog *et al.*, 1998) จากนั้น mobile phase จะชะเอาไอออนออกจาก stationary phase แล้วพาไปกับตัวมันด้วย

2.6.3 Atomic absorption spectrometry (AAS) และ Hydride generation AAS (HG-AAS)

ในช่วงทศวรรษที่ 80 วิธีการของ flame atomic absorption spectrometry หรือ Flame-AAS ได้ถูกนำมาใช้ในการตรวจวัดปริมาณอาร์เซนิกหลายรูปแบบด้วยกัน แต่ด้วยข้อจำกัดในด้านขีดจำกัดของการวิเคราะห์ที่อยู่ในระดับ mg As/l เท่านั้น และยังมี background noise ที่เกิดจาก flame รบกวนการวิเคราะห์มาก ทำให้การใช้ flame-AAS ไม่แพร่หลายเท่า Graphite Furnace AAS (GFAAS) และ Hydride generation AAS (HGAAS) แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง GFAAS กับ HGAAS แล้ว พบว่า ในขั้นตอน drying-ashing-atomizing ในวิธี GFAAS ใช้เวลานาน จึงไม่เหมาะสมต่อการนำไปเชื่อมต่อกับ HPLC ดังนั้น HGAAS จึงเป็นที่นิยมมากในการวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกในน้ำและตะกอน หรือ ในเลือดและปัสสาวะของคน (Do *et al.*, 2000 และ Gettar *et al.*, 2000) ซึ่งมี As^{III} , As^V , MMA และ DMA เป็นรูปแบบหลัก แต่มีข้อจำกัดคือ ไม่สามารถวิเคราะห์รูปแบบที่ไม่เกิดอนุพันธ์ arsine เมื่อทำปฏิกิริยากับ hydride ได้ เช่น arsenobetaine ดังนั้น HGAAS จึงไม่นิยมนำมาใช้วิเคราะห์อาร์เซนิกในสิ่งมีชีวิต (Francesconi และ Edmonds, 1998)

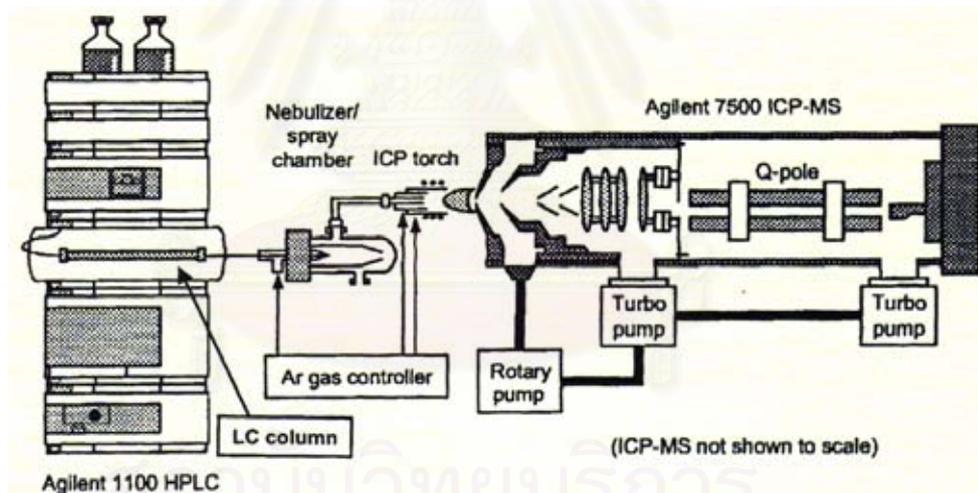
2.6.4 Inductively coupled plasma spectrometry (ICP)

Inductively coupled plasma spectrometry หรือ ICP เป็นระบบที่ใช้วิเคราะห์ธาตุได้ทีละหลายๆ ตัวและยังสามารถนำไปเชื่อมต่อกับ HPLC และ mass spectrometry (MS) ได้ง่ายและมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะระบบ HPLC/ICP-MS (รูปที่ 2.6) ซึ่งสามารถวิเคราะห์ปริมาณอาร์เซนิกได้ต่ำลงไปถึงประมาณ 5 pg-As/ml (Caruso และ Montes-Bayon, 2003 และ Coelho *et al.*, 2005)

ในระบบของ ICP จะมี nebulizer ซึ่งจะเปลี่ยนสารละลายตัวอย่างให้เป็น aerosol และส่งผ่าน spray chamber ไปยัง plasma โดยการพาของ nebulizer gas ในบริเวณนี้ สารตัวอย่างที่เป็น aerosol เล็กๆ จะถูกกำจัดตัวทำละลายและเมทริกซ์ และถูก atomized หรือ ionized โดย plasma ที่มีอุณหภูมิสูง จากนั้นจะถูกตรวจวัดด้วย detector หรือถ้าหากเป็นระบบ ICP-MS (รูปที่ 2.6) ก็จะถูกส่งต่อไปยัง MS detector ไอออนจะถูกแยกออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างของอัตราส่วนมวลต่อประจุ (mass-to-charge ratio, m/z) สำหรับ ICP-MS สามารถวิเคราะห์ธาตุที่มี m/z อยู่ในช่วง 6 – 238 (Hill, 1999 อ้างจาก Rattanachongkiat, 2004)

อย่างไรก็ตาม ระบบของ ICP-MS มีราคาค่อนข้างสูง ทำให้มีข้อจำกัดในการนำไปใช้ใน ห้องปฏิบัติการทั่วไป

นอกจากระบบ HPLC/ICP-MS แล้ว ยังมีการใช้ระบบ HPLC/ICP แบบ atomic emission spectrometry (AES) หรือ optical emission spectrometry (OES) ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปแบบ (transformation) ของอาร์เซนิกในหอยสองฝา *Mytilus edulis* ที่เลี้ยงในน้ำทะเลที่เติมสารประกอบอาร์เซนิกชนิดต่างๆ จากนั้นสกัดด้วยของผสมระหว่าง methanol กับน้ำ และใช้ 0.01 M 2-hydroxy-5-sulphobenzoic acid pH 2.5 เป็น mobile phase พบว่าสามารถแยกอาร์เซนิกรูปแบบต่างๆออกมาได้เป็นอย่างดี (Gailer *et al.*, 1995) นอกจากนี้ยังมีการใช้ HPLC/ICP-AES ในการศึกษารูปแบบของอาร์เซนิกในน้ำธรรมชาติ และในปัสสาวะของมนุษย์ โดยไม่สนใจ arsenobetaine เพราะไม่พบรูปแบบดังกล่าวในน้ำ (Do *et al.*, 2000 และ Gettar *et al.*, 2000)



รูปที่ 2.6 ระบบของ HPLC/ICP-MS

(ที่มา : Caruso และ Montes-Bayon, 2003)

2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกด้วยวิธี HPLC/ICP-OES

มีปัจจัยหลายประการที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิก ด้วยวิธี HPLC/ICP-OES ที่ใช้ anion-exchange column และมีไอออนของ sulphate หรือ phosphate อยู่ในส่วนประกอบของ mobile phase ปัจจัยเหล่านั้น ได้แก่ pH, pKa และ buffering capacity ของ mobile phase ชนิดของ packing material ในคอลัมน์ และผลของเกลือที่อยู่ใน mobile phase

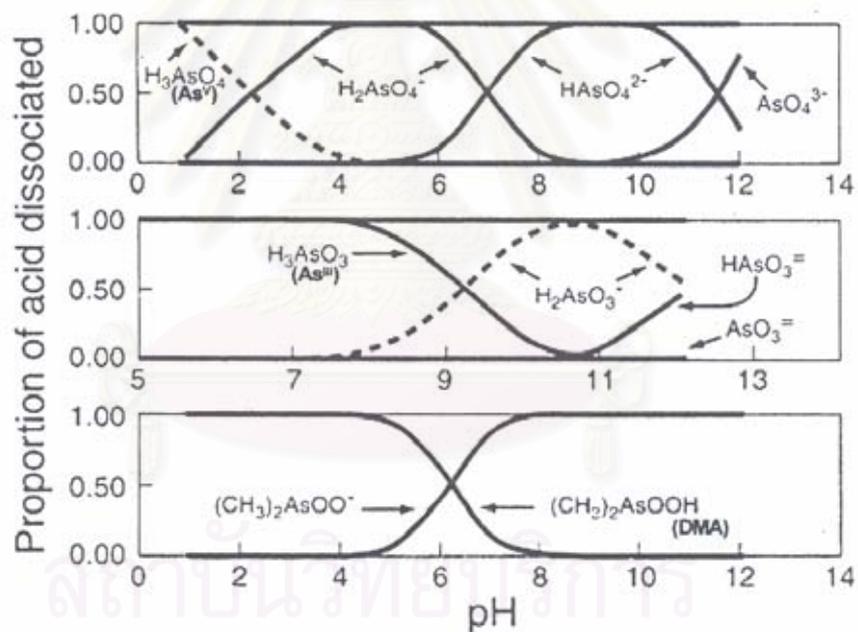
2.7.1 pH, pKa และ buffering capacity ของ mobile phase

อาร์เซนิกรูปแบบต่างๆมีค่าคงที่การแตกตัว (dissociation constant, pKa) ที่แตกต่างกันออกไปขึ้นกับค่า pH ดังตารางที่ 2.5 ทำให้ในสารละลายที่ pH ต่างๆมีสัดส่วนของอาร์เซนิกที่แตกตัวออกมาแตกต่างกัน

เมื่อพิจารณาจากรูปที่ 2.7 จะเห็นว่า DMA จะแตกตัวหมดอย่างสมบูรณ์ที่ $\text{pH} > 8$ ในขณะที่ arsenic acid (arsenate, As^{V}) จะอยู่ในรูปของ HAsO_4^{2-} เกือบ 100% ที่ $\text{pH} < 5$ neutral molecule ทั้งหมดจะเกิดการแตกตัวไปเป็น H_2AsO_4^- แต่ที่ $\text{pH} \sim 10$ มากกว่า 97% ของทั้งหมดจะอยู่ในรูปของ HAsO_4^{2-} ส่วนที่เหลือเป็น AsO_4^{3-} สำหรับ arsenous acid (arsenite, As^{III}) พบว่า ที่ $\text{pH} 7.5 - 8.0$ จะอยู่ในรูปของ H_3AsO_3 ซึ่งไม่มีประจุมากกว่า 94% ทำให้มันถูกแยกออกมาจากคอลัมน์อย่างรวดเร็วและใกล้กับแนวของ solvent front ซึ่งกรณีนี้จะเกิดขึ้นกับ arsenobetaine เช่นกันเมื่อ mobile phase มี $\text{pH} = 10$ ดังนั้น จึงต้องมีการควบคุม pH ของ mobile phase ให้คงที่ตลอดการวิเคราะห์

ตารางที่ 2.5 ค่า pKa ของสารประกอบอาร์เซนิกรูปแบบต่างๆ
(ที่มา : Foulkes, 2003)

Arsenic compounds		pKa value
arsenous acid (As ^{III})	$\text{HAsO}_2 \rightarrow \text{AsO}_2^-$	9.23
arsenic acid (As ^V)	$\text{H}_3\text{AsO}_4 \rightarrow \text{H}_{(3-n)}\text{AsO}_4^{n-}$	2.20, 6.97, 11.53
MMA	$\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})_2$	3.6, 8.2
DMA	$(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH})$	1.28, 6.2
AsB	$(\text{CH}_3)_3\text{As}^+\text{CH}_2\text{CO}_2^-$	2.18



รูปที่ 2.7 ผลของ pH ของ mobile phase ต่อการแตกตัวของสารประกอบอาร์เซนิก

(ที่มา : Naidu *et al.*, 2000)

2.7.2 ชนิดของ packing material ในคอลัมน์

ชนิดของวัสดุที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ (column packing material) มีความสำคัญต่อการแยกในระบบของ HPLC เป็นอย่างมาก เพราะการแลกเปลี่ยนไอออนอาจได้รับผลกระทบจากชนิดของ counter-ion ได้ โดยไอออนที่มีหลายประจุ (multiple charged ion) จะถูกจับได้ดีกว่าไอออนที่มีประจุเดียว (single charged ion) และถ้าหาก counter-ion เกิดการแลกเปลี่ยนกับไอออนอื่นที่ไม่ต้องการก็จะทำให้ retention time เพิ่มขึ้น (Skoog *et al.*, 1998)

packing material ภายในคอลัมน์ชนิด anion – exchange ส่วนมากเป็นสารประกอบพวกโคโพลิเมอร์ของสไตรีนกับไดไวนิลเบนซีนที่ต่อกันแบบ cross-linkage ปัจจุบันที่นิยมใช้กันโดยทั่วไป คือ anion – exchange column ชนิด Hamilton PRP-X 100 ซึ่งใช้ในการแยกที่มีเกลือ sulphate หรือ phosphate เป็น mobile phase ได้เป็นอย่างดี และมีสมบัติทนทานต่อ pH ได้ในช่วงกว้าง (pH 1-13) ทำให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการแยกสารได้หลากหลายชนิด

2.7.3 ผลของเกลือที่อยู่ใน mobile phase

เกลือที่เป็นองค์ประกอบใน mobile phase จะส่งผลกระทบต่อกระบวนการวิเคราะห์ โดยเฉพาะในระบบ HPLC/ICP-MS เป็นอย่างมาก เนื่องจากจะทำให้เกิด polyatomic ion ($^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$) ใน plasma ซึ่งจะไปซ้อนทับกับสัญญาณ m/z ที่ 75 ของสารประกอบอาร์เซนิก ผลของการรบกวนนี้จะแปรผันตามปริมาณเกลือ Cl^- ที่มีอยู่ นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการอุดตันใน nebulizer ของ ICP และ เกิดการกัดกร่อนของ detector ใน MS อีกด้วย

วิธีการแก้ปัญหาที่อาจเกิดขึ้นทำได้โดยการเพิ่มแก๊สไนโตรเจนเข้าไปใน plasma หรือ การต่อ hydride generation เข้าไประหว่าง HPLC กับ ICP ซึ่งจะทำให้มีเพียงอนุพันธ์ arsine ของอาร์เซนิกเท่านั้นที่สามารถผ่านเข้าไปยัง detector แต่ก็มีข้อจำกัดคือ ไม่สามารถใช้ในการวิเคราะห์ในสิ่งมีชีวิตได้ เนื่องจาก arsenobetaine ไม่เกิดอนุพันธ์ arsine อีกวิธีการหนึ่งที่ยากกว่าคือ การเตรียม mobile phase ให้มีความเข้มข้นต่ำๆ หรือมีเกลือเป็นองค์ประกอบไม่เกิน 2 % (Rattanachongkiat, 2004)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการศึกษา

3.1 การประยุกต์ใช้ระบบ HPLC/ICP-OES

ระบบ HPLC/ICP-OES ที่ใช้ในการศึกษาคั้งนี้พัฒนาการเชื่อมต่อ (coupling) ปลายคอลัมน์ของ HPLC เข้ากับ injector ที่ต่อกับ nebulizer ของ ICP-OES โดย HPLC ที่ใช้ในการแยกเป็นของ Knauer ซึ่ง pump เป็นชนิด K-1001 คอลัมน์มีขนาด 250 x 4.6 mm ทำด้วย stainless steel มี packing material เป็น Hamilton PRP-X100 anion-exchange resin ขนาดของ particle เท่ากับ 10 μm และใช้ guard column ซึ่งมี packing material เป็นชนิดเดียวกัน ขนาด 50 x 4.6 mm ICP-OES ที่ใช้ในการทดลองเป็นของ HORIBA Jobin Yvon รุ่น Ultima II ใช้ nebulizer เป็นแบบ pneumatic nebulizer การนำสารละลายตัวอย่างเข้าสู่เครื่องใช้ระบบของ peristaltic pump ใช้ plasma gas คือ แก๊สอาร์กอน ชนิด standard grade 99.99% (Prax Air)

เพื่อทำการตรวจวัดสัญญาณและ peaks ของสารที่แยกได้ ได้ทำการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม เช่น flow rate และ ลำดับการ elute ของ mobile phase, pump pressure และ เวลาที่ใช้ในการแยกรูปแบบที่ต้องการ รวมทั้งสภาวะต่างๆของเครื่อง ICP-OES ที่สามารถแยก peak ของสารทั้งสองออกจากกันได้ดีที่สุด

3.2 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

3.2.1 สารละลายมาตรฐานอาร์เซนิก

สารละลายมาตรฐานอาร์เซนิก 3 ชนิดที่ใช้ ได้แก่ inorganic arsenic (As^{V}) , arsenobetaine (AsB) และ monomethylarsonic acid (MMA) เตรียมสารละลายแต่ละชนิดด้วย Milli-Q water (18 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$)

สารละลายมาตรฐาน inorganic arsenic As^{V} (stock solution) ความเข้มข้น $1000 \pm 5 \text{ mg As/l}$ (standard reference material จาก NIST) เป็นของ MERCK สำหรับสารละลายมาตรฐาน AsB และ MMA เป็นของ Sigma, Gillingham, Dorset, UK โดยได้รับความ

อนุเคราะห์จาก Laboratory of School of Earth, Ocean Environmental Science, University of Plymouth, UK

Sodium dihydrogenphosphate (NaH_2PO_4) (analytical reagent grade) เป็นของ MERCK เตรียมให้มีความเข้มข้น 5 และ 50 mmol/l ปรับ pH ให้เท่ากับ 7 ด้วย ammonia solution (VWR, UK) แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง WHATMAN 0.45 μm ก่อนนำไปใช้เพื่อป้องกันอนุภาคที่อาจทำให้คอลัมน์เกิดการอุดตัน

Methanol (chromatographic grade) เป็นของ MERCK, Nitric acid (HNO_3) (ultrapure grade) เป็นของ MERCK, Hydrogen peroxide 37% (H_2O_2) (analytical reagent grade) เป็นของ Fisher Scientific

3.2.2 Certified Reference Materials (CRM)

CRM ที่ใช้ในการวิเคราะห์หมี 2 ชนิด ได้แก่ DORM-2 (Dogfish muscle) เป็นของ National Research Council, Ottawa, Canada และ MA-M-3/TM (Fish tissue homogenate) เป็นของ IAEA, Monaco

3.2.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

ทำความสะอาดอุปกรณ์ที่เป็น low-density polyethylene (LDPE) ตามวิธีการของ Cossa *et al.* (1996) โดยล้างอุปกรณ์ LDPE ให้สะอาดด้วย detergent จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำ deionized (DI) จากนั้นนำไปแช่ใน 10% v/v HNO_3 ใน DI นาน 3 – 5 วัน แล้วนำมาล้างด้วย DI อีกครั้ง สุดท้ายล้างด้วย Milli-Q water นำไปตากให้แห้งใน cleaned bent hood อุปกรณ์ที่แห้งแล้วเก็บในถุง polyethylene ชนิดซิปล็อค

3.3 ตัวอย่างปลา

เก็บตัวอย่างทั้งปลาทะเลและปลาน้ำจืด โดยปลาทะเลจาก จ.จันทบุรี เก็บจากเรือประมงพื้นบ้านใน อ. แหลมสิงห์ ส่วนปลาน้ำจืดเก็บจากแหล่งธรรมชาติในแม่น้ำจันทบุรี ซึ่งมีระยะห่างจากปากแม่น้ำประมาณ 12.8 กิโลเมตร การเก็บตัวอย่างทำโดยใช้แหขนาดเล็กและเบ็ดตกปลา นอกจากนี้ยังทำการเก็บตัวอย่างปลาชนิดใกล้เคียงกันจากตลาดสดด้วย ส่วนตัวอย่างปลาทะเลจาก จ. สมุทรปราการ เก็บจากเรือประมงพื้นบ้าน ตัวอย่างปลาน้ำจืดกับปลากะพงแดงของกรุงเทพมหานคร ซื้อมาจากตลาดสด ทำการเลือกตัวอย่างปลาในแต่ละชนิดให้มีขนาดใกล้เคียงกันและมีความหลากหลายทางด้านพฤติกรรมการกินอาหาร (feeding behavior) มากที่สุด เก็บใส่ถุง polyethylene ชนิดซิปล็อค 2 ชั้น แช่เย็นไว้จนกว่าจะถึงห้องปฏิบัติการ จากนั้นนำตัวอย่างปลาไปแล้วเอาเฉพาะเนื้อ แช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไป freeze dry เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของอาร์เซนิก ตัวอย่างที่แห้งแล้วบดให้ละเอียด เก็บใส่ถุง polyethylene 2 ชั้น เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

3.4 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์อาร์เซนิกในห้องปฏิบัติการ

3.4.1 ทดสอบการแยกสารละลายมาตรฐานอาร์เซนิก

- เตรียมสารละลายมาตรฐานอาร์เซนิก 3 ชนิด ได้แก่ inorganic arsenic, AsB และ MMA ให้มีความเข้มข้น เท่ากับ 250 µg/l นำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC/ICP-OES เพื่อหาลักษณะของ peak และ retention time ของสารแต่ละชนิด
- เตรียมสารละลายผสมของ inorganic arsenic, AsB และ MMA ให้มีความเข้มข้นแต่ละชนิด เท่ากับ 250 µg/l แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC/ICP-OES ที่สภาวะเดียวกัน เพื่อทดสอบว่าสามารถแยกสารทั้ง 3 ชนิดออกจากกันได้เป็นอย่างดี

3.4.2 ทดสอบการแยกสารสกัดจากปลาที่เติมสารละลายมาตรฐานอาร์เซนิก

- เตรียมสารสกัดจากปลาด้วยวิธีสกัดซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Geiszinger *et al.* (2002) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC/ICP-OES เพื่อดูว่ามีอาร์เซนิกรูปแบบใดบ้าง (เปรียบเทียบ retention time และ peak area กับสารละลายมาตรฐาน)
- นำปลาทัวอย่างเดิมมาเติมสารละลายมาตรฐาน inorganic arsenic และ MMA ซึ่งมีความเข้มข้นชนิดละ 250 µg/l ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปสกัดด้วยวิธีการเดียวกัน จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC/ICP-OES เพื่อทดสอบการแยก AsB, inorganic arsenic และ MMA ใน matrix ที่เป็นเนื้อปลาจริง

3.4.3 ทดสอบหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดอาร์เซนิกในปลา

- นำตัวอย่างปลา 1 ชนิด ไปวิเคราะห์ปริมาณอาร์เซนิกรวมด้วยวิธี Total acid digestion (ดูวิธีการในหัวข้อ 3.5.1)
- ชั่งตัวอย่างปลาชนิดเดิม 0.5 กรัม จำนวน 6 ตัวอย่าง ใส่ลงใน centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายที่เป็นของผสม methanol : water (v/v) อัตราส่วนต่างๆ กัน ดังนี้ 1:1, 2:1, 3:1, 1:2, 1:3 และ น้ำอย่างเดียวลงไป 5 มิลลิลิตร
- นำไปสกัดด้วยวิธีการซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Geiszinger *et al.* (2002) แล้วนำไปวัดปริมาณอาร์เซนิกที่สกัดได้ทั้งหมดด้วยเครื่อง ICP-OES
- เปรียบเทียบปริมาณอาร์เซนิกที่สกัดได้กับปริมาณอาร์เซนิกรวมจากวิธี Total acid digestion แล้วเลือกตัวทำละลายที่ให้เปอร์เซ็นต์การสกัดสูงสุดเพื่อนำไปใช้ในการสกัดตัวอย่างปลา

3.4.4 Recovery และ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานอาร์เซนิก

- นำตัวอย่างปลา 1 ชนิด เติมสารละลายมาตรฐาน inorganic arsenic และ MMA ซึ่งมีความเข้มข้นชนิดละ 25, 50, 75, 100, 150 และ 200 $\mu\text{g/l}$ ลงไป 1 มิลลิลิตร นำไปสกัดอาร์เซนิก แล้ววิเคราะห์ด้วย HPLC/ICP-OES
- วิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน arsenobetaine ซึ่งมีความเข้มข้น 25, 50, 75, 100, 150 และ 250 $\mu\text{g/l}$ ด้วย HPLC/ICP-OES
- เปรียบเทียบ % recovery ของสารทั้ง 3 ชนิด ที่ได้จากสองวิธีการ ดังนี้คือ

วิธีการที่ 1 one point calibration โดยเปรียบเทียบ retention time และ peak area ของสารที่แยกได้กับสารละลายมาตรฐาน จากนั้นคำนวณความเข้มข้น และ % recovery ของ AsB, inorganic arsenic และ MMA ที่ได้

วิธีการที่ 2 calibration curve โดยนำ peak area ของ AsB, inorganic arsenic และ MMA ที่ได้ไปพล็อต calibration curve แล้วคำนวณความเข้มข้น และ % recovery ของสารทั้ง 3 ชนิด

3.5 การพัฒนาขั้นตอนการวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกในปลา (รูปที่ 3.1)

3.5.1 ปริมาณอาร์เซนิกรวม (Total acid digestion method)

- ชั่งตัวอย่างปลาที่แห้งและบดละเอียดแล้ว 0.25 กรัม ใส่ลงใน Teflon bomb
- เติม HNO_3 เข้มข้น 3 มิลลิลิตร และ 37 % H_2O_2 1 มิลลิลิตร ปิดฝา bomb หลวมๆ ทิ้งไว้ 1 คืน ในตู้ควั่น (pre-digestion)
- ปิดฝา bomb ให้แน่น นำไปให้ความร้อนด้วยหม้ออัดความดันที่อุณหภูมิประมาณ 110 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งตัวอย่างให้เย็น
- ถ่ายสารละลายลงในขวดวัดปริมาตร ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร นำไปวัดปริมาณอาร์เซนิกรวมด้วยเครื่อง ICP-OES

3.5.2 ขั้นตอนการสกัดอาร์เซนิกในปลา (Solvent extraction method)

วิธีการวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกในปลา ทำการดัดแปลงจากวิธีการของ Geiszinger *et al.*, (2002), Fattorini *et al.* (2004) และ Rattanachongkiat (2004) รวมทั้งเอกสารอื่นที่เกี่ยวข้อง ดังต่อไปนี้

- ชั่งตัวอย่างปลาที่แห้งและบดละเอียดแล้ว 0.5 กรัม ใส่ลงใน centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร (ควรชั่งทันทีหลังจากตัวอย่างถูก freeze dried แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปวิเคราะห์)
- เติมน้ำ : water อัตราส่วน 3 : 1 v/v ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1 คืนที่อุณหภูมิห้อง (pre-extraction)
- นำไปผสมให้เข้ากันดีขึ้นด้วยเครื่อง sonicator นาน 30 นาที จากนั้น centrifuge ที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที
- เปิดสารละลายส่วนใสไว้ใน centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร
- ทำซ้ำโดยเติมน้ำ : water อัตราส่วน 3 : 1 v/v ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในส่วนของ residue นำไป sonicate 30 นาที และ centrifuge ที่ 2000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที
- เปิดสารละลายส่วนใสไปรวมกัน แล้วนำไป centrifuge อีกครั้ง ที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที
- เปิดสารละลายส่วนใสลงในขวดวัดปริมาตร ปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกด้วย HPLC/ICP-OES

3.5.3 ทดสอบประสิทธิภาพของการวิเคราะห์ด้วย CRM (รูปที่ 3.2)

- นำ CRM : DORM-2 และ MA-M-3/TM ไปวิเคราะห์ปริมาณอาร์เซนิกรวม ด้วยวิธี total acid digestion (ตามวิธีการข้อ 3.5.1) แล้วเปรียบเทียบผลที่ได้ กับค่า certified value
- นำ CRM : DORM-2 ไปสกัดด้วยวิธีการที่พัฒนาได้ในข้อ 3.5.2 แล้วนำ สารละลายที่ได้ไปแยกวิเคราะห์ 2 ส่วน ดังนี้

ส่วนที่ 1 วิเคราะห์ปริมาณอาร์เซนิกที่สกัดได้ทั้งหมดด้วย ICP-OES

ส่วนที่ 2 วิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกด้วย HPLC/ICP-OES

- นำค่าที่ได้จากทั้งสองส่วนไปเปรียบเทียบกับค่า certified value

3.5.4 Limit of detection (LOD) และ Limit of quantitation (LOQ) ของการวิเคราะห์

- LOD และ LOQ ของการวิเคราะห์ปริมาณอาร์เซนิกรวม คำนวณจากค่าส่วน เบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยความเข้มข้น blank ที่ได้จากการวิเคราะห์ ตัวอย่างปลา
- LOD และ LOQ ของการวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกทั้ง 3 รูปแบบ คือ arsenobetaine, MMA และ inorganic arsenic คำนวณจากค่าส่วน เบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถวัดได้ด้วย HPLC/ICP-OES

โดยที่

$$\text{LOD} = 3 \times \text{standard deviation}$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \text{standard deviation}$$

3.6 การวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกในตัวอย่างปลา

นำตัวอย่างปลาทั้งหมดไปวิเคราะห์ปริมาณอาร์เซนิกรวมด้วยวิธี total acid digestion (ตามวิธีการข้อ 3.5.1) และ รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิก (ตามวิธีการข้อ 3.5.2) วิเคราะห์ปริมาณ arsenobetaine, MMA และ inorganic arsenic ในปลา เปรียบเทียบปริมาณของอาร์เซนิกแต่ละรูปแบบกับปริมาณอาร์เซนิกรวม วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปริมาณอาร์เซนิกกับลักษณะการกินอาหาร และ แหล่งที่อยู่ของปลา โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ One way ANOVA

3.7 การวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำ

3.7.1 การเก็บตัวอย่างน้ำ

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำทะเลและน้ำจืดจาก จ. จันทบุรี โดยเก็บบริเวณเดียวกับการเก็บตัวอย่างปลา คือ น้ำทะเลเก็บที่ อ.แหลมสิงห์ และ น้ำจืดเก็บที่แม่น้ำจันทบุรี โดยใช้การเก็บโดยตรงที่ผิวน้ำด้วยขวด polyethylene ขนาด 250 มิลลิลิตร เก็บจุดละ 3 ตัวอย่าง แช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำกลับมายังห้องปฏิบัติการทันที

3.7.2 การวิเคราะห์ปริมาณอาร์เซนิกรวมในน้ำ

- นำตัวอย่างน้ำ 4 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง เติม conc. HCl 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 5% KI + 5% ascorbic acid 0.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 45 นาที
- นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry (HG-AAS)

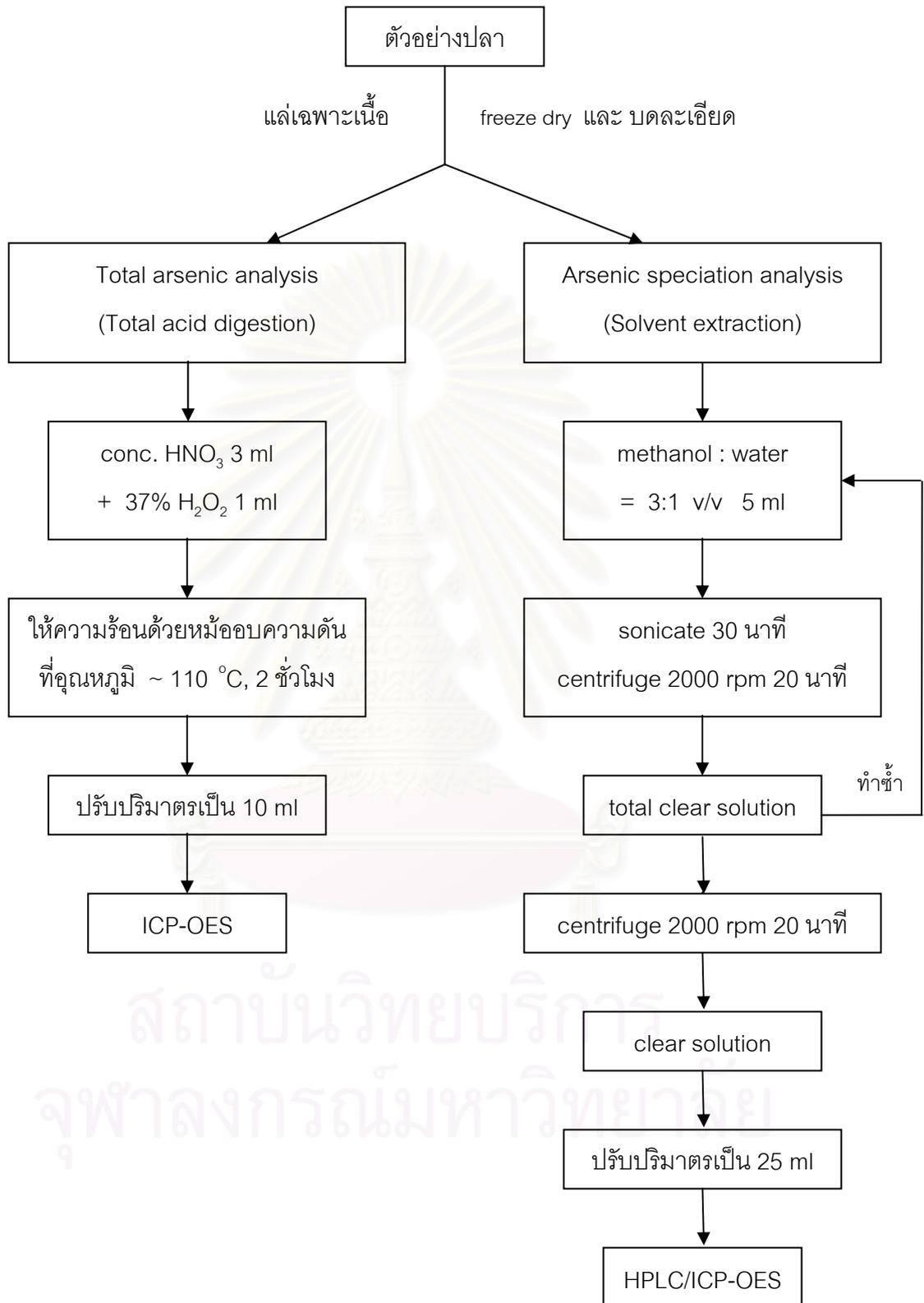
3.7.3 การวิเคราะห์ปริมาณอาร์เซนิกอนินทรีย์ (ในรูป As^{III} และ As^V)

- นำตัวอย่างน้ำ 9.9 มิลลิลิตร เติม conc. HNO₃ 0.1 มิลลิลิตร และ K₂S₂O₈ 0.1 กรัม นำไปให้ความร้อนนาน 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น
- เติม NH₃OHCl 0.1 กรัม ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที
- แบ่งตัวอย่างน้ำมา 4 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง เติมกรด HCl เข้มข้น 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 5% KI + 5% ascorbic acid 0.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 45 นาที
- นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry (HG-AAS)

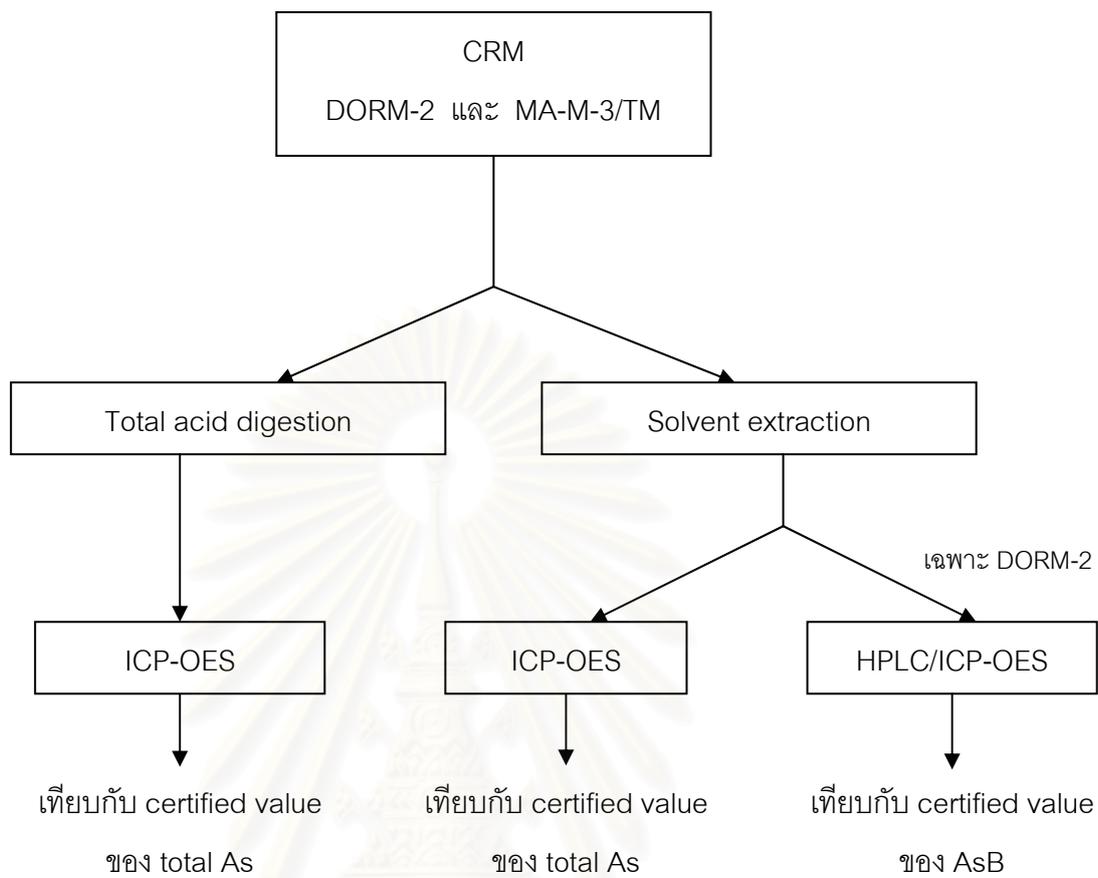
3.7.4 การคำนวณค่า Bioconcentration factor (BCF)

นำข้อมูลความเข้มข้นของอาร์เซนิกในปลาและในน้ำ จาก จ. จันทบุรี ในรูปของอาร์เซนิกรวม อาร์เซนิกอนินทรีย์ และอาร์เซนิกอินทรีย์ ไปคำนวณค่า bioconcentration factor (BCF) ซึ่งเป็นค่าที่ใช้อธิบายการสะสมของสารพิษในสิ่งมีชีวิต เป็นอัตราส่วนของความเข้มข้นของสารนั้นในตัวของสิ่งมีชีวิตกับความเข้มข้นในน้ำที่อยู่รอบตัวมัน (US-EPA, 1995) ซึ่งการสะสมในลักษณะนี้เกิดจากการรับสารนั้นจากน้ำเข้าสู่ร่างกายโดยตรง ไม่ว่าจะเป็นการกิน หรือการซึมผ่านทางผิวหนังและเหงือก

$$\text{BCF} = \frac{\text{concentration of As in fish } (\mu\text{g/g})}{\text{Concentration of As in ambient water } (\mu\text{g/l})}$$



รูปที่ 3.1 แผนผังการวิเคราะห์อาร์เซนิกในปลา



รูปที่ 3.2 แผนผังการวิเคราะห์ Certified Reference Materials

บทที่ 4

ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล

การศึกษานี้ทำการพัฒนาการวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกในปลา ด้วยวิธี HPLC/ICP-OES จากนั้นนำวิธีการที่พัฒนาได้ไปวิเคราะห์อาร์เซนิกในตัวอย่างปลาชนิดต่างๆ และหาความสัมพันธ์ของปริมาณและรูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกในปลาทะเลและปลาน้ำจืด ปริมาณอาร์เซนิกในน้ำ รวมถึงพฤติกรรมการกินอาหารและแหล่งที่อยู่ของปลา

4.1 การทดสอบการแยกสารละลายมาตรฐานอาร์เซนิกด้วยระบบ HPLC/ICP-OES

จากการทดลองแยกสารละลายมาตรฐานอาร์เซนิก 3 ชนิด ได้แก่ arsenobetaine (AsB), monomethylarsonic acid (MMA) และ inorganic arsenic (As^V) ความเข้มข้นชนิดละ 250 $\mu\text{g/l}$ ด้วยวิธี HPLC/ICP-OES และใช้ mobile phase คือ NaH_2PO_4 2 ความเข้มข้น ได้แก่ 5 mmol/l และ 50 mmol/l ตามโปรแกรมรวม 3 ขั้นตอน (Three step elution) ดังต่อไปนี้ (ดัดแปลงจาก Rattanachongkiat, 2004)

Isocratic elution	ใช้ mobile phase 5 mmol/l NaH_2PO_4	นาน 360 วินาที
Step gradient	ใช้ mobile phase 50 mmol/l NaH_2PO_4	นาน 180 วินาที
Re-equilibrate	ใช้ mobile phase 5 mmol/l NaH_2PO_4	นาน 360 วินาที

การใช้ mobile phase ตามโปรแกรมข้างต้นจะสามารถแยกสารละลายมาตรฐานอาร์เซนิกทั้งสามชนิดออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 900 วินาที (15 นาที) ซึ่งมีลำดับของการแยก คือ arsenobetaine \rightarrow MMA \rightarrow inorganic arsenic โดย arsenobetaine จะถูกแยกออกมาโดยการชะของ mobile phase ความเข้มข้นต่ำ (5 mmol/l) ที่ retention time 180 วินาที ส่วน MMA ถูกแยกออกมาโดย mobile phase ความเข้มข้นสูง (50 mmol/l) ที่ retention time 465 วินาที และสุดท้าย inorganic arsenic จะถูกแยกออกมาโดย mobile phase ความเข้มข้นต่ำ (5 mmol/l) ที่ retention time 630 วินาที โดยมีสภาวะของระบบ HPLC/ICP-OES ที่ใช้

ในการแยกเป็นดังตารางที่ 4.1 ซึ่งสภาวะดังกล่าวได้มาจากการทดลอง ส่วนโครมาโทแกรมของ การแยกสารละลายมาตรฐานทั้งสามชนิดเป็นดังรูปที่ 4.1 – 4.2

ตารางที่ 4.1 สภาวะของระบบ HPLC/ICP-OES ที่ใช้ในการศึกษา

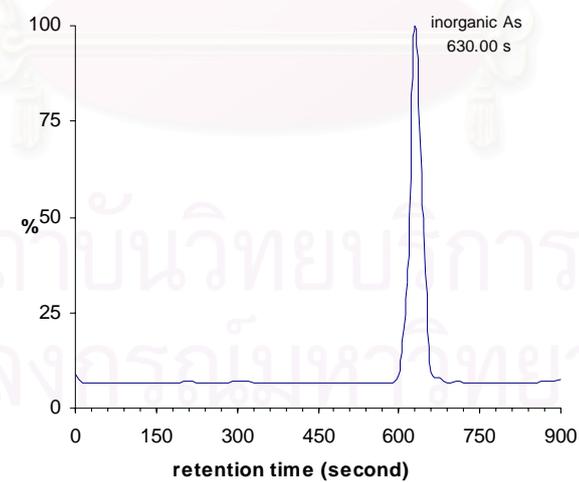
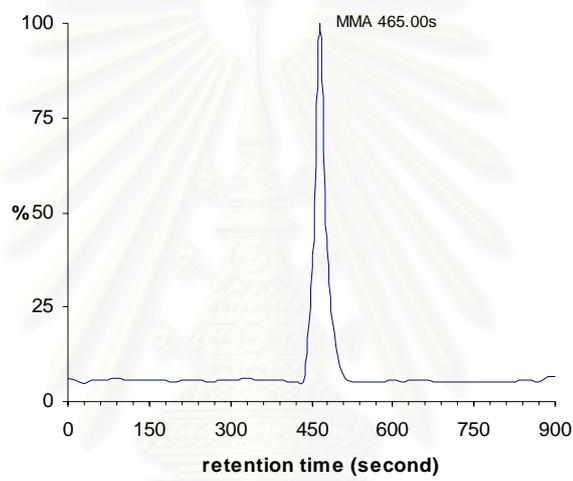
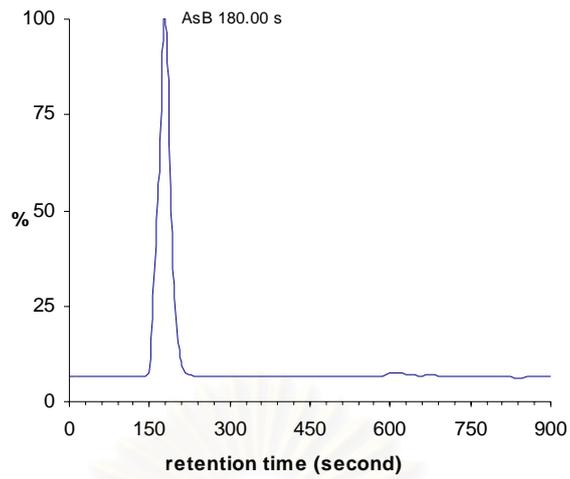
HPLC

Column dimension	250 x 4.6 mm
Guard column dimension	50 x 4.6 mm
Packing material	Hamilton resin PRP-X100, 10 μ m particle size
Eluent flow rate	1.0 ml/min
Sample loop	100 μ l
Competitive counter ion	Phosphate
Mobile phase	5 mmol/l NaH_2PO_4 , pH ~ 7 50 mmol/l NaH_2PO_4 , pH ~ 7 (ปรับ pH ด้วย ammonia solution)

ICP-OES

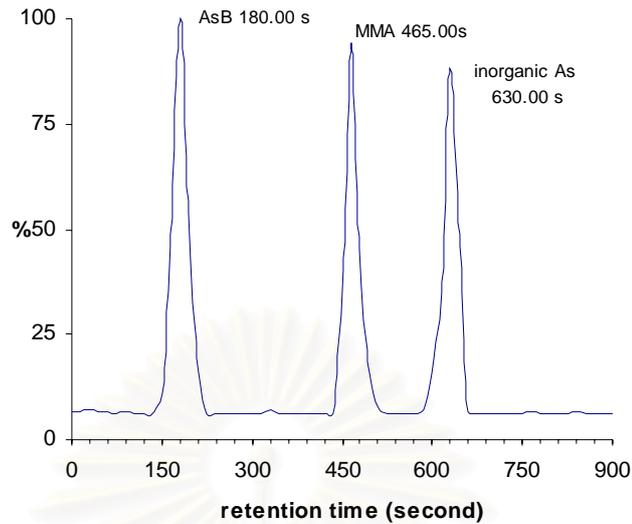
Nebulizer type	pneumatic nebulizer
Wavelength	193.695 nm
Forward power	1000 watt
Nebulizer gas	Argon gas (standard grade 99.99%)
Nebulizer gas flows	1.0 ml/min
Auxiliary gas	-

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.1 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานอาร์เซนิก ความเข้มข้น 250 µg/l โดยใช้ 5 และ 50 mmol/l NaH₂PO₄ เป็น mobile phase

(ก) arsenobetaine (ข) MMA และ (ค) inorganic arsenic

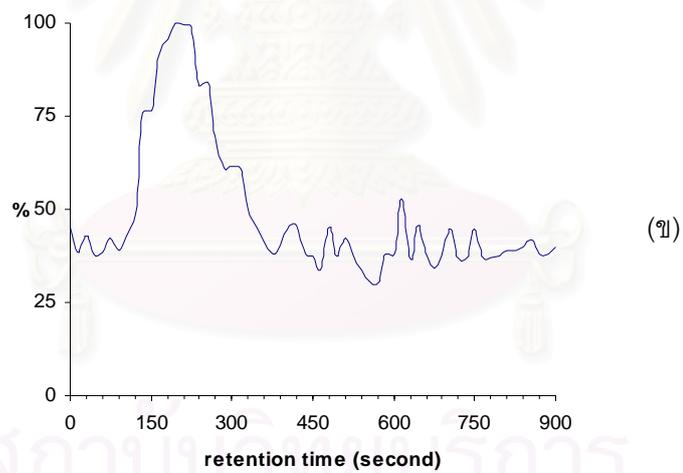
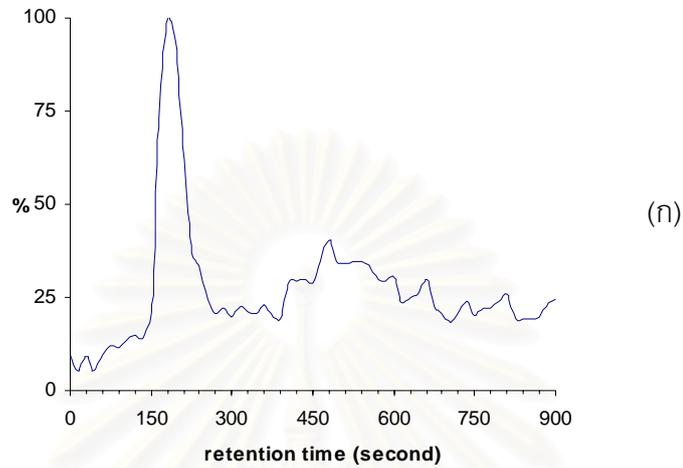


รูปที่ 4.2 โครมาโทแกรมของสารผสมระหว่าง arsenobetaine , MMA และ inorganic arsenic ความเข้มข้นชนิดละ 250 µg/l โดยใช้ 5 และ 50 mmol/l NaH₂PO₄ เป็น mobile phase

การใช้ NaH₂PO₄ ความเข้มข้นเดียว เป็น mobile phase ตลอดการแยก ไม่สามารถแยกสารละลายผสมของ AsB, MMA และ inorganic arsenic ออกจากกันได้ โดยพบว่าเมื่อใช้ 5 mmol/l NaH₂PO₄ ผลคือ มีเพียง AsB เท่านั้นที่ถูกแยกออกมา ส่วน MMA และ inorganic arsenic ไม่สามารถแยกออกมาได้ ทั้งยังให้ base line ที่สูงและไม่เรียบ ดังรูปที่ 4.3 (ก) และเมื่อทดลองใช้ 50 mmol/l NaH₂PO₄ เป็น mobile phase พบว่า สารทั้งหมดถูกแยกออกมาพร้อมกัน ได้ลักษณะเป็น bulky peak และมี base line ที่สูงและไม่เรียบเช่นเดียวกัน ดังรูปที่ 4.3 (ข)

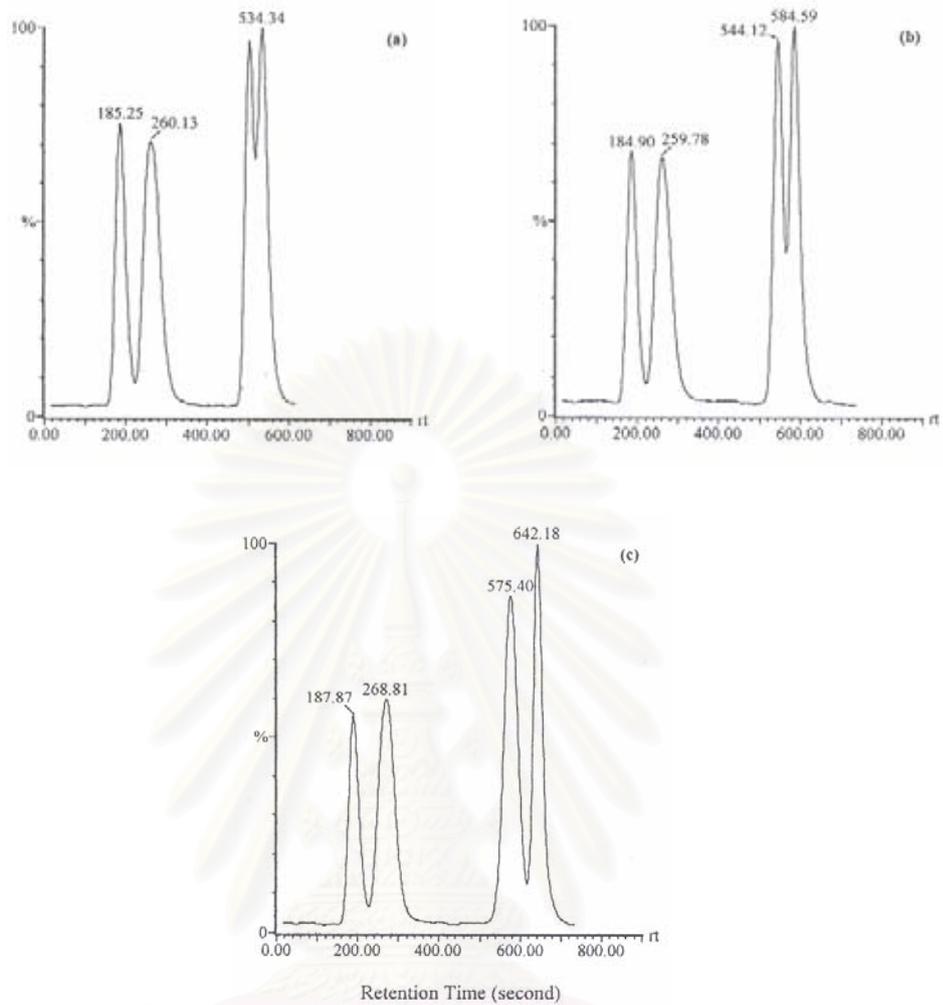
จากการศึกษาของ Rattanachongkiat (2004) พบว่า ประสิทธิภาพของการแยก MMA กับ inorganic arsenic ไม่ได้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ mobile phase แต่เพียงอย่างเดียว แต่ยังขึ้นกับเวลาที่ใช้ในการชะของ mobile phase ความเข้มข้นต่ำในช่วงแรกด้วย เนื่องจากในขณะที่กำลังชะคอลัมน์ด้วย mobile phase ความเข้มข้นต่ำ (ในที่นี้คือ 5 mmol/l NaH₂PO₄) อยู่ นั้น MMA และ inorganic arsenic จะถูกดูดซับไว้โดย stationary phase ของคอลัมน์ ซึ่ง MMA จะเคลื่อนที่ออกมาก่อน inorganic arsenic ดังนั้น ทั้งสองรูปแบบจะถูกแยกออกจากกันได้ดีถ้าเพิ่มเวลาที่ใช้ในการชะของ mobile phase ความเข้มข้นต่ำ ซึ่งเวลาที่เหมาะสมในการชะ mobile phase ความเข้มข้นต่ำในช่วงแรกที่ไม่ทำให้เวลาที่ใช้ในการแยกสารทั้งหมดนานเกินไป อยู่

ระหว่าง 300 – 360 วินาที (Rattanachongkiat, 2004) ส่วนเวลาที่น้อยกว่านั้นจะทำให้การแยก MMA และ inorganic arsenic เกิดขึ้นได้ไม่ดี ดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.3 โครมาโทแกรมของสารผสมระหว่าง arsenobetaine , MMA และ inorganic arsenic โดยใช้ mobile phase คือ NaH_2PO_4 ความเข้มข้นเดียวตลอดการแยก

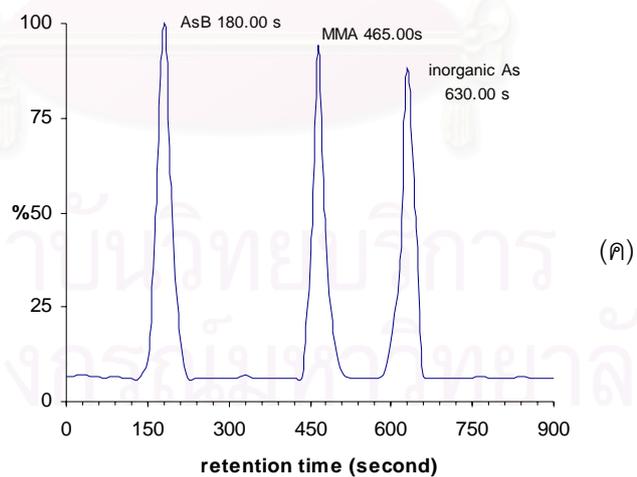
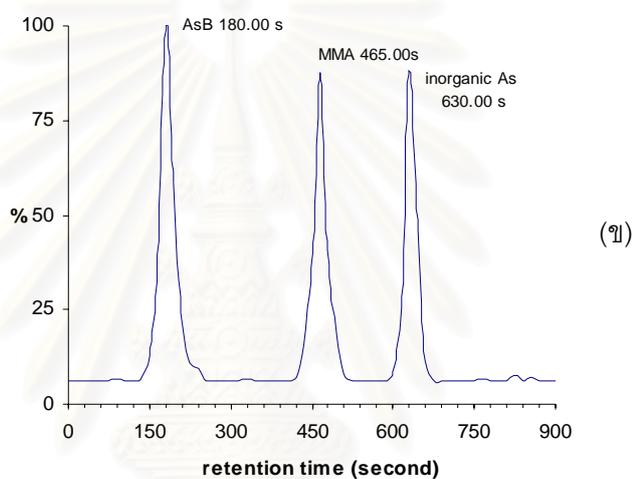
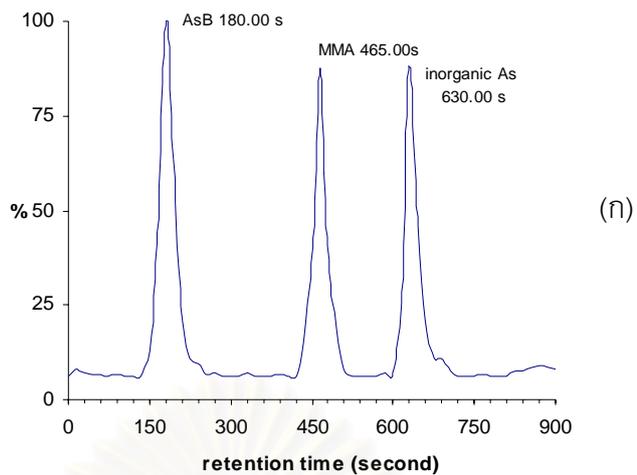
(ก) 5 mmol/l NaH_2PO_4 และ (ข) 50 mmol/l NaH_2PO_4



รูปที่ 4.4 การแยก AsB, DMA, MMA และ As^V เข้มข้น 200 µg/l โดยใช้ mobile phase แบบ Three step elution ซึ่งแปรผันเวลาที่ใช้ในขั้นตอนแรก (mobile phase ความเข้มข้นต่ำ) และวิเคราะห์ด้วย ICP-MS (a) 180 sec (b) 240 sec และ (c) 300 sec

(ที่มา : Rattanachongkiat, 2004)

เมื่อทดลองการแยกสารละลายมาตรฐานอาร์เซนิกทั้งสามชนิดโดยใช้ flow rate ของ HPLC ที่แตกต่างกัน 3 ค่า คือ 1.0, 1.5 และ 2.0 ml/min พบว่า ผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกัน เนื่องจากสารมาตรฐานอาร์เซนิกทั้งสามชนิดถูกแยกออกมาที่ retention time เดียวกัน และ peak ที่ได้ ก็มีลักษณะเหมือนกันทุกประการ ดังรูปที่ 4.5 ในการทดลองจึงเลือกใช้ flow rate 1.0 ml/min เนื่องจากเป็นค่าที่เท่ากับ flow rate ที่เหมาะสมของ nebulizer gas (Argon) ของ ICP-OES

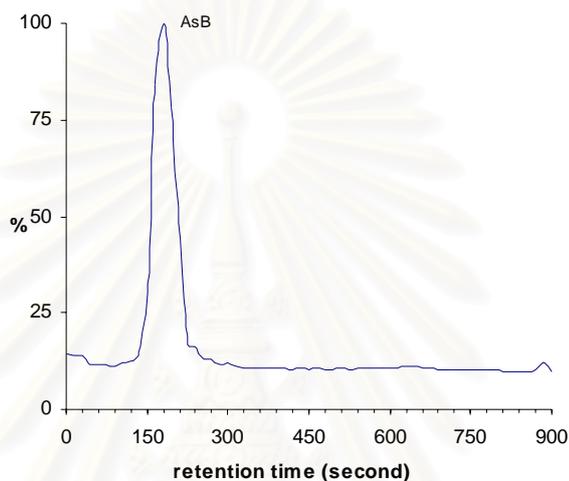


รูปที่ 4.5 โคโรมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานอาร์เซนิก ความเข้มข้นแต่ละชนิด 250 µg/l โดยใช้ flow rate ของ HPLC ที่แตกต่างกัน

(ก) 2.0 ml/min (ข) 1.5 ml/min และ (ค) 1.0 ml/min

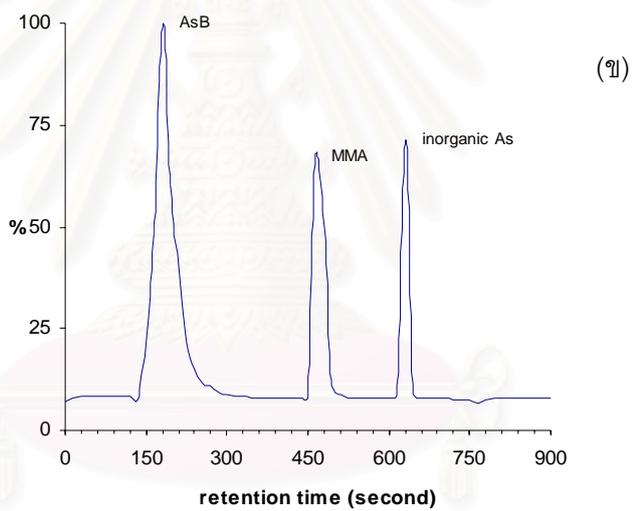
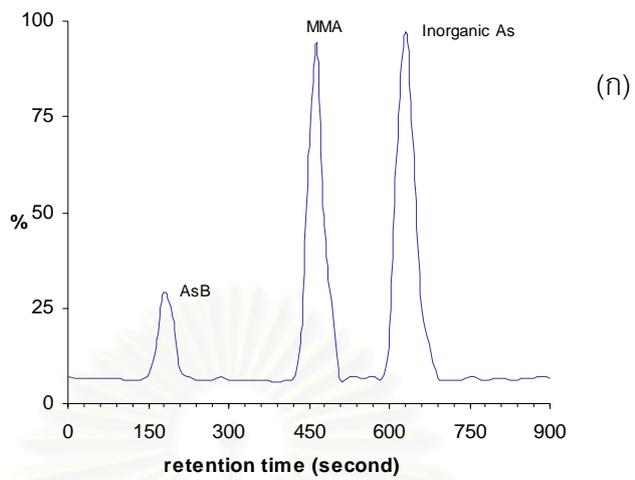
4.2 การทดสอบการแยกสารสกัดจากปลาที่เติมสารละลายมาตรฐานอาร์เซนิก

จากการทดลองแยกสารสกัดจากปลากะพงแดง ด้วยวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Geiszinger *et al.* (2002), Fattorini *et al.* (2004) และ Rattanachongkiat (2004) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC/ICP-OES ตามสภาวะที่พัฒนาได้ พบว่า ในสารสกัดจากปลากะพงแดงพบอาร์เซนิกเพียงรูปแบบเดียว คือ arsenobetaine ดังรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 โครมาโทแกรมของสารสกัดจากปลากะพงแดง

จากนั้นทดลองเพื่อยืนยันว่าสภาวะของ HPLC/ICP-OES ที่ได้ สามารถใช้แยกอาร์เซนิกรูปแบบต่างๆ ได้แก่ arsenobetaine, MMA และ inorganic arsenic ใน matrix ที่เป็นเนื้อปลาได้ดีเช่นเดียวกับการแยกสารมาตรฐาน จึงทำการเติม MMA และ inorganic arsenic ความเข้มข้น 2 ค่า ได้แก่ 1000 และ 200 $\mu\text{g/l}$ ลงในเนื้อปลากะพงแดง จากนั้นนำไปสกัดด้วยวิธีการเดียวกัน ผลปรากฏว่า สามารถแยก MMA และ inorganic arsenic ออกจาก arsenobetaine ที่มีอยู่ในเนื้อปลาได้ดี ดังรูปที่ 4.7 ซึ่งจากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า สภาวะของเครื่อง HPLC/ICP-OES ที่ได้สามารถนำไปใช้วิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกในปลาได้เป็นอย่างดีโดยไม่มีผลจาก matrix แต่ถ้าวินิจฉัยวิเคราะห์ในสัตว์ประเภทที่มีไขมันมาก เช่น กลุ่มของ molluscs จำเป็นต้องมีขั้นตอนของการกำจัดไขมันออก (defat) โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) เช่น acetone หรือ ether ก่อนที่จะนำไปสกัด (McSheehy *et al.*, 2003)



รูปที่ 4.7 โคโรมาโทแกรมของสารสกัดจากปลากะพงแดงที่เติม MMA และ inorganic arsenic

(ก) เติม 1000 $\mu\text{g/l}$ และ (ข) เติม 200 $\mu\text{g/l}$

4.3 การทดสอบหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดอาร์เซนิกในปลา

ทำการทดลองเพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดอาร์เซนิกในเนื้อปลา ด้วยวิธีการสกัดแบบ solvent extraction โดยใช้สารผสมระหว่างเมทานอลกับน้ำในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ผลปรากฏว่า อัตราส่วนของเมทานอลกับน้ำที่เหมาะสมสำหรับการสกัดอาร์เซนิกจากเนื้อปลา คือ 3:1 v/v โดยให้เปอร์เซ็นต์ของอาร์เซนิกที่สกัดได้สูงถึง 91.6% (ตารางที่ 4.2) ลำดับประสิทธิภาพของการสกัด คือ 3:1 > 2:1 > น้ำ > 1:2 > 1:3 > 1:1 โดยพบว่า ไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างสัดส่วนของเมทานอลในตัวทำละลายกับประสิทธิภาพของการสกัดอาร์เซนิกจากปลา

แม้ว่าของผสมระหว่างเมทานอลกับน้ำจะสามารถสกัดอาร์เซนิกจากตัวอย่างได้ดี แต่ประสิทธิภาพของการสกัดจะสูงหรือต่ำขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่างซึ่งส่งผลต่ออัตราส่วนของสารทั้งสองที่ใช้ด้วย (McSheehy *et al.*, 2003 และ Francesconi และ Kuehnelt, 2004) ในบางครั้งแม้ตัวอย่างจะเป็นสัตว์หรือพืชเหมือนกัน แต่ก็ใช้อัตราส่วนของสารทั้งสองในการสกัดแตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น การศึกษาในรูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกในสาหร่ายทะเล 3 ชนิด พบว่า สัดส่วนของเมทานอลที่ให้เปอร์เซ็นต์อาร์เซนิกที่สกัดได้สูงสุดอยู่ระหว่าง 56 - 78% ขึ้นกับชนิดของ marine algae (Tukai *et al.*, 2002)

ตารางที่ 4.2 ประสิทธิภาพของตัวทำละลายที่ใช้สกัดอาร์เซนิกจากเนื้อปลา (n = 3)

ลำดับ	ตัวทำละลาย	เปอร์เซ็นต์อาร์เซนิกที่สกัดได้*
1	methanol : water = 3:1	91.6 ± 1.6
2	methanol : water = 2:1	82.2 ± 1.5
3	water	71.3 ± 4.4
4	methanol : water = 1:2	59.2 ± 3.7
5	methanol : water = 1:3	47.7 ± 5.9
6	methanol : water = 1:1	43.3 ± 3.9

* ค่าเฉลี่ย + S.D.

4.4 การวิเคราะห์ certified reference materials (CRM)

จากการวิเคราะห์ certified reference materials (CRM) 2 ชนิด ได้แก่ DORM-2 (dogfish muscle) และ MA-M-3/TM (fish tissue homogenate) เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของการวิเคราะห์ปริมาณอาร์เซนิกรวมด้วยวิธี total acid digestion และ การวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกด้วยวิธี solvent extraction ผลเป็นดังนี้

4.4.1 Total acid digestion

จากการทดสอบประสิทธิภาพของวิธี total acid digestion โดยใช้ HNO_3 และ 37% H_2O_2 ซึ่งเป็นการวัดค่าปริมาณอาร์เซนิกรวมใน DORM-2 และ MA-M-3/TM พบว่า มีค่าเป็น 16.50 ± 0.97 และ 6.50 ± 0.47 $\mu\text{g/g}$ dry weight ตามลำดับ ($n = 10$) เมื่อเทียบกับค่า certified value ของ CRM ทั้งสองแล้ว คิดเป็น 91.7 และ 97.0 % ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ที่ $\alpha = 0.05$ โดยการศึกษาครั้งนี้ได้ประยุกต์ใช้วิธี digestion โดยการนำไปให้ความร้อนด้วยหม้ออัดความดันที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แต่พบว่าผลที่ได้มีความใกล้เคียงกับวิธี microwave digestion (Rattanachongkiat, 2004) จึงสรุปได้ว่าวิธีการที่ใช้ในครั้งนี้นี้สามารถวิเคราะห์ปริมาณอาร์เซนิกรวมได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นเดียวกัน

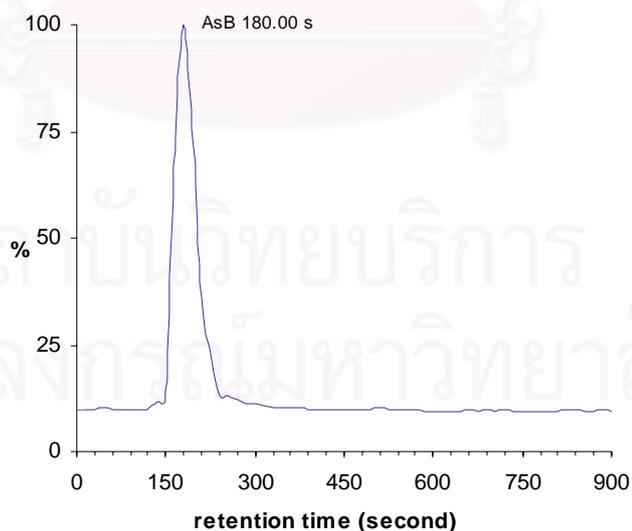
4.4.2 Solvent extraction

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีการสกัดอาร์เซนิกในปลา ด้วย DORM-2 และ MA-M-3/TM โดยวิธี solvent extraction ซึ่งใช้ methanol : water ในอัตราส่วน 3 : 1 v/v เป็นตัวสกัด พบว่า เมื่อวิเคราะห์สารที่สกัดได้ด้วย ICP-OES เทียบกับปริมาณอาร์เซนิกรวมแล้ว มีค่าเป็น 16.48 ± 0.86 และ 6.36 ± 1.14 $\mu\text{g/g}$ dry weight หรือคิดเป็น 91.6 และ 94.5 % สำหรับ DORM-2 และ MA-M-3/TM ตามลำดับ ($n = 10$) ซึ่งค่าดังกล่าวสามารถยอมรับได้ที่ $\alpha = 0.05$ แสดงให้เห็นว่า วิธีการสกัดด้วย methanol : water อัตราส่วน 3 : 1 v/v สามารถสกัดอาร์เซนิกจากเนื้อปลาได้มีประสิทธิภาพสูง

เมื่อนำสารที่สกัดได้จาก DORM-2 ไปวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกด้วย HPLC/ICP-OES พบอาร์เซนิกเพียงรูปแบบเดียว คือ arsenobetaine (ดังรูปที่ 4.8) โดยมีค่าเท่ากับ $14.14 \pm 1.04 \mu\text{g/g dry weight}$ เมื่อเทียบกับค่า certified value แล้ว คิดเป็น 86.9% ($n = 5$) ซึ่งจัดว่าสามารถยอมรับได้ $\alpha = 0.05$

สำหรับค่า certified value ของ arsenobetaine ที่ใช้ เป็นค่าเฉลี่ยจากหลายๆ การศึกษา เนื่องจากมีข้อจำกัดในเรื่อง CRM ที่มีจำนวนชนิดไม่มาก และไม่มีค่า certified value ของสารประกอบอาร์เซนิกอินทรีย์เหมือนกับสารประกอบอาร์เซนิกอนินทรีย์ จึงต้องนำค่าที่วิเคราะห์ได้ไปเปรียบเทียบกับค่าที่มีผู้ทำการศึกษาไว้แล้ว อาทิ Corr (1997), Goessler *et al.* (1998), Kubota *et al.* (2002) และ Rattanachongkiat (2004) ซึ่งพบว่า มีค่าใกล้เคียงกัน โดยอยู่ระหว่าง 86 – 101%

ถึงแม้การวิเคราะห์ DORM-2 ในครั้งนี้พบอาร์เซนิกเพียงรูปแบบเดียว คือ arsenobetaine ซึ่งเป็นรูปแบบที่เด่นที่สุดในสิ่งมีชีวิตทั่วไป แต่ในบางครั้งการวิเคราะห์ที่ใช้วิธี ICP-MS ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่าสามารถวิเคราะห์ได้ค่าที่ต่ำมาก อาจตรวจพบ DMA, MMA หรือ inorganic arsenic ได้บ้างในปริมาณที่น้อยกว่า $0.05 \mu\text{g/g}$ (Goessler *et al.*, 1998 และ Rattanachogkiat, 2004)



รูปที่ 4.8 โครมาโทแกรมของสารสกัดจาก DORM-2

ตารางที่ 4.3 การวิเคราะห์ปริมาณ total arsenic ใน DORM-2 และ MA-M-3/TM (n = 10)

CRM	Characteristic	Certified value ($\mu\text{g/g}$ dry weight)	Concentration obtained ($\mu\text{g/g}$ dry weight)	Digestion/extraction efficiency (%)
<i>Digestion using HNO_3 and H_2O_2</i>				
DORM-2	dogfish muscle	18.0 ± 1.10	16.50 ± 0.97	91.7
MA-M-3/TM	fish tissue homogenate	6.7 ± 0.60	6.50 ± 0.47	97.0
<i>Extraction using methanol : water = 3 : 1</i>				
DORM-2	dogfish muscle	18.0 ± 1.10	16.48 ± 0.86	91.6
MA-M-3/TM	fish tissue homogenate	6.7 ± 0.60	6.36 ± 1.14	94.9

ตารางที่ 4.4 ความเข้มข้นของอาร์เซนิกรูปแบบต่างๆ ใน DORM-2 (n = 5)

CRM	Certified AsB ($\mu\text{g/g dw}$)	Obtained AsB ($\mu\text{g/g dw}$)	Other species			Extraction efficiency (%)
			MMA	DMA	Inorganic As	
DORM-2	16.40 ± 1.20	14.14 ± 1.04	ND	ND	ND	86.9

หมายเหตุ ND = not detected

4.5 การวิเคราะห์ Limit of detection (LOD) และ Limit of quantitation (LOQ)

จากการวิเคราะห์ limit of detection (LOD, เท่ากับ 3 เท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ blank) และ limit of quantitation (LOQ, เท่ากับ 10 เท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ blank) พบว่า การวิเคราะห์ปริมาณอาร์เซนิกรวมมี LOD และ LOQ เท่ากับ 0.015 และ 0.050 $\mu\text{g/l}$ ตามลำดับ ส่วนการวิเคราะห์อาร์เซนิกทั้ง 3 รูปแบบ ได้แก่ arsenobetaine, MMA และ inorganic arsenic พบว่า ความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถวัดได้ด้วยวิธี HPLC/ICP-OES เท่ากับ 0.25 $\mu\text{g/l}$ ถ้าคิดในรูปของน้ำหนักอาร์เซนิกจะเท่ากับ 0.11 $\mu\text{g-As/l}$ เมื่อคำนวณ LOD และ LOQ พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 0.013 – 0.017 $\mu\text{g/l}$ และ 0.043 – 0.055 $\mu\text{g/l}$ ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 Limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ) ของการวิเคราะห์ (n = 10)

Arsenic species	Blank concentration ($\mu\text{g/l}$)	Blank standard deviation	LOD ($\mu\text{g/l}$)	LOQ ($\mu\text{g/l}$)
Total arsenic	0.027	0.0050	0.015	0.050
AsB	0.042	0.0043	0.013	0.043
MMA	0.038	0.0048	0.014	0.048
Inorganic arsenic	0.037	0.0055	0.017	0.055

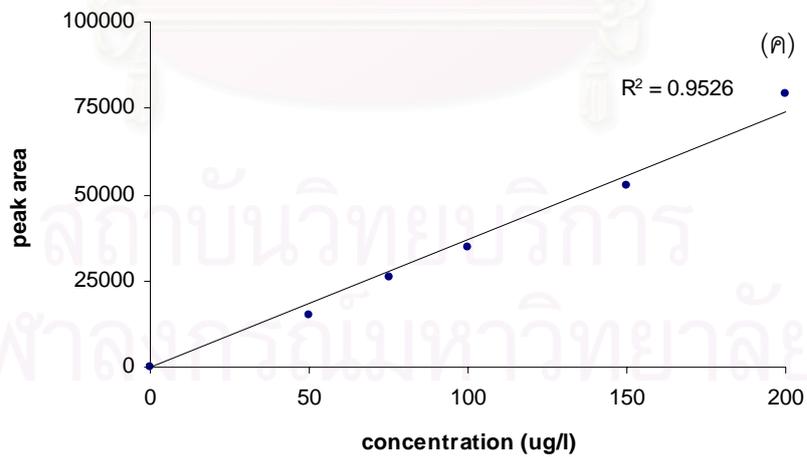
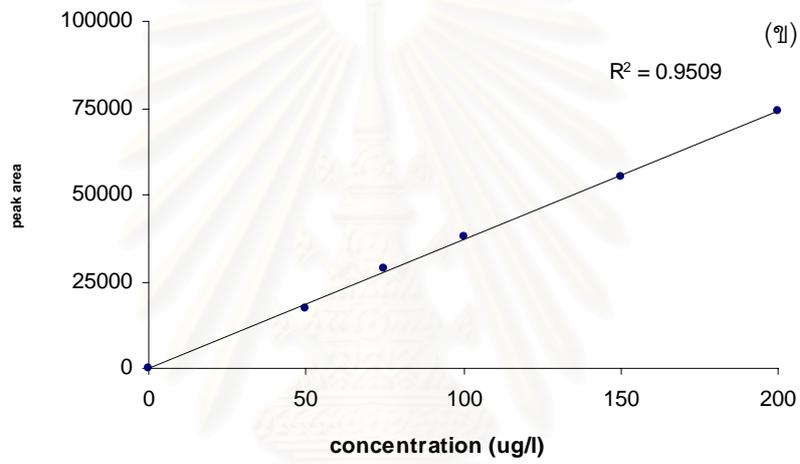
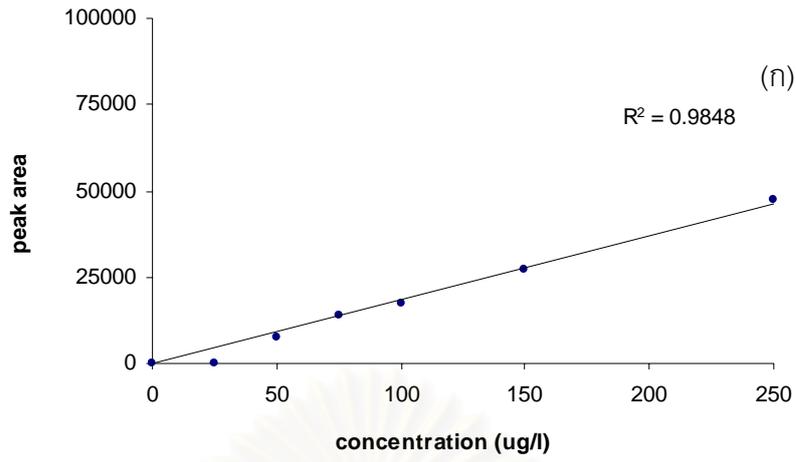
4.6 Recovery ของสารละลายมาตรฐานอาร์เซนิก

จากการวิเคราะห์ recovery ของสารละลายมาตรฐานอาร์เซนิกความเข้มข้นต่างๆ กัน ตั้งแต่ 25 – 250 $\mu\text{g/l}$ ที่เติมลงในเนื้อปลา แล้วนำไปสกัดด้วยวิธีการที่พัฒนาได้ ผลปรากฏว่า เมื่อคำนวณความเข้มข้นของอาร์เซนิกรูปแบบต่างๆ โดยเทียบกับสารมาตรฐานจุดเดียว (one point calibration) พบว่าให้ %recovery ของ arsenobetaine, MMA และ inorganic arsenic เท่ากับ 97.3, 91.3 และ 94.5 % ตามลำดับ ส่วนการคำนวณความเข้มข้นของอาร์เซนิกจากวิธี calibration curve พบว่า %recovery ของ arsenobetaine, MMA และ inorganic arsenic มีค่าเท่ากับ 100.1, 94.8 และ 94.9 % ตามลำดับ โดยมีค่า $r^2_{\text{AsB}} = 0.9848$, $r^2_{\text{MMA}} = 0.9509$ และ $r^2_{\text{inorg}} = 0.9526$ ซึ่งใกล้เคียง 1 ทั้งหมด และเมื่อเปรียบเทียบค่า %recovery ของสารมาตรฐานทั้งสามชนิด พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันที่ $\alpha = 0.05$ (p-value ของ AsB = 0.058, MMA = 0.188 และ inorganic arsenic = 0.939)

จากผลที่ได้ทำให้การคำนวณความเข้มข้นของอาร์เซนิกแต่ละรูปแบบในการทดลองครั้งนี้ เลือกใช้วิธีการเทียบมาตรฐานจุดเดียว (one point calibration) เนื่องจากค่าที่ได้ไม่แตกต่างจากวิธีการคำนวณจาก calibration curve แต่มีความสะดวกรวดเร็วและสิ้นเปลืองสารเคมีน้อยกว่า

ตารางที่ 4.6 เปอร์เซ็นต์ recovery ของสารละลายมาตรฐานอาร์เซนิก (n = 5)

Arsenic species	Arsenic recovery (%)	
	one point calibration	calibration curve
arsenobetaine	97.3	100.1
MMA	91.3	94.8
inorganic arsenic	94.5	94.9



รูปที่ 4.9 calibration curve ของสารละลายมาตรฐานอาร์เซนิก

(ก) AsB (ข) MMA และ (ค) inorganic arsenic

4.7 การวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกในตัวอย่างปลา

4.7.1 ตัวอย่างปลา

ตัวอย่างปลาทะเลและปลาน้ำจืดที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ มีดังต่อไปนี้

ปลาทะเล (จันทบุรี)

- ปลาอีโต้มอญ (*Coryphaena hippurus*)
- ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*)
- ปลาเห็ดโคน (*Sillago sihama*)
- ปลาทุ (*Rastrelliger brachysoma*)

ปลาน้ำจืด (จันทบุรี)

- ปลาช่อน (*Channa striata*) จากแม่น้ำจันทบุรี และตลาดสด
- ปลากดเหลือง (*Hemibagus nemurus*) จากแม่น้ำจันทบุรี และตลาดสด
- ปลาหมอไทย (*Anabus testudineus*) จากแม่น้ำจันทบุรี
- ปลาหมอเทศ (*Oreochromis mossambicus*) จากตลาดสด

ปลาทะเล (สมุทรปราการ)

- ปลาตาบเงิน (*Trichiurus lepturus*)
- ปลากุเลาหนวด 4 เส้น (*Eleutheronema tetradactylum*)
- ปลาจวด (*Otolithes ruber*)
- ปลาทุ (*Rastrelliger brachysoma*)

ปลาทะเล (กรุงเทพมหานคร)

- ปลากะพงแดง (*Lutjanus argentimaculatus*)

ปลาน้ำจืด (กรุงเทพมหานคร)

- ปลานิล (*Oreochromis niloticus*)
- ปลาสร้อย (*Pangasius hypothalamus*)
- ปลายี่สก (*Probabus jullieni*)
- ปลาช่อน (*Channa striata*)

4.7.2 ปริมาณอาร์เซนิกรวมในตัวอย่างปลา

จากการวิเคราะห์ปริมาณอาร์เซนิกรวมในตัวอย่างปลา ด้วยวิธี total acid digestion พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 3.7 – 29.0 µg/g dry weight โดยค่าสูงสุดพบในปลากระพงแดง (*Lutjanus argentimaculatus*) และค่าต่ำสุดพบในปลาชวาบ (*Pangasius hypophthalmus*) (ตารางที่ 4.7) จากการคำนวณเปอร์เซ็นต์น้ำในตัวอย่างปลาทะเลและปลาน้ำจืด พบว่ามีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 30.5 และ 31.87 % ตามลำดับ เมื่อคำนวณปริมาณอาร์เซนิกรวมในหน่วยน้ำหนักเปียก (wet weight) จะมีค่าอยู่ระหว่าง 2.5 – 20.2 µg/g wet weight เมื่อนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับ การศึกษาปริมาณอาร์เซนิกรวมในปลาหลายชนิด จาก จ.สมุทรปราการ ของ รุ่งฟ้า อินทจักร (2545) ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 4.1 – 25.5 µg/g wet weight พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน

4.7.3 รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกในตัวอย่างปลา

จากการวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกในตัวอย่างปลา ด้วยวิธี solvent extraction พบว่า อาร์เซนิกรูปแบบเด่นที่พบในทุกตัวอย่างปลา คือ arsenobetaine โดยมีสัดส่วน อยู่ระหว่าง 62.8 – 95.7 % เมื่อเทียบกับปริมาณอาร์เซนิกรวม ค่าสูงสุดพบในปลาเห็ดโคน (*Silver sillago*) และต่ำสุดพบในปลาหมอเทศ (*Oreochromis mossambicus*) (ตารางที่ 4.7)

นอกจากนี้ยังพบ monomethylarsonic acid (MMA) และ inorganic arsenic ด้วย โดย MMA พบในตัวอย่างปลาน้ำจืดเท่านั้น มีค่าอยู่ระหว่าง 0.3 – 0.9 µg/g dry weight (0.2 – 0.6 µg/g wet weight) คิดเป็น 3.7 – 10.9% ของปริมาณอาร์เซนิกรวม ส่วน inorganic arsenic พบในปลาน้ำจืดเกือบทุกชนิด มีค่าอยู่ระหว่าง 0.3 – 1.8 µg/g dry weight (0.2 – 1.2 µg/g wet weight) คิดเป็น 1.7 – 20.3 % ของปริมาณอาร์เซนิกรวม สำหรับในปลาทะเลพบ inorganic arsenic ในตัวอย่างปลาทุ (*Rastrelliger brachysoma*) ที่เก็บมาจาก จ. สมุทรปราการ เพียงชนิดเดียว โดยมีค่า 0.3 ± 0.1 µg/g dry weight หรือคิดเป็น 1.7 % ของปริมาณอาร์เซนิกรวม

สำหรับปริมาณอาร์เซนิกรวมที่วิเคราะห์ได้ในครั้งนี้ พบว่า ส่วนใหญ่จะมีค่าเกิน ค่ามาตรฐานในสัตว์น้ำของประเทศไทยที่กำหนดให้มีค่าสูงสุดไม่เกิน 2 µg/g wet weight (กรมควบคุมมลพิษ, 2541) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาในรูปแบบของ MMA และ inorganic arsenic แล้ว พบว่า ทั้งสองรูปแบบมีปริมาณไม่เกินค่ามาตรฐานแต่อย่างใด

ตารางที่ 4.7 ปริมาณอาร์เซนิกรูปแบบต่างๆที่พบในตัวอย่างปลา ($\mu\text{g/g}$ dry weight) , (n = 5)

ประเภทปลา	แหล่งที่มา	ชนิด	total arsenic	Arsenobetaine	MMA	inorganic arsenic	other species
ปลาทะเล	จันทบุรี (ธรรมชาติ)	เห็ดโคน	25.5 ± 0.9	24.4 ± 2.7	ND	ND	1.1
		ทู	19.6 ± 0.4	17.4 ± 1.5	ND	ND	2.2
		อีโต้มอญ	13.6 ± 0.8	11.2 ± 0.7	ND	ND	2.4
		กะพงขาว	24.7 ± 1.0	22.3 ± 0.6	ND	ND	2.4
	สมุทรปราการ (ธรรมชาติ)	จวด	27.4 ± 2.2	23.9 ± 1.7	ND	ND	3.5
		กูเรานวด 4 เส้น	23.2 ± 1.3	20.5 ± 0.8	ND	ND	2.7
		ดาบเงิน	12.7 ± 1.8	10.3 ± 0.7	ND	ND	2.4
		ทู	17.3 ± 1.9	14.9 ± 0.4	ND	0.3 ± 0.1	2.1
	กรุงเทพมหานคร (ตลาดสด)	กะพงแดง	29.0 ± 1.3	25.4 ± 1.5	ND	ND	3.6
	ปลาน้ำจืด	กรุงเทพมหานคร (ตลาดสด)	นิล	7.4 ± 0.5	4.7 ± 0.3	0.3 ± 0.1	0.8 ± 0.1
ยี่สก			8.8 ± 0.5	5.7 ± 0.8	ND	1.8 ± 0.2	1.3
สวาย			3.7 ± 0.2	2.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	ND	1.0
ช่อน			15.1 ± 1.3	10.5 ± 0.7	ND	ND	4.6
จันทบุรี (ธรรมชาติ)		ช่อน	13.0 ± 1.2	10.9 ± 2.1	ND	ND	2.1
		กตเหล็กอง	5.1 ± 0.9	3.9 ± 0.5	ND	0.8 ± 0.1	0.4
		หมอไทย	8.1 ± 0.5	5.7 ± 1.2	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.3	0.6
		ช่อน	13.3 ± 1.6	10.6 ± 0.5	ND	ND	2.7
จันทบุรี (ตลาดสด)		กตเหล็กอง	7.9 ± 2.2	5.6 ± 0.9	ND	1.0 ± 0.2	1.3
		หมอเทศ	8.8 ± 1.2	5.5 ± 0.9	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.3	1.4

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่า mean ± S.D. , ND = not detect, Other species ได้จาก total arsenic – (arsenobetaine + inorganic arsenic As^V + MMA)

4.7.4 ปริมาณอาร์เซนิกในตัวอย่างน้ำ

จากการวิเคราะห์ปริมาณอาร์เซนิกในตัวอย่างน้ำทะเลและน้ำจืดจาก จ. จันทบุรี ผลปรากฏดังตารางที่ 4.8 เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับปริมาณอาร์เซนิกในน้ำทะเลบริเวณชายฝั่งนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุด จ. ระยอง ซึ่งมีค่าเฉลี่ย $4.1 \pm 0.5 \mu\text{g/l}$ (รุ่งฟ้า อินทจักร, 2545) พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน ส่วนปริมาณอาร์เซนิกในน้ำจืดในบริเวณใกล้เคียงไม่มีผู้ทำการศึกษา แต่จากการเปรียบเทียบกับข้อมูลความเข้มข้นของอาร์เซนิกในน้ำจืดจากลุ่มน้ำปากพนัง ในปี 2002 บริเวณแม่น้ำปากพนัง คลองปากพญา คลองปากนคร และ คลองบางซาก (ส่วนที่ไม่ได้รับผลกระทบจากเหมืองแร่ร้อนพิบูลย์) ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง $1.7 - 4.1 \mu\text{g/l}$ (Rattanachongkiat, 2004) พบว่า มีความใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ คือ $1.4 - 3.0 \mu\text{g/l}$ (ค่าเฉลี่ย $2.2 \mu\text{g/l}$)

นอกจากนี้ ยังทำการวิเคราะห์อาร์เซนิกในรูป inorganic arsenic และ organic arsenic ด้วย และพบว่า inorganic arsenic ในรูปของ arsenite + arsenate มีปริมาณมากที่สุด คิดเป็นสัดส่วนสูงกว่า 80 % เป็นที่น่าสังเกตว่าปริมาณอาร์เซนิกรวมในน้ำทะเลมีค่าสูงกว่าในน้ำจืด ในขณะที่สัดส่วนของ inorganic arsenic จะมีค่าต่ำกว่า สอดคล้องกับการศึกษาของ Rattanachongkiat (2004) บริเวณลุ่มน้ำปากพนัง ซึ่งพบว่า สัดส่วนของ inorganic arsenic ในน้ำจืดจะสูงกว่าในน้ำทะเลอยู่เล็กน้อย (นำข้อมูลมาคำนวณใหม่เฉพาะบริเวณที่ไม่ได้รับผลกระทบจากเหมืองแร่ร้อนพิบูลย์)

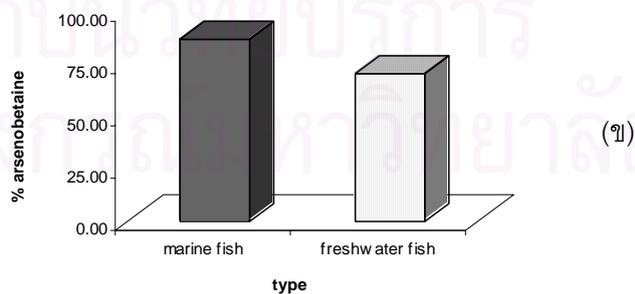
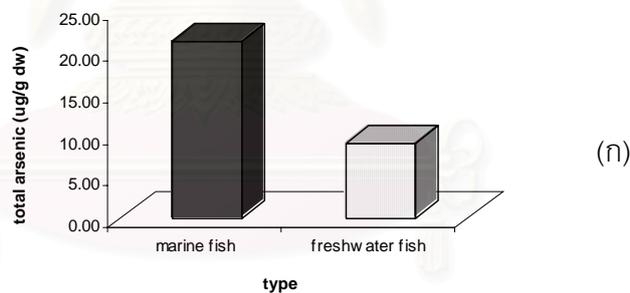
ตารางที่ 4.8 ปริมาณอาร์เซนิกในน้ำทะเลและน้ำจืด จาก จ. จันทบุรี (n = 3)

ชนิดของน้ำ	Total As	Inorganic As		Organic As	
	($\mu\text{g/l}$)	($\mu\text{g/l}$)	(%)	($\mu\text{g/l}$)	(%)
น้ำทะเล	4.7 ± 0.8	3.8 ± 1.3	80.9	0.9 ± 0.5	19.1
น้ำจืด	2.2 ± 0.8	1.9 ± 0.8	86.3	0.3 ± 0.1	13.7

4.7.5 ความสัมพันธ์ของปริมาณและรูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกที่พบในตัวอย่างปลา

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของปริมาณและรูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิก ระหว่างปลาทะเลกับปลาน้ำจืด แหล่งที่อยู่อาศัย (habitat) และ พฤติกรรมการกินอาหาร (feeding behavior) ของปลา พบสิ่งที่น่าสนใจดังต่อไปนี้

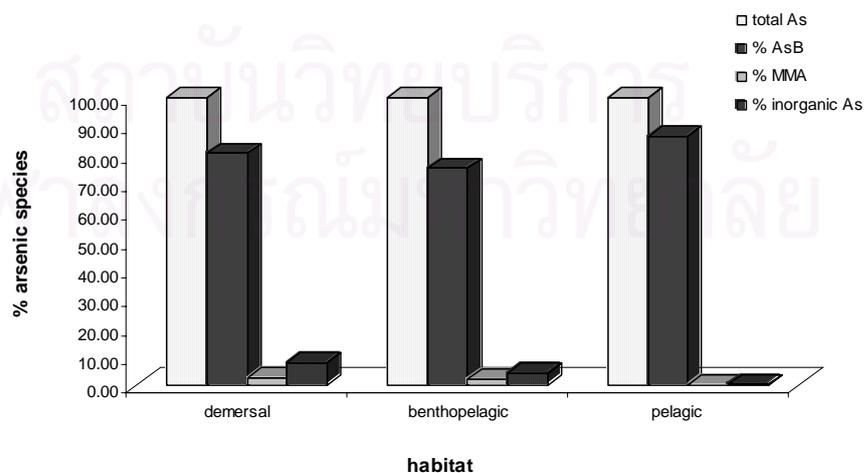
จากผลการศึกษาในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า ปลาทะเลจะมีปริมาณอาร์เซนิกรวมและสัดส่วนของ arsenobetaine สูงกว่าในปลาน้ำจืดอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.10) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการที่โครงสร้างทางเคมีของ arsenobetaine $[(CH)_3As^+COO^-]$ มีความคล้ายคลึงกับ glycinebetaine $[(CH)_3N^+COO^-]$ ซึ่งเป็นสารที่จำเป็นในกระบวนการควบคุมสมดุลน้ำและเกลือ (osmoregulation) ในร่างกายของปลา สันนิษฐานว่าอาร์เซนิกได้เข้าไปแทนที่โมเลกุลไนโตรเจนใน glycinebetaine ระหว่างที่เกิดกระบวนการ phospholipids biosynthesis (Phillips และ Depledge, 1985) เหตุผลนี้อาจอธิบายสาเหตุของการที่ปลาน้ำจืดซึ่งอาศัยอยู่ในบริเวณที่น้ำมีความเค็มต่ำจะมีความต้องการใช้ glycinebetaine ในปริมาณที่ต่ำกว่าปลาทะเล ทำให้มีสัดส่วนของ arsenobetaine ต่ำตามไปด้วย (Hanaoka *et al.*, 1999)



รูปที่ 4.10 ปริมาณอาร์เซนิกในปลาทะเลและปลาน้ำจืด

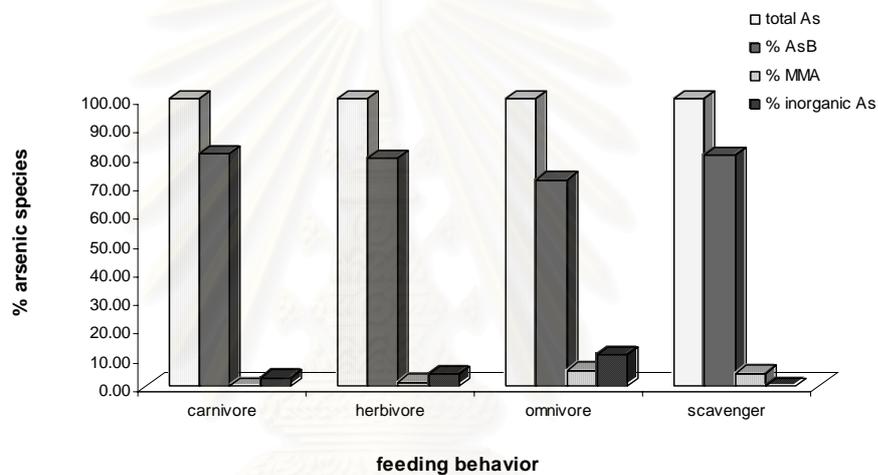
(ก) ความเข้มข้นของอาร์เซนิกรวม ($\mu\text{g/g}$ dry weight) และ (ข) % arsenobetaine

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของปริมาณและรูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกที่พบกับแหล่งที่อยู่ของปลา พบว่า ปลาที่อาศัยอยู่บริเวณผิวน้ำ (pelagic) มีสัดส่วนของ arsenobetaine สูงกว่าปลาที่อาศัยอยู่บริเวณหน้าดิน (demersal) หรือทั้งหน้าดินและผิวน้ำ (benthopelagic) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} = 0.002$) แต่ในทางตรงกันข้ามกลับพบว่า ปลาที่อาศัยอยู่บริเวณหน้าดินมีแนวโน้มที่จะพบทั้ง MMA และ inorganic arsenic ได้มากกว่าปลาที่อาศัยอยู่บริเวณอื่น เช่น ปลายี่สก และ ปลาหมอไทย เป็นต้น (รูปที่ 4.11) ซึ่งทั้ง MMA และ inorganic arsenic จัดเป็นอาร์เซนิกรูปแบบที่สิ่งมีชีวิตสามารถรับเข้าสู่ร่างกายได้ดี (bioavailable arsenic) สันนิษฐานว่าปลาหน้าดินได้รับอาร์เซนิกจากน้ำที่แทรกอยู่ระหว่างตะกอน (sediment porewater) ที่พุ่งขึ้นมาจากกระบวนการของสัตว์ที่อาศัยอยู่บริเวณหน้าดิน หรือกระบวนการที่ทำให้เกิดการฟุ้งของตะกอนที่พื้นท้องน้ำ น้ำที่แทรกอยู่ระหว่างตะกอนนี้จะมีความเข้มข้นของ bioavailable arsenic ในปริมาณสูงกว่าน้ำทะเลบริเวณเดียวกัน (Ebdon *et al.*, 1987 และ De Bettencourt, 1997) สำหรับตะกอนนั้นแม้จะพบว่ามีปริมาณอาร์เซนิกสูงแต่ก็มักอยู่ในรูปแบบที่สิ่งมีชีวิตรับเข้าสู่ร่างกายได้ต่ำ (Welch *et al.*, 1988) ตัวอย่างเช่น ในการศึกษาของ Rattanachongkiat (2004) ในเนื้อเยื่อของปลาที่อาศัยอยู่บริเวณผิวน้ำ ได้แก่ *Liza vaigiensis* มีปริมาณอาร์เซนิกรวมอยู่ระหว่าง 0.002 – 5.25 $\mu\text{g/g}$ dry weight ส่วนปลาที่อาศัยอยู่บริเวณหน้าดิน เช่น ปลากดหลวง (*Arius truncatus*) ปลาดุกทะเล (*Plotosus anguillaris*) ปลาเห็ดโคนจุด (*Sillago maculata*) และ ปลาลิ้นหมา (*Cynoglossus macrolepidotus*) จะมีปริมาณอาร์เซนิกรวมสูงกว่า คือ อยู่ระหว่าง 0.002 – 11 $\mu\text{g/g}$ dry weight เปรียบเทียบกับสัตว์หน้าดินกลุ่ม crustacean ได้แก่ ปู และ กุ้ง ซึ่งมีปริมาณอาร์เซนิกรวมสูงกว่าในปลา แสดงให้เห็นว่า สัตว์ที่อาศัยอยู่บริเวณหน้าดินจะมีโอกาสได้รับ bioavailable arsenic ได้มากกว่า



รูปที่ 4.11 สัดส่วนของอาร์เซนิกรูปแบบต่างๆ ในปลาที่มีแหล่งที่อยู่แตกต่างกัน

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ในด้านพฤติกรรมการกินอาหารของปลา พบว่า ปลาที่กินเนื้อเป็นอาหาร (carnivore) จะมีสัดส่วนของ arsenobetaine สูงที่สุด รองลงมา คือ ปลาที่กินซาก (scavenger) และ ปลาที่กินพืช (herbivore) ส่วนปลาที่กินทั้งพืชและสัตว์ (omnivore) จะมีสัดส่วนของ arsenobetaine น้อยที่สุด (รูปที่ 4.12) โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = 0.049) อย่างไรก็ตามไม่พบว่าปริมาณอาร์เซนิกรวมมีความแตกต่างกัน (p = 0.288) สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจาก arsenobetaine มักเปลี่ยนแปลงมาจากอาร์เซนิกรูปแบบอื่น โดยกระบวนการดังกล่าวเกิดขึ้นในร่างกายสัตว์ ปลาที่กินเนื้อเป็นอาหารจึงมีโอกาสสะสม arsenobetaine ได้มากกว่าปลาที่กินทั้งพืชและสัตว์



รูปที่ 4.12 สัดส่วนของอาร์เซนิกรูปแบบต่างๆ ในปลาที่มีพฤติกรรมการกินอาหารแตกต่างกัน

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของปริมาณอาร์เซนิกในตัวอย่างปลา กับในน้ำที่บริเวณเดียวกัน พบว่า ปริมาณอาร์เซนิกรวมในปลา มีค่าสูงกว่าในน้ำกว่า 2 – 6 เท่า แต่ส่วนใหญ่จะเป็นอาร์เซนิกอินทรีย์ในรูปของ arsenobetaine ซึ่งไม่เป็นพิษ ในขณะที่อาร์เซนิกที่พบทั้งในน้ำจืดและน้ำทะเลจะอยู่ในรูปอาร์เซนิกอนินทรีย์กว่า 80% เมื่อคำนวณค่า bioconcentration factor (BCF) ของ inorganic arsenic ในตัวอย่างปลาพบว่ามีค่าประมาณ 0 ทั้งสิ้น ในขณะที่ BCF ของ organic arsenic มีค่าอยู่ระหว่าง 13.7 – 40.4 l/g (ตารางที่ 4.9) ซึ่งจากค่า BCF แสดงให้เห็นว่า ปลาสามารถสะสมอาร์เซนิกในรูป organic arsenic ได้ดีกว่า แม้ว่าในน้ำที่มันอาศัยอยู่จะมี inorganic arsenic ในสัดส่วนที่สูงกว่าก็ตาม

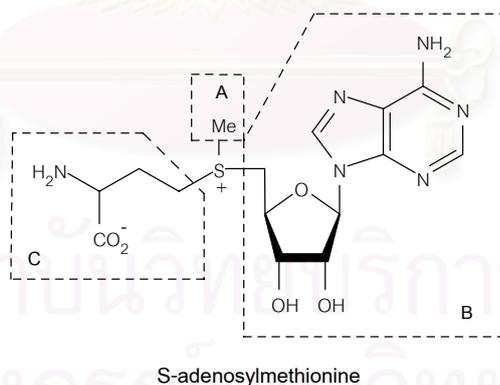
ตารางที่ 4.9 Bioconcentration factor ของอาร์เซนิกในตัวอย่างปลาและน้ำจาก จ. จันทบุรี

type	ปริมาณอาร์เซนิกในน้ำ (µg/l)			ชนิดของปลา	ปริมาณอาร์เซนิกในปลา (µg/g dw)			Bioconcentration factor (l/g)		
	Total	Inorganic	Organic		Total	Inorganic	Organic	Total	Inorganic	Organic
marine	4.66	3.84	0.82	เห็ดโคน	25.5	ND	24.4	5.5	0	29.7
				ทู	19.6	ND	17.4	4.2	0	21.3
				อีโต้มอญ	13.6	ND	11.2	2.9	0	13.7
				กะพงขาว	24.7	ND	22.3	5.3	0	27.2
freshwater	2.19	1.92	0.27	ช่อน	13.0	ND	10.9	5.9	0	40.4
				กตเหล็ก	5.1	0.8	3.9	2.3	0.4	14.7
				หมอไทย	8.1	0.9	6.5	3.7	0.5	24.2

ND = not detected

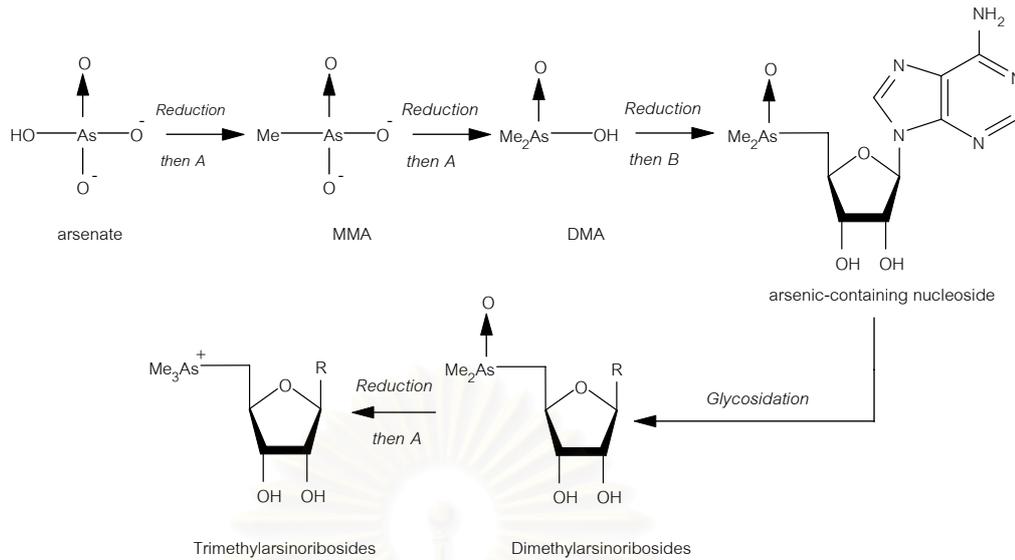
จากข้อมูลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาการสะสมอาร์เซนิกในรูปแบบต่างๆ ในหอยสองฝา *Mytilus edulis* ที่เลี้ยงในน้ำทะเลที่เติมสารประกอบอาร์เซนิกหลายตัว พบว่า *M. edulis* มีการเลือกดูดซึมอาร์เซนิกแต่ละรูปแบบที่แตกต่างกัน (Gailer *et al.*, 1995) โดยพบว่า *M. edulis* สามารถดูดซึม arsenobetaine, arsenocholine และ TMA^+ ได้ดีกว่า MMA, DMA หรือ inorganic arsenic กว่า 100 เท่า

การสะสมอาร์เซนิกแต่ละรูปแบบในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไป สำหรับสัตว์จะได้รับอาร์เซนิกจากอาหารที่กินเป็นหลัก (Francesconi และ Edmonds, 1998) ส่วนพืช และ สาหร่าย รวมทั้งแพลงก์ตอนพืช จะได้รับจากน้ำที่อยู่รอบตัวมัน สำหรับน้ำทะเลทั่วไปซึ่งมีออกซิเจนสูงอาร์เซนิกจะอยู่ในรูป arsenate (H_2AsO_4^-) ซึ่งสาหร่ายสามารถดูดซึมเข้าสู่เซลล์โดยผ่านกระบวนการ phosphate transport mechanism (Maugh, 1979 และ Meharg และ Macnair, 1992) เนื่องจาก arsenate มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับฟอสเฟตในน้ำ (H_2PO_4^-) ซึ่งเป็นสารที่จำเป็นในการเจริญเติบโต arsenate เหล่านี้จะเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็น arsenosugar ซึ่งพบกระจายทั่วไปตลอดทั้งเนื้อเยื่อ (Morita และ Shibata, 1990) โดยกระบวนการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเกี่ยวข้องกับสารที่ชื่อว่า S-adenosylmethionine (AdoMet) ซึ่งเชื่อว่าเป็นตัวให้หมู่ methyl และ หมู่ ribosyl ที่ปรากฏในโครงสร้างของ arsenosugar แก่ arsenate (รูปที่ 4.13 – 4.14)



รูปที่ 4.13 S-adenosylmethionine (AdoMet)

(ที่มา : Francesconi และ Edmonds, 1998)



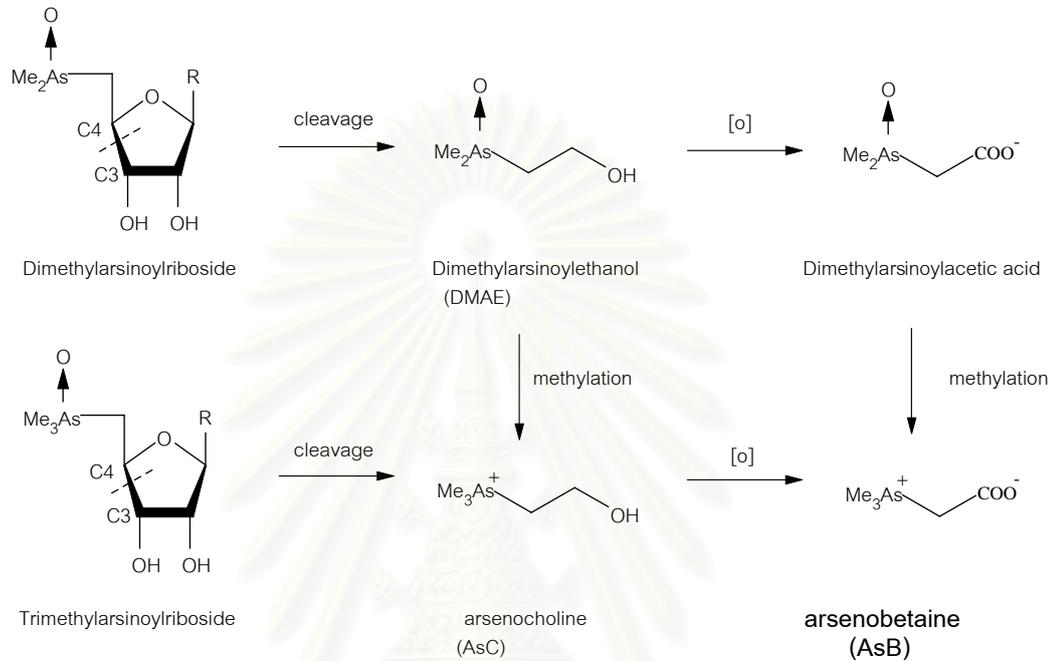
รูปที่ 4.14 กระบวนการเปลี่ยนแปลงของ arsenate ไปเป็น arsenosugar ในพืช

(ที่มา : Francesconi และ Edmonds, 1998)

ในสัตว์ที่กินพืชเป็นอาหาร เช่น กลุ่มของหอย ซึ่งกรองกินแพลงค์ตอนพืช จะมี arsenosugar ในสัดส่วนที่สูง และยังสามารถพบ tetramethylarsonium ion (TMA^+) อีกด้วย (Cullen และ Dodd, 1989 และ Shibata และ Morita, 1992) อย่างไรก็ตามสัดส่วนของ arsenosugar จะลดลงในสัตว์กินเนื้อเป็นอาหาร ซึ่งจะมี arsenobetaine ในสัดส่วนที่สูงขึ้นแทน (Howard และ Comber, 1989) ส่วนใหญ่แล้วสัดส่วนของ arsenobetaine ในสัตว์ที่กินเนื้อจะเกินกว่า 80 – 90% (Edmonds และ Francesconi, 1993 อ้างจาก Francesconi และ Edmonds, 1998)

สำหรับที่มาของ arsenobetaine ในสิ่งมีชีวิตนั้นเชื่อกันว่า เกิดจากกระบวนการ biomethylation ของอาร์เซนิกอนินทรีย์ในสิ่งมีชีวิต โดยเริ่มจากการเปลี่ยนแปลงของ arsenate ไปเป็น arsenosugar ในพืชหรือสาหร่าย จากนั้นเกิดการแตกออกของพันธะระหว่างคาร์บอนที่ตำแหน่ง C3 และ C4 ในวงแหวนน้ำตาลของโมเลกุล dimethylarsinoribosides (เป็น arsenosugar ตัวหนึ่ง) ไปเป็นสารตัวกลางที่ชื่อว่า DMAE (dimethylarsinoylethanol) จากนั้นเกิด methylation และ oxidation ไปเป็น arsenocholine และ arsenobetaine ตามลำดับ (Francesconi และ Edmond, 1998) ดังรูปที่ 4.15 ซึ่งจากการที่บางครั้งตรวจพบ arsenocholine

ในสัตว์ด้วย แต่กลับไม่ค่อยพบ dimethylarsinoylacetic acid ทำให้เชื่อกันว่า arsenocholine น่าจะเป็น precursor ที่สำคัญของการเกิด arsenobetaine (De Bettencourt *et al.*, 1997 และ Pellerito *et al.*, 2002)

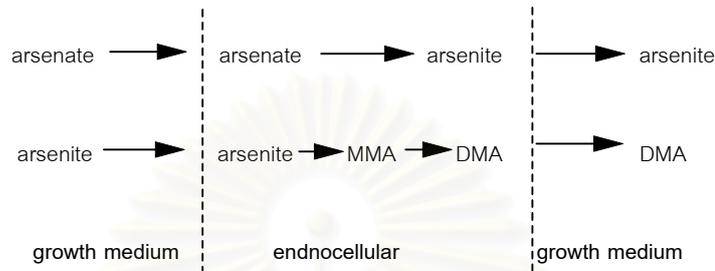


รูปที่ 4.15 กระบวนการเกิด arsenobetaine จาก arsenosugar

(ที่มา : Francesconi และ Edmond, 1998)

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า นอกจาก arsenobetaine แล้ว ยังพบ MMA และ inorganic arsenic อีกด้วย โดย MMA จะพบในปลาน้ำจืดเท่านั้น ส่วน inorganic arsenic พบในปลาน้ำจืดเป็นส่วนใหญ่ แต่ก็พบในปลาหู (*Rastrelliger brachysoma*) ซึ่งเป็นปลาทะเลด้วยเช่นกัน โดยแนวโน้มของการพบอาร์เซนิกทั้งสองรูปแบบจะสูงในปลาที่กินพืชหรือกินทั้งพืชและสัตว์เป็นอาหาร เช่น ปลาหู ปลานิล และ ปลายี่สก และมักเป็นปลาที่อาศัยอยู่บริเวณพื้นที่ตื้นน้ำเป็นส่วนใหญ่ เช่น ปลายี่สก และ ปลาหมอไทย เป็นต้น สาเหตุที่พบ inorganic arsenic นี้ คาดว่าปลาน้ำจืดจะได้รับมาจากน้ำที่อยู่รอบตัวมันโดยการกินโดยตรง หรือจากการที่ arsenate เปลี่ยนแปลงไปเป็นอาร์เซนิกรูปแบบอื่นๆ ได้ไม่หมด ส่วนการพบ MMA แต่ไม่พบ DMA นั้น คาดว่ามี

สาเหตุมาจากการที่ MMA มีค่า diffusion coefficient จากภายในเซลล์ออกนอกเซลล์ที่ต่ำ จึงถูกขับออกจากเซลล์ได้น้อยกว่า ในขณะที่ DMA มี diffusion coefficient สูงกว่า MMA มันจึงถูกขับออกจากเซลล์ของร่างกายสิ่งมีชีวิตได้ดี การสะสมจึงมีอยู่น้อยกว่า (Cullen *et al.*, 1994)



รูปที่ 4.16 การขับ arsenite และ DMA ออกจากเซลล์ของสิ่งมีชีวิต

(ที่มา : ดัดแปลงจาก Cullen *et al.*, 1994)

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการศึกษา

สรุปผลการศึกษาค้นคว้าการพัฒนากาารวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกในปลา ด้วยวิธี HPLC/ICP-OES ได้ดังต่อไปนี้

(1) การสกัดอาร์เซนิกจากเนื้อปลาด้วยสารละลายผสมระหว่างเมทานอลกับน้ำ ในอัตราส่วน 3 : 1 โดยปริมาตร สามารถสกัดอาร์เซนิกออกมาได้สูงถึง 91.6 % และเมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC/ICP-OES สามารถแยกอาร์เซนิกได้สามรูปแบบ คือ arsenobetaine (AsB), monomethylarsonic acid (MMA) และ inorganic arsenic ออกจากกันได้เป็นอย่างดี ภายในเวลา 900 วินาที โดยใช้ sodiumdihydrogenphosphate (NaH_2PO_4) เข้มข้น 5 และ 50 mmol/l pH 7 เป็น mobile phase ตามโปรแกรม 3 ขั้นตอน (three step elution) โดยมีเปอร์เซ็นต์กลับคืนเท่ากับ 86.9 %

(2) ปริมาณอาร์เซนิกรวมในตัวอย่างปลามีค่าอยู่ระหว่าง 3.7 – 29.0 $\mu\text{g}/\text{g}$ dry weight รูปแบบของอาร์เซนิกที่พบในสัดส่วนสูงที่สุด คือ arsenobetaine มีค่าอยู่ระหว่าง 62.8 – 95.7% ส่วน MMA และ inorganic arsenic พบในตัวอย่างปลาน้ำจืดเป็นส่วนใหญ่ คิดเป็นสัดส่วน 3.7 – 10.9 และ 1.7 – 20.3 % ตามลำดับ ปริมาณอาร์เซนิกรวมและสัดส่วนของ arsenobetaine ในปลาทะเลจะมีค่าสูงกว่าในปลาน้ำจืด แต่ในทางตรงข้าม ปลาน้ำจืดมีแนวโน้มที่จะพบทั้ง MMA และ inorganic arsenic ได้มากกว่า

(3) ปัจจัยที่จะทำให้พบหรือไม่พบรูปแบบทางเคมีใดๆ อาจเกี่ยวข้องกับพฤติกรรมการกินอาหารและแหล่งที่อยู่ของปลา เนื่องจากข้อมูลที่ได้ชี้ให้เห็นว่า ปลาที่กินพืช (herbivore) หรือกินซากพืชซากสัตว์เป็นอาหาร (scavenger) และมีแหล่งที่อยู่บริเวณพื้นที่ตื้นน้ำ (demersal หรือ benthic fish) จะมี MMA และ inorganic arsenic ในสัดส่วนที่สูงกว่า

(4) ปริมาณอาร์เซนิกรวมในตัวอย่งน้ำทะเลและน้ำจืด จาก จ. จันทบุรี มีค่าเฉลี่ย 4.7 และ 2.2 $\mu\text{g/l}$ ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าปริมาณที่พบในตัวอย่งปลาที่บริเวณเดียวกันประมาณ 2 – 6 เท่า แต่ในน้ำมี inorganic arsenic ในสัดส่วนที่สูงกว่า 80% จากค่า bioconcentration factor ซึ่งให้เห็นว่า ปลาสามารถสะสมอาร์เซนิกในรูป inorganic arsenic ได้ต่ำมาก แม้ว่าในน้ำที่มันอาศัยอยู่จะมี inorganic arsenic ในสัดส่วนที่สูงก็ตามแต่จะสะสมในรูป arsenobetaine แทน

5.2 ข้อเสนอแนะ

(1) การเลือกใช้เนื้อปลาในการวิเคราะห์ปริมาณอาร์เซนิกครั้งนี้ หากเป็นปลาตัวเล็กจะใช้เนื้อปลาทั้งตัวมาทำการวิเคราะห์ แต่ถ้าเป็นปลาตัวใหญ่ เช่น ปลากะพงแดง หรือ ปลาตาบเงิน จะแลเอาเฉพาะเนื้อบริเวณส่วนหลังของตัวปลามาใช้ ซึ่งผลที่ได้อาจแตกต่างจากการใช้เนื้อปลาทั้งตัวมาวิเคราะห์ได้ จึงควรมีการทดสอบว่า การเลือกใช้เนื้อปลาบริเวณส่วนหลังเพียงอย่างเดียวจะมีความแตกต่างจากการใช้เนื้อปลาทั้งตัวมาวิเคราะห์หรือไม่อย่างไร

(2) ในการศึกษาครั้งนี้ มุ่งเน้นที่การพัฒนาวิธีการที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกในปลามากกว่าการศึกษาในน้ำ แต่ถ้าต้องการศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกทั้งในปลาและในน้ำ ควรพัฒนาวิธีการวิเคราะห์รูปแบบของอาร์เซนิกในน้ำ ควบคู่ไปกับการทดลองเลี้ยงปลาในระบบที่เติมสารประกอบอาร์เซนิกรูปแบบต่างๆ จากนั้นนำปลาที่เลี้ยงและน้ำในระบบไปวิเคราะห์รูปแบบทางเคมี จะทำให้การอธิบายการเปลี่ยนแปลงอาร์เซนิกรูปแบบต่างๆ ชัดเจนยิ่งขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- กรมควบคุมมลพิษ. 2541. **รายงานสรุปคุณภาพน้ำและการปนเปื้อนของมลพิษบริเวณฝั่งทะเลอันดามันและอ่าวไทย ปี 2541**. Available from : <http://www.marinepcd.org/coastalwater/swqdata.html> [cited 14 March, 2006]
- ชัยเทพ วิริยะนิธิกรรณ์. 2547. **การสะสมของสารหนูในสิ่งมีชีวิตบริเวณปากแม่น้ำเจ้าพระยาตามห่วงโซ่อาหาร**. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- รุ่งฟ้า อินทจักร. 2545. **การกระจายของสารหนูในบริเวณชายฝั่งจังหวัดสมุทรปราการและนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุด**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม สหสาขาวิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

- Branch, S. Ebdon, L. and O'Neill, P. 1994. Determination of arsenic species in fish by directly coupled High performance liquid chromatography - Inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 9 (33) : 33 - 37.
- Brisbin, J.A. and Caruso, J. 2002. Comparison of extraction procedures for the determination of arsenic and other elements in lobster tissue by Inductively coupled plasma mass spectrometry. *The Analyst*. The Royal Society of Chemistry. 27 : 921 – 929.
- Caruso, J. A. and Montes-Bayon, M. 2003. Elemental speciation studies - new directions for trace metal analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 56 : 148 -163.
- Chappell, J., Chriswell, B. and Olszowy, H. 1995. Speciation of arsenic in a contaminated soil by solvent extraction. *Talanta*. 42 (3) : 323 - 329.

- Coelho, N.M.M., Coelho, L.M., De Lima, E.S., Pastor, A. and De la Guardia, M. 2005. Determination of arsenic compounds in beverages by High - performance liquid chromatography - Inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta*. 66 (4) : 818 – 822.
- Corr, J.J. 1997. Measurement of molecular species of arsenic and tin using elemental and molecular dual mode analysis by Ion - Spray mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 12 : 537 – 546.
- Cossa, D., Rondeau, B., Pham, T.T., Proulx, S. and Quemerais, B. 1996. *Principles and practices for sampling natural waters for the determination of trace and ultratrace substances and element*. Canada : St. Lawrence Centre.
- Cullen, W.R. and Dodd, M. 1989. Determination of arsenic compounds by High – pressure liquid chromatography – Graphite furnace atomic absorption spectrometry and thermospray mass spectrometry. *Applied Organometallic Chemistry*. 3 : 401 – 409.
- Cullen, W.R., Li, H., Pergantis, S.A., Eigendorf, G.K. and Harrison, L.G. 1994. The methylation of arsenate by a marine alga *Polyphysa peniculus* in the presence of L-methionine-methyl-d-3. *Chemosphere*. 28 (5) : 1009 – 1019.
- De Bettencourt, A.M., Duarte, M.F., Facchetti, S., Florencio, M.H, Gomes, M.L., Van't Klooster, H.A., Montanarella, L., Ritsema, R. and Vila-Boas, L.F. 1997. Evidence of the presence of dimethylated, trimethylated and refractory arsenic compounds in estuarine salt-marsh halophyte. *Applied Organometallic Chemistry*. 11 : 439 - 450.
- Do, B., Alet, P., Pradeau, D., Poupon, J., Guolley-Gaillot, M. and Guyon, F. 2000. On - line reversed - phase liquid chromatography hydride generation emission spectrometry : speciation of arsenic in urine of patients intravenously treated with As_2O_3 . *Journal of Chromatography Biomedical Science*. 740 (2) : 179 - 186.
- Ebdon, L., Walton, A.P., Millward, G.E. and Whitfield, M. 1987. Methylated arsenic species in estuarine porewaters. *Applied Organometallic Chemistry*. 1 : 427–433.
- Ellenhorn, M.J. 1997. *Ellenhorn's medical toxicology : diagnosis and treatment of human poisoning* . Second edition. Baltimore : Williams and Wilkins. 1538 pp.

- Fattorini, D., Alonso-Hernandez, C.M., Diaz-Asencio, M., Munoz-Caravaca, A., Pannacciulli, F.G., Tangherlini, M. and Regoli, F. 2004. Chemical speciation of arsenic in different marine organism : importance in monitoring studies. *Marine Environmental Research*. 58 : 845 - 850.
- Foulkes, M.E. 2003. Screening method for semi-quantitative techniques for elemental speciation in Cornelis, R., Heumann, K., Caruso, J. and Crews, H. (Eds). *Handbook of Elemental Speciation*. Chichester : John Wiley and Sons. 675 pp.
- Francesconi, K.A. and Edmonds, J.S. 1998. Arsenic in marine samples. *Croatica Chemica Acta*. 71 (2) : 343 - 359.
- Francesconi, K.A. and Kuehnelt, D. 2004. Determination of arsenic species: a critical review of methods and applications, 2000-2003. *The Analyst*. The Royal Society of Chemistry. 129 : 373 - 395.
- Gailer, J., Francesconi, K.A., Edmonds, J.S. and Irgolic, K.J. 1995. Metabolism of arsenic compounds by the blue mussels *Mytilus edulis* after accumulation from sea water spiked with arsenic compounds. *Applied Organometallic Chemistry*. 9 : 341 - 355.
- Geiszinger, A., Khokiattiwong, S., Goessler, W. and Francesconi K.A. 2002. Identification of the new arsenic-containing betaine, trimethylarsoniopropionate, in tissues of a stranded sperm whale *Physeter catodon*. *Journal of the Marine Biological Association*. 82 : 165 - 188.
- Gettar, R.T., Garavaglia, R.N., Gautier, E.A. and Batistoni, D.A. 2000. Determination of inorganic and organic anionic arsenic species in water by Ion - chromatography coupled to Hydride generation - Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Journal of Chromatography*. 9 (1) : 211 - 221.
- Goessler, W., Kuehnelt, D., Schlagenhafen, C., Slejkovec, Z. and Irgolic, K.J. 1998. Arsenobetaine and other arsenic compounds in the National Research Council of Canada Certified Reference Materials DORM 1 and DORM 2. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 13 : 183 - 188.

- Gomez-Camirero, A., Howe, P., Hughes, M., Kenyon, E., Lewis, D.R., Moore, M., Ng, J., Aitio, A. and Becking, G. 2001. *Environmental health criteria 224 : arsenic and arsenic compounds*. Framework of the inter-organization program for the sound management of chemicals. World Health Organization. Available from : <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc224.htm> [cited 2 October, 2004].
- Hanaoka, K., Goessler, W., Kaise, T., Ohno, H., Nakatani, Y., Ueno, S., Kuehnelt, D., Schlagenhaufen, C. Irgolic, K.J. 1999. Occurrence of a few organoarsenicals in jellyfish. *Applied Organometallic Chemistry*. 13 (2) : 95 – 99.
- Howard, A.G., Arbab-Zavar, M.H. and Apte, S. 1982. Seasonal variability of biological arsenic methylation in the River Beaulieu. *Marine Chemistry*. 11 : 493 - 498.
- Howard, A.G. and Comber, S.D.W. 1989. The discovery of hidden arsenic species in coastal waters. *Applied Organometallic Chemistry*. 3 : 509 - 514.
- Kubota, R., Kunito, T. and Tanabe, S. 2002. Chemical speciation of arsenic in the livers of higher trophic marine animals. *Marine Pollution Bulletin*. 45 (1) : 218 - 223.
- Le, X.C., Lu, X. and Li, X.F. 2004. Arsenic speciation. *Analytical Chemistry*. American Chemical Society. (1) : 27 - 33.
- Lobinski, R., Marczenko, Z. and Weber, S.G. (Eds). 1996. *Spectrochemical trace analysis for metal and metalloids*. Elsevier Science. 838 pp.
- Mace, J. 2003. *Arsenic speciation in marine food chain : a comparison of a top food chain predator with its terrestrial counterpart*. Available from : http://www.rmc.ca/academic/gradrech/abstracts/2003chem2003-9_e.html. [cited 13 December, 2004]
- Maugh, T.H. 1979. Speaking of Science : It Isn't Easy Being King. *Science*. 203 : 637.
- McSheehy, S., Szpunor, J., Morabito, R. and Quevauviller, P. 2003. *The speciation of arsenic in biological tissues and the certification of reference materials for quality control*. Elsevier Science. 22 (4) : 210 – 224.
- Meharg, A.A. and Macnair, M.R. 1992. Suppression of the high - affinity phosphate uptake system : a mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus*. *Journal of Experimental Botany*. 43 : 519 - 524.
- Morita, M. and Shibata, Y. 1990. Chemical forms of arsenic in marine macroalgae. *Applied Organometallic Chemistry*. 4 : 181 - 190.

- Naidu, R., Smith, J. McLaren, R.G., Stevens, D.P., Sumner, M.E. and Jackson, P.E. 2000. Application of capillary electrophoresis to anion speciation in soil water extracts : arsenic. *Soil Science Society*. American Journal. 64 :122 – 128.
- Pellerito, L., Barbieri, R., Di Stefano, R., Scopelliti, M., Pellerito, C., Fiore, T. and Triolo, F. 2002. Chapter 15 : Toxic effects of organometallic compounds towards marine biota. *Chemistry of Marine Water and Sediments*. Springer. 337 - 352.
- Phillips, D.J.H. and Depledge, M.H. 1985. Metabolic pathways involving arsenic in marine organisms : a unifying hypothesis. *Marine Environmental Research*. 17 : 1–12.
- Rattanachongkiat, S. 2004. *Arsenic in the Pak Pa - Nang river basin, Thailand*. Doctoral thesis submitted to School of Earth, Ocean and Environmental Sciences, University of Plymouth. UK.
- Roy, P. and Saha, A. 2002. Metabolism and toxicity of arsenic: A human carcinogen. *Current Science*. 82 (1) : 38 – 45.
- Santosa, S.J., Mokudai, H. and Tanaka, S. 1997. Automated continuous - Flow hydride generation with Inductively coupled plasma mass spectrometric detection for determination of trace amounts of selenium (IV) and total antimony, arsenic and germanium in seawater. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 12 : 409 - 415.
- Sanz, E., Munoz-Olivas, R. and Amara, C.C. 2005. Evaluation of a focused sonication probe for arsenic speciation in environmental and biological samples. *Journal of Chromatography*. 1097 : 1 – 8.
- Shibata, Y. and Morita, M. 1992. Characterization of organic arsenic compounds in bivalves. *Applied Organometallic Chemistry*. 6 : 343 - 349.
- Skoog, D.A., Holler, F.J. and Nieman, T.A. 1998. *Principles of Instrumental Analysis*. Philadelphia : Saunders College. Harcourt Brace College Publishers. 700 pp.
- Tukai, R., Maher, W.A., McNaught, I.J., and Ellwood, M.J. 2002. Occurrence and chemical form of arsenic in marine macroalgae from the east coast of Australia. *Marine and Freshwater Research*. 53 : 1 - 10.

US-EPA. 1995. *EPA's guidelines for derivation of Human health water quality criteria.*

Available from : <http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-WATER/1995/March/Day-23/pr-82.html> [cited 2 February, 2006]

US-EPA. 2003. *Bioaccumulation of arsenic (As) in fish & toxicity of as species.* EPA's

technical summary of information available on the bioaccumulation of arsenic in aquatic organisms. Available from : http://www.epa.gov/waterscience/criteria/techsum_bioacc.pdf. [cited 29 March, 2005]

Welch, A.H., Lico, M.S. and Hughes, J.L. 1988. Arsenic in groundwater of the western United States. *Ground Water*. 26 (3) : 333 – 347.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก ก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก รายละเอียดตัวอย่างปลาแต่ละชนิด

ชนิด/species	น้ำหนัก (กก.)	ความยาว (ซม.)	พฤติกรรมการกินอาหาร	แหล่งที่อยู่	
กะพงแดง <i>Lutjanus argentimaculatus</i>		0.955	56.80	กินเนื้อ (carnivore) เช่น ปลา ลูกหมึก และพวก crustacean	benthopelagic
กะพงขาว <i>Lates calcarifer</i>		0.525	28.65	กินเนื้อ (carnivore) เช่น ปลา กุ้งและสัตว์น้ำที่มีขนาดเล็ก กว่า	demersal
อีโต้มอญ <i>Coryphaena hippurus</i>		1.175	31.85	กินเนื้อ (carnivore) เช่น ปลา crustacean หมึก รวมทั้ง zooplankton	pelagic

หมายเหตุ

pelagic = ปลาที่อาศัยอยู่บริเวณผิวน้ำ

demersal = ปลาที่อาศัยอยู่บริเวณพื้นท้องน้ำ

benthopelagic = ปลาที่อาศัยอยู่บริเวณพื้นท้องน้ำ แต่บางครั้งก็ขึ้นมาอยู่ที่ผิวน้ำหรือกลางน้ำ

ข้อมูลปลาอ้างอิงจาก <http://www.fishbase.org> และ ประมง, กรม. 2540. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. *ภาพปลาและสัตว์น้ำของไทย*. พิมพ์ครั้งที่ 3. องค์การค้าของคุรุสภา. กรุงเทพฯ. 325 หน้า.

ภาคผนวก ก (ต่อ)

รายละเอียดตัวอย่างปลาแต่ละชนิด

ชนิด/species	น้ำหนัก (กก.)	ความยาว (ซม.)	พฤติกรรมการกินอาหาร	แหล่งที่อยู่
เห็ดโคน <i>Sillago sihama</i> 	0.165	17.20	กินซาก (scavenger) รวมถึง ลูกกุ้ง polychaete worms และ amphipods	demersal
ดาบเงิน <i>Trichiurus lepturus</i> 	0.525	85.90	กินเนื้อ (carnivore) เช่น ปลา หมึกและ cruatacean ที่มี ขนาดเล็กกว่า	benthopelagic
จวด <i>Otolithes ruber</i> 	0.250	26.80	กินเนื้อ (carnivore) เช่น ปลา กุ้ง invertebrate และสัตว์ที่ อาศัยอยู่บริเวณหน้าดิน	benthopelagic

ภาคผนวก ก (ต่อ)

รายละเอียดตัวอย่างปลาแต่ละชนิด

ชนิด/species	น้ำหนัก (กก.)	ความยาว (ซม.)	พฤติกรรมการกินอาหาร	แหล่งที่อยู่
<p>กุเภา</p> <p><i>Eleutheronema tetradactylum</i></p> 	0.325	29.55	กินได้ทั้งพืชและสัตว์ (omnivore) ได้แก่ ลูกกุ้ง ลูกปลา และพวก Mugilidae, Engraulidae และ Sciaenidae รวมทั้งพวก polychaetes	pelagic
<p>ทู</p> <p><i>Rastrelliger brachysoma</i></p> 	0.144 - 0.169	19.45 - 19.75	กินพืช (herbivore) แพลงค์ตอนพืชและ microzooplankton	pelagic
<p>ช้อน</p> <p><i>Channa striata</i></p> 	0.450 - 0.570	23.00 - 30.80	กินเนื้อ (carnivore) เช่น ปลา กบ แมลง earthworm ลูกข้อดี และ พวก crustacean	benthopelagic

ภาคผนวก ก (ต่อ)

รายละเอียดตัวอย่างปลาแต่ละชนิด

ชนิด/species	น้ำหนัก (กก.)	ความยาว (ซม.)	พฤติกรรมการกินอาหาร	แหล่งที่อยู่
<p>สวาย <i>Pangasius hypothalamus</i></p> 	0.829	50.20	กิน ซาก (scavenger) รวมทั้ง crustacean และ วัชพืชน้ำ	benthopelagic
<p>ยี่สก <i>Probabus jullieni</i></p> 	0.565	32.50	กินได้ทั้งพืชและสัตว์ (omnivore) แมลงน้ำ พืช น้ำ และหอย	demersal
<p>นิล <i>Oreochromis niloticus</i></p> 	0.216	26.40	กินพืช (herbivore) เช่น phytoplankton และพืชน้ำ ทั่วไป	benthopelagic

ภาคผนวก ก (ต่อ)

รายละเอียดตัวอย่างปลาแต่ละชนิด

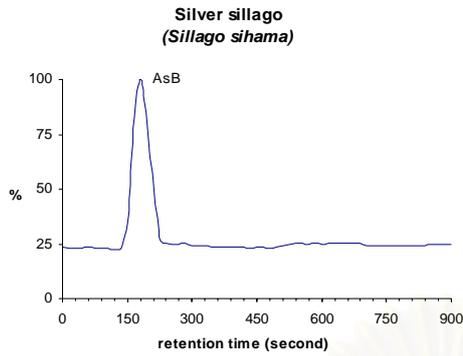
ชนิด/species	น้ำหนัก (กก.)	ความยาว (ซม.)	พฤติกรรมการกินอาหาร	แหล่งที่อยู่	
กตเหล็ก <i>Hemibagus nemurus</i>		0.295 – 0.350	19.25 – 20.50	กินเนื้อ (carnivore) ลูกปลา ลูกกุ้ง และ สัตว์น้ำขนาดเล็ก	benthopelagic
หมอไทย <i>Anabus testudineus</i>		0.250	16.50	กิน ได้ทั้งพืชและสัตว์ (omnivore) กิน macrophyte ลูกกุ้งและลูก ปลา	demersal
หมอเทศ <i>Oreochromis mossambicus</i>		0.320	18.00	กิน ได้ทั้งพืชและสัตว์ (omnivore) แต่ส่วนใหญ่มัก กินพืชน้ำและแมลงน้ำ	benthopelagic



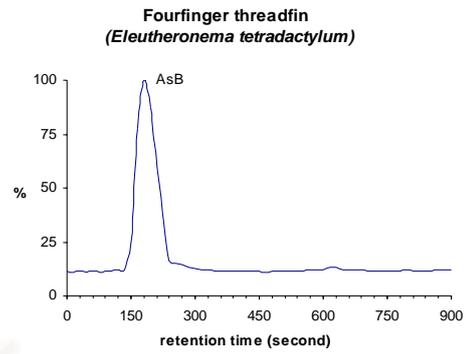
ภาคผนวก ข

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

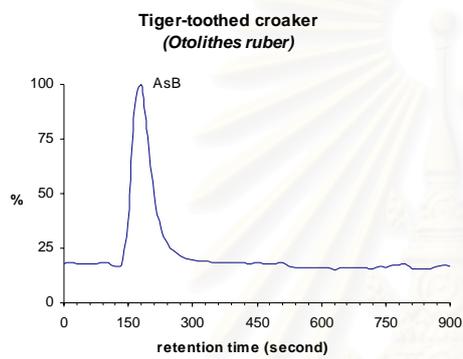
ภาคผนวก ข โครมาโทแกรมของตัวอย่างปลาทั้งหมด



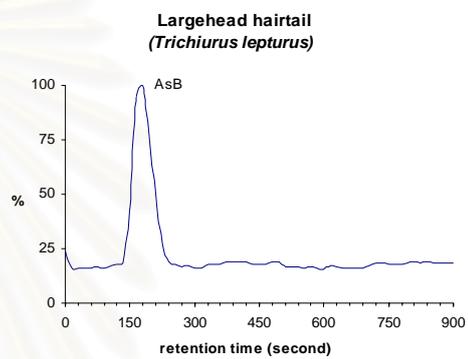
(1) ปลาเห็ดโคน



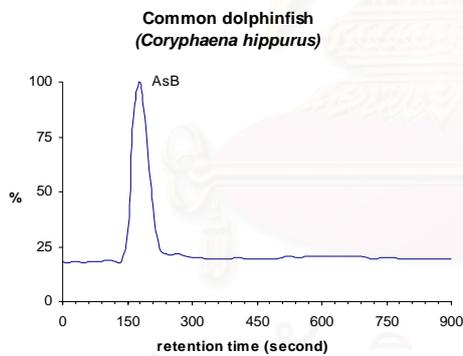
(2) ปลาเก๋า



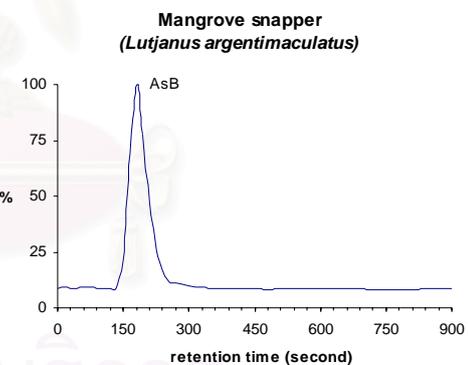
(3) ปลาจวด



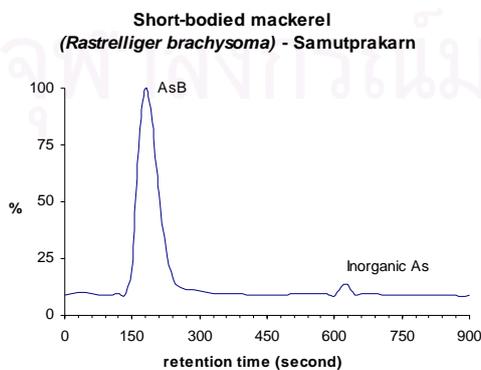
(4) ปลาดาบเงิน



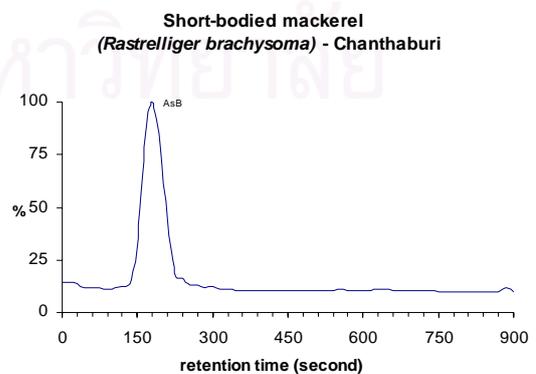
(5) ปลาอีโต้มอญ



(6) ปลากระพงแดง

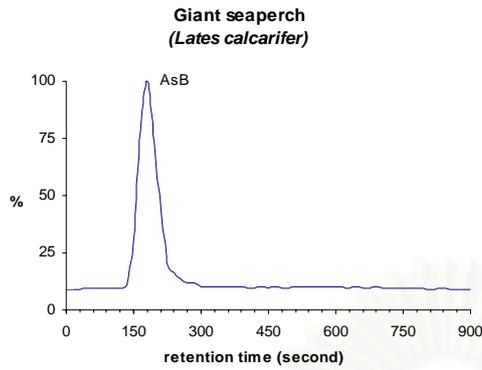


(7) ปลาทุ (สมุทรปราการ)

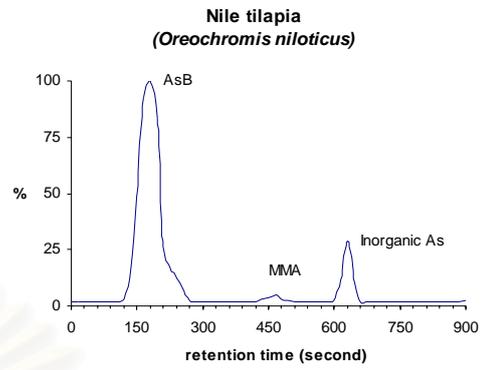


(8) ปลาทุ (จันทบุรี)

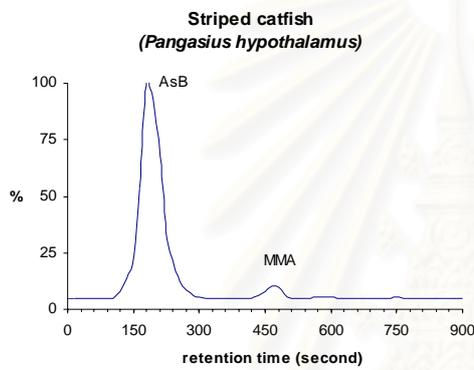
ภาคผนวก ข (ต่อ) โครมาโทแกรมของตัวอย่างปลาทั้งหมด



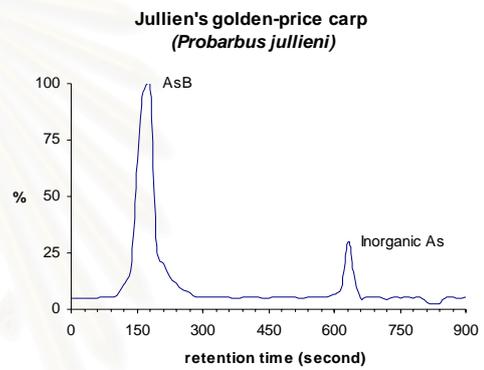
(9) ปลากะพงขาว



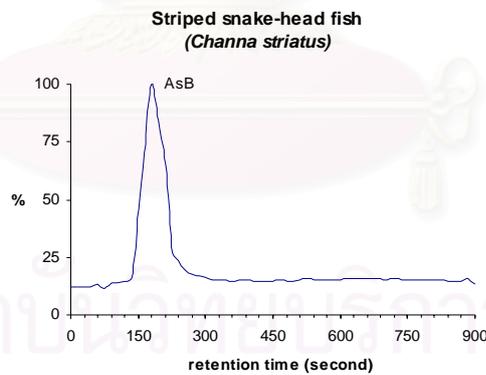
(10) ปลานิล



(11) ปลาสวาย



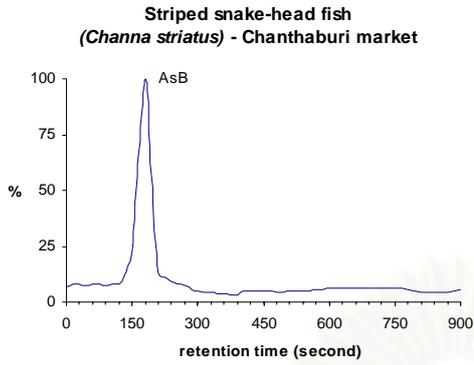
(12) ปลาอีปลัก



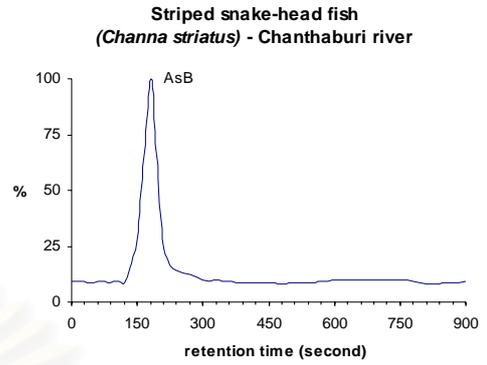
(13) ปลาช่อน (กทม.)

สถาบันวิจัยประชากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

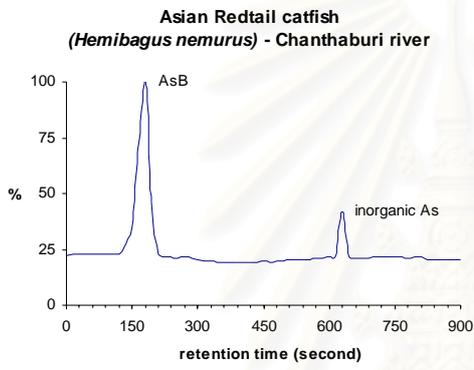
ภาคผนวก ข (ต่อ) โครมาโทแกรมของตัวอย่างปลาทั้งหมด



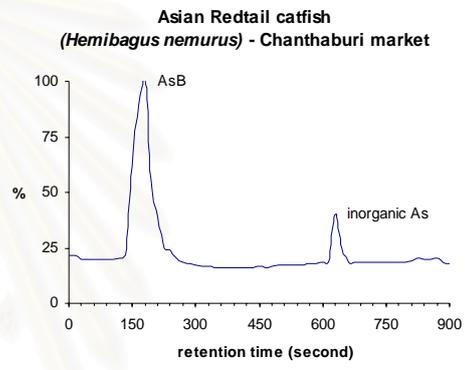
(14) ปลาช่อน (ตลาดสดจันทบุรี)




(15) ปลาช่อน (แม่น้ำจันทบุรี)




(16) ปลากดเหลือง (แม่น้ำจันทบุรี)



(17) ปลากดเหลือง (ตลาดสดจันทบุรี)



(18) ปลาหมอไทย (แม่น้ำจันทบุรี)



(19) ปลาหมอเทศ (ตลาดสดจันทบุรี)

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาววราภรณ์ ศรีมูล เกิดเมื่อวันที่ 1 มีนาคม พ.ศ. 2523 ที่จังหวัดจันทบุรี จบการศึกษาระดับปริญญาตรี (เกียรตินิยมอันดับ 2) สาขาวิชาสมุทรศาสตร์สกายะและเคมี ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2544 และเข้าศึกษาในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสมุทรศาสตร์เคมี ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2547 โดยได้รับทุนการศึกษาเนื่องในวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุ 72 พรรษา ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย