

นิพนธ์ฉบับ

การปรับปรุงวิธีการและตรวจสอบความถูกต้องการวิเคราะห์สารหนูและปรอท

เฉลิม จันทร์สม, วณิดา จันทร์สม

บทคัดย่อ

- บทนำ:** สารหนูและปรอทเป็นโลหะหนักที่ปนเปื้อนในดินและน้ำ การเพาะปลูกพืชในหรือใกล้กับแหล่งที่ปนเปื้อนสามารถดูดซึมและสะสมโลหะเหล่านี้แล้วก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อมนุษย์ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและตรวจสอบวิธีการวิเคราะห์ของสารหนูและปรอท ในอาหาร สมุนไพรและเครื่องสำอาง โดยใช้เครื่องมือที่มีอยู่
- วิธีการศึกษา:** ตรวจสอบวิธีการวิเคราะห์สารหนูด้วยวิธีกราไฟต์เฟอร์แนชอะตอมมิกแอ็บซอร์พชันสเปกโตรมิเตอร์ และการวิเคราะห์ปรอทด้วยวิธีโคลด์เวเปอร์อะตอมมิกแอ็บซอร์พชันสเปกโตรมิเตอร์ ตัวอย่างที่นำมาทดสอบคือ น้ำดื่ม ข้างล่อง ชিং และตัวอย่างครีมทาหน้า ตรวจสอบความถูกต้องตามแนวทางของ International Committee on Harmonization
- ผลการศึกษา:** พบว่ามีช่วงของการวิเคราะห์สารหนูและปรอทเท่ากับ 2.5 - 75 ไมโครกรัมต่อลิตร และ 0.25 - 5.0 ไมโครกรัมต่อลิตรตามลำดับ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มากกว่า 0.995 พบว่าค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ เท่ากับ 0.978 ไมโครกรัมต่อลิตร และ 0.068 ไมโครกรัมต่อลิตร สำหรับการวิเคราะห์สารหนูและปรอท ตามลำดับ ในขณะที่ค่าขีดจำกัดของการวัดปริมาณ เท่ากับ 3.26 ไมโครกรัมต่อลิตร และ 0.23 ไมโครกรัมต่อลิตร สำหรับการวิเคราะห์สารหนูและปรอทตามลำดับ ค่าร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ยอยู่ในช่วง 80 - 110 ในขณะที่ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานความสัมพัทธ์มีค่ามากกว่า 7 สำหรับการวิเคราะห์สารหนูและน้อยกว่า 11 สำหรับปรอท ผลการวิเคราะห์ปรอทของตัวอย่างทั้งหมดด้วยวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสอดคล้องกับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Inductively coupled plasma mass spectrometer
- วิจารณ์:** วิธีวิเคราะห์สารหนูที่พัฒนาขึ้นนี้ไม่เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณของสารหนูที่มีน้อยมากๆ (น้อยกว่า 20 ไมโครกรัมต่อลิตร) ในตัวอย่าง ซึ่งต้องมีการปรับปรุงเพิ่มเติม ส่วนวิธีวิเคราะห์ปรอทที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์การปนเปื้อนในอาหาร สมุนไพรและเครื่องสำอางได้
- คำสำคัญ:** สารหนู, ปรอท, อะตอมมิกแอ็บซอร์พชันสเปกโตรมิเตอร์

วันที่รับบทความ: 19 มีนาคม 2561

วันที่อนุญาตให้ตีพิมพ์: 10 กันยายน 2561

บทนำ

ตามธรรมชาติสามารถพบสารหนูได้ในน้ำทะเล ซึ่งสัตว์และพืชทะเลจะมีปริมาณสารหนูประมาณ 0.5 - 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ppm) สำหรับในแหล่งน้ำจืดพบว่ามีปริมาณสารหนูในปลาน้ำจืดต่ำกว่า 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งน้อยกว่าในปลาทะเล ปริมาณสารหนูในพืชขึ้นกับพื้นที่เพาะปลูก ถ้าหากปลูกใกล้แหล่งอุตสาหกรรมหรือในพื้นที่ที่มีปริมาณสารหนูสูง พืชดังกล่าวก็จะดูดซึมสารหนูได้มาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในข้าว¹ พรอทเป็นโลหะหนักที่สามารถตกค้างในแหล่งน้ำตามธรรมชาติและในอาหาร เช่น ปลา โดยเฉพาะปลาที่มีขนาดใหญ่ หอย เนื้อสัตว์ ผักและสมุนไพร เป็นต้น²⁻⁴ อีกทั้งยังพบว่ามีการผสมปรอทในเครื่องสำอางที่ทำให้ผิวขาวอีกด้วย พรอทมีความเป็นพิษสูง หากร่างกายได้รับเพียงเล็กน้อยก็อาจเกิดพิษที่รุนแรงได้⁵⁻⁹ องค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) และตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia, THP) กำหนดมาตรฐานอนุญาตให้วัตถุพิษสมุนไพรมีการปนเปื้อนของตะกั่วได้ไม่เกิน 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แคดเมียมไม่เกิน 0.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สารหนูไม่เกิน 4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และพรอทไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม¹⁰⁻¹³

ปัจจุบันคณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์สามารถให้บริการตรวจวิเคราะห์โลหะหนักดังกล่าวได้ทั้งหมด โดย ตะกั่ว แคดเมียมและสารหนู ถูกตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี graphite furnace atomic absorption spectrophotometry (GFAAS) และปรอทถูกตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี cold vapor atomic absorption spectrophotometry (CVAAS) ซึ่งเป็นเครื่องมือและวิธีการที่พัฒนาขึ้นเอง (in-house method) ทั้งนี้การวิเคราะห์ตะกั่วและแคดเมียมสามารถตรวจวิเคราะห์ที่ปริมาณต่ำๆ ได้ดี แต่การวิเคราะห์สารหนูด้วยวิธี GFAAS พบว่า base line ไม่นิ่ง การวิเคราะห์ที่ปริมาณต่ำๆ ได้ไม่ดี และมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสูงจากการวิเคราะห์ตัวอย่าง ส่วนการวิเคราะห์ปรอทด้วยวิธี CVAAS ที่พัฒนาขึ้นเอง ยังวิเคราะห์ที่ปริมาณต่ำๆ ได้ไม่ค่อยดี โดยความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถวิเคราะห์ได้เท่ากับ 0.067 ไมโครกรัมต่อลิตร¹⁴ ซึ่งสูงกว่าเครื่องมือมาตรฐานทั่วไป การวัดปริมาณปรอทแต่ละครั้งต้องใช้ปริมาณสารตัวอย่างจำนวนมาก และมีปัญหาที่ base line signal ไม่นิ่งกรณีวิเคราะห์พร้อมกันหลายๆ ตัวอย่าง

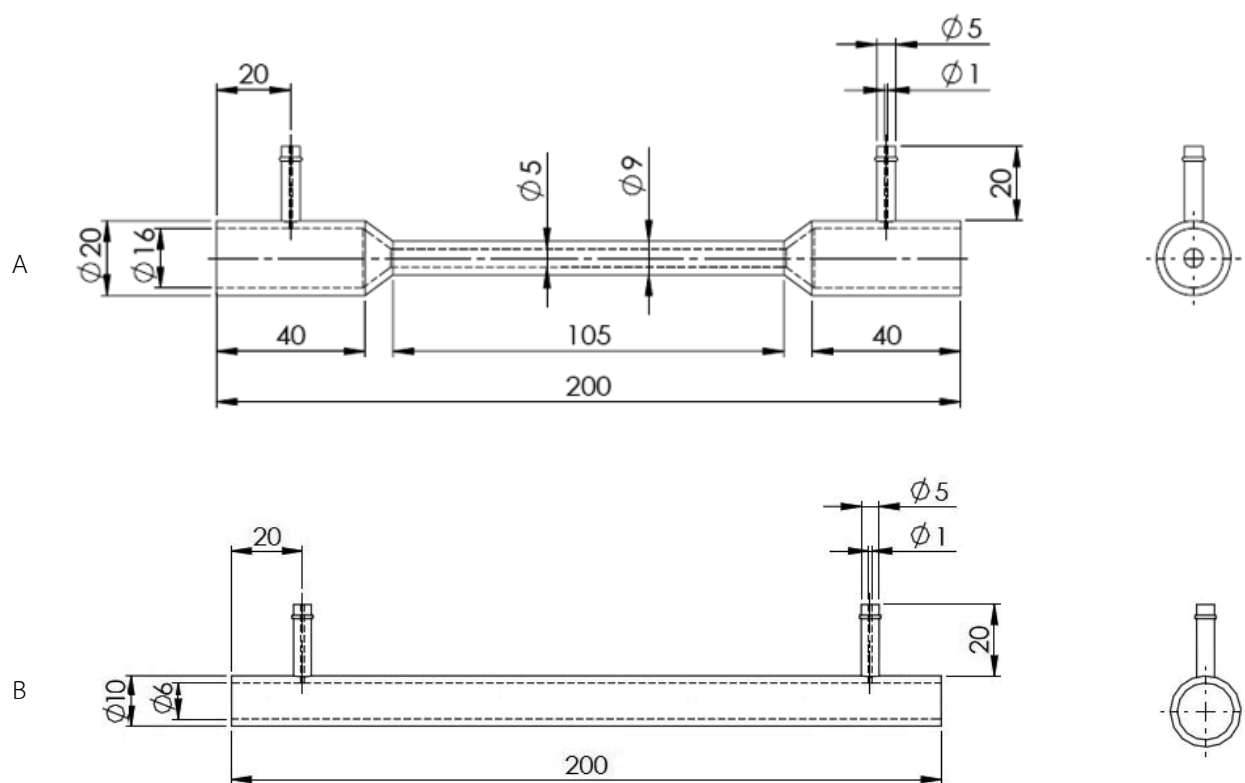
ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารหนูด้วยวิธี GFAAS ให้สามารถวิเคราะห์ที่ปริมาณต่ำๆ ได้ดี และมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการวิเคราะห์ตัวอย่างอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ โดยใช้สภาวะ การทดสอบของบริษัทผู้ผลิตเครื่องมือเป็นแนวทางและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) ตามแนวทางของ ICH-Q2¹⁵, AOAC¹⁶ และ สุภาณี ดวงธีรปรีชาและคณะ¹⁷ และพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปรอทด้วยวิธี CVAAS ให้สามารถวิเคราะห์ที่ปริมาณต่ำๆ ได้ดีขึ้น ลดปริมาณสารตัวอย่างที่ใช้และแก้ปัญหา base line signal จากการวิเคราะห์พร้อมกันหลายๆ ตัวอย่าง พร้อมตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์อีกครั้ง เพื่อส่งเสริมนโยบายการสร้างรายได้จากการให้บริการวิเคราะห์ และสร้างความเชื่อมั่นให้กับผู้รับบริการ รวมไปถึงใช้ในการเรียนการสอนของนักศึกษาอีกด้วย

วิธีการศึกษา

1. การปรับสภาพที่เหมาะสมของเครื่องอะตอมมิก แอ็บซอร์ปชันสเปกโตรมิเตอร์ยี่ห้อ Hitachi รุ่น Z-8200 Polarized Zeeman

1.1 วิธีการปรับสภาพที่เหมาะสมของเครื่อง GFAAS สำหรับการวิเคราะห์สารหนู (As) เช่น การเติม matrix modifier (NiNO_3 , Merck) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตเครื่องมือ และการปรับตั้งค่าโปรแกรมอุณหภูมิ (temperature program) ของเครื่อง GFAAS ในขั้นตอนการ drying และ ashing ของ furnace จาก 1000 °C เป็น 1200 °C และการปรับค่า PMT voltage, slit width และ lamp current แล้วทำ sensitivity check ให้ได้สัญญาณฟลักที่สมมาตร มีพื้นที่ใต้พีคสูงสุดและได้ค่า absorbance อยู่ในช่วง $100 \pm 20\%$ ของค่าที่ผู้ผลิตเครื่องมือกำหนดไว้

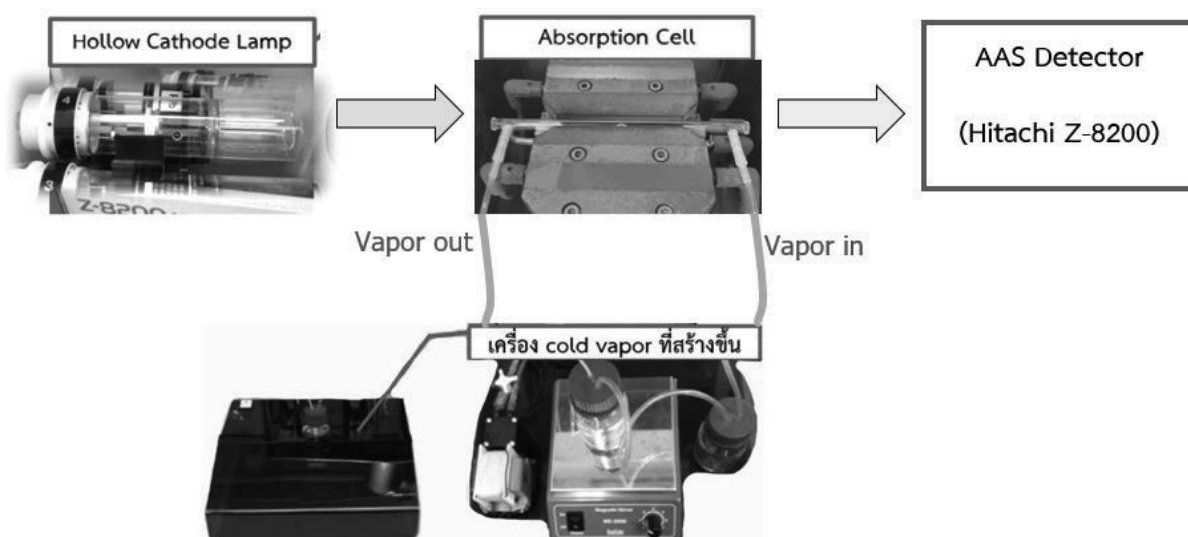
1.2 วิธีการปรับสภาพที่เหมาะสมของเครื่อง CVAAS สำหรับการวิเคราะห์ปรอท (Hg) เช่น การปรับลดขนาดของ absorption cell ที่มี diameter ขนาด 10 มิลลิเมตร แทนอันเดิมโดย หน้าต่างทั้ง 2 ด้าน ทำด้วย quartz (diameter เท่ากับ 10 มิลลิเมตร) มีท่อสำหรับสวมสายยางเพื่อให้อากาศเข้า-ออก (diameter ขนาด 5 มิลลิเมตร) ตามแบบของ absorption cell ในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แบบของ absorption cell เดิม (A) แบบของ absorption cell ใหม่ (B)

การลดปริมาณสารตัวอย่างที่ใช้ โดยลดขนาดของ reaction vessel โดยใช้ glass bottle สีของ Scott Duran

ขนาด 25 มิลลิลิตร แทนของเดิมที่ใช้ขนาด 50 มิลลิลิตร เจาะรูตรงฝาปิดเพื่อต่อสายยางให้อากาศจาก pump เข้าและอากาศออกสู่ drying tube ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 การติดตั้งเครื่อง cold vapor เข้ากับเครื่อง AAS

Drying tube บรรจุ drying agent เพื่อทำหน้าที่ดูดน้ำไม่ให้เข้าไปเกาะหน้าต่างของ absorption cell ซึ่งยังใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้นบรรจุใน glass bottle ใส่ของ Scott Duran ขนาด 50 มิลลิลิตรเหมือนเดิม และวิธีการกำจัดไอน้ำที่เกาะบริเวณ quartz cell กรณีวิเคราะห์หลายๆ ตัวอย่างพร้อมกันนั้น ให้พักช่วงการวิเคราะห์แล้วใช้ silica gel ที่อบมาใหม่ๆ บรรจุในขวด Duran ขนาด 50 มิลลิลิตร ต่อแทน drying tube พร้อมเปิด pump ให้อากาศไหลเวียนและช่วยดูดความชื้นในระบบประมาณ 5 นาที แล้วจึงเริ่มวิเคราะห์ตัวอย่างที่เหลืต่อไป

เนื่องจากมีการปรับขนาดของ reaction vessel จึงต้องปรับ air flowrate ใหม่ เพื่อป้องกันไม่ให้ฟองอากาศเกิดมากเกินไปและไหลเข้าไปในระบบ โดยปรับลด air flowrate ให้เหลือเท่ากับ 0.5 ลิตรต่อนาที และต้องการลดปริมาตรของอากาศในระบบ จึงใช้ Teflon tubing ขนาด diameter ขนาด 1/16 นิ้วเชื่อมต่อทุกส่วนในระบบ ส่วน magnetic stirrer ที่ใช้นั้นยังใช้ magnetic bar ขนาด 16 มิลลิเมตร และเพื่อให้สารละลายผสมกันได้ดีต้องให้ความเร็วรอบในการปั่นไม่น้อยกว่า รอบต่อนาทีเหมือนเดิม และการปรับค่า PMT voltage, slit width และ lamp current แล้วทำ sensitivity check ให้ได้สัญญาณฟีกที่สมมาตร มีพื้นที่ใต้ฟีกสูงสุดและได้ค่า absorbance อยู่ในช่วง $100 \pm 20\%$ จึงเหมาะสมที่จะใช้ทำการตรวจวิเคราะห์

2. วิธีการเตรียมตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างที่บดเป็นเนื้อเดียวกัน ประมาณ 0.5 กรัม (ตัวอย่างครีมทาหน้าใช้ 0.25 กรัม ส่วนตัวอย่างน้ำ ให้ตวงมา 50 มิลลิลิตร) ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมกรดไนตริก 50% v/v (Merck) จำนวน 10 มิลลิลิตร ปิดด้วยกระจกนาฬิกา ทำการย่อยสลายบนเตาความร้อน (hot plate) นาน 15 นาที ยกลง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง แล้วเติมกรดไนตริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ปิดบีกเกอร์ด้วยกระจกนาฬิกา ทำการย่อยสลายบน hot plate ต่อมา 1 ชั่วโมง หรือจนผงสมุนไพรถูกย่อยสลายหมดยกลงตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ที่อุณหภูมิห้อง และถ่ายสารละลายตัวอย่างใส่ในขวดปรับปริมาตร ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ นำมากรองผ่านกระดาษกรอง และถ่ายลงขวดพลาสติก เก็บไว้ในตู้เย็น 4°C โดยวิธีการเตรียมตัวอย่างนี้จะใช้ทั้งการวิเคราะห์ปริมาณสารหนูและปรอท

3. การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

(Method Validation)

3.1 การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and Range)

วิเคราะห์สารละลายมาตรฐานสารหนูความเข้มข้น

2.5, 5, 10, 25, 50, 75 และ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร (ppb) ที่เตรียมจากสารมาตรฐาน 1000 ppm (Merck) และสารละลายมาตรฐานปรอทความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 2.5, 5.0 และ 10 ppb ที่เตรียมจากปรอทมาตรฐาน 1000 ppm (Fluka) ตามสภาวะการทดสอบที่กำหนดไว้ของแต่ละธาตุ นำค่า absorbance ของแต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟมาตรฐานของแต่ละธาตุ แสดงสมการความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่า absorbance คำนวณ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) เพื่อศึกษาความเป็นเส้นตรง ซึ่งควรมีค่าไม่ต่ำกว่า 0.995

3.2 การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

ทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ โดยเติมสารละลายมาตรฐานลงในตัวอย่าง (standard addition method) ผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างตามขั้นตอนดังกล่าวข้างต้น ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 3 ระดับ คือสารหนูที่ความเข้มข้น 10, 30 และ 50 ppb และปรอทที่ความเข้มข้นที่ 1.0, 1.5 และ 2.5 ppb ระดับละ 3 ซ้ำ วิเคราะห์หาปริมาณ คำนวณ ค่าร้อยละของการคืนกลับ (% recovery) ของแต่ละระดับความเข้มข้น หาค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับ (% mean recovery) และค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% relative standard deviation, %RSD) โดยที่ % mean recovery ควรอยู่ในช่วง 80 - 110 และค่า %RSD ของสารหนู ไม่มากกว่า 7 และสำหรับปรอท ไม่มากกว่า 11 (AOAC, 1998)

3.3 การทดสอบความเที่ยง (Precision)

การทดสอบความทนซ้ำได้ (Repeatability) โดยเติมสารละลายมาตรฐานลงในตัวอย่าง (standard addition method) ผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างตามขั้นตอนดังกล่าวข้างต้น ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายคือสารหนูที่ความเข้มข้น 20 ppb และปรอทที่ความเข้มข้น 1.5 ppb เตรียมความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ วิเคราะห์หาปริมาณ คำนวณค่าเฉลี่ย และ %RSD โดย %RSD สำหรับสารหนู ไม่มากกว่า 7 และสำหรับปรอท ไม่มากกว่า 11 (AOAC, 1998) และการทดสอบ Intermediate precision โดยเตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับการทดสอบ repeatability โดยนักวิเคราะห์ 2 คน ด้วยเครื่องมือเดิม ทำคนละ 6 ซ้ำ รวมเป็น 12 ซ้ำ คำนวณ %RSD และใช้เกณฑ์พิจารณาเช่นเดียวกับของการทดสอบ repeatability

3.4 การทดสอบหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) ขีดจำกัดของการวัดปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

การทดสอบหาค่า LOD และ LOQ โดยการนำสารมาตรฐานความเข้มข้นต่ำๆ มาวิเคราะห์หาปริมาณสารหนูหรือ

ปรอท โดยการทำซ้ำจำนวน 10 ครั้ง คำนวณหาความเข้มข้นในตัวอย่างแล้วคำนวณค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) คำนวณหาค่า LOD ($SD \times 3$) และ LOQ ($SD \times 10$)

3.5 การวิเคราะห์หาปริมาณสารหนูและปรอทในตัวอย่าง

การวิเคราะห์หาปริมาณสารหนู โดยเทสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้ ใส่ใน cup ของ autosampler และวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์สารมาตรฐาน นำค่า peak height ที่ record ได้ไปหาปริมาณสารหนูในตัวอย่าง ส่วนการวิเคราะห์หาปริมาณปรอท ให้เปิดสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้จากข้างต้น ครั้งละ 25 มิลลิลิตร ใส่ใน reaction vessel และวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์สารมาตรฐาน นำค่า peak height ที่ record ได้ไปหาปริมาณปรอท ในตัวอย่าง

4. การวิเคราะห์หาปริมาณสารหนูและปรอทในตัวอย่างโดยใช้เทคนิค Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry (ICP-MS) เพื่อเปรียบเทียบผล

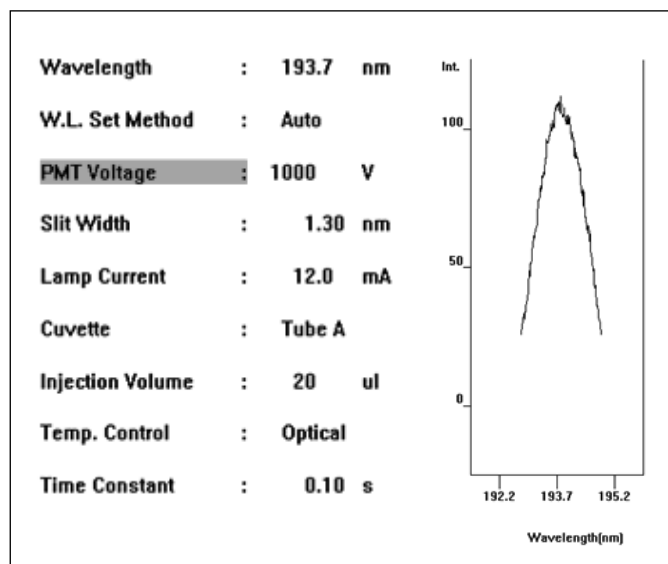
นำตัวอย่างสมุนไพรขิง ข้าวกล้อง ครีมหาหน้า และน้ำดื่ม อันเดียวกันกับที่ใช้ในการทดลองนี้ไปวิเคราะห์ด้วย ICP-MS (Agilent Technologies, 7700 x ICP-MS instrument, UK) คำนวณหาปริมาณสารหนูและปรอท ที่มีในสารละลายตัวอย่างในหน่วยนาโนกรัมต่อกรัม (ng/g)

ผลการศึกษา

1. การปรับหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่องมือและวิธีวิเคราะห์

1.1 วิธีการปรับหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง GFAAS สำหรับการวิเคราะห์สารหนู (As)

เมื่อปรับค่า PMT voltage ที่ 1000 V, slit width ที่ 1.3 nm และ lamp current ที่ 12 mA พบว่าได้สัญญาณฟีก (line profile) ที่สมมาตร มี maximum absorption ที่ 163.7 nm และค่า intensity มากที่สุด (~110) ดังรูปที่ 3 จึงเลือกใช้สภาวะนี้ในการทดลองทั้งหมด

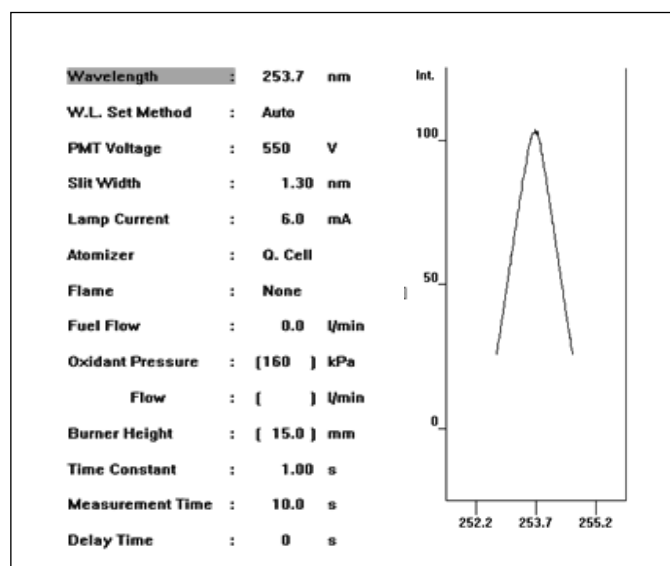


รูปที่ 3 การทดลองปรับตั้งค่าสภาวะของเครื่อง GFAAS สำหรับวิเคราะห์สารหนู

1.2 วิธีการปรับหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง CVAAS สำหรับการวิเคราะห์ปรอท (Hg)

เมื่อปรับค่า PMT voltage ที่ 550 V, slit width ที่ 1.3 nm และ lamp current ที่ 6.0 mA พบว่าได้สัญญาณ

ฟีก (line profile) ที่สมมาตร มี maximum absorption ที่ 193.7 nm และค่า intensity มากที่สุด (~105) ดังรูปที่ 4 จึงเลือกใช้สภาวะนี้ในการทดลองทั้งหมด



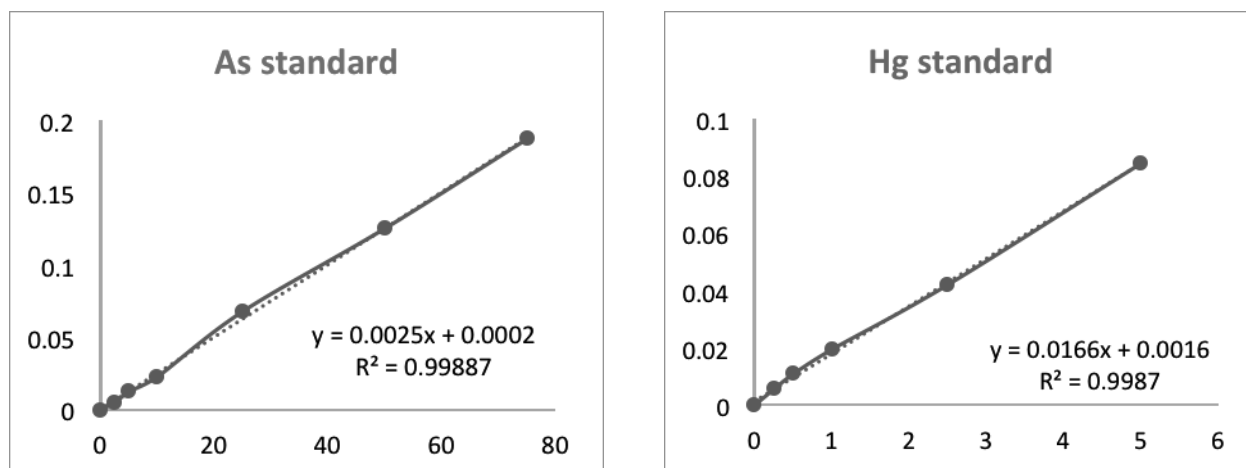
รูปที่ 4 การทดลองปรับตั้งค่าสภาวะของเครื่อง CVAAS สำหรับวิเคราะห์ปรอท

2. ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)

2.1 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and Range)

จากการปรับปรุงวิธีการวิเคราะห์สารหนูด้วยวิธี GFAAS และปรับปรุงวิธีการวิเคราะห์ปรอทด้วยวิธี CVAAS แล้วทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ได้ผลดังตารางที่ 1 พบว่ามีความเป็นเส้นตรงตลอดช่วงของการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นของสารหนูและปรอท คือ 2.5 - 75 และ 0.25 - 5.0 ไมโครกรัมต่อลิตร (ppb) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) เท่ากับ 0.9989 และ 0.9987 ตามลำดับ ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของการวิเคราะห์สารมาตรฐาน

ทั้งสารหนูและปรอทนั้นอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือ มากกว่า 0.995 พบว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของการวิเคราะห์สารหนูดีกว่าวิธีเดิม (0.9972) ส่วนปรอทมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ใกล้เคียงกับวิธีเดิม (0.9988) เมื่อเปรียบเทียบการวิเคราะห์ปรอทที่ปรับปรุงขึ้นนี้กับเครื่องโคลด์เวเพอร์เจเนเรเตอร์อย่างง่ายของวราตุลและยงยุทธ¹⁸ ที่มีช่วงของการวิเคราะห์ปรอทเท่ากับ 25 - 125 ppb จะเห็นว่าวิธีที่ปรับปรุงขึ้นนี้จะใช้สำหรับวัดปรอทในช่วงความเข้มข้นน้อยๆ ได้ดีกว่า แต่มีช่วงที่แคบกว่า แสดงว่าวิธีที่ปรับปรุงขึ้นจะวัดไม่ได้เมื่อมีปรอทในตัวอย่างความเข้มข้นสูงกว่า 5 ppb ดังนั้นต้องเจือจางตัวอย่างลง



รูปที่ 5 กราฟความสัมพันธ์จากการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วง (range) ของการวิเคราะห์สารหนูและปรอท

2.2 ผลการทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

การทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์สำหรับสารหนู ที่ความเข้มข้น 10 ppb, 30 ppb และ 50 ppb ซึ่งครอบคลุม ค่ามาตรฐานที่กำหนดของสารหนูที่ 3 ppm ($\mu\text{g/g}$) ซึ่งความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายตัวอย่างเท่ากับ 40 ppb พบว่า ค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับ (mean percent recovery, %recovery) ของสารหนู 3 ระดับ อยู่ในช่วง 85.29 - 111.70 มีค่าเฉลี่ยรวมเท่ากับ 93.20 และ ค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% Relative Standard Deviation, %RSD) เท่ากับ 9.06 ส่วนปรอทที่ความเข้มข้น 1.0 ppb, 1.5 ppb และ 2.5 ppb ซึ่งครอบคลุมค่ามาตรฐานที่กำหนดของปรอท ที่ 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ppm) ซึ่งความเข้มข้นสุดท้ายของ

สารละลายตัวอย่างจะเท่ากับ 2 ppb ได้ค่าเฉลี่ย % recovery ของปรอท 3 ระดับอยู่ในช่วง 83.94 - 106.02 มีค่าเฉลี่ยรวม เท่ากับ 93.1 และ %RSD เท่ากับ 7.29 ผลค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับของการวิเคราะห์สารหนูและปรอทอยู่ในเกณฑ์ ยอมรับได้ คืออยู่ในช่วง 80 - 110 ค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบน มาตรฐานสัมพัทธ์ของปรอทอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ คือ ไม่มากกว่า 11 แต่ค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ของสารหนูนั้นมากกว่า 7^{16} ทั้งนี้จะสังเกตพบว่าการทดสอบ ค่าร้อยละของการคืนกลับของสารหนูที่ความเข้มข้นน้อยๆ ค่อนข้างกว้าง โดยค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เฉลี่ยสูงที่ความเข้มข้น 10 ppb

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)

Method Validation	สารหนู (As)	ปรอท (Hg)
1. Linearity and Range		
Equation	$y = 0.0025x + 0.0002$	$y = 0.0166x + 0.0016$
Correlation coefficient (r)	0.9989	0.9987
Range	2.5 - 75 ppb	0.25 - 5.0 ppb
2. Accuracy		
% Recovery	93.20 %	93.10 %
% RSD	9.06 %	7.29 %
3. Precision		
3.1 Repeatability		
% Recovery	93.52 %	87.95 %
% RSD	6.92 %	9.73 %
3.2 Intermediate precision		
% Recovery	88.93 %	86.31 %
% RSD	8.18 %	10.76 %
4. Limit of detection (LOD)	0.978 ppb	0.068 ppb
5. Limit of quantitation (LOQ)	3.259 ppb	0.228 ppb

2.3 ผลการทดสอบความเที่ยง (Precision)

การทดสอบความเที่ยงของวิธี ได้ทำการทดสอบที่ความเข้มข้นที่ค่ามาตรฐานที่กำหนดของแต่ละธาตุ คือ สารหนูที่ 20 ppb และปรอทที่ 1.5 ppb ค่าร้อยละของการคืนกลับ (% recovery) ของสารหนูอยู่ในช่วง 86.92 - 104.57 มีค่าเฉลี่ยรวมเท่ากับ 93.52 และ ค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 6.92 สำหรับปรอทได้ค่าร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) อยู่ในช่วง 82.33 - 97.99 มีค่าเฉลี่ยรวมเท่ากับ 87.95 และค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 9.73 ผลค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับของการวิเคราะห์สารหนูและปรอทอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ คือ อยู่ในช่วง 80 - 110 ค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของสารหนูและปรอทที่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ คือ ไม่มากกว่า 7 และ 11 ตามลำดับ

จากผลการทดสอบความเที่ยงจากนักวิเคราะห์ 2 คนของวิธีวิเคราะห์สารหนู พบว่าค่าร้อยละของการคืนกลับ (% recovery) ของอยู่ในช่วง 78.27 - 104.57 ค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับ เท่ากับ 88.93 และค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 8.18 สำหรับการวิเคราะห์ปรอท พบว่าค่าร้อยละของการคืนกลับ (% recovery)

อยู่ในช่วง 69.07 - 99.60 ค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับ เท่ากับ 86.31 และค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 10.76 ผลค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับของการวิเคราะห์สารหนูและปรอทอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ คือ อยู่ในช่วง 80 - 110 และค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของปรอทนั้นอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ คือน้อยกว่า 11 แต่ค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของสารหนูนั้น ไม่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ คือ มากกว่า 7

2.4 ผลการทดสอบหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) ขีดจำกัดของการวัดปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

จากการทดสอบการทดสอบหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของการวัดปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ) พบว่า สารหนูมีค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) เท่ากับ 0.978 ppb และขีดจำกัดของการวัดปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 3.259 ppb เมื่อเปรียบเทียบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) การวิเคราะห์สารหนูด้วยวิธี GFAAS ที่ปรับปรุงขึ้นนี้กับงานวิจัยของสุภาณี และคณะ¹⁷ โดยมีขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) สารหนูเท่ากับ 2.5 ppb พบว่าวิธีที่ปรับปรุงขึ้นนี้มีค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD)

ดีกว่า แสดงว่าสามารถวัดสารหนูปริมาณน้อยๆ ได้ดีกว่า ส่วนปรอทมีค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) เท่ากับ 0.068 ppb และขีดจำกัดของการวัดปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 0.228 ppb เมื่อเปรียบเทียบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) การวิเคราะห์ปรอทด้วยวิธี CVAAS ที่ปรับปรุงขึ้นนี้กับเครื่องโคลด์เวเพอร์เจเนเรเตอร์อย่างง่ายของ วราดุล และยงยุทธ¹⁸ ที่มีขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) ปรอทเท่ากับ 2.4 ppb พบว่าวิธีที่ปรับปรุงขึ้นนี้สามารถวัดปรอทปริมาณน้อยๆ ได้ดีกว่าเช่นกัน

2.5 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารหนูและปรอทในตัวอย่างและการเปรียบเทียบผลจากการวิเคราะห์ด้วย ICP-MS

การวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยวิธีที่ปรับปรุงแล้ว ผลปรากฏว่าพบปริมาณสารหนูในตัวอย่างซิงเท่ากับ 125.73 ± 8.31 นาโนกรัมต่อกรัม (ng/g) แต่ไม่พบปริมาณสารหนูในตัวอย่างครีมทาหน้า น้ำดื่มและข้าวกล้อง และพบปริมาณปรอทในตัวอย่างครีมทาหน้าเท่ากับ $2,565,069.46 \pm 52,173.31$ ng/g แต่ไม่พบปริมาณปรอทในตัวอย่างซิง น้ำดื่มและข้าวกล้อง เมื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารหนูและปรอทในตัวอย่างเดียวกันด้วยเทคนิค ICP-MS ผลปรากฏว่าพบปริมาณสารหนูในตัวอย่างซิงเท่ากับ 111.56 ± 17.04 ng/g ข้าวกล้อง เท่ากับ 85.88 ± 19.69 ng/g ไม่พบปริมาณสารหนูในตัวอย่างครีมทาหน้าและน้ำดื่ม และปริมาณปรอทในตัวอย่างครีมทาหน้าเท่ากับ $2,745,379.37 \pm 40,997.36$ ng/g แต่ไม่พบปริมาณสารหนูในตัวอย่างน้ำดื่ม ข้าวกล้องและซิง ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์สารหนูและปรอทในตัวอย่างโดยใช้วิธีการที่พัฒนาขึ้นกับการวิเคราะห์ด้วย ICP-MS

ตัวอย่าง	ผลการวิเคราะห์สารหนู (ng/g)		ผลการวิเคราะห์ปรอท (ng/g)	
	วิธีที่ปรับปรุง	ICP-MS	วิธีที่ปรับปรุง	ICP-MS
ครีมทาหน้า	0.0	0.0	$2,565,069.46 \pm 52,173.31$	$2,745,379.37 \pm 40,997.36$
น้ำดื่ม	0.0	0.0	0.0	0.0
ข้าวกล้อง	0.0	85.88 ± 19.69	0.0	0.0
ซิง	125.73 ± 8.31	111.56 ± 17.04	0.0	0.0

เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์สารหนูด้วยวิธีที่พัฒนานี้แล้วกับผลวิเคราะห์ด้วยวิธี ICP-MS พบว่าผลการวิเคราะห์ในตัวอย่างซิงให้ผลสอดคล้องกันและได้ใกล้เคียงกัน และไม่พบสารหนูในตัวอย่างน้ำดื่มและครีมทาหน้าเหมือนกัน ทั้งสองวิธี แต่ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวกล้องนั้นให้ผลต่างกัน โดยตรวจพบสารหนูในข้าวกล้องด้วยวิธี ICP-MS แต่ในตัวอย่างเดียวกันนี้เมื่อตรวจด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นกลับไม่พบสารหนู ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะว่าปริมาณสารหนูที่มีอยู่ในข้าวกล้องนั้นมีน้อยเกินไป จนไม่สามารถตรวจพบสารหนูด้วยวิธี GFAAS ที่ปรับปรุงขึ้นนี้ เมื่อสังเกตจากผลการวิเคราะห์สารหนูในข้าวกล้องด้วยวิธี ICP-MS เท่ากับ 85.88 ng/g และคำนวณหาความเข้มข้นสุดท้ายของสารหนูในสารละลายตัวอย่างจะเท่ากับ 0.86 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ppb) ซึ่งน้อยกว่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD = 0.987 ppb) การวิเคราะห์สารหนูด้วยวิธีที่ปรับปรุงนี้ จึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ตรวจไม่พบ

วิจารณ์

เมื่อเปรียบเทียบขีดจำกัดของการตรวจพบหรือความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOD) เท่ากับ 0.068 ไมโครกรัมต่อลิตร ของวิธีการวิเคราะห์ปรอทที่พัฒนาปรับปรุงขึ้นกับวิธีการเดิมที่มี LOD เท่ากับ 0.067 ไมโครกรัมต่อลิตร¹⁴ นั้น ไม่ต่างกันทั้งนี้เป็เพราะการวัดปริมาณปรอทแต่ละครั้ง ต้องใช้ปริมาณสารตัวอย่างลดลงจากเดิมครึ่งหนึ่ง ทำให้ความเข้มข้นของปรอทในระบบลดลงไปด้วย แต่จากผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation) นี้ จะเห็นว่ามีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ แสดงว่าสามารถนำวิธีการวิเคราะห์ปรอทนี้ไปใช้ตรวจปริมาณการปนเปื้อนของปรอทในครีมทาหน้า สมุนไพร ข้าวและน้ำดื่มได้ ส่วนวิธีการวิเคราะห์สารหนูนั้นยังวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นน้อยๆ ได้ไม่ดี โดยยังมีค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เฉลี่ยสูงจากการวิเคราะห์ตัวอย่าง ทั้งนี้จากการทดสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ ได้ทำการทดสอบที่ความเข้มข้น

ของสารหนูที่ 20 ppb ได้ค่าร้อยละของการคืนกลับ (% recovery) เฉลี่ยเท่ากับ 93.52 และ ค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 6.92 แสดงว่าการวิเคราะห์สารหนูในตัวอย่างปริมาณมากกว่า 20 ppb ยังพอทำได้ ซึ่งครอบคลุมค่ามาตรฐานที่กำหนดของสารหนูในสมุนไพรที่ 4 ppm ($\mu\text{g/g}$) ซึ่งความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายตัวอย่างจะเท่ากับ 40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ppb) และหากต้องวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีสารหนูปริมาณน้อยกว่านี้ ก็จำเป็นต้องมีการปรับปรุงและพัฒนาอีก เช่น การเพิ่มปริมาณสารตัวอย่างเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารหนู การเพิ่มจำนวนซ้ำในการวิเคราะห์เพื่อลดค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) อาจเปลี่ยนวิธีการเตรียมตัวอย่างเป็นแบบ dry ash หรือใช้วิธี microwave digestion เพื่อลดสิ่งเจือปน (matrix) ที่ทำให้เกิดการรบกวนการวัดสารหนู เป็นต้น

กิตติกรรมประกาศ

ผลงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปี 2559

เอกสารอ้างอิง

1. สถาบันอาหาร กระทรวงอุตสาหกรรม, สารหนู, [cite 2016 July 16] Available from: http://www.nfi.or.th/foodsafety/upload/damage/pdf/arsenic_2.pdf.
2. Olivero J. Mercury in the aquatic environment of the village of Caimito at the Mojana region, north of Columbia, Water Air and Soil Pollution 2005;159:409-20.
3. แวตดา ทองระอา. การเปลี่ยนรูปแบบของสารปรอทในดินตะกอนบริเวณปากแม่น้ำบางปะกงและความเป็นพิษของสารปรอทเมื่อได้รับอิทธิพลจากความเค็ม. จุลสารสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเลมหาวิทยาลัยบูรพา 2546;14:1-4.
4. ณรงค์ ญ เชียงใหม่ และ อรุณโชติ คงพล. ปริมาณสารปรอทในปลาจากทะเลสาบสงขลา. วารสารสงขลานครินทร์ 2530;9:237-40.
5. จิราภรณ์ อ่ำพันธ์, อันตรายจากปรอท, [cite 2016 July 16] Available from: http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_toxic/a_tx_1_001c.asp?info_id=79.
6. Hishida K. Mina-Mata and Itai-Itai, Look Japan 1987;33:26.
7. โยธิน เบญจวัง, ชาญพงศ์ ตั้งคณะกุล และ มาลี เซ็นเสถียร. ตำราอายุรศาสตร์ทั่วไป. เรือนแก้วการพิมพ์. กรุงเทพฯ 2535
8. Bakir F, Al-Khalidi A, Clarkson TW and Greenwood R. Clinical observations on treatment of alkylmercury poisoning in hospital patients. In conference on intoxication due to Alkylmercury-treated seed. Bull. W.H.O. 1976;53(Suppl.):87-92.
9. อัจฉราพรรณ ดันดีปัญญพร และ พลังพล คงเสรี. สารปรอทปริมาณสูงในครีมหน้าขาวและการทดสอบเบื้องต้น, [cite 2016 July 16] Available from: <http://www.sc.mahidol.ac.th/usr/?p=320>.
10. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง หลักเกณฑ์การพิจารณาขึ้นทะเบียนตำรับยาแผนโบราณเกี่ยวกับมาตรฐานการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และโลหะหนัก. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 121 ตอนพิเศษ 43 ง. 2547 (ลงวันที่ 21 มิถุนายน 2547).
11. นันทนา สิทธิชัย, 2547, มาตรฐานของสมุนไพรในตำรามาตรฐานของสมุนไพรไทย. วารสารสมุนไพร, 11. 21-32.
12. สมภพ ประธานธรรักษ์, วัตถุดิบสมุนไพรที่มีคุณภาพ: กรณีศึกษาขมิ้นชัน. ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, [cite 2016 July 16] Available from: <http://www.abhaiherb.com/download/turmaric/sawanaT6.pdf>.
13. สุมลธา หนูคาบแก้ว, นุชนาถ รังคดิถก และ จุฑามาศ สัตยวิวัฒน์. การประเมินปริมาณธาตุในตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพรในประเทศไทย 31st STT at Suranaree University of Technology 2548.
14. เฉลิม จันทรสม, วนิดา จันทรสม และ จิตตรา ดอกบัว. การพัฒนาเครื่องโคลด์เวเปอร์อะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรมิเตอร์. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 2560;25:1060-71.
15. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). Geneva: ICH Steering Committee 2005.

16. AOAC. Peer Verified Methods Program. Manual on Policies and Procedures, Arlington VA. 1995.
17. สุภาณี ดวงธีรปรีชา, จิราณูช แจ่มทวีกุล, ประภาพรณ สุขพรรณ และ ปรัชญาพร อินทองแก้ว. การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ สารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ในยาจากสมุนไพร โดยวิธี Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2558; ฉบับพิเศษ 1:20-33.
18. วราตุล ฉัตรทอง และ ยงยุทธ ตัณฑุลเวสส. การพัฒนาเครื่องโคลเวเพอร์เจเนเรเตอร์อย่างง่ายเพื่อหาปริมาณปรอทในตัวอย่าง. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 2555;28:59-74.

Abstract

Development and Validation of Analytical Methods for Arsenic and Mercury Determination by Atomic Absorption Spectrophotometry

Chalerm Jansom, Vanida Jansom

Research Administrative Office, Faculty of Medicine, Thammasat University

Introduction: Arsenic (As) and mercury (Hg) are contaminants in soil and water. Crops in or close to contaminated sites can uptake and accumulate these metals and then exert potential risk to humans. This research aimed to develop and validate the analytical methods for As and Hg.

Methods: The As was determined by graphite furnace atomic absorption spectrophotometry (GFAAS), and Hg was determined by an in-house developed cold vapor atomic absorption spectrophotometry (CVAAS) method. The bottled water, rice, ginger and whitening cream as samples were prepared by wet digestion. Validation was performed according to the International Committee on Harmonization (ICH) Guidelines.

Results: The proposed method permitted the determination of As and Hg in the ranges of 2.5 - 75 micrograms per liter and 0.25 - 5.0 micrograms per liter, respectively, with correlation coefficients greater than 0.995. The limits of detection (LOD) were found to be 0.978 micrograms per liter and 0.068 micrograms per liter for As and Hg, respectively, while the limits of quantitation (LOQ) were found to be 3.26 micrograms per liter and 0.23 micrograms per liter for As and Hg, respectively. Mean percentage recoveries were in the range of 80 - 110 while percentage relative standard deviations (%RSD) were slightly more than 7 for As and less than 11 for Hg. The Hg results of all samples were consistent with analysis by an inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS).

Conclusion: The As method was not suitable for trace amounts of As in samples (less than 20 micrograms per liter) and need more development. The Hg method was successfully applied to the study of Hg contamination in food, herbal medicines and cosmetics.

Keywords: Arsenic, Mercury, Atomic absorption spectrometer