การวิเคราะห์สารหนูในรูปต่างๆ ในปัสสาวะ ด้วยเครื่องแยกไอออนและวิเคราะห์มวลสารในสภาวะของเหลว

ผู้จัดทำ กานติมา สิทธิเหล่าถาวร, รพีพร สุคนธปฏิภาค

บทนำ

สารหนู (Arsenic) เป็นธาตุกึ่งโลหะที่พบได้ในรูปธาตุบริสุทธิ์ หรือในรูปของสารประกอบอินทรีย์ของสารหนู และสารประกอบอนินทรีย์ของสารหนู สารหนูและสารประกอบของสารหนูส่วนใหญ่นั้นมีพิษร้ายแรง ก่อให้เกิดอาการต่อระบบร่างกายแทบทุกระบบ เช่น ระบบทางเดินอาหาร ระบบประสาท ระบบผิวหนัง ระบบหัวใจ และหลอดเลือด หากเราได้รับสารหนูในปริมาณสูงแบบเฉียบพลันสามารถทำให้เสียชีวิตได้ เราสามารถพบสารหนูปนเปื้อนอยู่ได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เช่น ปนเปื้อนในดิน แหล่งน้ำ จากน้ำดื่ม น้ำบ่อบาดาล น้ำเสียจากเหมืองแร่ดีบุก เหมืองทอง ในอาหาร เช่นข้าว อาหารทะเล ในยาลูกกลอน บุหรี่ หรือสมุนไพรที่ไม่ได้มาตรฐาน นอกจากนี้การปนเปื้อนในอากาศของสารหนู สามารถเกิดขึ้นได้หากมีการเผาไหม้ผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม หรือถ่านหินจากแหล่งที่มีสารหนูปนเปื้อนอยู่

สารประกอบอนินทรีย์ของสารหนู จะมีความเป็นพิษมากกว่าสารประกอบอินทรีย์ของสารหนู อะตอมของสารหนูนั้นจะพบได้อยู่ 2 Valencies คือแบบ Trivalent หรือ As (III) ซึ่งจะเรียกสารประกอบสารหนูพวกนี้ว่า อาร์เซไนต์ (Arsenite) และแบบ Pentavalent หรือ As (V) ซึ่งจะเรียกสารประกอบสารหนูพวกนี้ว่า อาร์เซเนต (Arsenate) สารประกอบของสารหนูในรูป As (III) มักจะมีพิษมากกว่าในรูป As (V)

เนื่องจากสารหนูจัดว่าเป็นสารแปลกปลอมในร่างกาย เราจึงสามารถนำการตรวจระดับสารหนูในร่างกายมาใช้เป็นการตรวจตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการทำงานที่ต้องสัมผัสสารหนูได้ โดยองค์กร ACGIH แนะนำให้ทำการตรวจระดับสารหนูในปัสสาวะแต่ไม่แนะนำให้ทำการตรวจระดับสารหนูในเลือด เนื่องจากปกติแล้วสารหนูจะดูดซึมเข้าสู่ร่างกายและถูกกำจัดออกไปอย่างรวดเร็ว ทำให้ระดับสารหนูในเลือดมักจะลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากดูดซึมเข้าสู่ร่างกายแล้ว ดังนั้นค่าที่ตรวจได้จึงมักมีความผิดพลาดสูง

การตรวจหาระดับสารหนูในปัสสาวะ นิยมตรวจด้วยวิธีการตรวจระดับสารหนูอนินทรีย์ และเมตาบอไลท์ที่เกิดขึ้นโดยตับ การตรวจนี้จะทำการตรวจแยกดูเฉพาะระดับสารหนูในรูปสารประกอบอนินทรีย์ทั้งหมดกับสารหนูในรูปสารประกอบอินทรีย์ ได้แก่ Monomethylarsonic acid (MMA), Dimethylarsinic acid (DMA), Arsenosugars, arsenobetaine (AsBt) และ Arsenocholine (AsC) โดยระดับความเป็นพิษจะขึ้นกับรูปฟอร์มที่เกิดขึ้น ซึ่งสารหนูในรูปเหล่านี้เกิดขึ้นจากกระบวนการเมตาบอไลซ์สารหนูอนินทรีย์ในร่างกายของมนุษย์ การตรวจด้วยวิธีนี้จะช่วยลดปัญหาการเกิดผลที่ผิดพลาดอันเนื่องจาก สารประกอบอินทรีย์ของสารหนูในกลุ่ม Arsenobetaine ที่พบในอาหารทะเลได้ เช่น ในเนื้อปลา (Fish) กุ้ง ปู (Shellfish) หอย (Mollusk) สาหร่ายทะเล (Seaweed) และซูชิ (Sushi) ซึ่งเป็นสารหนูในรูปสารประกอบอินทรีย์ที่ไม่มีข้อมูลว่ามีความเป็นพิษ

ในกระบวนการเมตาบอลิสม ของสารประกอบอนินทรีย์ของสารหนูในร่างกายมนุษย์นั้น สารประกอบในรูป As (V) จะสามารถเปลี่ยนแปลงแบบกลับไปมาเป็นสารประกอบในรูป As (III) ได้ สารประกอบในรูป As (III) จะถูกเปลี่ยนแปลงด้วยปฏิกิริยา Methylation เป็นสาร MMA และจากนั้นสาร MMA จะเปลี่ยนแปลงเป็นสาร DMA เป็นลำดับสุดท้าย ซึ่งสารเหล่านี้ทุกชนิดจะถูกขับออกจากร่างกายทางปัสสาวะ โดยจะขับออกมาในรูปสาร DMA มากที่สุด ลำดับความเป็นพิษของสารหนูจากมากไปน้อย สามารถเรียงลำดับได้ดังนี้

AsH3 > As (III) > As (V) > MMA > DMA > AsBt, AsC

โดยค่ามาตรฐานที่องค์กร ACGIH กำหนดไว้คือ ไม่เกิน 35 µg As/L ในการศึกษารูปฟอร์มของสารหนู โดยทั่วไป มีขั้นตอนหลักที่สำคัญ 3 ขั้นตอน

การเตรียมตัวอย่าง

ถือว่าเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญมากที่สุด เนื่องจากจะมีโอกาสที่จะเกิดความผิดพลาด ที่อาจเกิดจากการสุ่มตัวอย่างที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน การปนเปื้อน การระเหยเป็นไอ หรือการเปลี่ยนรูปฟอร์มมีสูงมากกว่าขั้นตอนอื่น ๆ โดยในการเตรียมตัวอย่างควรเลือกวิธีในการเตรียมตัวอย่างที่มีประสิทธิภาพ สามารถคงสภาพของรูปฟอร์มเดิมไว้ได้

ซึ่งการเปลี่ยนรูปฟอร์มของสารหนูอาจเกิดขึ้นได้ เนื่องจากค่าศักย์ไฟฟ้าหรือค่า pH ที่เปลี่ยนไป และในการเลือกใช้เครื่องมือทันสมัยในการสกัด ต้องคำนึงถึงความเป็นไปได้ในการเปลี่ยนฟอร์มของสารหนู โดยตัวสกัดที่เลือกใช้จะขึ้นอยู่กับสภาพขั้วของรูปฟอร์มของธาตุ และวิธีที่ใช้ในการสกัด ซึ่งวิธีการสกัดอาจไม่สามารถใช้ได้ครอบคลุมในตัวอย่างทุกเมทริกซ์ เช่น หากมีการใช้ trifluoroacetic acid (TFA)/ alkaline solubilization ในการสกัด รีเอเจนต์ตัวนี้จะมีผลต่อการเปลี่ยน oxidation state ของสารหนูอนินทรีย์ที่สกัดออกมาได้ โดย As(V) ถูกรีดิวซ์เป็น As(III)

การแยกรูปฟอร์มของสารหนู

การวิเคราะห์รูปฟอร์มทางเคมีของสารหนู มักจะใช้เป็นเทคนิคคู่ควบ ซึ่งจะเป็นการนำเอาเทคนิคการแยกและการตรวจวัดรวมเข้าด้วยกัน การใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟีเชื่อมต่อกับ Inductively coupled plasma - mass spectrometry (ICP-MS) มักจะใช้เป็นเครื่องมือ ในการวิเคราะห์รูปฟอร์มของสารหนูได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากมีความง่าย เชื่อถือได้ และให้ผลที่มีความเที่ยง โดยเทคนิคการแยกสารแบบโครมาโตกราฟีนั้นจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องใช้ระบบที่ปราศจากไอออนรบกวน เพื่อประสิทธิภาพในการวิเคราะห์สารหนูที่มีลักษณะเป็นทั้งธาตุบริสุทธิ์ และรูปแบบสารประกอบอนินทรีย์ เครื่องมือโครมาโตกราฟีที่ปราศจากการรบกวนของไอออน จะส่งผลให้มีประสิทธิภาพในการแยกดี รวดเร็ว และสามารถทวนซ้ำได้ โดยเทคนิคทางโครมาโตกราฟีที่นำมาใช้ได้จำเป็นต้องปรับเปลี่ยนวัสดุส่วนที่สัมผัสกับของเหลว ให้ปราศจากโลหะหรือแก้วทั้งหมด เพื่อป้องกันการเกิดไอออนรบกวน ปัจจุบันถูกเรียกว่า Ion Chromatography (IC) เทคนิค IC เมื่อเทียบกับ Liquid Chromatography จะให้ความจำเพาะของปฏิกิริยา และความจำเพาะเจาะจงที่มากขึ้นสำหรับสารประกอบไอออนิก การไหลของเฟสเคลื่อนที่จะปราศจากโลหะ ซึ่งจะช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนของคอลัมน์ในการแลกเปลี่ยนไอออน นอกจากนี้เทคนิค IC สามารถแยกสารออกเป็น Anion และ Cation ซึ่งทำให้เกิดความจำเพาะต่อไอออนได้อีกทางหนึ่ง

การตรวจวัดรูปฟอร์มของสารหนู

การตรวจวัดรูปฟอร์มของสารหนูจำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่สามารถตรวจวัดธาตุได้อย่างจำเพาะ และให้ความไวในการวิเคราะห์ที่ดีมาก ซึ่งจะเป็นปัจจัยที่สำคัญมากในการเลือกวิธีในการตรวจวัด ถึงแม้ว่าจะมีเครื่องมือตรวจวัดที่ต่อเชื่อมกับเทคนิคทางโครมาโทกราฟีได้ เช่น Flame atomic absorption spectrometry (FAAs), Graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAs), Atomic fluorescence spectrometry (AFs) แต่การใช้ ICP-MS มักจะถูกเลือกมาใช้งานเนื่องจากไม่เพียงแต่ให้ขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of Detections, LODs) ที่ดีในระดับนาโนกรัมต่อกรัม แต่ยังสามารถตรวจวัดได้หลายธาตุ และหลายไอโซโทปได้ในเวลาเดียวกัน โดยในงานนี้ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารหนูทั้งหมด และในรูปของสารอินทรีย์และอนินทรีย์ทั้งหมด 5 ฟอร์ม ได้แก่ As (III), As (V), MMA, DMA, AsB ด้วยเครื่องแยกไอออนและวิเคราะห์มวลสารในสภาวะของเหลว Ion Chromatography (IC) ควบคู่กับ Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS) ยี่ห้อ Thermo Scientific และเปรียบเทียบโครมาโทรแกรมจากการใช้คอลัมน์เฉพาะระหว่าง IC และ HPLC เมื่อทำงานร่วมกับ ICPMS

ขั้นตอนการวิเคราะห์

รูปที่ 1 แสดงเครื่อง ICP-MS และ IC
ผลิตภัณฑ์ Thermo Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา

พารามิเตอร์	Value
IC Column	Ion PAC AS7, 2x250 mm (Dionex)
HPLC Column	PRP-X100, 4.1x250 mm (Hamilton)
Injection	25 µL
Eluents	A) 2 mM $(NH_4)_2CO_3$ in 1% CAN B) 600 mM $(NH_4)_2CO_3$
Type	Gradient
Flow Rate	0.7 mL/min

ตารางที่ 1 แสดงการตั้งค่าการตรวจวิเคราะห์ของ IC โดยเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์โดยใช้คอลัมน์ IC และ HPLC

ขั้นตอนที่ 1) หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยก As ในรูปฟอร์มต่าง และทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบจากการใช้คอลัมน์ IC, Dionex Ion Pac AS7 เทียบกับคอลัมน์ HPLC, PRP-X100 ที่สภาวะเดียวกัน

ขั้นตอนที่ 2) วิเคราะห์หาปริมาณสารหนูในแต่ละรูปฟอร์ม โดยการเตรียมสารมาตรฐานของ Arsenic ได้แก่ Arsenic III (As3+), Monomethylarsonic acid (MMA), Dimethylarsinic acid (MMA), Arsenobetaine (AsBt) และ Arsenic V (As5+) โดยเตรียมใน Base urine เจือจาง 10 เท่าที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงแล้ว โดยเตรียมความเข้มข้น 0-50 µg/mL ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง RM Urine Control, ยี่ห้อ ClinCheck® - Control, PT Intercomparison program 63, D-91054 Erlangen, Germany

ขั้นตอนที่ 3) วิเคราะห์หาสารหนูรวม (Total As) ในตัวอย่างปัสสาวะ PT Intercomparison program 63, D-91054 Erlangen, Germany โดยสร้างกราฟมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 0-50 µg/L

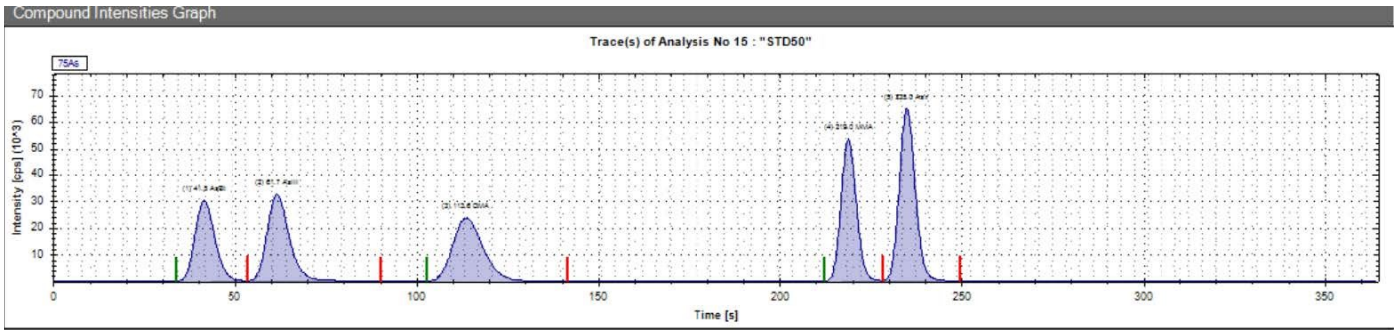
ในการเตรียมตัวอย่าง RM Urine Control, ยี่ห้อ ClinCheck® - Control, PT Germany และตัวอย่างปัสสาวะ นำตัวอย่างมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น 10 เท่า ทำการผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงและกรองผ่านเมมเบรนฟิลเตอร์ชนิดไนลอนหรือเซลลูโลสอะซิเตทขนาด 0.45 µm จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค IC ต่อพ่วงกับ ICP-MS

พารามิเตอร์	Value
Pump Tubing	Viton
Spray Chamber	Quartz, Cyclonic 27 °C
Nebulizer	Glass, Concentric
Injection Type; ID	Quartz 2.5 มม.
Interface	Ni Cone with High Matrix insert
RF Power	1,550 W
Cool Gas Flow	14 L/min
Aux Gas Flow	0.8 L/min
Neb Gas Flow	1.045 L/min
KED	Helium (99.999%) 4.8 mL/min

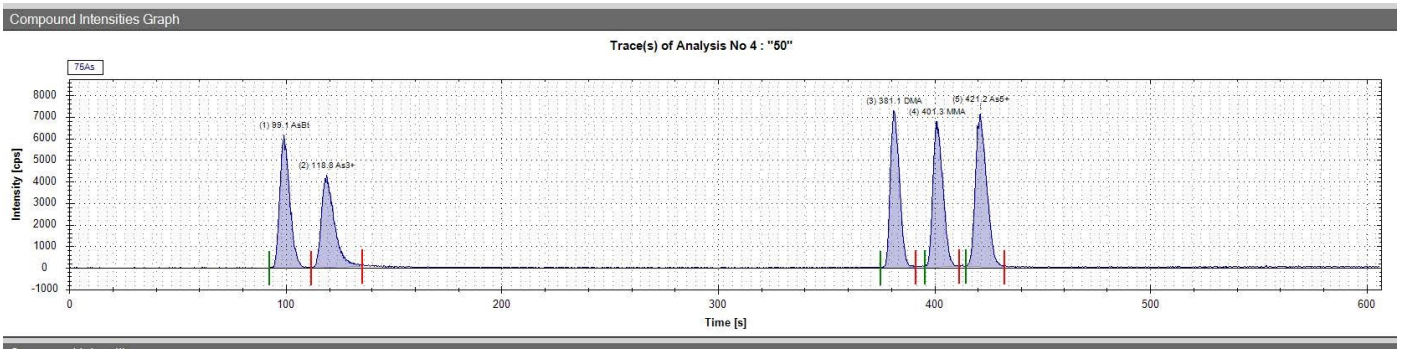
ตารางที่ 2 แสดงการตั้งค่าเครื่อง ICP-MS

ผลการวิเคราะห์

ขั้นตอนที่ 1) การวิเคราะห์สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหาสารหนูในแต่ละรูปฟอร์ม โดยเปรียบเทียบการใช้คอลัมน์ IC เทียบกับคอลัมน์ HPLCผลของโครมาโทรแกรมแสดงดังรูป



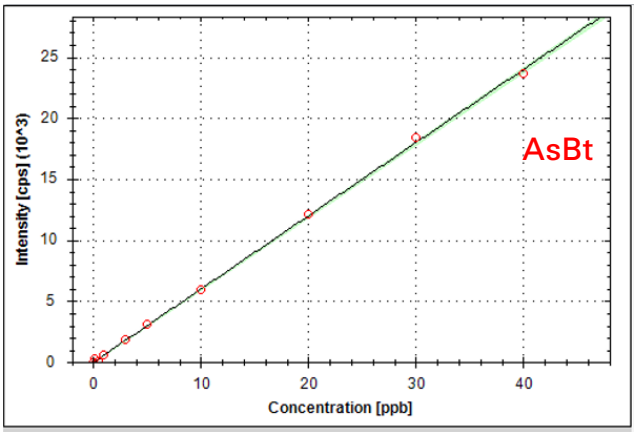
ภาพที่ 2 แสดงโครมาโตแกรมของสารหนูทั้ง 5 ฟอร์ม แยกผ่านคอลัมน์ Ion PAC AS7



ภาพที่ 3 แสดงโครมาโตแกรมของสารหนูทั้ง 5 ฟอร์ม แยกผ่านคอลัมน์ PRP-X100

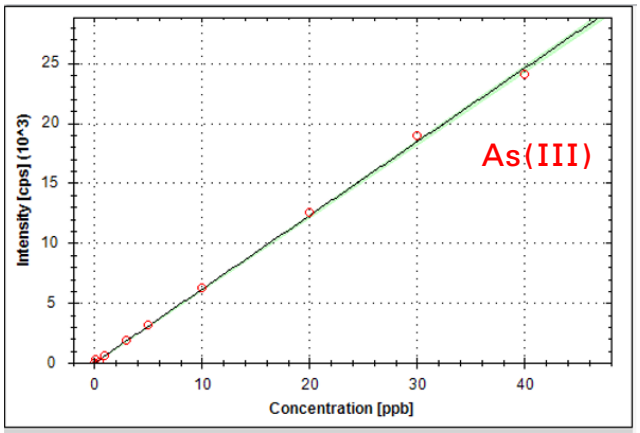
จะเห็นว่าโครมาโทแกรมที่ได้จากคอลัมน์ IC เมื่อเปรียบกับ HPLC พีคที่ได้มีความสมมาตร (Gaussian shape) กว่า และใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่รวดเร็วกว่า โดยสารหนูทั้ง 5 ฟอร์ม ใช้เวลาในการวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ IC น้อยกว่า 300 วินาที

ขั้นตอนที่ 2) การวิเคราะห์สารหนูในแต่ละรูปฟอร์ม ด้วยเทคนิค IC ควบคู่กับ ICP-MS แสดงกราฟมาตรฐานของสามาตรฐานของสารหนูในแต่ละฟอร์ม ตัวอย่างผลโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน และผลการวิเคราะห์ตัวอย่าง ClinCheck® - Control และ PT D-91054 Erlangen, Germany



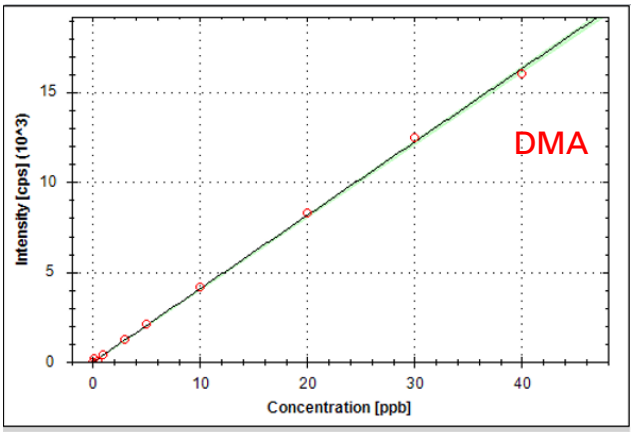
f(x) = b*x + a

Parameter	Value	Confidence Delta at 90	StdErr	Rel. StdErr [%]
b	599.617	+/-5.493	3.972	0.662
a	3.328	+/-0.000	0.000	0.000
R^2	0.999			
BEC	0.006 ppb			



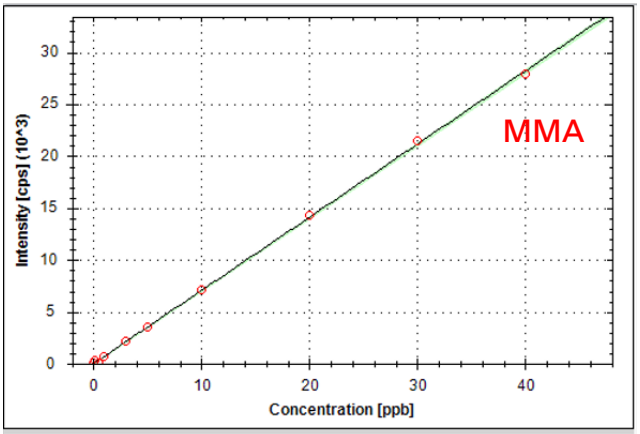
f(x) = b*x + a

Parameter	Value	Confidence Delta at 90	StdErr	Rel. StdErr [%]
b	614.197	+/-7.065	5.108	0.832
a	0.000	+/-0.000	0.000	NaN
R^2	0.999			
BEC	0.000 ppb			



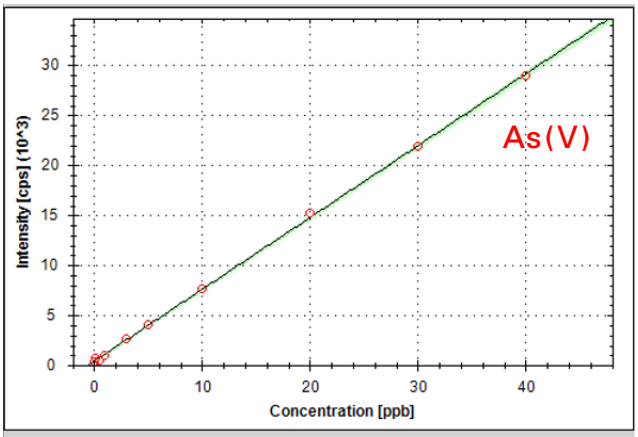
f(x) = b*x + a

Parameter	Value	Confidence Delta at 90	StdErr	Rel. StdErr [%]
b	407.662	+/-4.101	2.965	0.727
a	0.000	+/-0.000	0.000	NaN
R^2	0.999			
BEC	0.000 ppb			



f(x) = b*x + a

Parameter	Value	Confidence Delta at 90	StdErr	Rel. StdErr [%]
b	704.412	+/-5.361	3.877	0.550
a	39.078	+/-0.000	0.000	0.000
R^2	1.000			
BEC	0.055 ppb			



f(x) = b*x + a

Parameter	Value	Confidence Delta at 90	StdErr	Rel. StdErr [%]
b	718.033	+/-7.398	5.297	0.738
a	427.593	+/-128.895	92.279	21.581
R^2	1.000			
BEC	0.596 ppb			

รูปที่ 5 แสดงโครมาโตแกรมของสารหนูทั้ง 5 ฟอร์ม

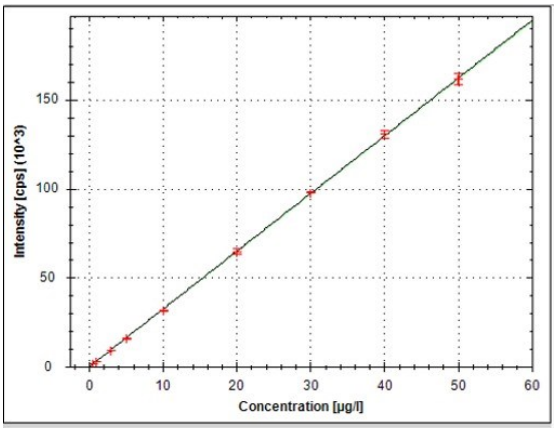
ฟอร์ม	ค่าที่วิเคราะห์ได้ (µg/L)	ค่า Certified (µg/L)
AsBt	30.98	23.0 - 34.6
As(III)	N.D	N.D
DMA	44.97	32.6 - 54.3
MMA	7.98	5.03 - 8.38
As(V)	30.04	25.4 - 42.3

ตารางที่ 3 แสดงผลการวิเคราะห์สารหนูแต่ละฟอร์มในตัวอย่างปัสสาวะ RM Urine Control, ยี่ห้อ ClinCheck® - Control

ฟอร์ม	ค่าที่วิเคราะห์ได้ (µg/L)	ค่า Certified (µg/L)
AsBt	N.D	N.D
As(III)		
#A	1.8	1.0 - 2.2
#B	13.9	8.4 - 15.6
DMA		
#A	9.8	6.3 - 12.3
#B	97.8	77.8 - 107.8
MMA		
#A	2.9	1.4 - 3.2
#B	22.6	15.6 - 25.8
As(V)		
#A	5.2	2.3 - 5.9
#B	37.4	21.9 - 38.1

ตารางที่ 4 แสดงผลการวิเคราะห์สารหนูแต่ละฟอร์มในตัวอย่างปัสสาวะ PT Intercomparison programme 63, D-91054 Erlangen, Germany

ขั้นตอนที่ 3) การวิเคราะห์ปริมาณสารหนูรวม (Total As) Isotope 75 ด้วยเครื่อง iCAP RQ ICPMS โดยกำจัด Polyatomic ด้วยแก๊ส He กราฟมาตรฐานที่ได้แสดงดังรูป 6



f(x) = b*x + a

Parameter	Value	Confidence Delta at 90	StdErr	Rel. StdErr [%]
b	3,240.968	+/-11.095	8.023	0.248
a	25.333	+/-0.000	0.000	0.000
R^2	1.000			
BEC	0.008 µg/l			
IDL(LOD)	0.005 µg/l			

ตารางที่ 6 แสดงกราฟมาตรฐานของ ^{75}As

Total As	ค่าที่วิเคราะห์ได้ (µg/L)	ค่า Certified (µg/L)
A	104.6	75.2 - 105.2
B	182.5	145.8 - 196.2

ตารางที่ 7 แสดงผลการวิเคราะห์ Total As ในตัวอย่าง PT Intercomparison programme 63, D-91054 Erlangen, Germany

สรุปผลการวิเคราะห์

การวิเคราะห์นี้ ได้แสดงให้เห็นความสามารถของเทคนิคต่อพ่วงระหว่าง IC กับ ICP-MS ในการแยกสารหนูแต่ละฟอร์มในตัวอย่างปัสสาวะ โดยสามารถแยกได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีความถูกต้อง ง่าย และรวดเร็ว และเมื่อเปรียบเทียบการใช้คอลัมน์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับ IC จะพบว่าโครมาโตแกรมที่ได้มีความสมมาตร และสามารถแยกสารหนูแต่ละฟอร์มออกจากกันได้ดีกว่าและใช้เวลาน้อยกว่า

ติดตามแอพพลิเคชั่นอื่น ๆ ได้ที่ https://www.scispec.co.th

SciSpec

บริษัท ซายน์ สเปค จำกัด
10 กาญจนาภิเษก ซอย 0010 แยกสอง
เขตบางแค กทม. 10160
โทร 02-454-8533

/scispec
@scispec

ThermoFisher SCIENTIFIC