

Arsenic Speciation Applications using IC and ICP-MS

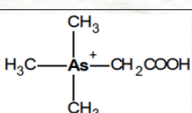
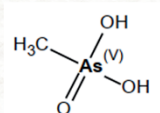
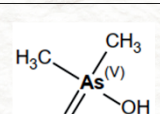
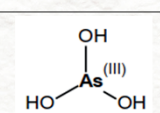
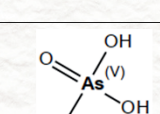
TECHNICAL NOTE

Introduction

Speciation analysis คือ การตรวจวัดรูปแบบทางเคมีของธาตุในรูปแบบต่างๆ หรือที่เรียกว่า “สปีชีส์ของธาตุ” โดยวิธีการนี้เป็นวิธีการที่ตรวจสอบธาตุและโลหะหนักปริมาณน้อย ยกตัวอย่างเช่น สารหนู (Arsenic, As) ที่มีทั้งรูปแบบของอินทรีย์ เช่น Arsenobetaine (AB), Monomethylarsonate (MMA) และ Dimethylarsenate (DMA) ซึ่งพบได้ทั่วไปในอาหารทะเล ในช่วง 1-25 µg/Asg. และรูปแบบอนินทรีย์ซึ่งมีความเป็นพิษมากกว่า ได้แก่ Arsenite, As (III) และ Arsenate, As (V) โดยองค์การอนามัยโลก (WHO) กำหนดปริมาณของสารหนูทั้งหมดในรูปของอนินทรีย์ต้องไม่เกิน 2 µg/kg น้ำหนักตัว การตรวจระดับสารหนูในร่างกายสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการทำงานที่ต้องสัมผัสสารหนูได้ โดยการตรวจสารหนูควรตรวจในปีสภาวะมากกว่าในเลือด เนื่องจากปกติแล้วสารหนูจะดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย และถูกกำจัดออกไปได้อย่างรวดเร็ว ทำให้ระดับสารหนูในเลือดลดลงหลังจากดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย ผลที่ได้จากเลือดจึงมีความผิดพลาดสูง

การศึกษาหรือตรวจวัดรูปแบบทางเคมีของธาตุไม่ว่าจะเป็นตัวอย่างทางด้านอาหาร น้ำดื่ม ทางคลินิก ทางด้านยา และ อุตสาหกรรม นิยมใช้เทคนิคการแยกทางโครมาโตกราฟี (Chromatography) ได้แก่ LC, IC หรือ GC ร่วมกับเทคนิคการตรวจวัดอย่าง Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry (ICP-MS) เนื่องจากให้ผลการทดสอบที่มีประสิทธิภาพสูง มีความถูกต้อง เทียบตรง สะดวกรวดเร็ว และน่าเชื่อถือ โดยกระบวนการแยกสารแบบโครมาโตกราฟีจำเป็นต้องปราศจากไอออนรบกวน ซึ่งต้องมีการปรับเปลี่ยนวัสดุที่สัมผัสกับของเหลวเป็น Polyether ether ketone (PEEK) ที่ปราศจากโลหะ เพื่อประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ธาตุที่มีลักษณะเป็นทั้งธาตุบริสุทธิ์และธาตุในรูปสารประกอบอนินทรีย์

ตารางที่ 1 แสดงรูปแบบฟอร์มต่างๆ ของสารหนู (Arsenic)

Name	Aberration	Structural formula	pKa
Arsenobetaine	AB		-
Monomethyl arsonic acid	MMA		4.1, 8.7
Dimethylarsinic acid	DMA		6.2
Arsenous (III) acid (arsenite)	As (III)		9.2, 12.1, 13.4
Arsenic (V) acid (arsenate)	As (V)		2.2, 7.0, 11.5

- Urine
- Speciation
- ICS6000
- iCAP RQ plus

KEYWORDS



Ion Chromatography (IC)

เป็นเทคนิคการแยกสารแบบแลกเปลี่ยนไอออนของสารกับตัวแลกเปลี่ยนไอออน (ion-exchanger) ด้วยประจุตรงข้าม และทำการชะสารด้วยบัฟเฟอร์ที่มี pH หรือมี ionic strength ต่างๆ โดยสารที่ยึดติดกับตัวแลกเปลี่ยนไอออนด้วยแรงอ่อนๆจะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ก่อน ซึ่งวัสดุส่วนที่สัมผัสกับของเหลวทั้งหมดในเทคนิค IC นั้น จะปราศจากโลหะหรือแก้ว ไม่ว่าจะเป็นท่อ นำของเหลว ส่วนประกอบของปั๊ม เข็มดูดจ่ายสารละลาย ระบบวาล์ว และระบบฉีดสารอัตโนมัติ เพื่อให้ระบบปราศจากการรบกวนของไอออนทั้งหมด ส่งผลให้การแยกนี้มีประสิทธิภาพสูง มีความจำเพาะต่อปฏิกิริยาสูง และสามารถทนซ้ำได้อย่างแม่นยำ นอกจากนี้เทคนิค IC มีการรบกวนจากแบกกราวด์ (Background) ต่ำ ทำให้ สามารถแยกสารออกเป็น anion หรือ cation ได้ โดยการเปลี่ยนรูปฟอร์มหรือสปีชีส์ของสารหนูจะใช้แอมโมเนียมคาร์บอเนต เป็นสารละลายชะ (Mobile phase) โดยเมื่อเข้าสู่พลาสมาจะถูกเปลี่ยนเป็น NO₂, H₂O และ CO₂ ในรูปของแก๊สทั้งหมด วิธีนี้จะช่วยลดการอุดตันที่บริเวณของ Cone ในเครื่อง ICP-MS ได้เป็นอย่างดี ด้วยเทคนิค IC นี้ทำให้ลักษณะของพีคที่แยกได้มีความแหลมคม (narrow peak shapes) และให้ signal to-noise ratios ที่ดี อีกทั้งระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสารที่คงที่ ส่งผลให้การทำซ้ำในการตรวจวัดระยะยาวมีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค HPLC ที่นิยมใช้สารละลายฟอสเฟตเป็นบัฟเฟอร์ โดยสารละลายฟอสเฟตเป็นหนึ่งในสาเหตุที่ทำให้ระบบ Cone ใน ICP-MS เกิดการอุดตันและการเสื่อมสภาพได้ง่าย ทำให้จำเป็นต้องมีการถอดทำความสะอาดหรือเพิ่มความถี่ในการเปลี่ยนอุปกรณ์มากขึ้น หรืออาจจะต้องใช้ Cone ที่มีคุณสมบัติที่ทนทานต่อเมทริกซ์ซับซ้อนได้ดีกว่า อย่างเช่น Pt-tipped ซึ่งมีราคาสูง และในการตรวจวัดระยะยาวจะส่งผลต่อประสิทธิภาพของคอลัมน์ได้ เช่น เกิด Sensitivity drop และ drift ของ Peak Retention Time ซึ่งทำให้ต้องเปลี่ยนคอลัมน์ไวยิ่งขึ้น

โดยทั่วไปในตัวอย่างปัสสาวะจะมีส่วนประกอบของคลอรีนสูง ทำให้เกิด polyatomic isobaric interference รบกวนในการตรวจวิเคราะห์ใน ICP-MS โดยจะฟอร์มในรูปของ 40Ar35Cl+ ซึ่งมีมวลเท่ากับ 75As ที่สนใจเครื่อง iCAP RQ plus มี Collision/Reaction Cell (CRC) โดยการใช้แก๊สเฉื่อย (He-KED) ร่วมกับเทคโนโลยี Automatic low mass cutoff เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัด polyatomic interference ส่งผลให้ผลการวิเคราะห์มีความถูกต้องแม่นยำสูง และลดสัญญาณ background ได้ต่ำลง

ในงานนี้จะทำการหาคอนดิชันที่เหมาะสมในการแยกรูปฟอร์มของสารหนู (As) ทั้งหมด 5 รูปที่มักพบได้ในตัวอย่างปัสสาวะ (Urine) ด้วยเครื่อง Ion-Chromatography (IC) ร่วมกับเครื่อง Inductive Coupled Plasma - Mass spectrometer (CP-MS) ยี่ห้อ ThermoScientific

Sample Analysis

เตรียมตัวอย่างปัสสาวะตามวิธีมาตรฐาน The Centers for Disease Control and Prevention (CDC), USA โดยตัวอย่างจะนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยอัตราเร็วอย่างน้อย 1500 รอบ ต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอน particle ต่างๆ และนำตัวอย่างมาเจือจาง 1 : 10 ด้วยสารละลาย 2%HNO₃ เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixer กรองผ่านเมมเบรนชนิด cellulose acetate (CA) ขนาด 0.25 micron และถ่ายใส่ขวด vial ขนาด 2 mL นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ICS6000+iCAP RQ plus กราฟมาตรฐานผสมของสารหนู 5 สปีชีส์เตรียมในรูปแบบของ Matrix matching ในสารละลาย base urine ที่ความเข้มข้น 0-100 ng/mL โดยสารละลายมาตรฐานผสมควรเตรียมใหม่ทุกวัน สำหรับสารละลาย Mobile phase ปรับ pH ให้เหมาะสมด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ และเก็บได้ไม่เกิน 3 วัน

ตารางที่ 2 แสดงพารามิเตอร์สำหรับเครื่อง IC (Anion exchange)

Column	Dionex IonPac AS7, 2x250 mm						
Guard column	Dionex IonPac AG7, 2x50 mm						
Mobile phase	A: 1 mM Ammonium carbonate, pH 10 B: 200 mM Ammonium carbonate, pH 9.8						
Gradient profile	No	Time	Flow [ml/min]	%B	%C	%D	Curve
	1	0.000					Run
	2	0.300	0.600	0.0	0.0	0.0	5
	3	4.000	0.600	40.0	0.0	0.0	5
	4	8.000	0.600	70.0	0.0	0.0	5
	5	11.000	0.600	80.0	0.0	0.0	5
	6	11.100	0.600	0.0	0.0	0.0	5
	7	12.100	0.600	0.0	0.0	0.0	5
	8	New Row					
	9	13.000					Stop Run
Flow rate	0.6 mL/min						
Injection volume	Push full loop, 25 µL						
Column Temperature	Ambient						
Analysis time	13 min						

ตารางที่ 3 แสดงพารามิเตอร์สำหรับเครื่อง ICP-MS

Nebulizer	Mira-mist Nebulizer
Spray chamber	Baffled cyclonic spray chamber
Injector tube	2.0 mm ID Quartz
Interface	Ni sampler and skimmer cone
Insert skimmer	0.35 mm
75As Dwell time	0.01 sec
Mode	He-KED with LMCO

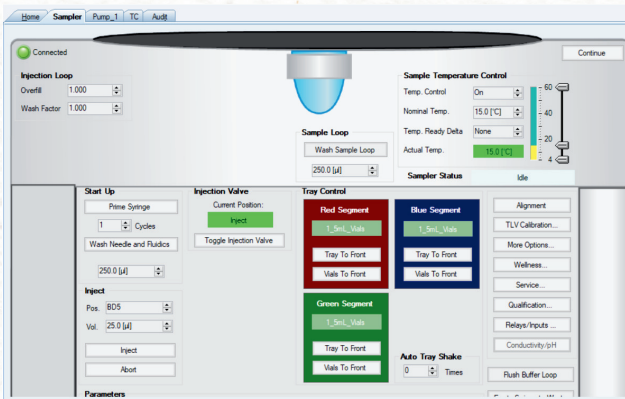


ภาพที่ 1 แสดงการเชื่อมต่อเครื่อง ICS6000 กับ iCAP RQ plus

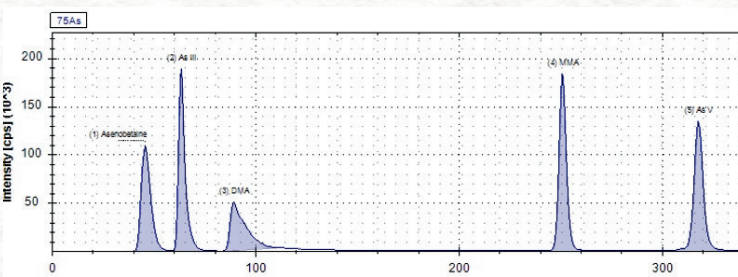
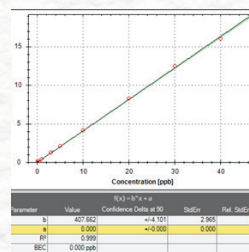
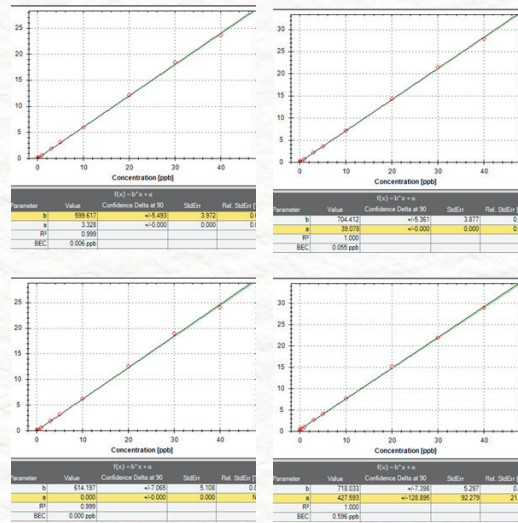
Results

การหาปริมาณสารหนูในสปีชีส์ต่างๆ ผ่านโปรแกรม Qtegra™ Intelligent Scientific Data Solution™ ร่วมกับ Chrom Control ที่อยู่ภายในโปรแกรมหลักอย่าง Qtegra สามารถควบคุมการสั่งงานได้ทั้งในส่วนของเครื่อง IC, ICP-MS, การสร้าง Method ในการวิเคราะห์ รวมไปถึงการดูผลการทดสอบได้ภายในโปรแกรมเดียว ทำให้สะดวกต่อผู้ใช้งานในการแปลผล และการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ (Method development)

จากคอนดิชันที่ใช้ในการวิเคราะห์ สามารถแยกสารหนู (As) ทั้ง 5 สปีชีส์ในตัวอย่างปัสสาวะออกจากกันโดยใช้เวลาเพียง 13 นาที ให้กราฟมาตรฐานที่มีค่า $R^2 > 0.995$ นั้นแสดงให้เห็นว่าเทคนิคนี้มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์อย่างยิ่งที่จะนำมาประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์งานทางด้าน Toxicology ในเมทริกซ์อื่นๆ เช่น เลือด Serum เป็นต้น นอกจากนี้เทคนิค IC-ICP-MS ยังมีความเหมาะสมในการหา Speciation ของธาตุอื่นๆ เช่น ธาตุ Cr(III) และ Cr(VI) ซึ่งใช้เพียง Guard column ชนิด anion สารละลายเจือจางกรดไนตริกเป็น mobile phase และรูปแบบการแยก Isocratic เท่านั้น ทำให้ตรวจวัดได้อย่างรวดเร็ว ส่งผลให้สามารถเพิ่มปริมาณตัวอย่างที่ต้องการตรวจวัดได้มากขึ้น



ภาพที่ 2 แสดงซอฟต์แวร์ Qtegra ร่วมกับ Chrom control



ภาพที่ 3 แสดงโครมาโทแกรมของสารหนูทั้ง 5 สปีชีส์

ภาพที่ 4 แสดงกราฟมาตรฐานของ AB, MMA, DM, As(III) และ As(V) ตามลำดับ

Find out more at thermofisher.com/ICP-MS

ind out more at <https://www.scispec.co.th/ICPSQ.html>