



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาและการประยุกต์ใช้ระบบต่อเนื่องสำหรับการศึกษา

การดูดซึมได้ของแร่ธาตุและโลหะหนัก

**Development and Applications of Continuous Systems for Study of
Bioavailability of Minerals and Heavy Metals**

ศ.ดร. ยุวดี เชี่ยววัฒนา และคณะ

มกราคม 2551

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาและการประยุกต์ใช้ระบบต่อเนื่องสำหรับการศึกษา

การดูดซึมได้ของแร่ธาตุและโลหะหนัก

Development and Applications of Continuous Systems for Study of

Bioavailability of Minerals and Heavy Metals

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. ศ.ดร. ยวดี เชี่ยววัฒนา	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
2. ผศ.ดร. อติทยา ศิริภิญญานนท์	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
3. ดร. น้ำฝน ทองทวี	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
4. ดร. รุ่งรัตน์ ปิเตอร์เซน	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
5. ดร. จรรยา บัวน่วม	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
6. ดร. ครรชิต จุดประสงค์	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
7. นางสาววีรวรรณ วัชรวัฒน์	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
8. นางสาววุฒิกา กิจธิคุณ	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
9. นางสาวอัปสร โสคติภัย	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
10. นางสาวจิราวรรณ พรหมจันทร์	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
11. นางสาวเนตติกานต์ แก้วหอมดี	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
12. นางสาวอาทิตย์ยา สามธนา	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
13. นางสาวกนกวรรณ คุณาจิรภรณ์	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
14. นายโสภณ ประวัฒน์	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
15. นายสุทธินันท์ แต่บรรพกุล	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
16. นายมธุรส อ่อนไทย	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
17. นายวิภาค อนุตรศักดิ์ดา	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่ได้สนับสนุนทุนการวิจัย “ทุนองค์ความรู้ใหม่ที่เป็นพื้นฐานต่อการพัฒนา” เพื่อใช้ในการดำเนินงานวิจัยในโครงการ “การพัฒนาและการประยุกต์ใช้ระบบต่อเนื่องสำหรับการศึกษาคูคัมภ์ได้ของแร่ธาตุและโลหะหนัก” โดยมีระยะเวลาของโครงการ 3 ปี ตั้งแต่ พฤษภาคม 2547 ถึง เมษายน 2550 ตลอดระยะเวลาดังกล่าวได้รับคำแนะนำและข้อเสนอแนะในการดำเนินโครงการจากบุคลากรที่เกี่ยวข้อง ทำให้สามารถดำเนินงานวิจัยได้อย่างราบรื่น จึงขอขอบคุณไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

ขอขอบคุณหน่วยงานต่างๆ ต่อไปนี้ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในด้านต่างๆ เป็นอย่างดี

- ศูนย์นวัตกรรมเคมี โครงการพัฒนาบัณฑิตศึกษาและการวิจัยทางเคมี สำหรับทุนการศึกษาของนักศึกษา วัสดุวิจัยและครุภัณฑ์บางส่วนในโครงการวิจัย
- ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับสถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ
- Department of Soil and Environmental Science, Lincoln University, New Zealand สำหรับสถานที่ในการทำวิจัยระยะสั้นของนักศึกษาในโครงการ และคำแนะนำจาก Professor Ronald McLaren
- Department of Chemistry, Technical University of Denmark, Denmark สำหรับสถานที่ในการทำวิจัยระยะสั้นของนักศึกษาในโครงการ และคำแนะนำจาก Professor Elo Harald Hansen
- Department of Chemistry, University of the Balearic Islands, Spain สำหรับสถานที่ในการทำวิจัยระยะสั้นของนักศึกษาในโครงการ และคำแนะนำจาก Dr. Manuel Miró

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: BRG4780002
ชื่อโครงการ: การพัฒนาและการประยุกต์ใช้ระบบต่อเนื่องสำหรับการศึกษาการดูดซึมได้ของแร่ธาตุและโลหะหนัก
ชื่อนักวิจัย: ศ.ดร.ยุวดี เชื้อยววัฒนา ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
Email Address: scysw@mahidol.ac.th
ระยะเวลาโครงการ: 1 พฤษภาคม 2547 – 30 เมษายน 2550

การวิเคราะห์ปริมาณทั้งหมดของโลหะหนักหรือแร่ธาตุในตัวอย่างมีประโยชน์จำกัด เพราะธาตุต่างๆ อาจดำรงอยู่ได้ในรูปฟอร์มที่ต่างกันซึ่งมีความสามารถในการเคลื่อนตัว การดูดซึมหรือการนำไปใช้ได้ของโลหะหนักหรือแร่ธาตุนั้นๆ ที่แตกต่างกัน ทำให้มีผลกระทบของธาตุต่างๆ ต่อสิ่งแวดล้อมและชีวิตของมนุษย์ที่ต่างกันด้วย งานวิจัยนี้ได้ประยุกต์ใช้วิธีใหม่ในการประเมินผลกระทบของการปนเปื้อนของโลหะหนักจากกิจกรรมอุตสาหกรรมหลอมโลหะและอุตสาหกรรมการถลุงแร่ โดยใช้ระบบการสกัดเป็นลำดับขั้นแบบไหลต่อเนื่องที่พัฒนาขึ้นใหม่ ทั้งนี้ได้เลือกศึกษากรณีการปนเปื้อนจากโรงงานที่น่าจะมีปัญหาในประเทศไทย คือปัญหาจากการหลอมโลหะตะกั่วจากแบตเตอรี่เก่า และปัญหาจากการถลุงโลหะสังกะสีที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของแคดเมียม โดยได้ศึกษาถึงความสามารถในการเคลื่อนตัวของตะกั่วและแคดเมียมที่ปนเปื้อนอยู่ในดิน ดินตะกอนและอากาศในบริเวณใกล้เคียง กับโรงงานดังกล่าว นอกเหนือจากนั้นได้ศึกษาถึงรูปฟอร์มของตะกั่วและสังกะสีที่อยู่ในท่อนำส่งกระแสธรรมชาติ สำหรับงานวิจัยอีกส่วนหนึ่ง ได้ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์แบบไหลต่อเนื่องเพื่อศึกษาการดูดซึมหรือการนำไปใช้ได้ของแร่ธาตุในอาหาร ระบบที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นการจำลองหลอดแก้วให้เสมือนเป็นระบบการย่อยในกระเพาะอาหารและการดูดซึมสารอาหารในลำไส้เล็ก โดยอาศัยวิธีแบบเบทซ์ในการจำลองการย่อยในกระเพาะอาหาร และใช้ระบบการซึมผ่าน เยื่อบางแบบไหลต่อเนื่อง (continuous-flow dialysis, CFD) ในการจำลองการดูดซึมสารอาหารในลำไส้เล็ก ด้วยระบบ CFD ทำให้สามารถเก็บสารละลายตัวอย่างที่ซึมผ่านเยื่อบางออกมาเพื่อการวิเคราะห์ปริมาณแร่ธาตุโดยใช้หน่วยตรวจวัดประเภทต่างๆ ได้ เช่น การวัดการดูดกลืนแสงโดยอาศัยเปลวไฟและความร้อน การวัดการคายแสงของธาตุโดยอาศัยพลาสมาเป็นแหล่งพลังงาน ซึ่งได้ทำการศึกษาถึงวิธีการเชื่อมต่อระบบ CFD ที่พัฒนาขึ้นกับหน่วยตรวจวัดประเภทต่างๆ ทำการประเมินวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่เปรียบเทียบกับวิธีแบบเบทซ์ที่ใช้กันอยู่เดิม ในด้านความแม่นยำ ความถูกต้อง และประสิทธิภาพ เพื่อประยุกต์ใช้ในการประเมินค่าการดูดซึมได้ของแร่ธาตุในอาหาร และศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อค่าการดูดซึมได้

คำหลัก: ระบบแบบไหลต่อเนื่อง การสกัดลำดับขั้น การซึมผ่านเยื่อบาง

ABSTRACT

Project Code: BRG4780002

Project Title: Development and Applications of Continuous Systems for Study of Bioavailability of Minerals and Heavy Metals

Investigator: Juwadee Shiowatana
Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University

Email Address: scysw@mahidol.ac.th

Project Period: May 1, 2004 – April 30, 2007

The determination of information on total concentration of heavy metals or minerals in samples has limited use because elements can exist in different chemical forms with varying mobility and availability to living organisms and thus can have varying impacts on environment and human life. Chemical speciation is therefore necessary. In this research, a newly developed continuous-flow sequential extraction was applied to assess the impact of heavy metals contamination caused by metal smelting and mining activities. Two major case studies were investigated including lead contamination in soil and air collected from the area nearby lead smelting industry and cadmium contamination in soil and sediment collected from the area in the vicinity of zinc mining industry. In addition, iron speciation in the natural gas pipe line was examined. Further to a different topic, a novel method for the determination of *in vitro* mineral bioavailability, or mineral bioaccessibility, was developed based on a simulated gastric digestion in a batch system followed by a continuous-flow intestinal digestion. The simulated intestinal digestion was performed in a dialysis bag placed inside a channel in a flowing stream of dialyzing solution. The continuous flow dialysis in the intestinal digestion step enables dialysable components to be continuously removed for element detection by various detection methods, including flame atomic absorption spectrometry (FAAS), electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS), and inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES). The interfacing between the continuous-flow dialysis system and the detection method was carefully optimized. The precision, accuracy and efficiency of the developed method were compared with the conventional batch analysis. The developed system was applied to examine factors affecting dialyzability, or the mineral bioavailability of food.

Keywords: continuous-flow, sequential extraction, dialysis

Executive Summary

Project Title: Development and Applications of Continuous Systems for Study of Bioavailability of Minerals and Heavy Metals

Investigaor: Juwadee Shiowatana
Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University

Email Address: scysw@mahidol.ac.th

Project Period: May 1, 2004 – April 30, 2007

The newly developed continuous-flow sequential extraction has been applied to assess metal mobility, bioavailability, and the impact of heavy metals contaminated in environmental systems. This type of study is considered as a futuristic approach used for planning how to perform environmental management. In addition, a novel method for the determination of *in vitro* mineral bioavailability, or mineral bioaccessibility, has been developed based on a simulated gastric digestion in a batch system followed by a continuous-flow intestinal digestion. The simulated intestinal digestion was performed in a dialysis bag placed inside a channel in a flowing stream of dialyzing solution. The continuous flow dialysis in the intestinal digestion step enables dialysable components to be continuously removed for element detection by various methods, including flame atomic absorption spectrometry (FAAS), electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS), and inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES). Moreover, the proposed continuous flow dialysis system offers information on dialysis kinetics, which could be extrapolated to be of some use for absorption studies. The developed system has been applied to examine factors affecting dialyzability, or the mineral bioavailability of food, with the ultimate goal to find ways to overcome mineral deficiency of Thai people.

Seventeen papers have been published in the international journals as follows:

Continuous-Flow Sequential Extraction

1. Samontha, A., Waiyawat, W., Shiowatana, J. & McLaren, R.G. 2007, "Atmospheric deposition of metals associated with air particulate matter: fractionation of particulate-bound metals using continuous-flow sequential extraction", *Science Asia*, vol. 33, pp. 421-428. (impact factor = _)

2. Buanuam, J., Miro, M., Hansen, E.H., Shiowatana, J., Estela, J.M. & Cerda, V. 2007, "A multisyringe flow-through sequential extraction system for on-line monitoring of orthophosphate in soils and sediments", *Talanta*, vol. 71, no. 4, pp. 1710-1719. (impact factor = 2.810)
3. Kaewkhomdee, N., Kalambaheti, C., Predapitakkun, S., Siripinyanond, A. & Shiowatana, J. 2006, "Iron fractionation for corrosion products from natural gas pipelines by continuous-flow sequential extraction", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 386, no. 2, pp. 363-369. (impact factor = 2.591)
4. Buanuam, J., Tiptanasup, K., Shiowatana, J., Miro, M. & Harald Hansen, E. 2006, "Development of a simple extraction cell with bi-directional continuous flow coupled on-line to ICP-MS for assessment of elemental associations in solid samples", *Journal of Environmental Monitoring*, vol. 8, no. 12, pp. 1248-1254. (impact factor = 1.523)
5. Buanuam, J., Miro, M., Hansen, E.H. & Shiowatana, J. 2006, "On-line dynamic fractionation and automatic determination of inorganic phosphorus in environmental solid substrates exploiting sequential injection microcolumn extraction and flow injection analysis", *Analytica Chimica Acta*, vol. 570, no. 2, pp. 224-231. (impact factor = 2.894)
6. Buanuam, J., Shiowatana, J. & Pongsakul, P. 2005, "Fractionation and elemental association of Zn, Cd and Pb in soils contaminated by Zn minings using a continuous-flow sequential extraction", *Journal of Environmental Monitoring*, vol. 7, no. 8, pp. 778-784. (impact factor = 1.523)
7. Chomchoei, R., Miro, M., Hansen, E.H. & Shiowatana, J. 2005, "Automated sequential injection-microcolumn approach with on-line flame atomic absorption spectrometric detection for implementing metal fractionation schemes of homogeneous and nonhomogeneous solid samples of environmental interest", *Analytical Chemistry*, vol. 77, no. 9, pp. 2720-2726. (impact factor = 5.646)
8. Chomchoei, R., Miro, M., Hansen, E.H. & Shiowatana, J. 2005, "Sequential injection system incorporating a micro-extraction column for automatic fractionation of metal ions in solid samples: Comparison of the extraction profiles when employing uni-, bi-, and multi-bi-directional flow plus stopped-flow sequential extraction modes", *Analytica Chimica Acta*, vol. 536, no. 1-2, pp. 183-190. (impact factor = 2.894)

9. Tongtavee, N., Shiowatana, J., McLaren, R.G. & Gray, C.W. 2005, "Assessment of lead availability in contaminated soil using isotope dilution techniques", *Science of the Total Environment*, vol. 348, pp. 244-256. (impact factor = 2.359)
10. Tongtavee, N., Shiowatana, J. & McLaren, R.G. 2005, "Fractionation of lead in soils affected by smelter activities using a continuous-flow sequential extraction system", *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, vol. 85, no. 8, pp. 567-583. (impact factor = 0.917)
11. Tongtavee, N., Shiowatana, J., McLaren, R.G. & Buanuam, J. 2005, "Evaluation of distribution and chemical associations between cobalt and manganese in soils by continuous-flow sequential extraction", *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, vol. 36, no. 19-20, pp. 2839-2855. (impact factor = 0.302)

Continuous-Flow Dialysis

12. Purawatt, S., Siripinyanond, A. & **Shiowatana, J.** 2007, "Flow field-flow fractionation-inductively coupled optical emission spectrometric investigation of the size-based distribution of iron complexed to phytic and tannic acids in a food suspension: Implications for iron availability", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 389, no. 3, pp. 733-742. (impact factor = 2.591)
13. Judprasong, K., Siripinyanond, A. & **Shiowatana, J.** 2007, "Towards better understanding of in vitro bioavailability of iron through the use of dialysis profiles from a continuous-flow dialysis with inductively coupled plasma spectrometric detection", *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, vol. 22, no. 7, pp. 807-810. (impact factor = 3.630)
14. **Shiowatana, J.**, Kitthikhun, W., Sottimai, U., Promchan, J. & Kunajiraporn, K. 2006, "Dynamic continuous-flow dialysis method to simulate intestinal digestion for in vitro estimation of mineral bioavailability of food", *Talanta*, vol. 68, no. 3, pp. 549-557. (impact factor = 2.810)
15. **Shiowatana, J.**, Purawatt, S., Sottimai, U., Taebunpakul, S. & Siripinyanond, A. 2006, "Enhancement effect study of some organic acids on the calcium availability of vegetables: Application of the dynamic in vitro simulated gastrointestinal digestion method with continuous-flow dialysis", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, no. 24, pp. 9010-9016. (impact factor = 2.322)
16. Judprasong, K., Ornthai, M., Siripinyanond, A. & **Shiowatana, J.** 2005, "A continuous-flow dialysis system with inductively coupled plasma optical emission spectrometry for in vitro

estimation of bioavailability", *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, vol. 20, no. 11, pp. 1191-1196. (impact factor = 3.630)

17. Promchan, J. & **Shiowatana, J.** 2005, "A dynamic continuous-flow dialysis system with on-line electrothermal atomic-absorption spectrometric and pH measurements for in-vitro determination of iron bioavailability by simulated gastrointestinal digestion", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 382, no. 6, pp. 1360-1367. (impact factor = 2.591)

Fifteen papers have been presented at the international and national conferences during the past three years as follows:

1. Nattikarn Kaewkhomdee, Chatvalee Kalambaheti, Somruedee Predapitakkun, Atitaya Siripinyanond and Juwadee Shiowatana, Study of iron forms of corrosion products from natural gas pipelines by continuous-flow sequential extraction, **6th International Colloquium on Process Related Analytical Chemistry**, 21-23 March 2007, Dortmund, Germany.
2. Janya Buanuam, Manuel Miró, Ero Harald Hansen, Juwadee Shiowatana, José Manuel Estela and Victor Cerdà, A multisyringe flow injection system for automated fractionation and on-line determination of orthophosphate in solid substrates, **6th International Colloquium on Process Related Analytical Chemistry**, 21-23 March 2007, Dortmund, Germany.
3. Janya Buanuam, Kasipa Tiptanasup and Juwadee Shiowatana, Bi-directional continuous-flow sequential extraction system with on-line inductively coupled plasma mass spectrometric detection for study of metal partitioning in solid substrates, **2nd Asia-Pacific Winter Conference on Plasma Spectrochemistry**, 27 November – 2 December 2006, Bangkok, Thailand.
4. Kunchit Judprasong, Atitaya Siripinyanond and Juwadee Shiowatana, Use of dialysis profiles from a continuous-flow dialysis system hyphenated with inductively coupled plasma optical emission spectrometry for study of *in vitro* bioavailability of some mineral fortifications, **2nd Asia-Pacific Winter Conference on Plasma Spectrochemistry**, 27 November – 2 December 2006, Bangkok, Thailand.
5. Sopon Purawatt, Atitaya Siripinyanond and Juwadee Shiowatana, Molecular-mass based elemental distribution of food during simulated gastrointestinal digestion, **2nd Asia-Pacific Winter Conference on Plasma Spectrochemistry**, 27 November – 2 December 2006, Bangkok, Thailand.

6. Supharart Sangsawong, Juwadee Shiowatana and Atitaya Siripinyanond, Continuous-flow sequential extraction with on-line field-flow fractionation matrix removal before ICP detections, **2nd Asia-Pacific Winter Conference on Plasma Spectrochemistry**, 27 November – 2 December 2006, Bangkok, Thailand.
7. Sopon Purawatt, Atitaya Siripinyanond and Juwadee Shiowatana, Molecular-mass based elemental distribution of food suspension during simulated continuous-flow gastrointestinal digestion, **1st Asia-Pacific Winter Conference on Plasma Spectrochemistry**, 24-30 April 2005, Chiangmai, Thailand.
8. Weerawan Waiyawat, Janya Buanuam and Juwadee Shiowatana, Interference removal in ICPMS measurements of soil extracts, **1st Asia-Pacific Winter Conference on Plasma Spectrochemistry**, 24-30 April 2005, Chiangmai, Thailand.
9. Namfon Tongtavee, Juwadee Shiowatana, Ron McLaren and Colin Gray, Assessment of lead availability in contaminated soils by stable isotope dilution mass spectrometry, **1st Asia-Pacific Winter Conference on Plasma Spectrochemistry**, 24-30 April 2005, Chiangmai, Thailand.
10. Kanokwan Kunajiraporn, Juwadee Shiowatana, Jeerawan Promchan, Continuous-flow dialysis system with online ETAAS/ICPOES and pH measurements for evaluation bioavailability of iron enriched vegetables, **1st Asia-Pacific Winter Conference on Plasma Spectrochemistry**, 24-30 April 2005, Chiangmai, Thailand.
11. Atitaya Samontha, Nattikarn Kaewkhomdee Ronald McLaren and Juwadee Shiowatana, Elemental fractionation of air particulates using sequential extraction with ICPMS and ICPOES detections, **1st Asia-Pacific Winter Conference on Plasma Spectrochemistry**, 24-30 April 2005, Chiangmai, Thailand.
12. Kanchit Judprasong, Mathuros Ornthai, Atitaya Siripinyanond and Juwadee Shiowatana, A continuous-flow dialysis system with online inductively coupled plasma optical emission spectrometric detections for in vitro estimation of bioavailability, **1st Asia-Pacific Winter Conference on Plasma Spectrochemistry**, 24-30 April 2005, Chiangmai, Thailand.
13. Kanchit Judprasong, Mathuros Ornthai, Sopon Purawatt, Atitaya Siripinyanond and Juwadee Shiowatana, Study of interelemental effects of mineral bioavailability using in vitro continuous-flow dialysis with ICPOES method, **7th International Conference of the Intern.Soc.Trace Element Research in Humans**, 7-12 Nov 2004 Bangkok, Thailand.

14. Sutthinun Taebunpakul, Upsorn Sottimai and Juwadee Shiowatana, Estimation of calcium in vitro bioavailability of vegetables using a novel continuous-flow dialysis system, **7th International Conference of the Intern.Soc.Trace Element Research in Humans**, 7-12 Nov 2004 Bangkok, Thailand.
15. Jeerawan Promchan, Wuttika Kittikhun and Juwadee Shiowatana, A novel continuous-flow dialysis system with online AAS and pH measurements for in vitro iron bioavailability study, **7th International Conference of the Intern.Soc.Trace Element Research in Humans**, 7-12 Nov 2004 Bangkok, Thailand.

Eleven students working on this project have been graduated and three are still working on the project. A 2-day workshop related to this study was organized in May 2007 with 64 participants from 25 organizations at the Faculty of Science, Mahidol University to disseminate the knowledge gained from this study among Thai scientists and researchers.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
Abstract	iii
Executive Summary	iv
เนื้อหางานวิจัย	
ตอนที่ 1 การพัฒนาระบบการซึมผ่านเยื่อบางแบบไหลต่อเนื่อง เพื่อจำลองระบบการย่อยและดูดซึมสารอาหารสำหรับ การประมาณค่าการดูดซึมได้ของแร่ธาตุโดยวิธีในหลอดแก้ว	1
1.1 บทนำ	2
1.2 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	4
1.3 ผลการทดลองและวิจารณ์	8
1.4 บทสรุป	14
1.5 เอกสารอ้างอิง	15
ตอนที่ 2 การพัฒนาระบบไดอะไลซิสแบบไหลต่อเนื่องที่เชื่อมต่อกับ Electrothermal atomic absorption spectrometer (ETAAS) และ pH meter (CFD-ETAAS-pH)	17
2.1 บทนำ	18
2.2 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	18
2.3 ผลการทดลองและวิจารณ์	22
2.4 บทสรุป	25
2.5 เอกสารอ้างอิง	25
ตอนที่ 3 การพัฒนาระบบการซึมผ่านเยื่อบางแบบไหลต่อเนื่อง เชื่อมต่อกับหน่วยตรวจวัด ICP-OES เพื่อประมาณ ค่าการดูดซึมได้ของแร่ธาตุโดยวิธีในหลอดแก้ว	27
3.1 บทนำ	29
3.2 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	29
3.3 ผลการทดลองและวิจารณ์	35
3.4 บทสรุป	59
3.5 เอกสารอ้างอิง	59

ตอนที่ 4	การใช้ระบบเชื่อมต่อระหว่าง Flow field-flow fractionation กับ Inductively coupled plasma optical emission spectrometer ในการศึกษาการกระจายตัวตามขนาดของสารประกอบระหว่างธาตุเหล็กกับ Phytic acid และ Tannic acid ในอาหาร	61
4.1	บทนำ	62
4.2	อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	63
4.3	ผลการทดลองและวิจารณ์	67
4.4	บทสรุป	74
4.5	เอกสารอ้างอิง	74
ตอนที่ 5	บทสรุป	76
Output จากโครงการวิจัย		77
ภาคผนวก	ผลงานตีพิมพ์	
	ผลงานรอกการตีพิมพ์	

ตอนที่ 1

การพัฒนาระบบการซึมผ่านเยื่อบางแบบไหลต่อเนื่องเพื่อจำลองระบบการย่อยและ
ดูดซึมสารอาหารสำหรับการประมาณค่าการดูดซึมได้ของแร่ธาตุโดยวิธีในหลอดแก้ว

1.1 บทนำ

1.2 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

- 1.2.1 การออกแบบระบบไดอะไลซิสแบบไหลต่อเนื่อง (Continuous-flow dialysis system)
- 1.2.2 เครื่องมือ
- 1.2.3 สารเคมีและตัวอย่าง
- 1.2.4 วิธีการทดสอบปริมาณแคลเซียมในตัวอย่างหลังการไดอะไลซิส
- 1.2.5 วิธีการจำลองการย่อยในกระเพาะอาหารและวิธีการหา titratable acidity
- 1.2.6 วิธีการไดอะไลซิสแบบสมดุล (Equilibrium dialysis system)
- 1.2.7 วิธีการเลือกอัตราการไหลและความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตสำหรับ
ระบบไดอะไลซิสแบบไหลต่อเนื่อง
- 1.2.8 วิธีการไดอะไลซิสแบบไหลต่อเนื่อง (Continuous-flow dialysis system)
- 1.2.9 วิธีคำนวณค่าความสามารถที่ร่างกายจะนำแร่ธาตุไปใช้ (Dialyzability)

1.3 ผลการทดลองและวิจารณ์

- 1.3.1 การออกแบบระบบไหลแบบต่อเนื่องเพื่อการประมาณค่าความสามารถที่ร่างกายจะนำแร่ธาตุ
ไปใช้
- 1.3.2 การเลือกอัตราการไหลที่เหมาะสมของสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต
- 1.3.3 การเลือกความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตที่เหมาะสม
- 1.3.4 การศึกษาความถูกต้องของระบบที่พัฒนาขึ้น
- 1.3.5 การศึกษาค่าความสามารถที่ร่างกายจะนำแคลเซียมไปใช้ได้ กรณีตัวอย่าง แคลเซียม
คาร์บอเนตแบบเม็ดและเครื่องดื่มนม

1.4 บทสรุป

1.5 เอกสารอ้างอิง

1.1 บทนำ

ปัจจุบันการประเมินค่าปริมาณแร่ธาตุที่ร่างกายจะนำไปใช้ประโยชน์ในกิจกรรมของร่างกายได้มีความจำเป็นที่จะต้องพัฒนาเพื่อให้การประมาณค่าเป็นไปอย่างถูกต้องและง่าย ปริมาณแร่ธาตุทั้งหมดในอาหารไม่ได้บ่งชี้ถึงปริมาณแร่ธาตุที่ร่างกายจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในกิจกรรมได้ การจำแนกชนิดของสารอาหาร หรือ การศึกษาถึงรูปฟอร์มต่างๆ ในอาหารจึงจำเป็นที่จะทำให้ทำความเข้าใจและทำนายความสามารถในการดูดซึมของสารอาหาร โดยทั่วไปวิธีการศึกษาค่าปริมาณแร่ธาตุที่ร่างกายจะนำไปใช้ประโยชน์ในกิจกรรมของร่างกายได้ หรือ bioavailability จะทำการศึกษาในมนุษย์ แต่มีข้อจำกัดคือ ใช้เวลานานในการศึกษา ราคาแพง และให้ข้อมูลที่แปรปรวนเนื่องจากปัจจัยของสมรรถภาพและสภาวะของร่างกายที่ไม่สามารถควบคุมให้เหมือนกันได้ ดังนั้นจึงมีการทดลองในสัตว์ทดลองแทนการทดลองในมนุษย์ ซึ่งมีราคาถูกกว่า แต่มีข้อจำกัดคือมีความแตกต่างของกระบวนการเมตาบอลิซึมของสัตว์ทดลองกับมนุษย์ อีกทางเลือกหนึ่งคือ การทดลองในหลอดแก้ว ซึ่งวิธีนี้กำลังเป็นที่นิยมเนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย แม่นยำ รวดเร็ว และราคาถูก

การทดลองในหลอดแก้วเริ่มมีการพัฒนาเพื่อใช้ในการประมาณค่าปริมาณแร่ธาตุที่ร่างกายจะดูดซึมได้ตั้งแต่ปี 1930 วิธีการในหลอดแก้วนี้ให้ข้อมูลเกี่ยวกับแร่ธาตุที่ไม่สอดคล้องกับการทดลองในสิ่งมีชีวิต ในปี 1981 Miller และทีมวิจัย ได้พัฒนาวิธีการทดลองในหลอดแก้วเพื่อใช้ในการประมาณค่าปริมาณแร่ธาตุที่ร่างกายมนุษย์จะดูดซึมได้ ซึ่งพบว่าสอดคล้องกับวิธีการทดลองในสิ่งมีชีวิตในกรณีการศึกษาธาตุหลัก วิธีการทดลองของ Miller ได้ถูกนำไปพัฒนาต่อเกิดเป็นการทดลองในหลอดแก้วแบบอื่นๆ ซึ่งใช้ประมาณค่าการดูดซึมได้ของธาตุที่หลากหลาย เช่น แคลเซียม และ สังกะสี วิธีการทดลองในหลอดแก้วประกอบด้วย การลอกเลียนแบบกระบวนการย่อยในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กด้วยเอนไซม์ pepsin ที่ pH 2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ระหว่างขั้นตอนการย่อยในกระเพาะอาหาร และด้วยเอนไซม์ pancreatin และ bile salts ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลง pH อย่างต่อเนื่องจาก 2 เป็น 7 ระหว่างขั้นตอนการย่อยในลำไส้เล็ก สัดส่วนของสารที่สามารถแพร่ผ่านรูพรุนของเมมเบรนระหว่างขั้นตอนการย่อยในลำไส้เล็กจะใช้เพื่อทำนายค่า bioavailability ของธาตุต่างๆ

วิธีการของ Miller อาศัยหลักการสมมูลที่ทำให้สารในรูปที่สามารถแพร่ผ่านเมมเบรนได้ระหว่างขั้นตอนการย่อยในลำไส้เล็ก แต่ระบบนี้ยังมีปัญหาเรื่องการพาสารที่แพร่ผ่านออกจากเมมเบรนออกนอก ระบบ ซึ่งไม่สามารถทำได้ระหว่างการทำโคอะไลซิสเหมือนกับที่เกิดขึ้นจริงในระบบการย่อยและการดูดซึมของมนุษย์ ทำให้ค่า bioavailability ที่วิเคราะห์ได้จากวิธีนี้มีค่าต่ำ ดังนั้นระบบโคอะไลซิสแบบไหลต่อเนื่องจึงเริ่มพัฒนาอย่างแพร่หลาย โดยทีมวิจัยของ Minihane ได้พัฒนาระบบโคอะไลซิสให้สามารถพาสารที่สามารถแพร่ผ่านเมมเบรนออกมาได้อย่างต่อเนื่อง ระบบดังกล่าวนี้ประกอบด้วย Amicon stirred cell สำหรับการทำโคอะไลซิส pH จะถูกปรับให้เปลี่ยนไปอย่างต่อเนื่องจาก 2 เป็น 7 ภายใน 30 นาที ก่อนเริ่มทำการโคอะไลซิส จากนั้นทีมวิจัยของ Shen ได้พัฒนาให้มีการปรับเปลี่ยน pH ระหว่างทำโคอะไลซิสแทนการปรับ pH ก่อนการโคอะไลซิส Shen ทำโคอะไลซิสโดยการปรับ pH ด้วยการเติมสารละลาย NaHCO_3 ใน

ปริมาณที่เท่ากับค่าประมาณของความเป็นกรด (titratable acidity) ของตัวอย่างที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ pepsin แล้ว การไดอะไลซิสจะทำในภาชนะขนาดเล็กภายใต้ความดัน 50 psi

Wolters และทีมวิจัยได้พัฒนาระบบหลอดแก้วสำหรับวิธีไดอะไลซิสแบบไหลต่อเนื่อง โดยใช้ระบบรูพรุนของเมมเบรนแบบท่อกลมกลวง (hollow-fiber) ระบบนี้ประกอบด้วยภาชนะทำปฏิกิริยาที่วางอยู่ใน water bath ที่ปรับอุณหภูมิไว้ 41 องศาเซลเซียส อนุภาคแขวนลอยของอาหารจะถูกบีบผ่านท่อคู่ไปยังรูพรุนของเมมเบรนแบบท่อกลมกลวงขนาดเล็กที่ถูกต่อไว้ที่ปลายทางเข้าของ hollow-fiber และมีแท่งแม่เหล็กหมุนเพื่อป้องกันการอุดตันของอนุภาคขนาดใหญ่ อนุภาคที่สามารถแพร่ผ่าน hollow-fiber ได้จะถูกบรรจุลงในขวดพลาสติกเพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป ซึ่งองค์ประกอบต่างๆ สามารถถูกย่อยและลำเลียงไปสู่ hollow-fiber จนเสร็จขั้นตอนการไดอะไลซิส

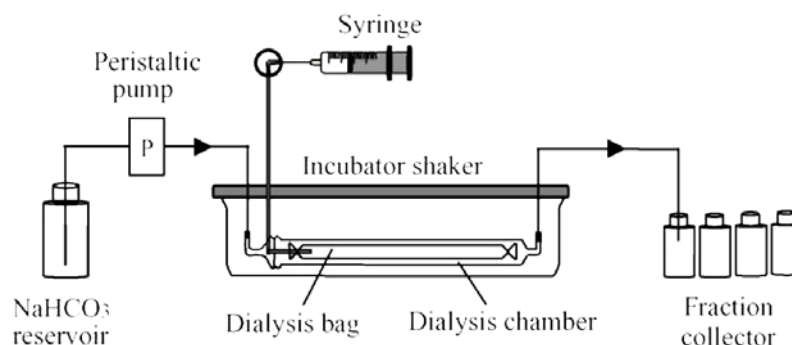
Multicompartmental computer controlled simulated gastrointestinal digestion system ได้ถูกพัฒนาขึ้นและประยุกต์ใช้ในการประเมินค่า bioavailability ระบบนี้ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ที่ลอกเลียนแบบระบบการย่อยในกระเพาะอาหารและลำไส้ส่วนต่างๆ (duodenum, jejunum และ ileum) ส่วนต่างๆ นั้นจะถูกต่อเชื่อมกับปั๊มที่ควบคุมการปล่อยเอนไซม์สำหรับการย่อย ระบบนี้จะต่อเข้ากับ rotary pumps และ syringe pumps สำหรับควบคุมความดันน้ำและการหลังสาร เนื่องจากงานนี้มีวัตถุประสงค์ในการเลียนแบบระบบการย่อยและการดูดซึมตั้งแต่กระเพาะอาหารจนถึงลำไส้ใหญ่ ileum จึงเป็นระบบที่ค่อนข้างซับซ้อนและไม่ง่ายนักที่จะสร้างขึ้น วิธีการอย่างง่ายที่จะประเมินค่า bioaccessibility ได้ถูกพัฒนาโดยเติมน้ำลายเทียม น้ำย่อยในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก ซึ่งวิธีการนี้ให้ข้อดีคือ สะดวกและรวดเร็ว แต่อย่างไรก็ตามการดูดซึมใช้เวลาเพียงไม่กี่นาที ตัวอย่างอาหารอาจจะถูกย่อยและดูดซึมเพียงบางส่วนเท่านั้น

ในงานวิจัยนี้ ได้พัฒนาระบบการซึมผ่านเยื่อแบบไหลต่อเนื่อง (ระบบไดอะไลซิสแบบไหลต่อเนื่อง) อย่างง่ายโดยวิธีในหลอดแก้วเพื่อจำลองการย่อยในลำไส้เล็ก พิจารณาจากการดูดซึมแร่ธาตุจะเกิดขึ้นที่บริเวณลำไส้เล็ก ระบบที่พัฒนาขึ้นนี้ถูกออกแบบสำหรับการไดอะไลซิสที่ขั้นตอนการย่อยและการดูดซึมที่ลำไส้เล็กโดยการไหลผ่านของสารละลาย (สารละลายเจือจาง NaHCO_3) ที่อยู่รอบถุงไดอะไลซิสที่อยู่ในบรรจุอาหารที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ pepsin ในกระเพาะอาหารแล้ว ขั้นตอนการย่อยในกระเพาะอาหารทำในระบบเบทซ์ ทำให้เพิ่ม sample throughput เนื่องจากสามารถทำการย่อยพร้อมๆ กันหลายๆ ตัวอย่างได้ ในขั้นตอนการจำลองการย่อยในลำไส้เล็กนั้นการเปลี่ยนแปลง pH จะเกิดขึ้นใกล้เคียงกับสถานะที่เกิดขึ้นจริงในลำไส้เล็ก ซึ่งควบคุมได้จากการเลือกใช้อัตราการไหลและความเข้มข้นของสารละลาย NaHCO_3 ที่เหมาะสม สารที่สามารถแพร่ผ่านออกมาถึงสารละลาย NaHCO_3 จะเรียกว่า dialysate ซึ่งถูกเก็บในขวดพลาสติกและวิเคราะห์หาปริมาณแร่ธาตุที่สามารถแพร่ผ่านเมมเบรนออกมาได้ กราฟที่พล็อตระหว่างปริมาณแร่ธาตุที่สามารถไดอะไลซ์ได้กับเวลาในการทำไดอะไลซิสยังให้ข้อมูลเชิงจลนศาสตร์ของกระบวนการไดอะไลซิสอีกด้วย และได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของระบบที่พัฒนาขึ้นโดยการประยุกต์ใช้กับตัวอย่าง calcium carbonate tablets และนมผง เพื่อศึกษาค่า dialyzability ของแคลเซียม

1.2 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1.2.1 การออกแบบระบบไดอะไลซิสแบบไหลต่อเนื่อง

(Continuous-flow dialysis system)



รูปที่ 1.1 ระบบการซึมผ่านเยื่อบางแบบไหลต่อเนื่อง (ระบบไดอะไลซิสแบบไหลต่อเนื่อง) เพื่อใช้เป็นระบบแบบหลอดแก้วในการจำลองการย่อยและดูดซึมอาหารในลำไส้เล็ก

การออกแบบระบบการไดอะไลซิส มีวัตถุประสงค์ 3 ข้อ ดังนี้

- มีการเปลี่ยน pH ในขั้นตอนของการไดอะไลซิส
- มีความสะดวกในการเติมเอนไซม์
- สามารถพา dialysate ออกจากระบบไดอะไลซิสระหว่างการไดอะไลซิสได้

ระบบไดอะไลซิสที่ได้เสนอขึ้นดังแสดงในรูปที่ 1.1 ประกอบด้วยภาชนะมีฝาปิดที่ทำจากแก้ว (dialysis chamber) ความยาว 20 เซนติเมตร และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.8 เซนติเมตร ภายในภาชนะกับฝาปิดบรรจุด้วยเมมเบรนที่มีรูพรุนขนาด 12,000-4,000 Da ที่มีดเป็นถุงโดยที่ปลายด้านหนึ่งมีท่อซิลิโคน ความยาว 5 เซนติเมตร และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.2 เซนติเมตร ส่วนปลายอีกด้านของท่อซิลิโคนสอดผ่านฝาปิดของภาชนะเพื่อต่อกับวาล์วสามทาง ซึ่งต่อกับกระบอกฉีดขนาด 3 มิลลิลิตร เพื่อฉีดอาหารที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ pepsin และฉีดเอนไซม์อื่นที่จำเป็นเข้าสู่ถุงไดอะไลซิส ระหว่างภาชนะกับฝาปิดถูกขันด้วยแผ่นซิลิโคน โดยทั้งหมดถูกยึดให้ติดเข้าด้วยกัน หลังจากนั้นนำภาชนะแก้วสำหรับไดอะไลซิสวางลงใน water bath ที่ตั้งอุณหภูมิ ณ 37 ± 1 องศาเซลเซียส และเขย่าขณะไดอะไลซิส สารละลาย NaHCO_3 ถูกปั๊มเข้าสู่ระบบไดอะไลซิสด้วยอัตราการไหล 0.5 – 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งจากการศึกษาพบว่า อัตราการไหลของสารละลาย NaHCO_3 ที่เหมาะสมคือ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที dialysate จะถูกพาออกจากภาชนะแก้วแล้วเก็บในขวดพลาสติกอย่างต่อเนื่อง

ในการไดอะไลซิส ถุงไดอะไลซิสจะต้องสะอาด ก่อนการฉีดตัวอย่างเข้าไป จะต้องไล่อากาศและสารละลายที่อยู่ภายในถุงไดอะไลซิสออกให้หมดโดยใช้กระบอกฉีดที่ต่อเข้ากับท่อซิลิโคนที่สอดอยู่ในถุงไดอะไลซิส จากนั้นฉีดตัวอย่างที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ pepsin 2.5 กรัม ผ่านท่อซิลิโคนอันเดิม แล้วพาสารละลาย NaHCO_3 เข้าสู่ระบบไดอะไลซิสด้วยอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที หรือตามที่ต้องการ

1.2.2 เครื่องมือ

Flame atomic absorption spectrometer (FAAS), Perkin-Elmer Model 3100

pH meter, Denver Instrument Model 215 (USA)

Incubator shaker, Grant Instrument Model SS40-D2 (Cambridge, England)

1.2.3 สารเคมีและตัวอย่าง

เอนไซม์ pepsin (P-7000, from porcine stomach mucosa)

เอนไซม์ pancreatin (P-1750, from porcine pancreas)

bile extract (B-6831, porcine) Sigma (St. Louis, MO, USA).

สารละลายแคลเซียมมาตรฐาน (1000 มิลลิกรัมต่อลิตร)

ตัวอย่าง ได้แก่ แคลเซียมคาร์บอเนตแบบเม็ด และ ตัวอย่างนม

การเตรียมสารละลาย pepsin: ละลาย pepsin 0.16 กรัม ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 โมลาร์ 1 มิลลิลิตร

การเตรียม pancreatin–bile extract (PBE) mixture: ละลาย pancreatin 0.004 กรัม และ bile extract 0.025 กรัม ในสารละลาย NaHCO_3 0.001 โมลาร์ 5 มิลลิลิตร

1.2.4 วิธีการทดสอบปริมาณแคลเซียมที่มีทั้งหมดในตัวอย่างและปริมาณแคลเซียมที่มีในตัวอย่างหลังการไดอะไลซิส

ในการวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมที่มีทั้งหมดในตัวอย่างทำได้โดยละลายตัวอย่าง (250 มิลลิกรัม สำหรับแคลเซียมแบบเม็ด และ 10.0 กรัม สำหรับเครื่องดื่มนม) แล้วทำการย่อยด้วยสารละลายกรดไนตริกจนกระทั่งได้สารละลายใส จากนั้นเจือจางด้วยน้ำบริสุทธิ์ ปรับปริมาตรเป็น 100.0 มิลลิลิตร สำหรับของผสมที่เหลืออยู่ในถุงไดอะไลซิสที่ได้หลังการทำไดอะไลซิส (retentate) นั้น จะถูกถ่ายลงบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร และล้างถุงไดอะไลซิส 2 ครั้ง ด้วยสารละลาย EDTA 0.01 โมลาร์ และตามด้วยสารละลายกรดไนตริก 2 เปอร์เซ็นต์ อีก 2 ครั้ง จากนั้นทำการย่อยจนได้สารละลายใส แล้ววิเคราะห์หาปริมาณแคลเซียมด้วยเทคนิค FAAS

1.2.5 วิธีการจำลองการย่อยในกระเพาะอาหารและวิธีการหา Titratable acidity

ขั้นตอนการจำลองการย่อยในกระเพาะอาหารอาศัยหลักการของ Miller สำหรับตัวอย่าง แคลเซียมคาร์บอเนตแบบเม็ด ใช้แคลเซียมคาร์บอเนต 1 เม็ด (ตัวอย่างนมผง 10.0 กรัม) ละลายในน้ำ 90 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 2.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก จากนั้นเติมสารละลาย pepsin 1.5 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 2.0 อีกครั้งด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 100 มิลลิลิตร แล้วเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปรับ pH เป็น 2.0 ทุกๆ 30 นาที

Titrateable acidity ของตัวอย่าง หาได้โดยนำตัวอย่างที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ pepsin 2.5 มิลลิลิตร มาเติม PBE mixture 625 ไมโครลิตร แล้วไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.01 โมลาร์ จนกระทั่งได้ pH 7.5

1.2.6 วิธีการโคอะไลซิสแบบสมดุล (Equilibrium dialysis system)

บรรจุตัวอย่างที่ผ่านการจำลองการย่อยในกระเพาะอาหารด้วยเอนไซม์ pepsin 2.5 กรัมลงในถุงโคอะไลซิสที่บรรจุในภาชนะแก้ว แล้วเติมสารละลาย NaHCO_3 3 มิลลิลิตร ที่มีปริมาณ NaHCO_3 สัมพันธ์กับค่า titrateable acidity ลงในบริเวณที่ว่างระหว่างถุงโคอะไลซิสกับภาชนะแก้ว จากนั้นเขย่าภาชนะแก้วข้างต้น ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติม PBE mixture 625 ไมโครลิตร ลงในถุงโคอะไลซิส เขย่าภาชนะแก้วข้างต้น ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง dialysate จะถูกเก็บในขวดตามลำดับเพื่อวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียม

1.2.7 วิธีการเลือกอัตราการไหลและความเข้มข้นของสารละลาย NaHCO_3 สำหรับระบบ

โคอะไลซิสแบบไหลต่อเนื่อง

ขั้นตอนแรก ใช้สารละลายแคลเซียมมาตรฐานที่เตรียมในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.01 โมลาร์ เป็นตัวอย่างในการศึกษาถึงอิทธิพลของอัตราการไหลของสารละลาย NaHCO_3 ในระบบโคอะไลซิสแบบไหลต่อเนื่อง โดยบรรจุตัวอย่างที่ผ่านการจำลองการย่อยในกระเพาะอาหารด้วยเอนไซม์ pepsin 2.5 กรัมลงในถุงโคอะไลซิส ทำการโคอะไลซิสด้วยสารละลาย NaHCO_3 0.001 โมลาร์ ที่อัตราการไหลต่างๆ และเก็บสารละลายที่ได้จากการโคอะไลซิส อย่างต่อเนื่อง แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียม อัตราการไหลที่เหมาะสมคืออัตราการไหลที่การโคอะไลซิสเกิดได้สมบูรณ์โดยใช้เวลาไม่นานและสารละลายที่ได้จากการโคอะไลซิสไม่เกิดการเจือจางมากเกินไป

ดังนั้น จะใช้อัตราการไหลของสารละลาย NaHCO_3 ที่เหมาะสมในการศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย NaHCO_3 ต่างๆ ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง pH ของตัวอย่างที่ผ่านการจำลองการย่อยในกระเพาะอาหารที่มีค่า titrateable acidity ต่างกัน ประกอบด้วย สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.01 โมลาร์ สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.01 โมลาร์และสารละลายกรดแอสคอร์บิก 0.04 โมลาร์ สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.01 โมลาร์และสารละลายกรดแอสคอร์บิก 0.09 โมลาร์ ซึ่งแต่ตัวอย่างนี้มี pH เท่ากับ 2.0

และมีค่า titratable acidity 0.01, 0.05 และ 0.10 โมลาร์ตามลำดับ ตัวอย่างดังกล่าว 2.5 มิลลิลิตร จะถูกฉีดเข้าระบบการจำลองการย่อยในลำไส้ต่อไป

1.2.8 วิธีการไดอะไลซิสในหลอดแก้วแบบไหลต่อเนื่อง

(Continuous-flow dialysis system)

ขั้นแรก เตรียมถุงไดอะไลซิสแล้วบรรจุลงในภาชนะแก้วสำหรับไดอะไลซิสดังที่ได้อธิบายไปแล้ว ใช้แผ่นซิลิโคนคั่นระหว่างฝากับภาชนะแก้วเพื่อให้ปิดสนิท แล้วนำภาชนะแก้วสำหรับไดอะไลซิสนี้ต่อกับท่อที่พาสารละลาย NaHCO_3 ทั้งเข้าและออกจากภาชนะแก้ว หลังจากนั้นจุ่มภาชนะแก้วลงใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส ฉีดตัวอย่างที่ผ่านการจำลองการย่อยในกระเพาะอาหารเข้าสู่ถุงไดอะไลซิสผ่านท่อซิลิโคนด้วยกระบอกฉีด เริ่มการไดอะไลซิสด้วยการพาสารละลาย NaHCO_3 เข้าสู่ระบบด้วยอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บ dialysate ลงในขวดพลาสติกทุก 10 นาที หลังจากไดอะไลซิสได้ 30 นาที ฉีด PBE mixture 625 ไมโครลิตร ลงในถุงไดอะไลซิส แล้วทำการไดอะไลซิสต่ออีก 2 ชั่วโมง แล้วนำ dialysate ไปวิเคราะห์ปริมาณธาตุด้วยเทคนิค FAAS ปริมาณธาตุที่ไดอะไลซ์ได้นั้นคำนวณได้จากผลรวมของทุกขวด

1.2.9 วิธีคำนวณค่าความสามารถที่ร่างกายจะนำแร่ธาตุไปใช้ (Dialyzability)

ปริมาณแคลเซียมที่สามารถไดอะไลซ์สามารถ คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ Dialyzability ได้ดังสมการ

$$\text{Dialyzability (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(D - B) \times 100}{W \times A}$$

เมื่อ	D	คือ ปริมาณของธาตุที่ไดอะไลซ์ได้ในตัวอย่าง
	B	คือ ปริมาณของธาตุที่ไดอะไลซ์ได้ใน Blank
	W	คือ น้ำหนักตัวอย่าง
	A	คือ ความเข้มข้นของธาตุในตัวอย่าง

สำหรับวิธีไดอะไลซิสแบบสมดุล แคลเซียมที่ไดอะไลซ์ได้จะคำนวณโดยนำเอาปริมาณที่วิเคราะห์ได้คูณสองในกรณีที่ปริมาตรของตัวอย่างในถุงไดอะไลซิสกับปริมาตรของสารละลาย NaHCO_3 ที่ใช้เท่ากัน เนื่องจาก ธาตุที่สามารถไดอะไลซ์ได้เพียงครั้งเดียวเท่านั้นที่จะแพร่ผ่านเมมเบรนออกมาได้ ถ้าปริมาตรของตัวอย่างในถุงไดอะไลซิสกับปริมาตรของสารละลาย NaHCO_3 ที่ใช้ไม่เท่ากัน ต้องคำนวณให้ถูกต้อง

1.3 ผลการทดลองและวิจารณ์

1.3.1 การออกแบบระบบไดอะไลซิสแบบไหลต่อเนื่องเพื่อประมาณค่าความสามารถที่ร่างกายจะนำแร่ธาตุไปใช้

การดูดซึมแร่ธาตุเกิดขึ้นที่บริเวณลำไส้เล็กส่วนต้น การจำลองสภาวะในลำไส้เล็กจึงเป็นส่วนสำคัญในการพัฒนาระบบเพื่อประมาณค่าการดูดซึมได้ของแร่ธาตุ ถ้าสภาวะกรดต่างในลำไส้ต่างกันจะมีผลต่อการดูดซึมได้ของแร่ธาตุ ดังนั้นการศึกษานี้จึงสนใจกระบวนการเปลี่ยนแปลง pH ซึ่งเป็นตัวแปรที่สำคัญอันหนึ่งในขั้นตอนการทำไดอะไลซิส โดยกราฟการเปลี่ยนแปลง pH ที่ได้จะสอดคล้องกับกราฟไดอะไลซิส วิธีไดอะไลซิสแบบ dynamic ได้ถูกพัฒนาโดยนักวิจัยหลายกลุ่ม เช่น Miller, Minihansfe, Shen และ Wolters และในงานวิจัยนี้ มีการปรับ pH ที่แตกต่างกัน

การศึกษ้อัตราการไหลและความเข้มข้นของสารละลาย NaHCO_3 ที่เหมาะสม มีวัตถุประสงค์เพื่อเลียนแบบระบบการย่อยอาหารในลำไส้ของมนุษย์ ดังนี้

1. การเปลี่ยน pH จาก 2.0 เป็น 5.0-6.0 ใน 30 นาที แล้วเปลี่ยน pH เป็น 7.0-7.5 ภายใน 60 นาที และคงที่หลังจากนี้
2. การเติมเอนไซม์สำหรับการย่อย ณ เวลาที่ต้องการผ่านวาล์ว
3. การเก็บ dialysate อย่างต่อเนื่องออกจากระบบไดอะไลซิส

ตามวัตถุประสงค์ข้างต้น จึงศึกษาการอัตราการไหลที่เหมาะสม และ ความเข้มข้นของสารละลาย NaHCO_3 ที่เหมาะสม ตามลำดับ

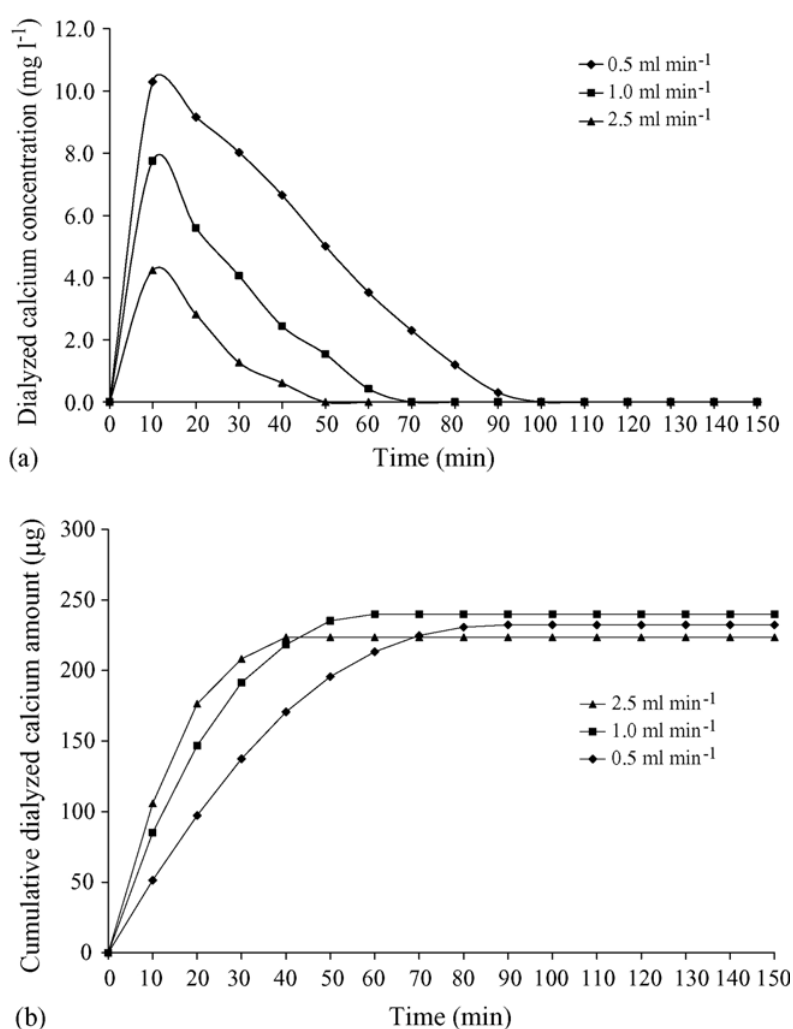
ระบบที่เสนอข้างต้นสามารถนำมาเชื่อมกับเครื่อง FAAS ทำการตรวจวัดแบบ on-line ได้ แต่ในการศึกษานี้จะเก็บสารละลายที่ได้จากการไดอะไลซิสเป็นขวดทุก 5 หรือ 10 นาที แล้ววิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมต่อไป ในกรณีนี้ dialysate บางส่วนเท่านั้นที่นำไปวิเคราะห์หาปริมาณธาตุ ซึ่งสามารถเก็บ dialysate นั้นไปวัด pH และสามารถเก็บไว้ตรวจวัดซ้ำได้

1.3.2 การเลือกอัตราการไหลที่เหมาะสมของสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต

การจำลองการย่อยในกระเพาะอาหารด้วยเอนไซม์ pepsin ที่ pH 2.0 ทำในระบบเบทซ์ สำหรับระบบการย่อยในลำไส้เป็นแบบไดอะไลซิสที่สมดุลโดยที่ตัวอย่างจะถูกแช่อยู่ในตัวกลางคือสารละลาย NaHCO_3 ที่มีความเข้มข้นเหมาะสม ไหลผ่านถุงไดอะไลซิสที่อยู่ในบรรจุตัวอย่างที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ pepsin ส่วนของสารละลายที่สามารถแพร่ผ่านเมมเบรนจะถูกเก็บเป็นส่วนๆ ซึ่งได้ทำการศึกษ้อัตราการไหลที่เหมาะสมรวมถึงความเข้มข้นของสารละลาย NaHCO_3 ที่เหมาะสม ต่อการเปลี่ยนแปลง pH ในการทำไดอะไลซิส ในทางทฤษฎี หากใช้อัตราการไหลที่เร็วจะทำให้การเคลื่อนตัวของสารละลายที่ได้จากการไดอะไลซิสออกจากระบบได้เร็ว ดังนั้นสามารถลดเวลาในการทำไดอะไลซิสด้วย

การใช้อัตราการไหลที่เร็วได้ แต่อย่างไรก็ตามจะทำให้เกิดการเจือจางของ dialysate การเลือกอัตราการไหลที่เหมาะสมจึงต้องพิจารณาให้การพาสารละลายที่ได้จากการไดอะไลซิสออกจากระบบได้เร็วและต้องไม่ทำให้เกิดการเจือจางที่มากเกินไป รูปที่ 1.2 แสดงกราฟไดอะไลซิสเมื่อใช้อัตราการไหลต่างๆ ซึ่งแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของแคลเซียมที่สามารถไดอะไลซิสได้เมื่อใช้อัตราการไหล 0.5, 1.0 และ 2.5 มิลลิลิตรต่อนาที

ในการพา dialysate ออกจากระบบได้อย่างสมบูรณ์นั้น หากใช้อัตราการไหล 2.5 มิลลิลิตรต่อนาที จะใช้เวลาเพียง 50 นาที แต่ถ้าใช้อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที จะใช้เวลานานประมาณ 100 นาที แต่ความเข้มข้นของแคลเซียมในสารละลายที่ได้จากการไดอะไลซิสจะต่ำกว่าเมื่อใช้อัตราการไหลที่เร็ว ซึ่งเป็นผลจากการเจือจางที่เกิดขึ้น ดังนั้นอัตราการไหลที่เหมาะสมสำหรับการศึกษานี้ ได้แก่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที เนื่องจากใช้เวลาในการไดอะไลซิสเสร็จสมบูรณ์ภายในเวลา 1 ชั่วโมง และการเจือจางที่เกิดขึ้นอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้



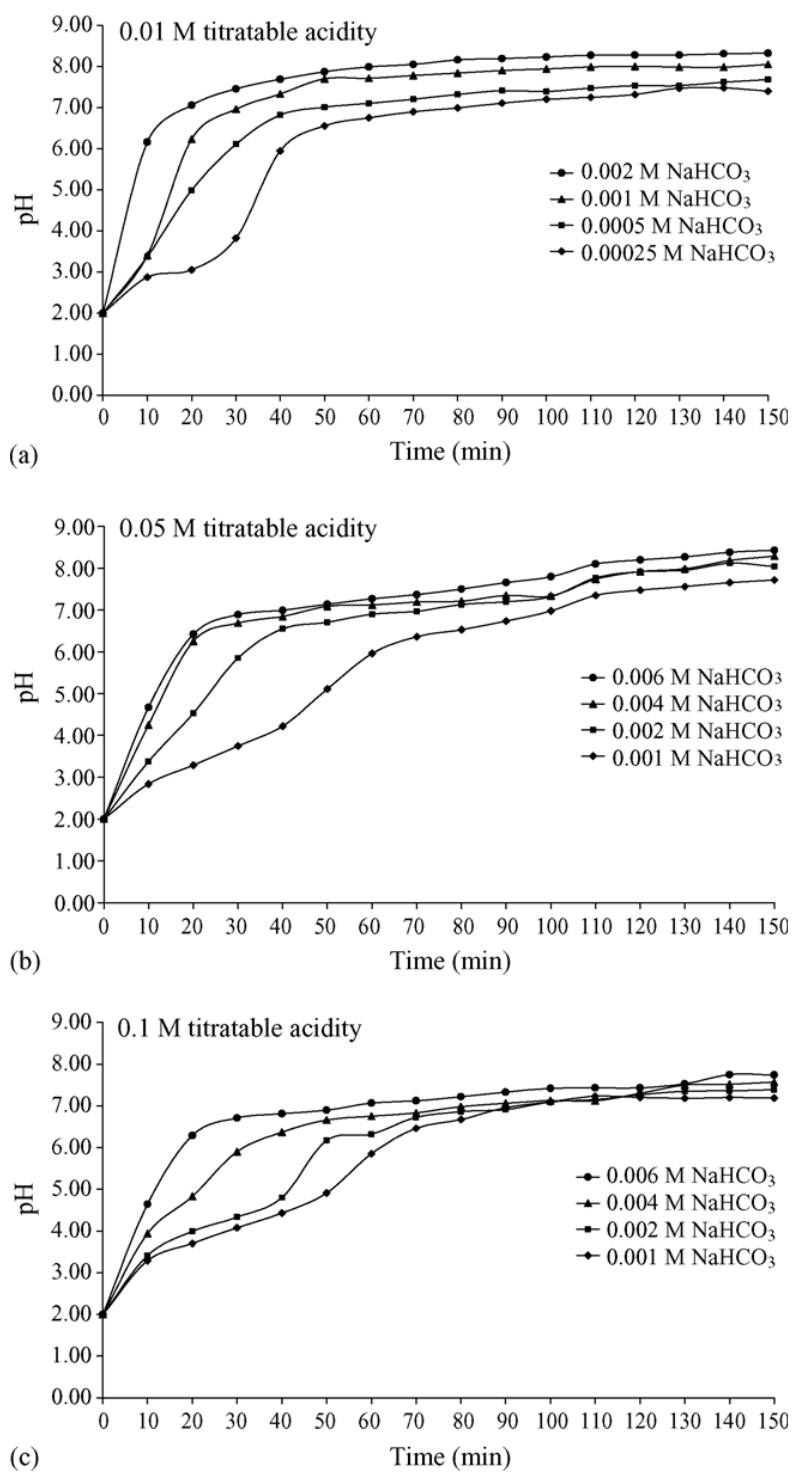
รูปที่ 1.2 กราฟแสดง (a) ปริมาณแคลเซียมที่ถูกไดอะไลซิสได้ (b) ปริมาณสะสมของแคลเซียมที่ถูกไดอะไลซิสได้ อัตราการไหลต่างๆ ของ dialyzing solution โดยใช้แคลเซียมเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณ 2.5 มิลลิลิตร

1.3.3 การเลือกความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตที่เหมาะสม

ทำการศึกษาเพื่อประเมินค่าความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้ในการทำไดอะไลซิสเพื่อการเปลี่ยนแปลง pH เป็นไปตามสภาวะที่เกิดขึ้นจริง รูปที่ 1.3 แสดงกราฟของการเปลี่ยนแปลง pH เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลาย NaHCO_3 ต่างๆ ไดอะไลซิสตัวอย่างแคลเซียมแบบเม็ดที่ผ่านการจำลองการย่อยในกระเพาะอาหารซึ่งมีค่า titratable acidity 0.01, 0.05 และ 0.1 โมลาร์ ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย NaHCO_3 ที่เหมาะสมในการไดอะไลซิส กับ ค่า titratable acidity ของตัวอย่าง เป็นดังสมการ

$$\text{ความเข้มข้นของสารละลาย } \text{NaHCO}_3 = \frac{\text{Titratable acidity ในหน่วยโมลาร์}}{25}$$

เมื่อทำการไดอะไลซิสตัวอย่างแคลเซียมแบบเม็ดที่มีค่า titratable acidity ต่างๆ โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลาย NaHCO_3 ที่คำนวณจากสมการข้างต้น พบว่าการเปลี่ยนแปลง pH ขณะไดอะไลซิสใกล้เคียงกับสภาวะจริงเป็นที่น่าพอใจ ดังนั้นสมการข้างต้นจะใช้ในการหาความเข้มข้นของสารละลาย NaHCO_3 ที่เหมาะสมในการไดอะไลซิสตัวอย่างแคลเซียมแบบเม็ดต่อไป หากเปลี่ยนชนิดของตัวอย่างจำเป็นจะต้องศึกษาความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของสารละลาย NaHCO_3 ที่เหมาะสมในการไดอะไลซิส กับ ค่า titratable acidity ในตัวอย่างชนิดนั้นๆ เช่น กรณีตัวอย่างเครื่องคัมนม พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย NaHCO_3 ที่เหมาะสมในการไดอะไลซิส เท่ากับ ค่า titratable acidity ในหน่วยโมลาร์ หาดด้วย 50 ความแตกต่างที่เกิดขึ้นน่าจะมีสาเหตุมาจากในตัวอย่างเครื่องคัมนมที่ผ่านการจำลองการย่อยในกระเพาะอาหารมีปริมาณสารแขวนลอยมากกว่า ซึ่งอาจทำให้อัตราการแพร่ผ่านเมมเบรนช้าลง ดังนั้น สำหรับการศึกษาตัวอย่างต่างชนิดจึงจำเป็นจะต้องศึกษาความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของสารละลาย NaHCO_3 ที่เหมาะสมในการไดอะไลซิสกับค่า titratable acidity ในตัวอย่างชนิดดังกล่าวด้วย



รูปที่ 1.3 อิทธิพลของความเข้มข้นของ NaHCO_3 ต่อการเปลี่ยนแปลงค่า pH ระหว่าง dialysis สำหรับตัวอย่างที่มีค่า titratable acidity ต่างๆ หลังผ่านกระบวนการย่อยด้วย pepsin ที่อัตราการใช้ 1.0 มิลลิลิตร ต่อนาที

1.3.4 การศึกษาความถูกต้องของระบบที่พัฒนาขึ้น (Method validation)

เนื่องจากไม่มีสารมาตรฐานที่ให้ข้อมูลเกี่ยวกับค่าความสามารถที่ร่างกายจะนำแร่ธาตุไปใช้ได้ จึงมีความจำเป็นในการศึกษาความน่าเชื่อถือของระบบที่พัฒนาขึ้นนี้ โดยทำการศึกษา analytical recoveries ของธาตุที่สนใจ ในการทดลองนี้ใช้ตัวอย่างนมผงเพื่อศึกษาหาความสามารถที่ร่างกายจะนำแร่ธาตุไปใช้และส่วนที่ร่างกายไม่สามารถนำแร่ธาตุไปใช้ได้ ตารางที่ 1.1 แสดงผลการศึกษา พบว่า % dialyzability ใกล้เคียงกัน และพบว่าให้ % recovery ที่ยอมรับได้

ตารางที่ 1.1 ค่า analytical recovery ของธาตุแคลเซียมสำหรับตัวอย่างนมผง (n = 3)

ตัวอย่าง	Dialyzed		Non-dialyzed		%Recovery
	Amount (mg kg ⁻¹)	%Dialyzability	Amount (mg kg ⁻¹)	%Remaining	
นมผง	4680	68.1	1800	26.2	94.3
	4500	65.4	2270	33.1	98.4
	4780	69.5	2080	30.3	99.8
ค่าเฉลี่ย	4650 ± 140	67.6 ± 2.1	2060 ± 240	29.9 ± 3.4	97.5 ± 2.9

Total calcium 6890 ± 120 mg kg⁻¹

1.3.5 การศึกษาค่าความสามารถที่ร่างกายจะนำแคลเซียมไปใช้ได้ กรณีตัวอย่าง

แคลเซียมคาร์บอเนตแบบเม็ดและเครื่องดื่มนม

ตัวอย่างการประยุกต์ใช้ระบบที่ได้พัฒนาขึ้นในการประมาณค่าการดูดซึมได้ของแคลเซียมในตัวอย่างเครื่องดื่มนม ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 1.2 โดยแสดงค่าเปรียบเทียบกับวิธีการไออะไลซิสของกลุ่มงานวิจัยอื่นๆ ทั้งแบบไดนามิกและแบบสมดุล

เนื่องจากยังไม่มีวิธีไออะไลซิสใดที่ถูกยอมรับเป็นวิธีมาตรฐานเพื่อใช้ประมาณค่าการดูดซึมได้ของแร่ธาตุในอาหาร ดังนั้นกลุ่มนักวิจัยต่างๆ จึงมีวิธีการและใช้สถานะต่างกัน นอกจากนั้นแล้วองค์ประกอบต่างๆ ในตัวอย่างก็มีผลต่อการไออะไลซิส องค์ประกอบบางตัวทำหน้าที่ช่วยให้ไออะไลซ์ได้มากขึ้น ในขณะที่องค์ประกอบบางตัวจะไปยับยั้งการไออะไลซิส ซึ่งสาเหตุต่างๆ ดังที่กล่าวมา ทำให้การเปรียบเทียบผลการทดลองจากกลุ่มงานวิจัยต่างๆ เป็นไปได้ยาก

ตารางที่ 1.2 เปรียบเทียบร้อยละของ bioavailability (dialyzability) ของธาตุแคลเซียมในตัวอย่างเครื่องดื่ม
นมต่างๆ และ calcium carbonate ที่วิเคราะห์ได้จากกลุ่มวิจัยต่างๆ

Sample	In vitro		In vivo	Ref.
	Continuous flow	Equilibrium		
Powder cow milk	42.7 ± 2.5 ^a	16.3 ± 1.1 ^a (32.6 ± 2.2)	-	This work
Powder milk-based formula	67.7 ± 2.1	-	-	This work
Cow milk	-	20.2 ± 1.4	-	[22]
Cow milk	-	17.0 ± 0.8	-	[18]
Milk-based formula	13.9 ± 2.6 ^b	10.2 ± 0.7	-	[13]
Milk-based formula	4.3 ± 0.6 ^c	-	-	[13]
Cow milk	-	-	46.3 ± 9.5	[23]
Whole milk	-	-	31 ± 3	[24]
Powder cow milk	-	-	37.4 ± 8.7	[25]
Calcium carbonate	72.8 ± 2.2 ^a	32.4 ± 1.5 ^a (64.8 ± 3.0)	-	This work
Calcium carbonate	-	-	43.0 ± 5.9	[25]
Calcium carbonate	-	-	39 ± 3	[24]

^a $n = 3$, in brackets are corrected values (ดูตอนที่ 1.2.9)

^b By Shen's method

^c By Minihane's method

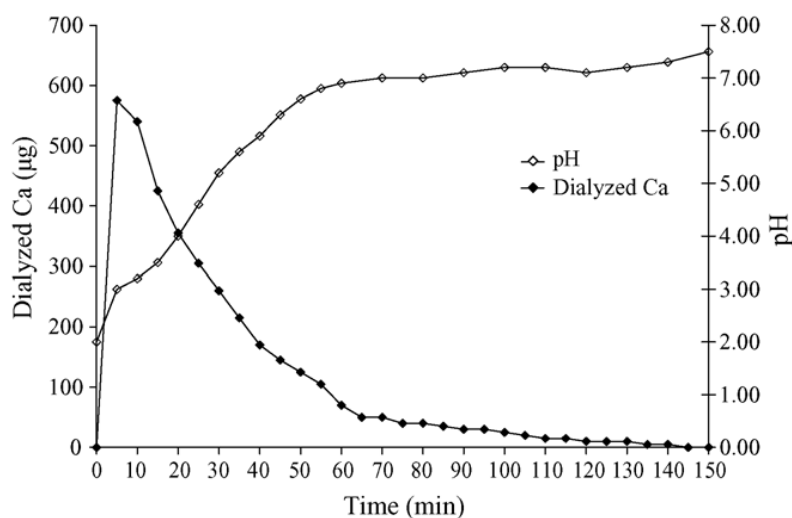
ผลการทดลองพบว่า ในงานวิจัยนี้ กรณีตัวอย่างเครื่องดื่มนมวัว พบแคลเซียมที่ไอโอะไลซ์ได้ 32.6 และ 42.7 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้วิธีไอโอะไลซิสแบบสมดุลและแบบไดนามิคตามลำดับ มีการศึกษาในตัวอย่างเครื่องดื่มนม ซึ่งพบแคลเซียมที่ไอโอะไลซ์ได้มากถึง 67.7 เปอร์เซ็นต์ โดยค่าประมาณการดูดซึมได้ของแคลเซียมในตัวอย่างเครื่องดื่มนมจากกลุ่มวิจัยต่างๆ พบในช่วง 4.3 ถึง 46.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งค่าที่แตกต่างกันนี้ น่าจะมีสาเหตุมาจากความแตกต่างขององค์ประกอบในตัวอย่างเครื่องดื่มนมที่ศึกษา วิธีการทดลองและ สภาวะที่ใช้

กรณีตัวอย่างแคลเซียมคาร์บอเนตแบบเม็ด งานวิจัยนี้ พบแคลเซียมที่ไอโอะไลซ์ได้ 64.8 และ 72.8 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้วิธีไอโอะไลซิสแบบสมดุลและแบบไดนามิคตามลำดับ นักวิจัยบางกลุ่มรายงานว่า การละลายที่ไม่สมบูรณ์และขีดจำกัดของการละลายแคลเซียมคาร์บอเนตจะส่งผลต่อความสามารถในการไอโอะไลซ์ของแคลเซียม ในงานวิจัยนี้ พบว่า หลังการจำลองการย่อยตัวอย่างในกระเพาะอาหารที่ pH 2.0 เป็นเวลา 2 ชั่วโมงนั้น สารละลายที่ได้ค่อนข้างใส แสดงว่าตัวอย่างแคลเซียมคาร์บอเนตละลายได้เกือบหมด ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุที่ได้ค่า dialyzability ที่สูงกว่างานวิจัยอื่น ส่วนค่าที่ได้จากวิธีไอโอะไลซิสแบบสมดุลพบว่าต่ำกว่า อาจเนื่องมาจากสารที่ได้จากการไอโอะไลซิสบางส่วนหายไปขณะเปลี่ยนภาชนะหลังไอโอะไลซิสแล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณ ซึ่งอาจจะติดอยู่ที่ภาชนะซึ่งขั้นตอนนี้ ไม่พบในวิธีไอโอะไลซิสแบบไดนามิค

ส่วนผลการทดลองจากวิธีวิเคราะห์ในสิ่งมีชีวิตแบบสมดุล พบว่า ได้ค่า bioavailability ต่ำ (43.0 และ 39 เปอร์เซ็นต์)

เนื่องด้วยวิธีการไดอะไลซิสแบบในหลอดแก้วสอดคล้องกับการประมาณค่าที่แท้จริง การใช้วิธีการต่างๆ เพื่อศึกษา bioavailability จำเป็นต้องพิจารณาภาวะที่ใช้อย่างระมัดระวังและการรายงานค่าต่างๆ ควรมาจากการใช้วิธีการเดียวกันภายใต้สภาวะเดียวกัน เพื่อให้มั่นใจว่าในการไดอะไลซิสแต่ละครั้ง ทำภายใต้สภาวะเดียวกัน งานวิจัยนี้จึงได้เสนอการตรวจวัดค่า pH ที่เปลี่ยนแปลงขณะทำไดอะไลซิส กราฟไดอะไลซิสและกราฟการเปลี่ยนแปลง pH ขณะทำการไดอะไลซิสตัวอย่างแคลเซียมคาร์บอเนตแบบเม็ด หลังจากผ่านการจำลองการย่อยในกระเพาะอาหาร แสดงดังรูปที่ 1.4 กราฟ pH ดังกล่าวชี้ให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลง pH ที่เป็นไปตามสภาวะจริงที่เกิดขึ้นในมนุษย์ กราฟไดอะไลซิสของแคลเซียมจะมีค่าสูงในส่วนต้น แล้วลดลงอย่างต่อเนื่องเหมือนกับกราฟรูปที่ 1.2 การไดอะไลซิสอย่างสมบูรณ์ใช้เวลาเพียง 60 นาที เหมือนกันกับกรณีตัวอย่างเครื่องคั้นนม

กราฟไดอะไลซิสและการเปลี่ยนแปลง pH น่าจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาเปรียบเทียบ dialyzability ของตัวอย่างต่างชนิดและการศึกษาอิทธิพลขององค์ประกอบในตัวอย่างที่มีผลต่อ dialyzability ซึ่งข้อมูลดังกล่าวไม่สามารถวิเคราะห์ด้วยระบบไดอะไลซิสแบบสมดุลได้



รูปที่ 1.4 กราฟแสดงปริมาณธาตุแคลเซียมที่ไดอะไลซ์ได้และการเปลี่ยนแปลง pH ของเม็ด calcium carbonate โดยวิธีการไดอะไลซิสในหลอดแก้วแบบไหลต่อเนื่อง

1.4 บทสรุป

การจำลองระบบการย่อยในลำไส้ได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อประมาณค่าการดูดซึมได้ของแร่ธาตุ วิธีไดอะไลซิสในหลอดแก้วแบบไหลต่อเนื่องน่าจะเป็นวิธีที่ใกล้เคียงกับระบบจริงที่เกิดขึ้นมากกว่าวิธีไดอะไลซิสในหลอดแก้วแบบสมดุลเนื่องจากสารที่แพร่ผ่านเมมเบรนได้จะถูกพาออกจากระบบขณะทำไดอะไลซิส

ในงานวิจัยนี้ระบบไดอะไลซิส อย่างง่ายแบบไหลต่อเนื่องได้ถูกพัฒนาและใช้ในการประมาณค่าแคลเซียมที่ร่างกายจะสามารถดูดซึมได้ แล้วนำมาเปรียบเทียบกับวิธีไดอะไลซิสแบบสมดุล ส่วนที่สำคัญในการจำลองระบบการดูดซึมให้เหมือนในลำไส้ก็คือ การปรับ pH ขณะเกิดการย่อยในลำไส้ ซึ่งทำได้โดยการใช้อัตราการไหลและความเข้มข้นของสารละลาย NaHCO_3 ในการทำไดอะไลซิสให้เหมาะสม เงื่อนไขที่เหมาะสมสำหรับวิธีไดอะไลซิสแบบไหลต่อเนื่อง คือ ใช้อัตราการไหลของสารละลาย NaHCO_3 เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และความเข้มข้นของสารละลาย NaHCO_3 ขึ้นกับค่า titratable acidity ของตัวอย่าง นอกจากนั้นแล้ว การเตรียม PBE mixture ควรเตรียมในสารละลาย NaHCO_3 เข้มข้น 0.001 โมลาร์ เพื่อให้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง pH น้อยที่สุด แทนการเตรียมในสารละลาย NaHCO_3 เข้มข้น 0.1 โมลาร์ซึ่งใช้ในระบบไดอะไลซิสแบบสมดุล จากผลการทดลองพบว่าระบบที่ได้เสนอนั้น ให้การเปลี่ยนแปลง pH อย่างต่อเนื่อง วิธีไดอะไลซิสแบบไหลต่อเนื่องไม่ได้ให้ข้อมูลเฉพาะค่า dialyzability ของธาตุต่างๆ เพียงเท่านั้น แต่ยังสามารถให้กราฟไดอะไลซิสเพื่อการศึกษารายละเอียดอื่นๆ ได้ การเปลี่ยนแปลง pH ขณะไดอะไลซิสจะมีผลต่อค่า dialyzability เนื่องจากบางธาตุเกิดการตกตะกอน จึงได้มีการพัฒนาการตรวจวัดค่า pH อย่างต่อเนื่องไปพร้อมๆ กับการไดอะไลซิส กราฟไดอะไลซิสที่สอดคล้องกับ pH ที่เปลี่ยนแปลงจะช่วยให้เข้าใจถึงการไดอะไลซิส ณ เวลาต่างๆ และอิทธิพลขององค์ประกอบในตัวอย่างที่มีผลต่อค่า dialyzability ของธาตุนั้น

ระบบที่ถูกพัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปเชื่อมต่อกับระบบตรวจวัดธาตุแบบอื่นได้ รวมถึงสามารถตรวจวัดแบบ on-line ได้ ในตอนที่ 1 นี้เสนอการวิเคราะห์เพียงธาตุเดียว คือ แคลเซียม ด้วยเทคนิค FAAS แบบ off-line ในการศึกษาในตอนต่อไป ระบบไดอะไลซิสแบบไหลต่อเนื่องจะถูกเชื่อมต่อกับหน่วยตรวจวัด เช่น ETAAS (ตอนที่ 2), ICP-MS, ICP-OES (ตอนที่ 3) และตรวจวัดแบบ on-line เพื่อให้สามารถตรวจวัดธาตุได้หลายๆ ธาตุไปพร้อมๆ กันและเพื่อแสดงให้เห็นถึงการใช้ประโยชน์ของกราฟไดอะไลซิส

1.5 เอกสารอ้างอิง

1. L.H. Allen, *Am. J. Clin. Nutr.* 1982, **35**, 783.
2. L. Shackleton and R.A. McCance, *Biochem. J.* 1936, **30**, 583.
3. B.S. Narasinga Rao and T. Prabhavathi, *Am. J. Clin. Nutr.* 1978, **31**, 169.
4. S. Lock and A.E. Bender, *Br. J. Nutr.* 1980, **43**, 413.
5. D.D. Miller, B.R. Schriker, R.R. Rasmussen and D. Van Campen, *Am. J. Clin. Nutr.* 1981, **34**, 2248.
6. B.R. Schriker, D.D. Miller, R.R. Rasmussen, D. Van Campen, *Am. J. Clin. Nutr.* 1981, **34**, 2257.
7. T. Hazell and I.T. Johnson, *Br. J. Nutr.* 1987, **57**, 223.
8. R.F. Hurrell, S.R. Lynch, T.P. Trinidad, S.A. Dassenko and J.D. Cook, *Am. J. Clin. Nutr.* 1988, **47**, 102.

9. M.G.E. Wolters, H.A.W. Schreuder, G. Van Den Heuvel, H.J. Van Lonkhuijsen, R.J.J. Hermus and A.G.J. Voragen, *Br. J. Nutr.* 1993, **69**, 849.
10. P. Hocquellet and M.D. L'Hotellier, *J. AOAC Int.* 1997, **80**, 920.
11. J. Veenstra, M. Minekus, P. Marteau and R. Havenaar, *Int. Food Ingredients*, 1993, **3**, 1.
12. A.M. Minihane, T.E. Fox and S.J. Fairweather-Tait, *Proceedings of Bioavailability '93 Nutritional, Chemical and Food Processing Implications of Nutrient Availability, Part II, FRG*, 1993, p. 175.
13. L.H. Shen, I. Luten, H. Robberecht, J. Bindels and H. Deelstra, *Lebensm Unters Forsch*, 1994, **199**, 442.
14. M. Minekus, P. Marteau, R. Havenaar and J.H.J. Huis in't Veld, *Altern. Lab. Anim. (ATLA)* 1995, **23**, 197.
15. M. Larsson, M. Minekus and R. Havenaar, *J. Sci. Food Agric.* 1997, **74**, 99.
16. C. Krul, A. Luiten-Schuite, R. Baan, H. Verhagan, G. Hohn, V. Feron and R. Havenaar, *Food Chem. Toxicol.* 2000, **38**, 783.
17. M. Chu and D. Beauchemin, *J. Anal. At. Spectrom.* 2004, **19**, 1213.
18. P. Chaiwanon, P. Puwastien, A. Nitithamyong and P.P. Sirichakwal, *J. Food Comp. Anal.* 2000, **13**, 319.
19. D.R. Van Campen and R.P. Glahn, *Field Crop. Res.* 1999, **60**, 93.
20. C. Ekmekcioglu, *Food Chem.* 2002, **76**, 225.
21. D. Bosscher, Z.L. Lu, R. Van Cauwenbergh, M. Van Callie-Bertrand, H. Robberecht and H. Deelstra, *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2001, **52**, 173.
22. M.J. Roig, A. Alegria, R. Barbera, R. Farre and M.J. Lagarda, *Food Chem.* 1999, **65**, 353.
23. R.P. Heaney, C.M. Weaver, S.M. Hinders, B. Martin and P.T. Packard, *J. Food Sci.* 1993, **58**, 1378.
24. M.S. Sheikh, C.A. Santa Ana, M.J. Niocar, L.R. Schiller and J.S. Fordtran, *N. Engl. J. Med.* 1987, **317**, 532.
25. M.C. Kruger, B.W. Gallaher and L.M. Schollum, *Nutr. Res.* 2003, **23**, 1229.
26. M.J. Brennan, W.E. Duncan, L. Wartofsky, V.M. Butler and H.L. Wray, *Calcif. Tissue Int.* 1991, **49**, 308.

ตอนที่ 2

การพัฒนาระบบไดอะไลซิสแบบไหลต่อเนื่องที่เชื่อมต่อกับ Electrothermal atomic absorption spectrometer (ETAAS) และ pH meter (CFD-ETAAS-pH)

2.1 บทนำ

2.2 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.2.1 สารเคมี

2.2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

2.2.3 อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ETAAS และอุปกรณ์เพื่อตรวจวัด pH

2.2.4 วิธีการจำลองการย่อยในกระเพาะอาหารและการย่อยในลำไส้

2.2.4.1 วิธีไดอะไลซิสแบบสมดุล

2.2.4.2 วิธีไดอะไลซิสแบบไหลต่อเนื่อง

2.2.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณธาตุหลักทั้งหมดที่มีในตัวอย่างเครื่องดื่มนมและธาตุหลักที่
เหลือจากการไดอะไลซิส

2.2.4.4 การคำนวณค่า Dialyzability

2.3 ผลการทดลองและวิจารณ์

2.3.1 กราฟไดอะไลซิส

2.3.2 ค่า Dialyzability ของธาตุหลักในตัวอย่างนม

2.3.3 การศึกษาความถูกต้องของระบบที่พัฒนาขึ้น (Method validation)

2.4 บทสรุป

2.5 เอกสารอ้างอิง

2.1 บทนำ

ระบบหลอดแก้วที่จำลองการย่อยอาหารและดูดซึมสารอาหารอย่างง่ายได้ถูกพัฒนาขึ้นดังที่ได้กล่าวไปแล้วในตอนที 1 ในการประมาณค่าการดูดซึมได้ของแร่ธาตุที่ร่างกายจะนำไปใช้ประโยชน์ได้ประกอบด้วยระบบการจำลองการย่อยในกระเพาะแบบแบทช์ จากนั้นเข้าสู่ระบบการจำลองการย่อยในลำไส้คือระบบไดอะไลซิสแบบไหลต่อเนื่อง ในงานวิจัยนี้ระบบไดอะไลซิสแบบไหลต่อเนื่องจะถูกเชื่อมกับหน่วยตรวจวัดโดยตรงและวิเคราะห์แบบออนไลน์ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณธาตุและติดตามการเปลี่ยนแปลง pH ตามลำดับ ขณะทำไดอะไลซิส

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการวิเคราะห์ธาตุที่มีปริมาณต่ำได้ ดังนั้นเทคนิควิเคราะห์ปริมาณธาตุที่เลือกใช้คือ ETAAS นอกจากนั้นแล้วการติดตามการเปลี่ยนแปลง pH ขณะทำไดอะไลซิส ยังมีความจำเป็นเพื่อให้มั่นใจได้ว่า การเปลี่ยนแปลง pH ที่เกิดขึ้นในระบบที่จำลองขึ้นนั้นใกล้เคียงกับสภาวะจริงที่เกิดขึ้นในร่างกายมนุษย์ ในงานวิจัยนี้ได้ประยุกต์วิธีที่พัฒนาขึ้นเพื่อวิเคราะห์ dialyzability ของธาตุหลักในตัวอย่างเครื่องดื่มนมชนิดต่างๆ ผลที่ได้จะถูกเปรียบเทียบกับวิธีไดอะไลซิสแบบสมดุล

2.2 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.2.1 สารเคมี

สารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.00 ± 0.01 , 7.00 ± 0.01 , และ 10.00 ± 0.01 (Merck, Germany)

สารละลายเหล็กมาตรฐาน (1010 มิลลิกรัมต่อลิตร)

เอนไซม์ pepsin (P-7000, from porcine stomach mucosa)

เอนไซม์ pancreatin (P-1750, from porcine pancreas)

bile extract (B-6831, porcine) Sigma (St. Louis, MO, USA).

ตัวอย่างเครื่องดื่มนม

การเตรียมสารละลาย pepsin: ละลาย pepsin 0.16 กรัม ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 โมลาร์ 1 มิลลิลิตร

การเตรียม pancreatin–bile extract (PBE) mixture: ละลาย pancreatin 0.02 กรัม และ bile extract 0.125 กรัม ในสารละลาย NaHCO_3 0.1 โมลาร์ 5 มิลลิลิตร

2.2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

ETAAS (Perkin–Elmer Analyst 100 atomic absorption spectrometer ต่อกับ deuterium arc background corrector และ Perkin–Elmer HGA-800 heated-graphite atomizer)

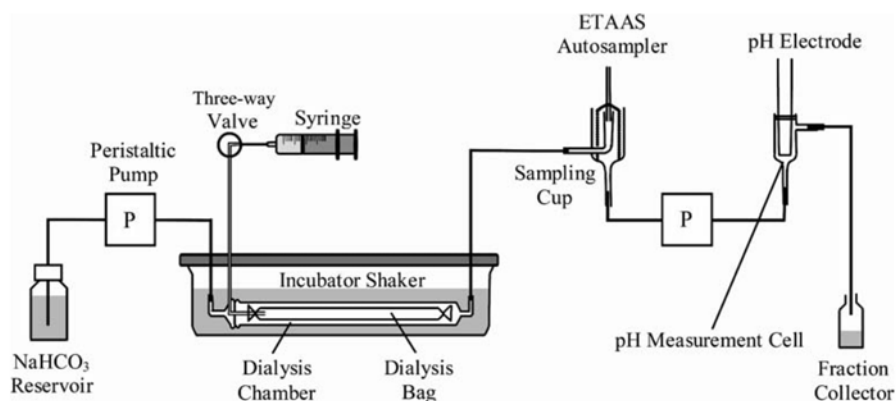
เครื่องวัด pH (Orion Model PCM500 SensorLink)

Incubator shaker, Grant Instrument Model SS40-D2 (Cambridge, England)

อิเล็กโทรด (Orion, เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร)

2.2.3 อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ETAAS และเพื่อตรวจวัด pH

อุปกรณ์สำหรับเก็บสารละลายตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ETAAS ทำจากแก้วซึ่งออกแบบให้กรวยด้านในมีขนาดเล็กและมีปริมาตรน้อยเพื่อให้สามารถตรวจวัด ณ เวลานั้นๆ ได้ แสดงดังรูปที่ 2.1 โดยที่กรวยด้านในและกรวยด้านนอกมีเส้นผ่านศูนย์กลางภายในขนาด 3 และ 8 มิลลิเมตร ตามลำดับ และกรวยด้านในมีปริมาตรเพียง 60 ไมโครลิตร สารละลายที่ไดอะไลซ์ได้จะถูกปั๊มเข้าสู่กรวยด้านในจากด้านล่างแล้วไหลออกสู่กรวยด้านนอกและไหลออกทางด้านล่างของอุปกรณ์นี้ autosampler ของเครื่อง ETAAS จะเก็บตัวอย่างไปครั้งละ 20 ไมโครลิตร เพื่อวิเคราะห์ปริมาณธาตุเหล็กใน dialysate ทุก 2 นาที (หรือเป็นช่วงเวลาที่ห่างกว่านี้ในกรณีที่ความเข้มข้นของเหล็กที่ไดอะไลซ์มีค่าคงที่) สำหรับการตรวจวัด pH อุปกรณ์สำหรับเก็บสารละลายตัวอย่างถูกออกแบบให้มีขนาดใหญ่กว่าอิเล็กโทรดเพียงเล็กน้อย โดยเชื่อมอิเล็กโทรดกับอุปกรณ์สำหรับเก็บสารละลายตัวอย่างนี้ด้วย o-ring ซึ่ง dialysate ที่ไหลมาอย่างต่อเนื่องจะถูกตรวจวัด pH ในอุปกรณ์สำหรับเก็บสารละลายตัวอย่าง



รูปที่ 2.1 ระบบไดอะไลซิสแบบไหลต่อเนื่องเชื่อมต่อกับหน่วยตรวจวัดประเภท ETAAS และ pH

2.2.4 วิธีการจำลองการย่อยในกระเพาะอาหารและการย่อยในลำไส้

2.2.4.1 วิธีไดอะไลซิสแบบสมดุล

การจำลองการย่อยในกระเพาะอาหาร (Gastric digestion): เติมตัวอย่าง 5 มิลลิตร และน้ำ 5 มิลลิตร ลงในภาชนะแก้วขนาด 125 มิลลิตร ปรับ pH เป็น 2.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก

ริกเข้มข้น 6 โมลาร์ แล้วปรับปริมาตรเป็น 12.5 มิลลิลิตรด้วยน้ำ จากนั้นเติมสารละลาย pepsin 325 ไมโครลิตร นำภาชนะดังกล่าวไปแช่ที่อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

การจำลองการย่อยในลำไส้ (Intestinal digestion): หลังจากจำลองการย่อยในกระเพาะอาหาร นำสารที่ได้มา 2.5 กรัม (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) นิดเข้าถุงไดอะไลซิสซึ่งบรรจุอยู่ในภาชนะแก้วสำหรับไดอะไลซิส จากนั้นเติมสารละลาย NaHCO_3 3.0 มิลลิลิตร ลงในภาชนะไดอะไลซิส นำไปแช่ที่อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม PBE mixture 625 ไมโครลิตรลงในถุงไดอะไลซิส แล้วทำไดอะไลซิสต่อเป็นเวลา 2 ชั่วโมง dialysate จะถูกเก็บไปวิเคราะห์ปริมาณธาตุเหล็กต่อไป

การศึกษาหาความเข้มข้นของสารละลาย NaHCO_3 ที่เหมาะสม: คำนวณจากค่า titratable acidity ซึ่ง titratable acidity คือ ปริมาณที่เท่ากับปริมาณของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตตัวอย่างที่ผ่านการจำลองการย่อยในกระเพาะอาหาร ให้ได้ pH 7.5 ทำการศึกษาโดยนำตัวอย่างที่ผ่านการย่อยด้วยกระเพาะอาหาร 2.5 กรัมมาเติม PBE mixture 625 ไมโครลิตร แล้วไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.01 โมลาร์

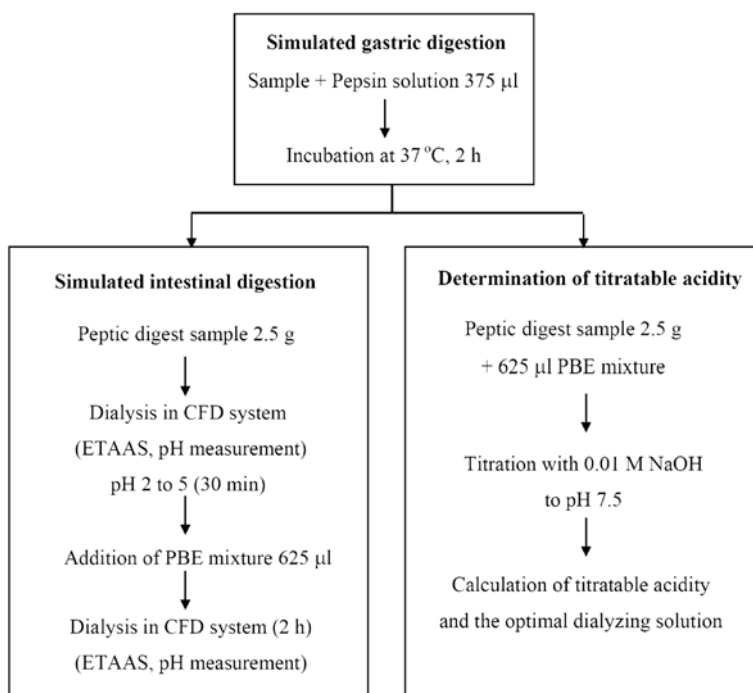
2.2.4.2 วิธีไดอะไลซิสแบบไหลต่อเนื่อง

การจำลองการย่อยในกระเพาะอาหาร (Gastric digestion): เหมือนวิธีไดอะไลซิสแบบสมดุล

การจำลองการย่อยในลำไส้ (Intestinal digestion): รูปที่ 2.1 แสดงภาพระบบไดอะไลซิสแบบไหลต่อเนื่องเพื่อจำลองการย่อยและดูดซึมสารอาหารในลำไส้เล็กหลังจากจำลองการย่อยในกระเพาะอาหารแล้ว ทำการศึกษาโดยนำสารที่ได้มา 2.5 กรัม นิดเข้าถุงไดอะไลซิสซึ่งบรรจุอยู่ในภาชนะแก้วสำหรับไดอะไลซิส ซึ่งปลายทั้งสองข้างของภาชนะไดอะไลซิสต่อกับท่อพาสารละลาย NaHCO_3 เพื่อพาสารละลายเข้าและออกจากภาชนะไดอะไลซิส แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส ปลายด้านที่พาสารละลายออกจากภาชนะไดอะไลซิสจะเชื่อมต่อกับหน่วยตรวจวัด ETAAS และเครื่องวัด pH โดยตรงตามลำดับ เริ่มการไดอะไลซิสด้วยการพาสารละลาย NaHCO_3 เข้าสู่ระบบด้วยอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที หลังจากไดอะไลซิส 30 นาที จึงเติม PBE mixture 625 ไมโครลิตรผ่านวาล์วสามทาง สารละลายที่ไดอะไลซิสได้จะถูกวิเคราะห์หาปริมาณธาตุเหล็กและวัด pH อย่างต่อเนื่อง อีก 2 ชั่วโมง

การศึกษาหาความเข้มข้นของสารละลาย NaHCO_3 ที่เหมาะสม: ความเข้มข้นของสารละลาย NaHCO_3 ที่เหมาะสมจะขึ้นกับค่า titratable acidity ของตัวอย่างและอัตราการไหลที่ใช้ หากใช้อัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ความเข้มข้นของสารละลาย NaHCO_3 ที่เหมาะสมจะคำนวณได้โดยนำค่า titratable acidity หารด้วย 50 ซึ่งความเข้มข้นของสารละลาย NaHCO_3 ที่คำนวณได้นี้จะเปลี่ยนค่า pH เป็น 5.0 หลังการไดอะไลซิส 30 นาที และเปลี่ยนเป็น 7.0 - 7.5 หลังการเติม PBE mixture

การทำ reagent blank จำเป็นที่จะต้องศึกษาเพื่อหากลบเอาปริมาณธาตุเหล็กที่ปนเปื้อนในสารเคมีต่างๆ รวมถึงเอนไซม์ต่างๆ ที่ใช้ด้วย



รูปที่ 2.2 กระบวนการในการทดลองเพื่อศึกษาการดูดซึมได้ของแร่ธาตุ

2.2.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณธาตุหลักทั้งหมดที่มีในตัวอย่างเครื่องดื่มนมและธาตุหลักที่เหลือจากการไดอะไลซิส

ซึ่งตัวอย่าง 1.0 กรัม เติมสารละลายผสมระหว่างกรดไนตริกเข้มข้นกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30 เปอร์เซ็นต์ (อัตราส่วน 3:2) 10.0 มิลลิลิตร ย่อยที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้สารละลายใส นำไปวิเคราะห์ปริมาณธาตุหลักทั้งหมดที่มีในตัวอย่างด้วยเทคนิค ETAAS

กรณีวิเคราะห์ธาตุหลักที่เหลือจากการไดอะไลซิส นำของผสมที่เหลืออยู่ภายในถุงไดอะไลซิสที่ได้หลังการทำไดอะไลซิสถ่ายลงบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร และล้างถุงไดอะไลซิส 2 ครั้ง ด้วยสารละลาย 0.01 M EDTA 3 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลายกรดไนตริก 2 เปอร์เซ็นต์ 10.0 มิลลิลิตร อีก 2 ครั้ง เทลงบีกเกอร์เดียวกัน จากนั้นทำการย่อยจนได้สารละลายใส จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณธาตุหลักทั้งหมดที่มีในตัวอย่างด้วยเทคนิค ETAAS

2.2.4.4 การคำนวณค่า Dialyzability

ปริมาณธาตุที่สามารถไดอะไลซิสได้สามารถคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ Dialyzability ได้ดังสมการที่แสดงในตอนที่ 1.2.9

ในระบบ CFD ความเข้มข้นของเหล็กในสารละลายที่ได้จากไดอะไลซิสอยู่ในระดับนาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งวิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค ETAAS ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้จะเป็นตัวแทน

ของความเข้มข้นของธาตุเหล็กที่สามารถไดอะไลซ์ได้ ณ เวลานั้นๆ เนื่องจากใช้อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร ต่อนาที ดังนั้นหน่วยของปริมาณธาตุเหล็กจะเป็น นาโนกรัมต่อนาที ซึ่งได้มาจากการคูณ ปริมาณกับอัตราการไหล ปริมาณเหล็กที่ไดอะไลซ์ได้โดยรวมจะคำนวณได้จากการอินทิเกรตพื้นที่ใต้กราฟระหว่างปริมาณ ในหน่วย นาโนกรัมต่อนาที กับเวลาในหน่วยนาที ตลอดจนการไดอะไลซิส โดยใช้โปรแกรม Origin เวอร์ชัน 6.0

2.3 ผลการทดลองและวิจารณ์

2.3.1 กราฟไดอะไลซิส

กราฟไดอะไลซิสของธาตุเหล็กและการเปลี่ยนแปลง pH ขณะไดอะไลซิส ของตัวอย่าง เครื่องดื่มชนิดต่างๆ แสดงดังรูปที่ 2.3 ธาตุเหล็กสามารถแพร่ผ่านเมมเบรนระหว่างการย่อยในลำไส้ได้ และแพร่ผ่านได้ลดลงเมื่อ pH เพิ่มขึ้น pH เพิ่มขึ้นเป็น 5.0 อย่างช้าๆ ภายใน 30 นาที เหมือนสภาวะจริงที่เกิดขึ้นในลำไส้ของมนุษย์ แล้ว pH เพิ่มขึ้นเป็น 7.0 อย่างรวดเร็วเนื่องจากเติม PBE mixture หลังจาก pH เป็นกลาง ธาตุเหล็กจะแพร่ผ่านเมมเบรนได้ลดลง ยกเว้น กรณีของตัวอย่างนมธัญพืช UHT และ นมถั่วเหลือง UHT 2 ที่ยังคงไดอะไลซ์ได้ ซึ่งอาจเป็นผลจากองค์ประกอบที่อยู่ในตัวอย่างไม่ไปช่วยให้ไดอะไลซ์ ได้มากขึ้น จากผลการทดลองยังพบว่า ตัวอย่างนมถั่วเหลือง UHT 2 ให้ค่า dialyzability ของธาตุเหล็กสูงกว่า กรณีตัวอย่างนมถั่วเหลือง UHT 1 ทั้งที่มีปริมาณธาตุเหล็กในตัวอย่างน้อยกว่า (แสดงในตารางที่ 2.1)

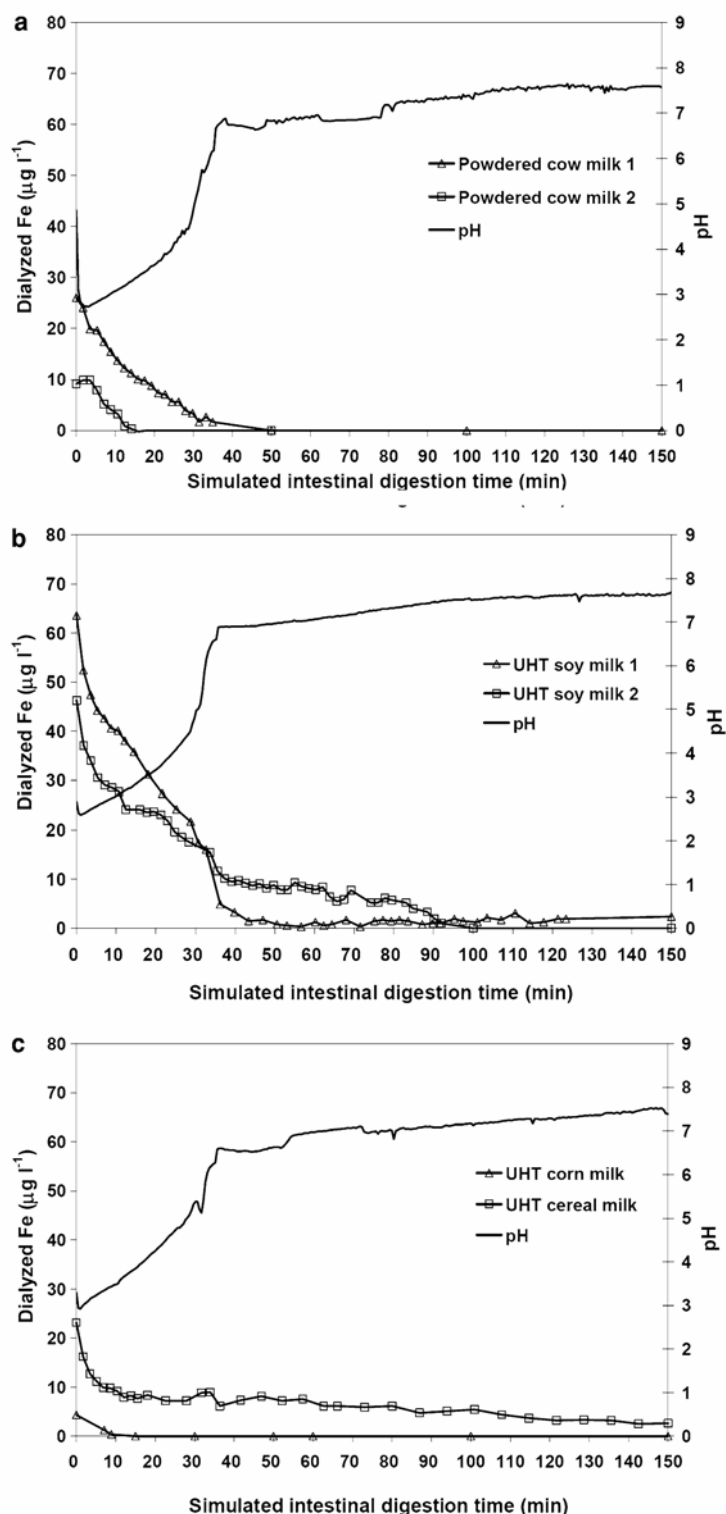
กราฟไดอะไลซิสของตัวอย่างนมวัวแบบผงที่เสริมแคลเซียม แสดงดังรูปที่ 2.3(a) พบว่า ตัวอย่างนมวัวแบบผง 1 ให้ค่า dialyzability ของธาตุเหล็กต่ำ เพียง 1.7 เปอร์เซ็นต์ ส่วนตัวอย่างนมวัวแบบผง 2 มีค่า dialyzability ของธาตุเหล็กต่ำมากไม่สามารถวิเคราะห์ได้ นักวิจัยหลายกลุ่มรายงานว่แคลเซียมมี บทบาทไปยับยั้งการดูดซึมธาตุเหล็ก กลไกของการยับยั้งนี้ยังไม่มีคำอธิบายที่ชัดเจน

กราฟไดอะไลซิสของตัวอย่างนมถั่วเหลือง UHT แสดงดังรูปที่ 2.3(b) ตัวอย่างนมถั่วเหลืองทั้งสองชนิดมีองค์ประกอบดังนี้ โปรตีนถั่วเหลือง วิตามินต่างๆ และแคลเซียมที่ปริมาณต่างกัน ซึ่งมี รายงานว่าวิตามินซีและวิตามินเอจะช่วยในการดูดซึมธาตุเหล็ก ส่วนโปรตีนถั่วเหลืองจะไปยับยั้งการดูดซึม ธาตุเหล็ก ค่า dialyzability ของธาตุเหล็กในตัวอย่างนมถั่วเหลืองนี้ จึงขึ้นกับอิทธิพลของตัวยับยั้งและตัวช่วย ในการดูดซึมได้ของธาตุเหล็ก

สำหรับตัวอย่างนมธัญพืช UHT ธาตุเหล็กสามารถไดอะไลซ์ได้ตลอดการไดอะไลซิส 2.5 ชั่วโมง ในขณะที่ตัวอย่างนมข้าวโพด UHT ธาตุเหล็กที่สามารถไดอะไลซ์มีปริมาณต่ำมากไม่สามารถ วิเคราะห์ได้ ดังกราฟไดอะไลซิส รูปที่ 2.3(c) ตัวอย่างนมข้าวโพด UHT มีปริมาณธาตุเหล็กในตัวอย่างน้อย ที่สุดในกลุ่มตัวอย่างที่เลือกมาศึกษา

ผลการทดลองพบว่าในตัวอย่างเครื่องดื่มชนิดต่างๆ กราฟไดอะไลซิสและความสามารถของธาตุ เหล็กในการไดอะไลซ์ได้จะแตกต่างกัน โดยองค์ประกอบของตัวอย่างมีผลต่อลักษณะของกราฟไดอะไลซิส

ดังนั้นกราฟไดอะไลซิสสามารถใช้ประโยชน์ในการศึกษาอิทธิพลขององค์ประกอบต่างๆ ในอาหารต่อค่า dialyzability ของธาตุต่างๆ



รูปที่ 2.3 กราฟแสดงปริมาณธาตุเหล็กที่ไดอะไลซิสได้และการเปลี่ยนแปลงค่า pH ระหว่างกระบวนการ dialysis สำหรับตัวอย่าง (a) นมผงจากวัว (b) เครื่องดื่มนมถั่วเหลือง UHT (c) เครื่องดื่มนมข้าวโพด UHT วิเคราะห์โดยระบบ CFD-ETAAS-pH โดยใช้อัตราการไหลของ dialyzing solution เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

2.3.2 ค่า Dialyzability ของธาตุเหล็กในตัวอย่างเครื่องดื่มนม

ค่า Dialyzability ของตัวอย่างเครื่องดื่มนมชนิดต่างๆ ที่วิเคราะห์ด้วยระบบที่ได้พัฒนาขึ้น แสดงดังตารางที่ 2.1 พบว่าในตัวอย่างเครื่องดื่มนมมีปริมาณธาตุเหล็กอยู่ในช่วง 0.8 – 17.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งพบธาตุเหล็กมากที่สุดในตัวอย่างเครื่องดื่มนมวัว 1 และต่ำที่สุดในตัวอย่างเครื่องดื่มนมข้าวโพด UHT และพบว่าในตัวอย่างเครื่องดื่มนมวัว 1 มีค่า dialyzability 1.7 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ในกรณีเครื่องดื่มนมวัว 2 และเครื่องดื่มนมข้าวโพด UHT ไม่สามารถประมาณค่าได้ เนื่องจาก dialysate มีปริมาณธาตุเหล็กต่ำกว่าขีดจำกัดของเครื่องมือวัด ในตัวอย่างเครื่องดื่มนมธัญพืช UHT เครื่องดื่มนมถั่วเหลือง UHT 1 และ เครื่องดื่มนมถั่วเหลือง UHT 2 มีค่า dialyzability ของธาตุเหล็ก 20.4, 24.9 และ 37.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่า ธาตุเหล็กในตัวอย่างเครื่องดื่มนมถั่วเหลือง UHT สามารถไดอะไลซ์ได้ดีกว่าในตัวอย่างเครื่องดื่มนมวัว (24.9-37.7 เปอร์เซ็นต์)

ค่า dialyzability ของธาตุเหล็กในตัวอย่างเครื่องดื่มนมชนิดต่างๆ ที่วิเคราะห์ด้วยระบบไดอะไลซิสแบบสมดุล แสดงดังตารางที่ 2.1 พบว่าผลที่ได้จากทั้งสองวิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (t-test)

ตารางที่ 2.1 ปริมาณทั้งหมด ปริมาณที่ไดอะไลซ์ได้ และร้อยละของการไดอะไลซ์ ของธาตุเหล็กในตัวอย่างเครื่องดื่มนมหลายชนิด ทำการวิเคราะห์โดย CFD-ETAAS และระบบไดอะไลซิสแบบสมดุล (n=3)

Sample	Total iron (mg L ⁻¹)	Dialyzed iron			
		CFD		Equilibrium dialysis	
		mg L ⁻¹	Dialyzability (%)	mg L ⁻¹	Dialyzability (%)
Powdered cow milk 1 (calcium and iron fortified)	17.1 ± 0.7	0.28 ± 0.04	1.7 ± 0.3	0.19 ± 0.03	1.1 ± 0.2
Powdered cow milk 2 (calcium fortified)	1.1 ± 0.1	< 0.09 (not detectable)	–	ND	ND
UHT soymilk 1 (high iron, vitamins B, D, E, and soy protein)	5.1 ± 0.0	1.27 ± 0.08	24.9 ± 1.6	1.18 ± 0.15	23.2 ± 3.2
UHT soymilk 2 (high calcium, soy protein, and vitamins A, C and E)	3.0 ± 0.3	1.13 ± 0.07	37.7 ± 2.4	ND	ND
UHT corn milk (high vitamins A and E)	0.80 ± 0.10	< 0.05 (not detectable)	–	ND	ND
UHT cereal milk (high calcium, vitamin B1, B2, E, and soy protein)	4.1 ± 0.3	0.84 ± 0.01	20.4 ± 0.4	0.81 ± 0.03	19.8 ± 0.6

ND for not determined

2.3.3 การศึกษาความถูกต้องของระบบที่พัฒนาขึ้น (Method validation)

เนื่องจากข้อจำกัดของสารมาตรฐานที่ไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับ bioavailability ดังนั้นการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีที่พัฒนาขึ้นจึงต้องศึกษา analytical recoveries ของสารที่สนใจในตัวอย่าง โดยการวิเคราะห์ปริมาณธาตุเหล็กในตัวอย่างนมผงทั้งส่วนที่ไดอะไลซ์ได้และไม่สามารถไดอะไลซ์ได้ ดังแสดงในตารางที่ 2.2 พบว่า % dialyzability ให้ค่าแตกต่างกันเล็กน้อยระหว่างการทำซ้ำ ซึ่งน่าจะมาจาก

ตัวอย่างที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน และพบว่าให้ % recovery อยู่ในช่วง 77.9 – 90.5 เปอร์เซ็นต์เฉลี่ย 83.6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งธาตุเหล็กบางส่วนอาจจะติดอยู่ในถุงไดอะไลซิส แต่อย่างไรก็ตามข้อผิดพลาดดังกล่าวไม่ได้ส่งผลต่อ % dialyzability

ตารางที่ 2.2 Analytical recovery ของการวิเคราะห์ธาตุเหล็กในตัวอย่างนมผง (n = 3)

Sample	Dialyzed		Non-dialyzed		Recovery (%)
	Amount (mg kg ⁻¹)	Dialyzability (%)	Amount (mg kg ⁻¹)	Remaining (%)	
Powdered milk-based formula	3.0	4.8	45.3	73.1	77.9
	2.1	3.4	54.0	87.1	90.5
	3.1	5.1	48.0	77.4	82.4
Average	2.7 ± 0.6	4.4 ± 0.9	49.1 ± 4.5	79.2 ± 7.2	83.6 ± 6.4
Total iron 62.0 ± 1.0 mg kg ⁻¹					

2.4 บทสรุป

วิธีการประมาณค่าการดูดซึมได้ของธาตุเหล็กโดยวิธีไดอะไลซิสแบบไดนามิกในหลอดแก้วได้ถูกพัฒนาขึ้นโดยเชื่อมต่อกับระบบไดอะไลซิสแบบไหลต่อเนื่องอย่างง่ายเข้ากับหน่วยตรวจวัด ETAAS และเครื่องวัด pH ระบบนี้สามารถติดตามปริมาณธาตุเหล็กที่ไดอะไลซ์ได้และการเปลี่ยนแปลง pH ได้พร้อมกัน ในขณะที่ไดอะไลซิส ซึ่งระบบ CFD-ETAAS-pH เป็นเครื่องมือที่ใช้งานได้ดี ราคาไม่แพง เพื่อใช้ในการศึกษา dialyzability และ bioavailability ข้อมูลที่ได้เกี่ยวกับค่า dialyzability ของธาตุต่างๆ นั้น สามารถใช้ประโยชน์ในการประเมินคุณค่าทางโภชนาการได้และยังสามารถใช้ศึกษาอิทธิพลขององค์ประกอบในอาหารต่อค่า dialyzability ของธาตุต่างๆ ความรู้เกี่ยวกับ bioavailability ของสารอาหารนั้นจะเป็นประโยชน์ในการวางแผนการบริโภคที่เหมาะสมและช่วยลดความเสี่ยงในการขาดสารอาหาร

2.5 เอกสารอ้างอิง

1. L.A. Smolin and M.B. Grosvenor, *Nutrition science and applications*. Saunders College Publishing, PA, USA, 1994.
2. A. Scalbert, C. Morand, C. Manach and C. Remesy, *Biomed Pharmacother*, 2002, **56**, 276.
3. R.P. Glahn and G.M. Wortley, *J. Agric. Food Chem.* 2002, **50**, 390.
4. S.R. Lynch, *Nutr. Rev.* 1997, **55**, 102.
5. R.F. Hurrell, *Eur. J. Clin. Nutr.* 1997, **51**, S4.
6. M.N. Garcia-Casal, M. Layrisse, J.P. Peña-Rosas, J. Ramirez, I. Leets and P. Matus, *Nutr. Res.* 2003, **23**, 451.

7. M. Tuntawiroon, N. Sritongkul, M. Brune, L. Rossander-Hulten, R. Pleehachinda, R. Suwanik and L. Hallberg, *Am. J. Clin. Nutr.* 1991, **53**, 554.
8. R. Uicich, F. Pizarro, C. Almeida, M. Díaz, J. Boccio, M. Zubillaga, E. Carmuega and A. O'Donnell, *Nutr. Res.* 1999, **19**, 893.
9. S.A. Atkinson, J.K. Shah, C.E. Webber, I.L. Gibsom and R.S. Gibson, *J. Nutr.* 1993, **123**, 1586.
10. W.A. House, *Field Crop Res.* 1999, **60**, 115.
11. K.J.H. Wienk, J.J.M. Marx and A.C. Beynen, *Eur. J. Nutr.* 1999, **38**, 51.
12. D.R. Van Campen and R.P. Glahn, *Field Crop Res.* 1999, **60**, 93.
13. M.R. Reddy, R.F. Hurrell and J.D. Cook, *Am. J. Clin. Nutr.* 2000, **71**, 937.
14. B.S. Narasinga Rao and T. Prabhavathi, *Am. J. Clin. Nutr.* 1978, **31**, 169.
15. S. Lock and A.E. Bender, *Brit. J. Nutr.* 1980, **43**, 413.
16. D.D. Miller, B.R. Schricker, R.R. Rasmussen, D. Van Campen, *Am. J. Clin. Nutr.* 1981, **34**, 2248.
17. B.R. Schricker, D.D. Miller, R.R. Rasmussen and D. Van Campen, *Am. J. Clin. Nutr.* 1981, **34**, 2257.
18. M.G.E. Wolters, H.A.W. Schreuder, G. Van Den Heuvel, H.J. Van Lonkhuijsen, R.J.J. Hermus and A.G.J. Voragen, *Br. J. Nutr.* 1993, **69**, 849.
19. L.H. Shen, J. Luten, H. Robberecht, J. Bindels and H. Deelstra, *Lebensm Unters Forsch*, 1994, **199**, 442.
20. M. Minekus, P. Marteau, R. Havenaar and J.H.J. Huis in't Veld, *ATLA*, 1995, **23**, 197.
21. P. Chaiwanon, P. Puwastien, A. Nitithamyong and P.P. Sirichakwal, *J. Food Comp. Anal.* 2000, **13**, 319.
22. B. Chen and R. Beckett, *Analyst*, 2001, **126**, 1588.
23. C. Ekmekcioglu, *Food Chem.* 2002, **76**, 225.
24. L. Hallberg, M. Brune, M. Erlandsson, A.S. Sandberg and L. Rossander-Hulten, *Am. J. Clin. Nutr.* 1991, **53**, 112.

ตอนที่ 3

การพัฒนาระบบการซึมผ่านเยื่อบางแบบไหลต่อเนื่องเชื่อมต่อกับหน่วยตรวจวัด ICP-OES เพื่อประมาณค่าการดูดซึมได้ของแร่ธาตุโดยวิธีในหลอดแก้ว

3.1 บทนำ

3.2 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.2.1 เครื่องมือ

3.2.2 วัสดุ และสารเคมี

3.2.3 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาและการเตรียมตัวอย่างอาหาร

3.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณแร่ธาตุ (total mineral content) ในตัวอย่างอาหาร

3.2.5 ระบบการไดอะไลซิสแบบไหลต่อเนื่อง (Continuous-flow dialysis, CFD) ที่เชื่อมต่อการตรวจวัดแบบ on-line ด้วย ICP-OES และเครื่องวัดค่า pH

3.2.6 การวิเคราะห์ปริมาณแร่ธาตุในสารละลายที่ผ่านการย่อยด้วยระบบ CFD (dialysate) และในสารละลายที่เหลือจากการย่อย (residues after dialysis)

3.2.7 การคำนวณหาปริมาณแร่ธาตุที่สามารถดูดซึมได้

3.3 ผลการทดลองและวิจารณ์

3.3.1 การพัฒนา และประเมินประสิทธิภาพของระบบ CFD-ICP-OES เพื่อใช้ในการศึกษาความสามารถในการดูดซึมได้ของแร่ธาตุ

3.3.1.1 การออกแบบ และติดตั้งระบบ CFD-ICP-OES

3.3.1.2 การวัดความเป็นกรดด่าง (pH measurement)

3.3.1.3 ศึกษาผลของ matrix interferences ต่อการวัดด้วย ICP-OES

3.3.1.4 การตรวจสอบความใช้ได้ (Validation) ของระบบ on-line CFD-ICP-OES

3.3.1.5 กราฟการเปลี่ยนแปลงของไดอะไลซิส (Dialysis profile)

3.3.1.6 การประเมินค่าไดอะไลซิสของแร่ธาตุในอาหารชนิดต่างๆ ที่ได้จากใช้ระบบ CFD-ICP-OES

3.3.2 การใช้ประโยชน์ของข้อมูลที่ได้จากระบบ CFD-ICP-OES ในการศึกษาการดูดซึมได้ของแร่ธาตุในสารเสริมแร่ธาตุ

3.3.2.1 การประเมินความสามารถในการไดอะไลซิส และการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

3.3.2.2 กราฟการเปลี่ยนแปลงของการไดอะไลซิส

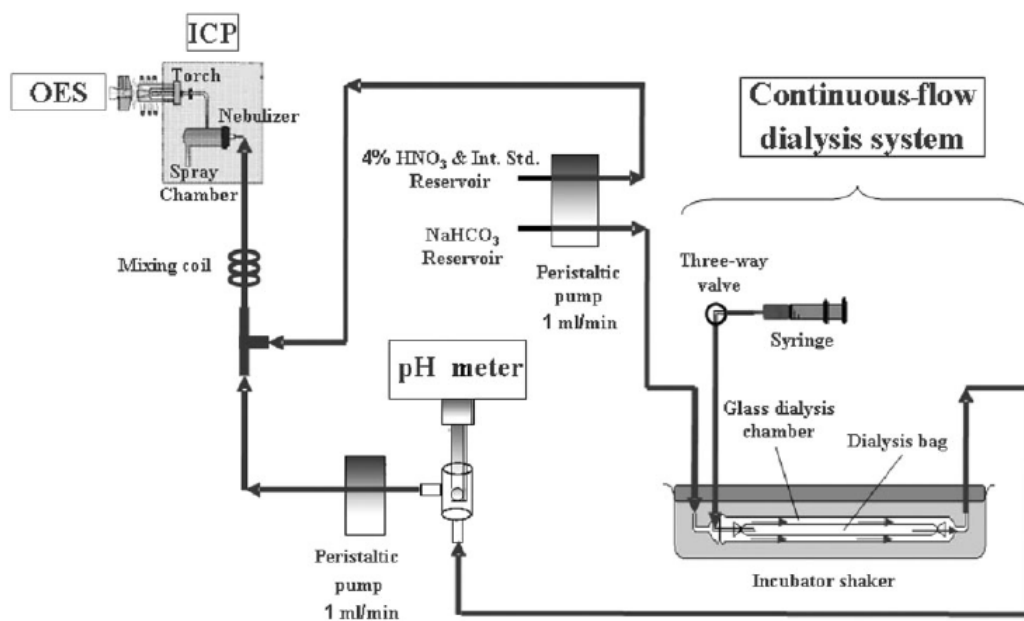
3.3.2.3 กราฟการเปลี่ยนแปลงของไดอะไลซิสของธาตุเหล็กในสารเสริมธาตุเหล็กรูปฟอร์ม
ต่างๆ ที่มีการเติมสารส่งเสริม และสารยับยั้งการดูดซึม

3.4 บทสรุป

3.5 เอกสารอ้างอิง

3.1 บทนำ

ระบบไดอะไลซิสแบบไหลต่อเนื่องที่ได้มีการพัฒนาขึ้นนี้ ในช่วงแรกได้มีการเชื่อมต่อกับหน่วยตรวจวัดประเภท AAS ที่ใช้เปลวไฟ และ AAS ที่ไม่ใช้เปลวไฟ (ตอนที่ 1 และ 2 ตามลำดับ) การตรวจวัดด้วยเครื่องเหล่านี้จะทำการตรวจวัดแร่ธาตุได้ครั้งละธาตุ อย่างไรก็ตามในอาหารมีแร่ธาตุที่มีความสำคัญทางโภชนาการหลายชนิด ดังนั้นในการศึกษานี้ได้ทำการต่อเชื่อมระบบ CFD เข้ากับเครื่องตรวจวัดแบบหลายแร่ธาตุด้วยการตรวจวัดครั้งเดียว คือเครื่องอินดักทีฟพลาสมาออกพิกัลอิมิซชันสเปกโตรมิเตอร์ (ICP-OES) วิธีการประมาณค่าด้วยวิธีนี้ได้ทำการจำลองการย่อยในกระเพาะอาหารโดยใช้ระบบแบทช์ (batch) ตามด้วยการจำลองการย่อยในลำไส้แบบไหลต่อเนื่อง (continuous-flow) ซึ่งทำโดยการผ่านสารละลายเข้าไปในท่อที่ภายในมีตัวอย่างอาหารบรรจุอยู่ในถุงไดอะไลซิส ทำการตรวจวัดค่า pH และความเข้มข้นของธาตุในสารละลายที่แพร่ผ่านถุงไดอะไลซิส ด้วยเครื่อง pH meter และ ICP-OES ตามลำดับ ดังนั้นระบบที่พัฒนาขึ้นนี้จึงสามารถใช้ในการตรวจวัดค่า pH และความเข้มข้นของแร่ธาตุต่างๆ ในส่วนที่ผ่านการไดอะไลซิสมาจาก CFD ได้อย่างต่อเนื่องตลอดกระบวนการไดอะไลซิส รายละเอียดของระบบที่พัฒนาขึ้นนี้แสดงไว้ในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 ระบบ CFD-ICP-OES ที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณแร่ธาตุที่ไดอะไลซิสได้ และตรวจวัดค่า pH

[Judprasong et al., 2005]

3.2 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.2.1 เครื่องมือ

Inductively coupled plasma optical emission spectrometer (ICP-OES)

คู่อุปไมโครเวฟ (Milestone MLS1200 mega, Italy)

เครื่องวัด pH (Orion Model PCM500 SensorLink)

เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler AJ150, Switzerland)

Incubator shaker, Grant Instrument Model SS40-D2 (Cambridge, England)

Inductively coupled plasma optical emission spectrometer (ICP-OES)

เครื่อง ICP-OES ที่ใช้ในการวัดปริมาณแร่ธาตุต่างๆ คือเครื่องรุ่น SPECTRO CIROS CCD ใช้รูปแบบของตำแหน่งการวัดแบบ axial configuration โดยใช้ spray chamber เป็นแก้ว แบบ double pass, Scott-type และใช้ cross-flow nebulizer (อุปกรณ์ทั้งหมดเป็นของบริษัท SPECTRO, ประเทศเยอรมัน) เพื่อให้สารละลายตัวอย่างเกิดเป็นละอองฝอยเล็กๆ เข้าไปสู่พลาสมาที่มีพลังงานสูง (plasma) ที่ทำให้สารตัวอย่างเปลี่ยนเป็นอะตอมอิสระและกระตุ้นอะตอมนี้ให้เปลี่ยนสถานะจากสถานะพื้นไปอยู่ในสถานะเร้า เพื่อทำการตรวจวัดการคายแสง (emission) ของแร่ธาตุต่างๆ โดยหน่วยตรวจวัดความเข้มแสงสถานะที่ใช้ในการตรวจวัดด้วยเครื่อง ICP-OES ได้แก่กำลัง (power) 1350 วัตต์ ใช้อัตราก๊าซสำหรับ nebulizer 1 ลิตรต่อนาที และใช้อัตราก๊าซสำหรับหล่อเย็นรอบๆ คบ (torch coolant gas) 12 ลิตรต่อนาที การวัดปริมาณของแต่ละแร่ธาตุอาศัยหลักของการใช้ Internal standard โดยการเปรียบเทียบธาตุที่ต้องการวัดเทียบกับธาตุที่ไม่มีในธรรมชาติและเติมลงไป (Y) แล้วนำไปสร้าง calibration curve โดยเลือกใช้การคายแสง (emission lines) ของแต่ละธาตุที่มีความจำเพาะเจาะจง ทั้งที่เป็น ionic line (II) และ atomic line (I) โดยไม่มีการรบกวนจากธาตุอื่นๆ ได้แก่ แร่ธาตุแคลเซียม (Ca) ที่ความยาวคลื่น 396.847(II), 317.933(II), และ 422.673(I) นาโนเมตร แมกนีเซียม (Mg) ที่ความยาวคลื่น 279.553(II), 279.079(II) และ 280.270(II) นาโนเมตร ฟอสฟอรัส (P) ที่ความยาวคลื่น 177.495(I) และ 214.914(I) นาโนเมตร เหล็ก (Fe) ที่ความยาวคลื่น 238.204(II), 239.562(II) และ 259.940(II) นาโนเมตร และสังกะสี (Zn) ที่ความยาวคลื่น 202.548(II), 206.191(II) และ 213.856(II) นาโนเมตร สำหรับธาตุที่ใช้เป็น internal standards คือธาตุอิทเทรียม (Y) ที่ความยาวคลื่น 320.332(II), 371.030(II) และ 442.259(II) นาโนเมตร และสแกนเดียม (Sc) ที่ความยาวคลื่น 256.023(II), 361.384(II) และ 440.037(II) นาโนเมตร

3.2.2 วัสดุ และสารเคมี

วัสดุ และสารเคมีที่ใช้พร้อมกับบริษัทผู้ผลิต แสดงอยู่ในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 วัสดุ และสารเคมีที่ใช้

วัสดุ และสารเคมี	ผู้ผลิต
Hydrochloric acid (AR 37% assay)	Merck, Germany
Nitric acid (AR 65% assay)	Merck, Germany
Hydrogen peroxide (AR 30% assay)	BDH Laboratory, England
Sodium bicarbonate (AR 99.7-100.3% assay)	APS Finechem, Australia
Sodium hydroxide (AR 99% assay)	Merck, Germany
Na ₂ EDTA (AR 99% assay)	Merck, Germany
Ethanol (AR 99% assay)	Merck, Germany
Multielemental solution (QCS 01-5, 100 mg mL ⁻¹)	AccuStandard, USA
Y (ICP-69N-1 at 1000 mg mL ⁻¹)	AccuStandard, USA
Sc (ICP-53N-1 at 1000 mg mL ⁻¹)	AccuStandard, USA
Iron (II) sulphate (AR, >99.5%)	Carlo Erba, Milano, Italy
Ammonium iron(III) sulphate (AR, 99-102%)	UNIVAR, Australia
Standard buffer solutions pH 4.01, 7.00 and 10.01	Thermo-Orion, USA
<i>Enzyme</i>	
Pepsin (P-7000, from porcine stomach mucosa)	Sigma, USA
Pancreatin (P-1750, from porcine pancreas)	Sigma, USA
Bile Extract (B-6831, porcine)	Sigma, USA
<i>Dialysis tubing</i>	
MWCO 12000-14000 Da (Spectra/por [®] 4)	Spectrum Laboratories, USA
MWCO 6000-8000 Da (Spectra/por [®] 1)	Spectrum Laboratories, USA

3.2.3 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาและการเตรียมตัวอย่างอาหาร

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา แสดงอยู่ในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา	ผู้ผลิต หรือ ผู้จำหน่าย
ส่วนที่ 1 Milk-based infant formula (SRM 1846) นมผง (Instant powdered milk) ยี่ห้อ Nestle® คะน้า (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>alboglabra</i> , <i>Bail.</i>) ชะอม (<i>Acacia pennata</i> , <i>L Willd. Subsp.</i>) ถั่วเขียว (<i>Phaseolus aureus</i> <i>Roxb.</i>) ข้าวหอมมะลิ (<i>Oryza sativa</i>) เนื้อไก่	NIST, USA ตลาดในกรุงเทพมหานคร ตลาดในกรุงเทพมหานคร ตลาดในกรุงเทพมหานคร ตลาดในกรุงเทพมหานคร ตลาดในกรุงเทพมหานคร ตลาดในกรุงเทพมหานคร
ส่วนที่ 2 Calcium fortificants: Calcium carbonate (CaCO_3) Tri-calcium phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) Calcium lactate gluconate ($\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_{20}\text{Ca}_2$) Calcium citrate ($\text{Ca}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$) Calcium lactate ($\text{Ca}(\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COO})_2$) Iron fortificants: Iron(II) sulphate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Fe 36.8%) Iron(II) fumarate ($\text{FeC}_4\text{H}_2\text{O}_4$, Fe 32.9%) Sodium iron (Fe(III)) ethylenediaminetetraacetic acid (NaFe(III)EDTA , Fe 13%) Fe(II) lactate ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{FeO}_6$, Fe 20%) Fe(III) ammonium citrate ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{Fe}_2 \cdot 2\text{NH}_3$, Fe 20%)	Nutrition Ltd. Partnership, กรุงเทพมหานคร Ajax Co., Auburn, Australia Vicky Consolidate Co. Ltd., กรุงเทพมหานคร Akzo Nobel Functional Chemicals Co. Ltd., Arnhem, the Netherlands Dr. Paul Lohmann Ltd., Germany
Zinc fortificants: Zinc sulphate (ZnSO_4) Zinc oxide (ZnO) Zinc amino complex (containing 10% Zn)	Dr. Paul Lohmann Ltd., Germany
Ascorbic acid (AR grade, 99.78%) Citric acid (AR grade, >99%) Phytic acid (AR grade, ~40% in water) Tannic acid (AR grade, >99%) Oxalic acid (AR grade, >99%)	Fisher Scientific, UK Fluka, Switzerland Sigma, USA Fluka, Germany BDH, England

การเตรียมตัวอย่างอาหาร

ตัวอย่างอาหารที่ใช้ในการศึกษานี้ได้แก่ นมผง ค่ะน้ำ ชะอม ถั่วเขียว เนื้อไก่ และ ข้าวหอมมะลิ เตรียมโดยการสับตัวอย่างจาก 3 ตลาดในกรุงเทพมหานคร แต่ละตัวอย่างซื้อประมาณ 1-3 กิโลกรัม สำหรับตัวอย่างนมผง ถั่วเขียว และข้าวหอมมะลิ เตรียมโดยการนำไปปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นแบบแห้ง ส่วนค่ะน้ำ ชะอม และเนื้อไก่ ทำการล้างด้วยน้ำประปา แล้วตามด้วยน้ำที่ปราศจากแร่ธาตุ 2 ครั้ง นำเฉพาะส่วนที่กินได้ทำให้สุกด้วยการต้ม หลังจากนั้นปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องเตรียมอาหาร (food processor ตรา Tefal® Kaleo Blender, ประเทศฝรั่งเศส) นำไปทำให้แห้งด้วยการอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจนแห้งสนิท (24-48 ชั่วโมง) ปั่นด้วยเครื่องปั่นให้ละเอียด เก็บในถุงพลาสติกแล้วใส่ไว้ในหม้อดูดความชื้น (desiccator) ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะทำการวิเคราะห์

3.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณแร่ธาตุ (total mineral content) ในตัวอย่างอาหาร

ชั่งตัวอย่างอาหารประมาณ 1 กรัมลงใน digestion teflon vessel เติมกรดไนตริก 10 มิลลิลิตรและ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 1 มิลลิลิตร ทำการย่อยด้วยการใช้เครื่องย่อยแบบไมโครเวฟ (microwave digestion) ประกอบด้วย 5 ขั้นตอนคือขั้นแรกที่กำลัง 250 วัตต์เป็นเวลา 1 นาที ขั้นที่ 2 หยุดการให้กำลังเป็นเวลา 1 นาที ขั้นที่ 3 ที่กำลัง 250 วัตต์เป็นเวลา 5 นาที ขั้นที่ 4 ที่กำลัง 400 วัตต์เป็นเวลา 5 นาที และขั้นสุดท้ายที่กำลัง 650 วัตต์เป็นเวลา 5 นาที ทำการย่อยจนได้สารละลายที่ใส ถ้าไม่ใสจะทำการซ้ำอีก 1 รอบ หลังจากได้สารละลายที่ใส ทำการเจือจางด้วยน้ำที่ปราศจากแร่ธาตุให้ครบ 50 มิลลิลิตร เพื่อทำการวัดปริมาณแร่ธาตุด้วยเครื่อง ICP-OES ต่อไป

3.2.5 ระบบการไดอะไลซิสแบบไหลต่อเนื่อง (Continuous-flow dialysis, CFD) ที่เชื่อมต่อการตรวจวัดแบบ on-line ด้วย ICP-OES และเครื่องวัดค่า pH

ทำการจำลองการย่อยในกระเพาะอาหารด้วยขั้นตอนต่อไปนี้คือ ชั่งตัวอย่างอาหารแห้งประมาณ 0.5-1 กรัมลงใน conical flask ที่มีฝาปิดขนาด 250 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำ 10 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 2.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (6 M HCl) และปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 12.5 กรัมด้วยน้ำที่ปราศจากแร่ธาตุ หลังจากนั้นเติม 375 ไมโครลิตรของสารละลายเอนไซม์เปปซิน นำไปบ่มในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ได้สารละลายที่ผ่านการย่อยในกระเพาะอาหาร (gastric digest) แบ่งสารละลายที่ได้เป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโซเดียมโบคาร์บอเนตสำหรับระบบ CFD อีกส่วนหนึ่งใช้สำหรับการจำลองการย่อยในลำไส้ต่อไป โดยชั่ง 2.0-2.5 กรัมของสารละลายที่ผ่านการย่อยในกระเพาะอาหารแล้ว ใส่เข้าไปใน dialysis bag ที่ปิดปลายทั้งสองด้าน เพื่อใส่เข้าไปในท่อแก้วกลวง (dialysis chamber) ด้วยการใช้เข็มฉีดยา (syringe) ฉีดตัวอย่างเข้าไป ท่อแก้วกลวงจะมียางกันซึมวางชั้นอยู่ (silicone rubber gasket) หลังจากใส่ตัวอย่างเข้าไปเรียบร้อยแล้ว ปลายท่อด้านหนึ่งของท่อกลวงจะเชื่อมต่อกับท่อ (tygon tubing) ที่มีการไหล

ของสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งจะต่อท่อเพื่อนำไปเข้าเครื่องวัดค่า pH และ ICP-OES ตามลำดับต่อไป นำท่อแก้วลงบ่มไว้ในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิคงที่ 37 ± 0.1 องศาเซลเซียสตลอดช่วงกระบวนการไดอะไลซิส ดังแสดงในรูปที่ 3.1

ให้สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมไหลเข้าไปในด้านหนึ่งของท่อกลง ด้วยการเปิดปั๊ม (peristaltic pump) ที่อัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที สารละลายที่ได้ออกมาจากระบบ CFD ถูกส่งเข้าไปสู่เครื่องวัดค่า pH และวัดปริมาณแร่ธาตุด้วยเครื่อง ICP-OES ตามลำดับต่อไป หลังจาก 30 นาทีเติมสารละลาย pancreatin bile extract (PBE) จำนวน 625 ไมโครลิตรเข้าไปโดยผ่านวาล์วสามทาง (three-way valve) ทำการ dialyse ต่อไปอีก 2 ชั่วโมง สำหรับการวัดแบบ off-line CFD-ICP-OES จะทำการเก็บส่วนสารละลายที่ได้จากระบบ CFD จำนวนขวดละ 10 มิลลิลิตร เพื่อทำการวัดความเป็นกรด-ด่าง และวัดปริมาณแร่ธาตุต่อไป

3.2.6 การวิเคราะห์ปริมาณแร่ธาตุในสารละลายที่ผ่านการย่อยด้วยระบบ CFD (dialysate) และในสารละลายที่เหลือจากการย่อย (retentate)

เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพที่ดีของการเกิดละอองฝอย (good nebulisation performance) และเพื่อให้แน่ใจว่าแร่ธาตุที่ต้องการวิเคราะห์ยังคงอยู่ในสภาพที่ละลายน้ำได้ ไม่เกิดการตกตะกอนก่อนการตรวจวัด จึงมีความจำเป็นในการเติมกรดไนตริก 4% พร้อมทั้งมี Y และ Sc (internal standards) เข้าผสมกับสารละลายที่ผ่านการย่อย (dialysate) ด้วยอัตราเร็ว 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ก่อนการตรวจวัดด้วย ICP-OES (ดังแสดงในรูปที่ 3.1) การวัดปริมาณความเข้มข้นของแร่ธาตุต่างๆ (Ca, Mg, P, Fe, Zn) ของสารละลายที่เชื่อมต่อมาจากระบบ CFD ในหน่วยไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่างนั้น สามารถคำนวณได้จากการตรวจวัดสารละลายมาตรฐานของธาตุต่างๆ (external calibration) แล้วนำมาหาพื้นที่ใต้กราฟด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (Microcal Origin, Version 6.0) เทียบกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน หลังจากนั้นทำการหาปริมาณของแร่ธาตุที่เหลืออยู่ใน dialysis bag ด้วยการนำไปย่อยด้วยกรดไนตริกจนได้สารละลายที่ใส แล้วนำไปตรวจวัดด้วยเครื่อง ICP-OES

3.2.7 การคำนวณหาปริมาณแร่ธาตุที่สามารถดูดซึมได้

(mineral bioaccessibility, dialysability) [Shiowatana et al., 2006]

ปริมาณแร่ธาตุที่ได้จากระบบไดอะไลซิสหลังจากจำลองการย่อยในลำไส้ นั้น สอดคล้องกับปริมาณแร่ธาตุที่ร่างกายดูดซึมได้ (bioaccessibility) ดังรายละเอียดในตอนต้นที่ 1.2.9

3.3 ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง แบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนแรกเกี่ยวกับการพัฒนาระบบ CFD ที่ต่อเชื่อมกับการตรวจวัดด้วยเครื่อง ICP-OES เพื่อประมาณค่าการดูดซึมได้ของแร่ธาตุ (mineral bioaccessibility) ส่วนที่สองเป็นการนำผลที่ได้จากระบบที่พัฒนาขึ้นมาใช้ในการศึกษาการดูดซึมได้ของแร่ธาตุโดยวิธีในหลอดแก้วของแร่ธาตุเสริมอาหาร (mineral fortificants) และผลของตัวส่งเสริม (enhancers) และตัวยับยั้ง (inhibitors) การดูดซึมของแร่ธาตุ

ระบบการจำลองการย่อยของมนุษย์ (simulated human gastrointestinal digestion) ความเป็นกรดต่างในสารละลายที่ได้จากระบบ CFD เปลี่ยนแปลงจากค่า pH (pH) 2.0 ไปเป็น 5.0 ภายใน 30 นาที หลังจากนั้นเปลี่ยนจาก 5.0 เป็น 7.0-7.5 โดยคณะวิจัยได้ศึกษาถึงผลของอัตราเร็วในการไหล (flow rate) และความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดต่างดังรายละเอียดในตอนต้นที่ 1 [Shiowatana et al., 2006] พบว่าอัตราเร็วในการไหลที่เหมาะสมคือ 1.0 มิลลิเมตรต่อวินาที ซึ่งพิจารณาถึงระยะเวลาของการไดอะไลซิส และการเจือจางของสารละลายจากระบบ CFD และความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตซึ่งคำนวณได้จากความเป็นกรดที่ไทเทรตได้ในหน่วยโมลาร์ (molarity) หาค่าด้วย 50 สำหรับตัวอย่างยาเม็ดแคลเซียม และผักชนิดต่างๆ [Shiowatana et al., 2006] สำหรับในการศึกษานี้ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณความเป็นกรดที่ไทเทรตได้ของแต่ละตัวอย่าง และความเป็นกรดของตัวอย่าง ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตที่ใช้ในการไหลขึ้นกับชนิดของตัวอย่างและค่าความเป็นกรดที่ไทเทรตได้ดังแสดงในตารางที่ 3.3

3.3.1 การพัฒนาและประเมินประสิทธิภาพของระบบ CFD-ICP-OES เพื่อใช้ในการศึกษาความสามารถในการดูดซึมได้ของแร่ธาตุ

การพัฒนาระบบ CFD ที่เชื่อมต่อแบบ on-line กับการตรวจวัดด้วย ETAAS ได้รายงานไว้ในตอนที่ 2 [Promchan and Shiowatana, 2005] เพื่อใช้ในการติดตามปริมาณแร่ธาตุหลัก และความเป็นกรดต่างระหว่างการไดอะไลซิส นอกจากนั้นยังได้มีการออกแบบด้วยตัวอย่างขนาดเล็ก (sampling cup) (inlet i.d. 2 mm และ outlet i.d. 15 mm) ที่มีปริมาตร 100 ไมโครลิตรเพื่อใช้ในการระบบการตรวจวัดด้วย ETAAS แบบต่อเนื่อง และวัดความเป็นกรดต่างต่อไปในภาชนะแก้วขนาดเล็กที่หุ้มอิเล็กโทรด (a small glass combination electrode chamber, i.d. 6 mm) ซึ่งมีวงแหวนซิลิโคน (silicone o-ring) ป้องกันไม่ให้สารละลายไหลออกจากระบบ

สำหรับการศึกษาในตอนต้นที่ 3 นี้ได้มีการใช้ระบบ CFD เชื่อมต่อกับการตรวจวัดแร่ธาตุด้วยเครื่อง ICP-OES และเชื่อมต่อกับเครื่องวัดความเป็นกรดต่าง ระบบที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจวัดปริมาณแร่ธาตุหลายๆ ธาตุในครั้งเดียว ด้วยเครื่อง ICP-OES อย่างต่อเนื่องตลอดการทำไดอะไลซิส ระบบนี้ประกอบด้วย

3 ส่วนหลักๆ คือระบบ CFD ระบบการวัดความเป็นกรดต่าง และระบบการวัดปริมาณแร่ธาตุด้วยเครื่อง ICP-OES

ตารางที่ 3.3 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตที่ใช้ในระบบ CFD

ตัวอย่าง	ความเป็นกรดที่ไทเทรตได้ (Titratable acidity) (x 10 ⁻² โมลต่อลิตร)	ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต (x 10 ⁻⁴ โมลต่อลิตร)
ส่วนที่ 1 (ตัวอย่างอาหาร)		
สารละลาย Blank	2.19	4.37
ข้าวหอมมะลิ (Jasmine rice)	3.88	7.77
เนื้อไก่ (Chicken meat)	9.47	18.94
ถั่วเขียว (Mungbean)	6.60	13.21
อะเซีย (Acacia pennata)	7.96	15.93
นมผง (Milk powder)	5.71	11.41
คะน้า (Kale)	7.21	14.42
ส่วนที่ 2 สารเสริมแร่ธาตุ (mineral fortificant)		
สารละลาย Blank	2.18	4.36
Calcium carbonate	1.82	3.64
Tri-calcium phosphate	2.66	5.33
Calcium citrate	3.27	6.54
Calcium lactate gluconate	3.51	7.03
Fe(II) sulphate	4.36	8.72
Fe(II) fumarate	4.36	8.72
Fe(II) lactate	2.54	5.09
NaFe(III)EDTA	2.42	4.85
Fe(III) ammonium citrate	2.42	4.85
Zinc sulphate	2.55	5.09
Zinc oxide	2.55	5.09
Zinc amino complex	2.67	5.35

3.3.1.1 การออกแบบระบบ CFD-ICP-OES

เนื่องจากอัตราการไหลของสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม และอัตราการดูดซับสารละลาย (uptake rate) ของ ICP-OES มีค่าเท่ากันคือ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ดังนั้นการเชื่อมต่อของทั้งสองระบบจึงทำได้สะดวก สำหรับการตรวจวัดความเป็นกรดต่างนั้นใช้ระบบของบริษัท Orion (Model PCM500 SensorLink) ที่มีการใช้อุปกรณ์ต่อพ่วงกับคอมพิวเตอร์ การเชื่อมต่อบนทั้งสาม

คือ CFD ICP-OES และ pH meter นั้นมีสิ่งสำคัญที่ต้องพิจารณาคือการเชื่อมต่อ สำหรับการวัดความเป็นกรด่างใช้ภาชนะแก้วขนาดเล็กที่หุ้มอิเล็กทรอนิกส์โดยมีการไหลเข้าจากด้านล่าง และไหลออกทางด้านข้างบน เช่นเดียวกับการศึกษาในตอนที 2 [Promchan and Shiowatana, 2005] หลังจากนั้นสารละลายจะไหลไปผสมกับกรดไนตริก 4% (ที่มี Y และ Sc อยู่) โดยผ่านวาล์วสามทางที่ทำจากแก้วขนาดเล็ก (glass three-way) แล้วไหลออกไปผสมกันในท่อพลาสติกที่ขดเป็นปม (mixing coil) ก่อนการตรวจวัดด้วยเครื่อง ICP-OES

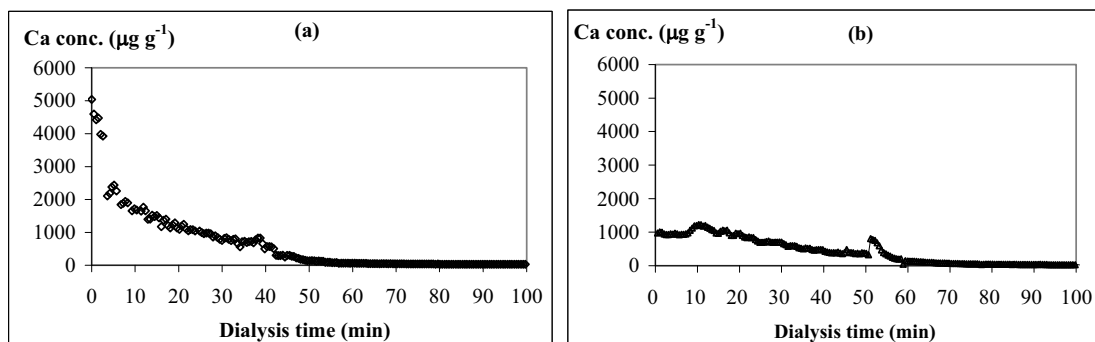
เครื่อง ICP-OES มีข้อดีหลายด้านคือ ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณแร่ธาตุต่างๆ ที่มีในตัวอย่างทั้งปริมาณสูงและปริมาณต่ำ (macro and trace elements) โดยสามารถทำการวัดหลายๆ ธาตุด้วยการวิเคราะห์ครั้งเดียว (simultaneous detection) มีความเร็วในการวิเคราะห์ และมีความไวในการวิเคราะห์สูง (good sensitivity)

เพื่อเป็นการแสดงให้เห็นว่าสารละลายที่ได้จากระบบ CFD (dialysate) ไม่มีผลรบกวนต่อการตรวจวัดของ ICP-OES (matrix interference) จึงได้ทำการศึกษาตัวอย่างนมผง และผักคะน้าเพื่อใช้เป็นตัวแทน โดยการใช้สารละลายที่ได้จากระบบ CFD ซึ่งอยู่ในโซเดียมไบคาร์บอเนต 0.01 โมลาร์ แล้วนำไปตรวจวัดด้วยเครื่อง ICP-OES เปรียบเทียบผลที่ได้จากการละลายอยู่ในกรดไนตริก 2% พบว่าระดับสัญญาณที่ได้ของแคลเซียมและเหล็กของตัวอย่างนมผงในสารละลายที่มีกรดมีค่าสูงกว่าแบบไม่มีกรดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 3.4 นอกจากนั้นการศึกษาในผักคะน้าด้วยระบบ on-line CFD-ICP-OES พบว่าแร่ธาตุแคลเซียม และเหล็กโดยไม่ผสมกรดให้ระดับสัญญาณต่ำกว่าประมาณ 5 และ 3 เท่าตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายที่มีผสมกับการไหลของกรดไนตริก 4% ดังแสดงในรูปที่ 3.2 และ 3.3

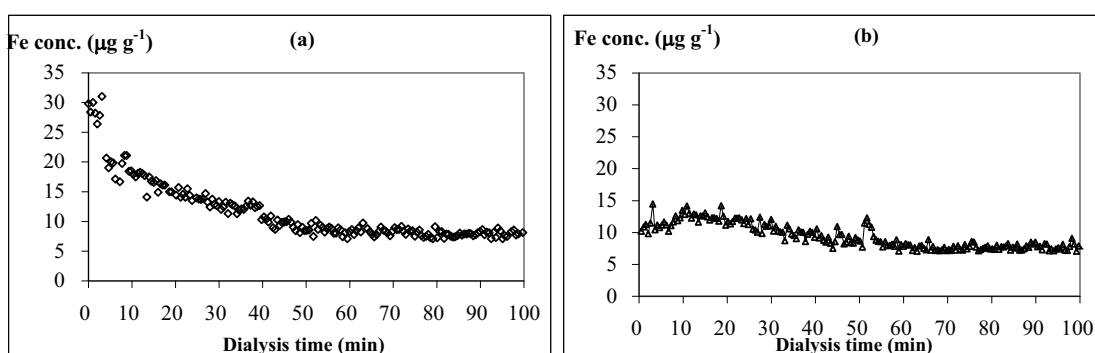
ตารางที่ 3.4 ปริมาณแร่ธาตุต่างๆ ในสารละลายที่ได้จากระบบ off-line ICP-OES (0.01 M NaHCO₃) ของตัวอย่างนมผงเปรียบเทียบกับสารละลายที่มีกรดไนตริกในความเข้มข้นสุดท้าย 2% (n=3)

แร่ธาตุ (ไมโครกรัมต่อกรัม)	สารละลายที่มีกรดไนตริกใน ความเข้มข้นสุดท้าย 2% (2% HNO ₃)	สารละลายที่ไม่มีกรดไนตริก (0.01 M NaHCO ₃)
แคลเซียม (Ca)	5845 ± 175 ^a	4090 ± 55 ^a
แมกนีเซียม (Mg)	865 ± 85	870 ± 60
ฟอสฟอรัส (P)	550 ± 45	510 ± 40
เหล็ก (Fe)	740 ± 55 ^b	375 ± 25 ^b
สังกะสี (Zn)	510 ± 30	495 ± 20

^{a, b} ตัวอักษรที่เหมือนกันอยู่ในแถวเดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



รูปที่ 3.2 กราฟแสดงการโคละไลซิสของแคลเซียมในผักคะน้าที่ได้จากระบบ on-line CFD-ICP-OES ในสารละลายที่มีการผสมของการไหลของกรดไนตริก 4% (a) และไม่มีการผสมกรดไนตริก (b) ตามลำดับ

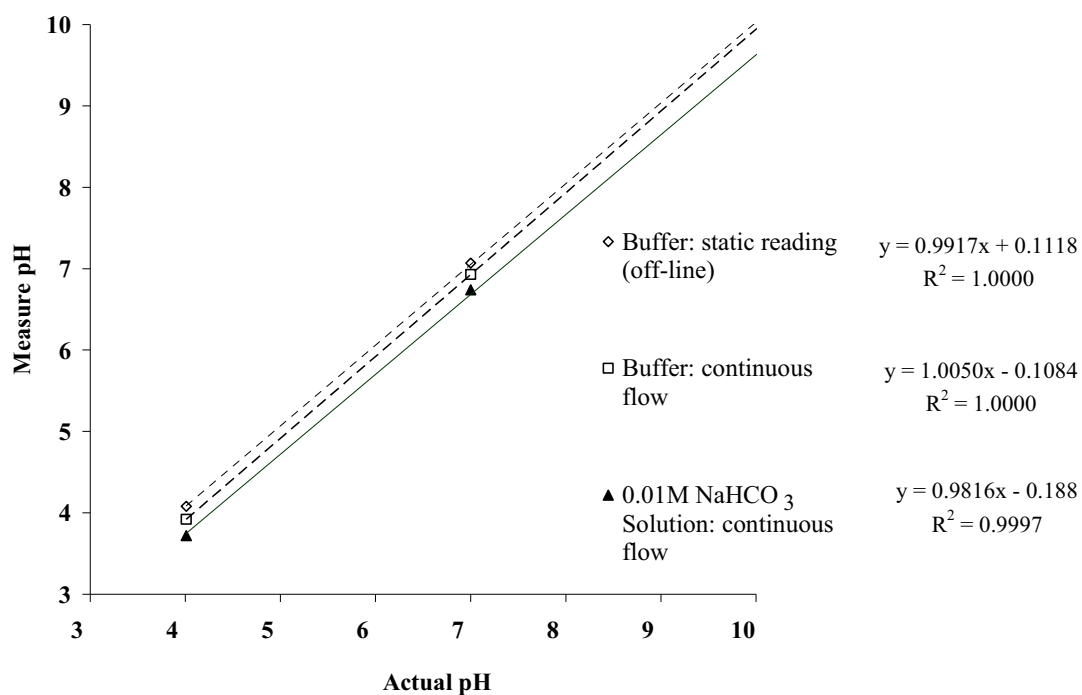


รูปที่ 3.3 กราฟแสดงการโคละไลซิสของธาตุเหล็กในผักคะน้าที่ได้จากระบบ on-line CFD-ICP-OES ในสารละลายที่มีการผสมของการไหลของกรดไนตริก 4% (a) และไม่มีการผสมกรดไนตริก (b) ตามลำดับ

3.3.1.2 การวัดความเป็นกรดด่าง (pH measurement)

เครื่องวัดความเป็นกรดด่างที่ใช้หือ Orion (รุ่น PCM500 SensorLink pH Measurement System) กรณีที่วิเคราะห์แบบต่อเนื่อง (on-line pH measurement) นั้นมีการใช้อิเล็กโทรดขนาดเล็กใส่ไว้ในภาชนะแก้วขนาดเล็ก (sampling cup) และปิดสนิทด้วยยางกันรั่วซึม (rubber o-ring) เมื่อสารละลายไหลจากด้านล่างผ่านเข้าไปท่วมอิเล็กโทรดแล้วไหลออกด้านบนเรียบร้อยแล้ว จึงเริ่มทำการอ่านค่า pH ทำการศึกษาการวัดความเป็นกรดด่างแบบต่างๆ 3 แบบคือ 1) ทำการสอบเทียบในการวัดแบบปกติ (static reading, off-line) กับสารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐาน (buffer solution) ที่ความเป็นกรดด่าง 4.0, 7.0 และ 10.0 ตามลำดับ 2) ทำการอ่านค่าสารละลายกรดมาตรฐานที่ผ่านการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที แล้วทำการอ่านค่าแบบต่อเนื่อง (continuous flow, on-line) และ 3) ทำการอ่านค่า pH ของสารละลายที่มี 0.01 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ไหลผ่านแบบต่อเนื่อง พบว่าความไว (sensitivity โดยอ่านค่าจาก slope ของสมการเส้นตรง) ของการอ่านค่าทั้งแบบปกติ และแบบที่มีการไหลของสารละลายไม่มีความแตกต่างกันอย่างมี

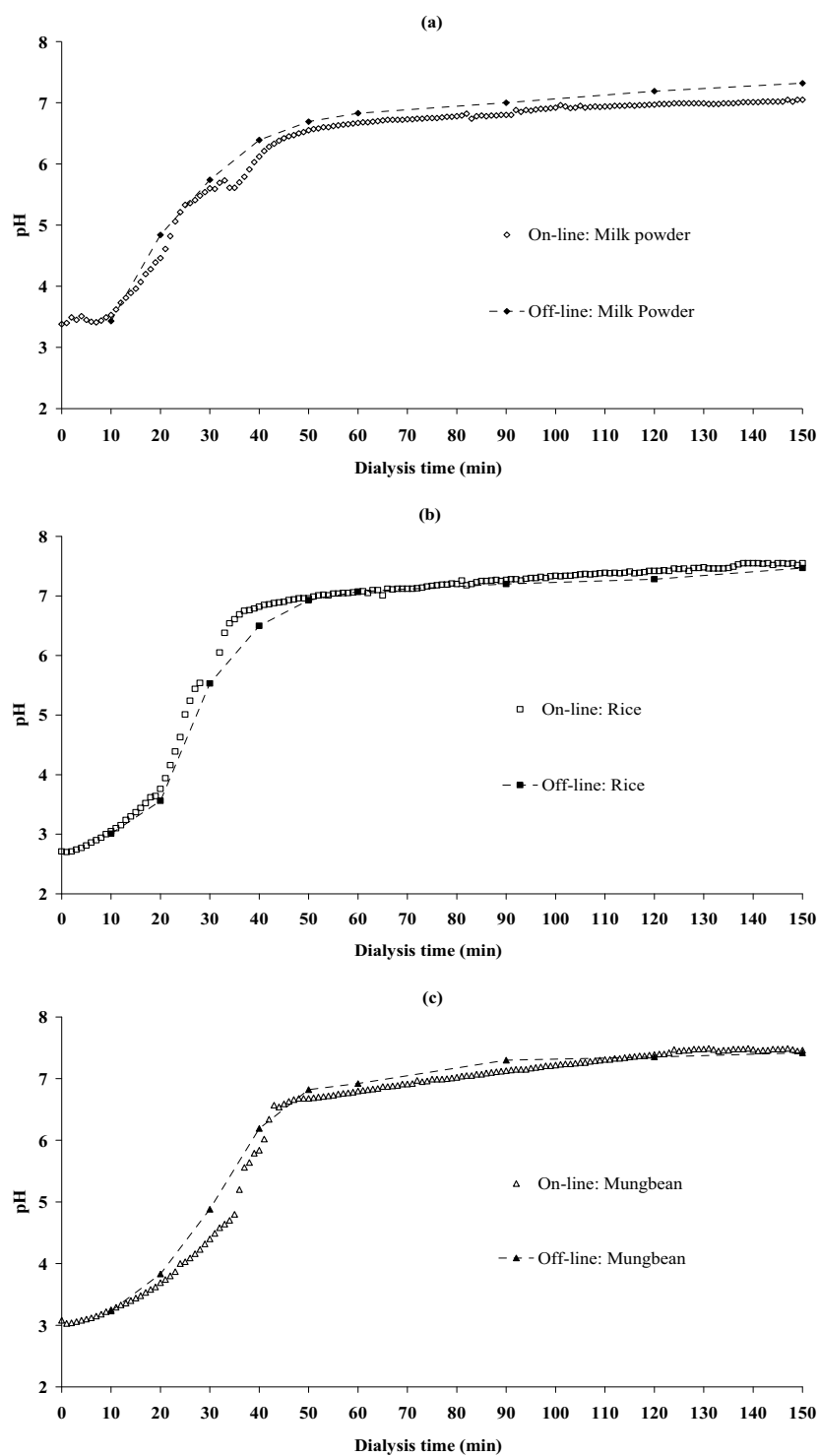
นัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่พบว่าการอ่านค่า pH ของสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต 0.01 โมลาร์ แบบต่อเนื่องให้ความไวที่ต่ำกว่าเล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 เปรียบเทียบความเป็นเส้นตรง (calibration curve) ของการวัดความเป็นกรดต่างแบบต่างๆ

รูปแบบของค่า pH ที่อ่านได้จากการอ่านค่าแบบต่อเนื่อง (on-line) และไม่ต่อเนื่อง (off-line) ของตัวอย่างนมผง ข้าวหอมมะลิ และถั่วเขียว ในสารละลายเดียวกันที่ได้จากระบบ CFD แสดงดังรูปที่

3.5



รูปที่ 3.5 ค่า pH ที่เวลาต่างๆ ของการไดอะไลซิสที่อ่านได้จากการอ่านแบบ on-line และ off-line ของตัวอย่างนมผง (a) ข้าวหอมมะลิ (b) และถั่วเขียว (c)

การเปลี่ยนแปลงของการวัดค่า pH ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างการวัดแบบ on-line และแบบ off-line โดยแบบ on-line ให้ค่า pH ต่ำกว่าเพียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงสามารถใช้การวัดความเป็นกรดต่างในการวัดแบบ on-line เพื่อใช้ในการติดตามการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดต่างของการไดอะไลซิส

3.3.1.3 ศึกษาผลของ matrix interferences ต่อการวิเคราะห์ด้วย ICP-OES

ผลของการรบกวนการตรวจวัดจาก matrix ต่างๆ กัน เกิดขึ้นได้โดยอาจทำให้เกิดการเพิ่มหรือลดสัญญาณของการตรวจวัด ซึ่งเกิดขึ้นจากคุณลักษณะทางกายภาพและทางเคมีที่ต่างกันระหว่างสารละลายมาตรฐานกับสารละลายตัวอย่าง ทางกายภาพ เช่น ความหนืด แรงตึงผิว เป็นต้น ส่วนทางเคมี อาจทำให้เกิดการยับยั้งของสมดุลไอออนในพลาสมาโดยเฉพาะเมื่อสารละลายตัวอย่างมีความเข้มข้นของเกลือกรด หรือ matrix ที่ต่างจากสารละลายมาตรฐาน เพื่อป้องกันปัญหานั้นเกิดจากสาเหตุนี้ จึงจำเป็นต้องทำให้สารละลายของสารมาตรฐาน และสารละลายตัวอย่าง มีคุณลักษณะใกล้เคียงกัน (มี matrix ที่เหมือนกัน)

การวิเคราะห์ปริมาณสารโดยใช้วิธีการที่เรียกว่า “standard additions” เป็นวิธีการที่นิยมใช้ในการป้องกันและแก้ไขปัญหานั้นเกิดจากการรบกวนของ matrix และเป็นวิธีที่มีความถูกต้องมาก ทำได้โดยเติมสารละลายมาตรฐานหลายๆ ความเข้มข้นลงในสารละลายตัวอย่าง ดังนั้นการรบกวนของ matrix ในสารละลายต่างๆ จึงเหมือนกัน นั่นคือไม่มีผลกระทบจากสิ่งรบกวน นอกจากนั้นวิธีนี้ยังเป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบว่าเกิดการรบกวนของ matrix หรือไม่ ด้วยการเปรียบเทียบความชัน (slope) ของสมการเส้นตรงระหว่างสารละลายมาตรฐานกับสารละลายที่เติมสารมาตรฐานหลายๆ ความเข้มข้น ถ้าหากความชันมีค่าแตกต่างกันแสดงว่าสารรบกวนการวิเคราะห์มีผลต่อการวัด

สารละลายที่ใช้ในการทำไดอะไลซิสคือโซเดียมไบคาร์บอเนตที่มีความเข้มข้นประมาณ 10^{-4} - 10^{-5} โมลาร์ และมีการเติมกรดไนตริกให้ได้ประมาณ 2% ดังนั้นจึงได้ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานและ สารละลาย blank ในสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต การศึกษาผลของสิ่งรบกวนการวัดของสารละลายที่ได้จากการทำไดอะไลซิสด้วยการเปรียบเทียบความชันของสมการเส้นตรงระหว่างสารละลายมาตรฐานกับสารละลายที่เติมสารมาตรฐานหลายๆ ความเข้มข้น แสดงในตารางที่ 3.5 พบว่าความชันของสมการเส้นตรงของแต่ละ emission line และของแต่ละธาตุ (แคลเซียม แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก และสังกะสี) ไม่มีความแตกต่างกัน นั่นคือไม่เกิดการรบกวนการวัดของสิ่งรบกวนการวัด ดังนั้นจึงสามารถทำการตรวจวัดปริมาณแร่ธาตุต่างๆ ด้วย ICP-OES ในสารละลายที่ได้จากการทำไดอะไลซิสได้

ตารางที่ 3.5 เปรียบเทียบความชันของสมการเส้นตรงระหว่างสารละลายมาตรฐาน (External calibration curve) กับสารละลายที่เติมสารมาตรฐานหลายๆ ความเข้มข้น (Standard Addition) ในโซเดียมไบคาร์บอเนต 0.01 โมลาร์

	External calibration curve	Standard addition
แคลเซียม (Ca)		
Ca 396.847 nm	$y = 6651.6x - 46722.3$	$y = 6551.6x + 96443.5$
Ca 422.673 nm	$y = 365.5x - 131.1$	$y = 356.1x + 9301.1$
Ca 317.933 nm	$y = 186.3x - 1941.5$	$y = 186.0x + 3372.3$
แมกนีเซียม (Mg)		
Mg 279.079 nm	$y = 3.493x + 116.5$	$y = 3.492x + 104.2$
Mg 279.553 nm	$y = 982.2x + 44786.7$	$y = 964.8x + 340916.9$
Mg 280.270 nm	$y = 485.9x + 30927.5$	$y = 490.4x + 161596.7$
ฟอสฟอรัส (P)		
P 177.495 nm	$y = 29.05x + 33.87$	$y = 31.61x + 506.80$
P 214.914 nm	$y = 12.38x + 62.26$	$y = 13.38x + 735.06$
เหล็ก (Fe)		
Fe 238.204 nm	$y = 107.16x - 688.68$	$y = 107.17x + 1159.72$
Fe 239.562 nm	$y = 77.58x - 759.20$	$y = 63.77x + 629.73$
Fe 259.940 nm	$y = 128.40x - 833.16$	$y = 123.05x - 1378.91$
สังกะสี (Zn)		
Zn 202.548 nm	$y = 96.08x + 617.33$	$y = 95.29x + 45602.30$
Zn 213.856 nm	$y = 62.55x + 1271.39$	$y = 56.88x + 28929.30$

3.3.1.4 การตรวจสอบความใช้ได้ของระบบ on-line CFD-ICP-OES

เนื่องจากไม่มีตัวอย่างสารมาตรฐาน (reference material) เกี่ยวกับการดูดซึมได้ของแร่ธาตุ ดังนั้นการตรวจสอบความใช้ได้ (validation) ของระบบ CFD-ICP-OES จึงเป็นสิ่งสำคัญ ทำโดยการศึกษา %recovery ของแร่ธาตุของการวิเคราะห์ทั้งหมด ซึ่งเลือกอาหารมาตรฐานของหน่วยงาน NIST (SRM 1846) คืออาหารเลี้ยงทารก (milk-based infant formula) เป็นตัวแทน โดยใช้เป็นตัวอย่างอาหารในระบบ CFD แล้วทำการวิเคราะห์หาปริมาณแร่ธาตุทั้งส่วนที่ไดอะไลซ์ได้ (dialysate) จากระบบ CFD และส่วนที่เหลือจากการไดอะไลซ์ (non-dialysable, retentate) ด้วยการใช้กรดย่อยสลายส่วนที่เหลือจนได้สารละลายใส แล้วนำทั้งสองส่วนไปวิเคราะห์หาปริมาณแร่ธาตุต่างๆ ด้วยเครื่อง ICP-OES ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.6 พบว่าการวิเคราะห์หาปริมาณแร่ธาตุทั้งหมด (total amount) มีค่าไม่แตกต่างจากค่าที่ระบุไว้ (certified values) นอกจากนั้นค่าผลรวมของแร่ธาตุจากส่วนที่ไดอะไลซ์ได้และส่วนที่เหลือจากการไดอะไลซ์มีค่าไม่

แตกต่างจากที่ระบุไว้เช่นเดียวกัน มีค่า % recoveries ตั้งแต่ $90 \pm 5\%$ ของธาตุเหล็ก จนถึง $104 \pm 6\%$ ของธาตุฟอสฟอรัส

ตารางที่ 3.6 ผลของการตรวจสอบความใช้ได้ของปริมาณแร่ธาตุที่ได้วิเคราะห์ได้จากระบบ CFD-ICP-OES ในตัวอย่างอาหารมาตรฐาน (milk-based infant formula, SRM 1846) (n=3)

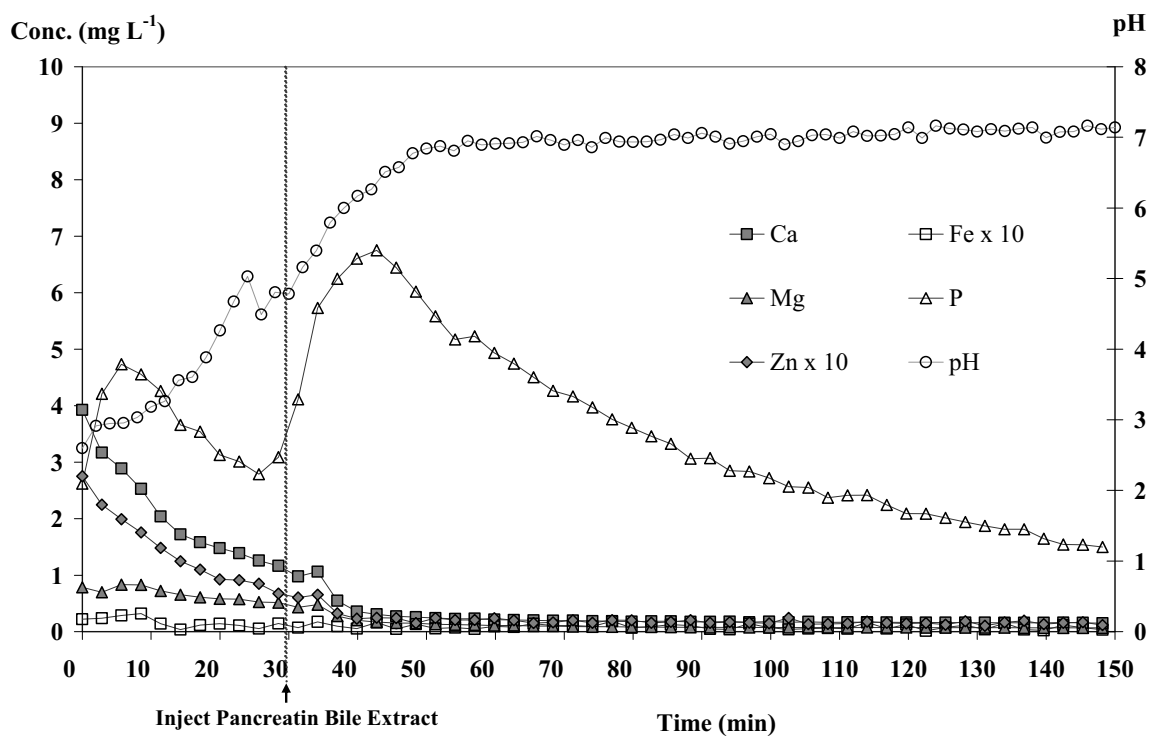
	ปริมาณแร่ธาตุ				
	แคลเซียม (Ca)	แมกนีเซียม (Mg)	ฟอสฟอรัส (P)	เหล็ก (Fe)	สังกะสี (Zn)
ค่าที่ระบุ (Certified value, $\mu\text{g g}^{-1}$)	3670 ± 200	538 ± 29	2610 ± 150	63.1 ± 4.0	60.0 ± 3.2
แร่ธาตุทั้งหมด (Total minerals, $\mu\text{g g}^{-1}$)*	3760 ± 160	541 ± 17	2490 ± 96	66.6 ± 1.5	62.8 ± 1.8
ส่วนที่ไดอะไลซิสได้ (Dialysed minerals, $\mu\text{g g}^{-1}$)*	2810 ± 140	428 ± 10	1730 ± 200	17.7 ± 2.2	51.5 ± 3.7
ส่วนที่เหลือจากการไดอะไลซิส (Non-dialysed minerals, $\mu\text{g g}^{-1}$)*	790 ± 46	86 ± 12	1040 ± 94	42.4 ± 5.5	7.8 ± 1.0
Dialysed + non-dialysed mineral ($\mu\text{g g}^{-1}$)	3600 ± 140	514 ± 6	2690 ± 145	60.1 ± 5.0	59.0 ± 4.9
ร้อยละของไดอะไลซิส (Dialysis, %)	76.3 ± 3.7	79.6 ± 1.9	69.6 ± 5.0	26.5 ± 3.2	85.7 ± 5.7
ร้อยละของส่วนที่เหลือ (Element retained, %)	21.6 ± 1.2	16.0 ± 2.2	41.8 ± 3.8	63.6 ± 5.2	12.5 ± 1.6
ร้อยละของผลรวม (Sum, %)	97.9 ± 3.7	95.6 ± 1.2	103.8 ± 5.8	90.1 ± 5.4	94.2 ± 8.6

* ได้ทำการหัก blank ออกแล้ว (blank subtracted)

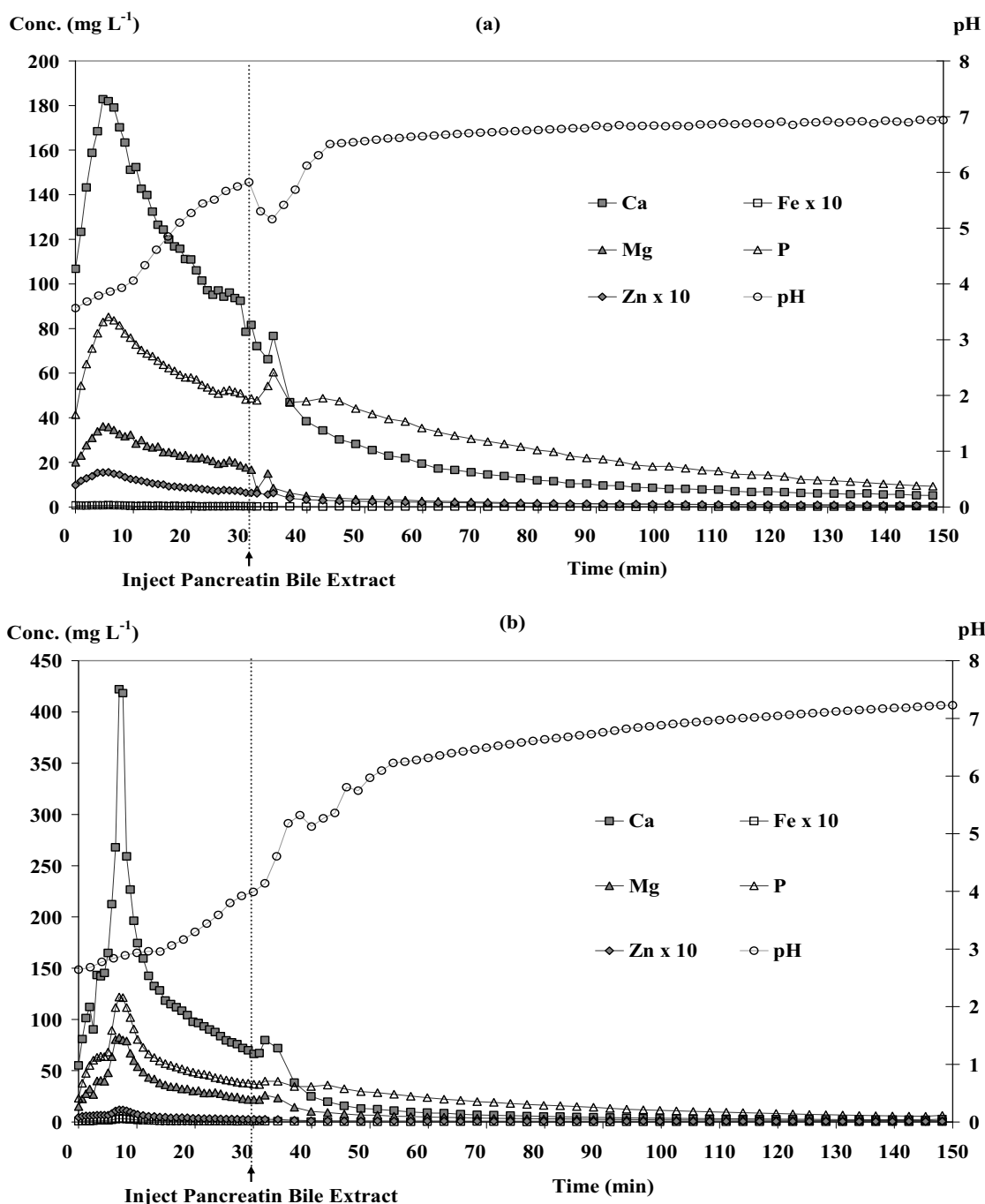
3.3.1.5 กราฟการเปลี่ยนแปลงของไดอะไลซิส (Dialysis profile)

ระบบ CFD นอกเหนือจากจะให้ข้อมูลของร้อยละการไดอะไลซิสแล้ว ยังให้ข้อมูลของการเปลี่ยนแปลงค่า pH และการเปลี่ยนแปลงระดับแร่ธาตุต่างๆ ด้วย ซึ่งช่วยให้เข้าใจการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นระหว่างการไดอะไลซิส และปัจจัยที่ส่งผลถึงการไดอะไลซิส โดยพิจารณาจากแกนด้านขวาของกราฟการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรดต่างในรูปที่ 3.6 พบว่าค่า pH เปลี่ยนแปลงจากประมาณ 2.0 ในการย่อยของกระเพาะอาหารไปเป็นประมาณ 5.0 ภายใน 30 นาทีของการย่อยในลำไส้ และเปลี่ยนเป็น 7.0-7.5 หลังจาก 1 ชั่วโมงซึ่งใกล้เคียงกับการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระบบการย่อยของมนุษย์ ค่าการเปลี่ยนแปลงของแร่ธาตุในตัวอย่าง blank แสดงในรูปที่ 3.6 พบว่าปริมาณแร่ธาตุต่างๆ มีค่าต่ำคือน้อยกว่า 4 mg L^{-1} สำหรับทุกธาตุ สูงสุดคือฟอสฟอรัสที่ความเข้มข้น 3 ถึง 7 mg L^{-1} เนื่องจากธาตุนี้เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ต่างๆ อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการหักค่าของ blank ออก

กราฟการเปลี่ยนแปลงของไออะไลซิสของแร่ธาตุต่างๆ ในตัวอย่างนมผง และกะน้ำ ที่ได้ทำการศึกษาด้วยระบบ CFD-ICP-OES แสดงอยู่ในรูปที่ 3.7 พบว่ารูปแบบการเปลี่ยนแปลงของไออะไลซิสมีลักษณะใกล้เคียงกัน มีค่าสูงสุดที่ประมาณ 10 นาทีของการไออะไลซิส หลังจากนั้นค่อยลดลงจนถึงระดับคงที่ (baseline) การเปลี่ยนแปลงในช่วงประมาณ 30-40 นาทีเกิดขึ้นเนื่องจากผลของการฉีดสารละลาย PBE เข้าไปในระบบ ณ เวลา 30 นาที

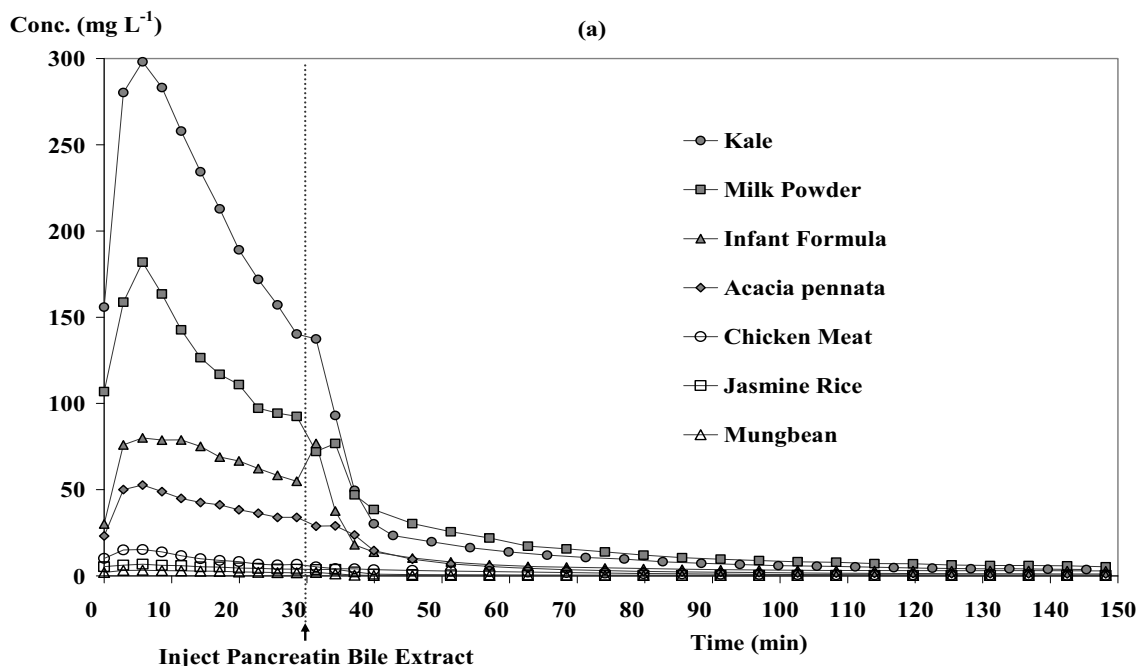


รูปที่ 3.6 กราฟการเปลี่ยนแปลงของไออะไลซิสของ blank



รูปที่ 3.7 กราฟการเปลี่ยนแปลงของไออะไลซิสของตัวอย่างนมผง (a) และกะน้ำ (b)

รูปที่ 3.8 แสดงกราฟการเปลี่ยนแปลงของไออะไลซิสของแคลเซียม (แสดงเป็นตัวแทนของธาตุต่างๆ) ในตัวอย่างอาหารที่ใช้ในการศึกษา พบว่าในตัวอย่างกะน้ำและนมผงมีการไออะไลซ์ได้อย่างรวดเร็ว ตั้งแต่ช่วงเริ่มต้นจนถึงประมาณ 30 นาที โดยภาพรวมปริมาณการไออะไลซ์ได้ของแคลเซียมเรียงจากมากไปน้อยแสดงได้คือ กะน้ำ>นมผง>อาหารเสริมทารก>หะอม>เนื้อไก่>ข้าวหอมมะลิ>ถั่วเขียว (จากปริมาณ 13867 ถึง 56 $\mu\text{g g}^{-1}$) ขึ้นกับปริมาณแคลเซียมที่ไออะไลซ์ได้



รูปที่ 3.8 กราฟการเปลี่ยนแปลงของโคอะไลซิสของแคลเซียมในตัวอย่างอาหารต่างๆ

3.3.1.6 การประเมินค่าโคอะไลซิสของแร่ธาตุในอาหารชนิดต่างๆ ที่ได้จากการใช้

ระบบ CFD-ICP-OES

ค่าความสามารถในการโคอะไลซิส (dialysability) คำนวณได้จากการหาค่าพื้นที่ใต้กราฟของการโคอะไลซิสจากระบบที่พัฒนาขึ้นเทียบกับสารละลายมาตรฐานของแร่ธาตุต่างๆ ตารางที่ 3.7 แสดงปริมาณแร่ธาตุที่วิเคราะห์ได้ทั้งปริมาณแร่ธาตุในอาหารของน้ำหนักแห้ง ปริมาณแร่ธาตุที่โคอะไลซิสได้ และส่วนที่เหลือจากการโคอะไลซิส ปริมาณแร่ธาตุแคลเซียมมีค่าต่ำสุดในตัวอย่างข้าวหอมมะลิ ($56 \pm 3 \mu\text{g g}^{-1}$) และสูงสุดในผักคะน้า ($13870 \pm 540 \mu\text{g g}^{-1}$) ร้อยละของการโคอะไลซิสในตัวอย่างต่างๆ มีค่าระหว่างร้อยละ 61 ถึง 93 ร้อยละส่วนที่เหลือจากการโคอะไลซิสมีค่าร้อยละ 4 ถึง 40 และผลรวมของทั้งสองส่วนมีค่าร้อยละ 94 ถึง 105 ส่วนธาตุอื่นมีค่าดังแสดงในตารางที่ 3.8 โดยสรุปคือการโคอะไลซิสได้ของแร่ธาตุขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่างและปริมาณแร่ธาตุที่มีในตัวอย่าง เช่นนมผงและคะน้ามีปริมาณแคลเซียม แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส และสังกะสีสูง ส่วนเนื้อไก่มีเหล็กสูง เป็นต้น ร้อยละของการโคอะไลซิสของแคลเซียม แมกนีเซียม และสังกะสีมีค่าตั้งแต่ร้อยละ 36 ถึง 93 ส่วนธาตุฟอสฟอรัสมีค่าแตกต่างกันมากตั้งแต่ $9 \pm 1\%$ ในข้าวสารถึง $56 \pm 3\%$ ในนมผง ในขณะที่ธาตุเหล็กมีค่าโคอะไลซิสต่ำร้อยละ 5-10 เท่านั้น ผลรวมของทั้งส่วนที่โคอะไลซิสได้และส่วนที่เหลือจากการโคอะไลซิสของแร่ธาตุแมกนีเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก และสังกะสีมีค่าในช่วงที่ยอมรับได้คือร้อยละ 82-107, 79-107, 86-103 และ 87-108 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.8 ปริมาณแร่ธาตุจากระบบ CFD-ICP-OES ในอาหารชนิดต่างๆ (ต่อน้ำหนักแห้ง) (n=3)

	Jasmine rice	Chicken meat	Mungbean	Acacia pennata	Milk powder	Kale
Calcium						
Total minerals ($\mu\text{g g}^{-1}$)	56 ± 3	299 ± 13	819 ± 43	1650 ± 30	6890 ± 120	13870 ± 540
Dialysed minerals ($\mu\text{g g}^{-1}$)	44 ± 2	279 ± 9	714 ± 35	1220 ± 55	5560 ± 280	8520 ± 430
Non-dialysed minerals ($\mu\text{g g}^{-1}$)	8 ± 2	12 ± 5	119 ± 27	482 ± 25	1030 ± 30	5520 ± 240
Dialysed + non-dialysed minerals ($\mu\text{g g}^{-1}$)	52 ± 4	290 ± 13	842 ± 26	1760 ± 91	6580 ± 280	14030 ± 520
Dialysis (%)	78 ± 3	93 ± 3	87 ± 4	74 ± 3	81 ± 4	61 ± 3
Element Retained (%)	14 ± 3	4 ± 2	15 ± 3	31 ± 2	15 ± 0.5	40 ± 2
Sum (%)	94 ± 6	100 ± 4	103 ± 3	105 ± 6	96 ± 4	101 ± 4
Magnesium						
Total minerals ($\mu\text{g g}^{-1}$)	157 ± 3	878 ± 30	1410 ± 3	1980 ± 12	763 ± 29	4690 ± 310
Dialysed minerals ($\mu\text{g g}^{-1}$)	95 ± 4	814 ± 13	1050 ± 40	1640 ± 44	628 ± 46	3130 ± 100
Non-dialysed minerals ($\mu\text{g g}^{-1}$)	34 ± 6	47 ± 2	459 ± 3	417 ± 7	69 ± 3	1470 ± 40
Dialysed + non-dialysed minerals ($\mu\text{g g}^{-1}$)	129 ± 3	861 ± 14	1507 ± 43	2080 ± 50	697 ± 45	4600 ± 90
Dialysis (%)	60 ± 2	93 ± 2	74 ± 3	84 ± 2	82 ± 6	67 ± 2
Element Retained (%)	22 ± 4	5 ± 0.2	33 ± 0.2	21 ± 1	9 ± 0.4	31 ± 1
Sum (%)	82 ± 2	98 ± 2	107 ± 3	105 ± 2	91 ± 6	98 ± 2
Phosphorus						
Total minerals ($\mu\text{g g}^{-1}$)	839 ± 41	6060 ± 209	4000 ± 60	8540 ± 220	6610 ± 310	5990 ± 60
Dialysed minerals ($\mu\text{g g}^{-1}$)	77 ± 8	2720 ± 90	525 ± 13	3250 ± 120	3680 ± 180	3240 ± 210
Non-dialysed minerals ($\mu\text{g g}^{-1}$)	699 ± 26	2490 ± 340	3750 ± 40	5390 ± 260	1610 ± 30	1840 ± 40
Dialysed + non-dialysed minerals ($\mu\text{g g}^{-1}$)	776 ± 25	5210 ± 370	4280 ± 60	8630 ± 340	5160 ± 140	5280 ± 60
Dialysis (%)	9 ± 1	45 ± 1	13 ± 0.3	38 ± 1	56 ± 3	54 ± 3
Element Retained (%)	83 ± 3	45 ± 1	94 ± 1	63 ± 3	23 ± 2	31 ± 1
Sum (%)	92 ± 3	90 ± 2	107 ± 1	101 ± 4	79 ± 2	88 ± 1

ตารางที่ 3.8 ปริมาณแร่ธาตุจากระบบ CFD-ICP-OES ในอาหารชนิดต่างๆ (ต่อน้ำหนักแห้ง) (n=3) (ต่อ)

	Jasmine rice	Chicken meat	Mungbean	Acacia pennata	Milk powder	Kale
Iron						
Total minerals ($\mu\text{g g}^{-1}$)	3.8 ± 0.1	15.2 ± 0.8	46.8 ± 2.1	113.4 ± 10.2	69.0 ± 1.4	90.9 ± 8.6
Dialysed minerals ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0.2 ± 0.1	0.7 ± 0.2	2.2 ± 0.3	11.8 ± 0.9	3.7 ± 0.7	4.8 ± 0.4
Non-dialysed minerals ($\mu\text{g g}^{-1}$)	3.2 ± 0.1	14.0 ± 0.3	41.4 ± 1.4	104.9 ± 1.9	55.5 ± 3.1	85.5 ± 2.8
Dialysed + non-dialysed minerals ($\mu\text{g g}^{-1}$)	3.5 ± 0.1	14.7 ± 0.4	43.6 ± 1.4	116.7 ± 2.7	59.2 ± 3.4	90.4 ± 2.6
Dialysis (%)	6 ± 1	5 ± 1	5 ± 1	10 ± 1	5 ± 1	5 ± 1
Element Retained (%)	84 ± 3	92 ± 2	89 ± 3	92 ± 2	80 ± 4	94 ± 3
Sum (%)	91 ± 3	96 ± 2	93 ± 3	103 ± 2	86 ± 5	100 ± 3
Zinc						
Total minerals ($\mu\text{g g}^{-1}$)	19.4 ± 0.6	27.5 ± 1.8	29.6 ± 0.4	44.0 ± 3.2	50.7 ± 2.3	32.0 ± 4.0
Dialysed minerals ($\mu\text{g g}^{-1}$)	10.8 ± 1.3	22.9 ± 0.7	21.3 ± 0.2	15.9 ± 0.6	38.3 ± 1.7	18.2 ± 0.9
Non-dialysed minerals ($\mu\text{g g}^{-1}$)	6.5 ± 0.7	6.9 ± 0.2	10.4 ± 0.8	22.9 ± 0.8	7.2 ± 0.1	15.1 ± 0.8
Dialysed + non-dialysed minerals ($\mu\text{g g}^{-1}$)	17.3 ± 1.4	29.8 ± 0.7	31.5 ± 0.6	38.8 ± 0.6	44.3 ± 1.1	32.6 ± 0.8
Dialysis (%)	55 ± 7	83 ± 2	72 ± 1	36 ± 1	76 ± 3	57 ± 3
Element Retained (%)	33 ± 4	25 ± 1	35 ± 3	52 ± 2	14 ± 0.2	47 ± 2
Sum (%)	89 ± 7	108 ± 3	106 ± 2	88 ± 2	87 ± 2	102 ± 3

3.3.2 การใช้ประโยชน์ของข้อมูลที่ได้จากระบบ CFD-ICP-OES ในการศึกษาการ

ดูดซึมได้ของแร่ธาตุในสารเสริมแร่ธาตุ [Judprasong et al., 2007]

3.3.2.1 การประเมินความสามารถในการไดอะไลซิสและการตรวจสอบ

ความใช้ได้ของวิธี

เช่นเดียวกับในตอนที่แล้วเนื่องจากไม่มีตัวอย่างสารมาตรฐาน (reference material) เกี่ยวกับการดูดซึมได้ของแร่ธาตุ ดังนั้นการตรวจสอบความใช้ได้ (validation) ของระบบ CFD-ICP-OES ของตัวอย่างแร่ธาตุที่เติมลงในอาหารในรูปแบบต่างๆ (mineral fortificants) จึงจำเป็นต้องศึกษา ทำโดยการศึกษา %recovery ของแร่ธาตุทั้งหมด (แคลเซียม เหล็ก และสังกะสี) ทำการวิเคราะห์หาปริมาณแร่ธาตุทั้งส่วนที่ไดอะไลซิสได้ (dialysate) จากระบบ CFD และส่วนที่เหลือจากการไดอะไลซิส (non-dialysable, retentate) แล้วนำทั้งสองส่วนไปวิเคราะห์หาปริมาณแร่ธาตุต่างๆ ด้วยเครื่อง ICP-OES ได้ผลการวิเคราะห์

ดังแสดงในตารางที่ 3.9 พบว่าผลรวมของส่วนที่ได้อะไลซ์ได้ และส่วนที่เหลือจากการได้อะไลซ์มีค่าใกล้เคียงกับปริมาณแร่ธาตุทั้งหมด ซึ่งมี %recovery ในช่วงร้อยละ 94.5-102.8 โดยมีค่าความแม่นยำ (repeatability, RSD) ของธาตุทั้งสาม (Ca, Fe, Zn) น้อยกว่าร้อยละ 3

ร้อยละของความสามารถในการได้อะไลซ์ของแคลเซียมในสารเสริมแคลเซียม (calcium fortificants) ในรูปฟอร์มต่างๆ มีค่าไม่แตกต่างกันอยู่ในช่วงประมาณร้อยละ 75-80 พบสูงสุดในรูปของแคลเซียมซิเตรต (calcium citrate, $81.8 \pm 2.5\%$) ส่วนของสารเสริมสังกะสี (zinc fortificants) มีค่าตั้งแต่ร้อยละ 45.0 ± 2.2 ในรูปของสารประกอบสังกะสี-กรดอะมิโน (zinc amino complex) จนถึงร้อยละ 53.1 ± 2.7 ในรูปของสังกะสีซัลเฟต (zinc sulphate) สำหรับรูปฟอร์มต่างๆ ของสารเสริมธาตุเหล็ก (iron fortificants) มีค่าความสามารถในการได้อะไลซ์แตกต่างกัน เหล็ก(II)ซัลเฟต (iron(II)sulphate), เหล็ก(II)แลคเตส (iron(II)lactate) และเหล็ก(II)ฟูเมอเรต (iron(II)fumarate) มีค่าร้อยละ 41-45 ซึ่งไม่แตกต่างกัน ส่วนสารเสริมเหล็กในรูปของ NaFe(III)EDTA มีค่าความสามารถในการได้อะไลซ์สูงสุด ($81.3 \pm 2.2\%$) ทั้งนี้สามารถอธิบายจากค่า stability ระหว่างสารประกอบ iron-EDTA ($\log K$ of 25.7 for Fe(III) and 14.3 for Fe(II) [Hurrell RF, 1997; Furia TE, 1980]) ค่าความสามารถในการเกิดสารเชิงซ้อนระหว่าง EDTA กับโลหะ ขึ้นอยู่กับค่า effective stability constant (K_{eff}) ณ ค่า pH หนึ่งๆ โดยค่า K_{eff} นี้สามารถคำนวณได้ ณ ที่ความเป็นกรดต่างๆ เช่น K_{eff} ของ EDTA และ Fe(III) มีค่า 12.3 ที่ความเป็นกรดต่าง 2, 19.2 ที่ความเป็นกรดต่าง 5, 22.4 ที่ความเป็นกรดต่าง 7 และ 25.7 ที่ความเป็นกรดต่าง 12 นอกจากนั้นยังมีค่าสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับธาตุอื่นๆ คือทองแดง Cu(II) ($\log K$ 18.8), สังกะสี Zn(II) ($\log K$ 16.5) และแคลเซียม Ca(II) ($\log K$ 10.7) ดังนั้นเมื่อ EDTA อยู่ในสภาวะความเป็นกรดต่างของกระเพาะอาหาร จึงคาดได้ว่าเกิดเป็นสารประกอบระหว่าง EDTA กับ Fe(III) และป้องกันการตกตะกอนของ Fe(III) ในอาหารเมื่อค่า pH สูงขึ้น [Hurrell RF, 1997]

ตารางที่ 3.9 ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของตัวอย่างสารเสริมแร่ธาตุ Ca, Fe และ Zn mineral fortificants (n=3)

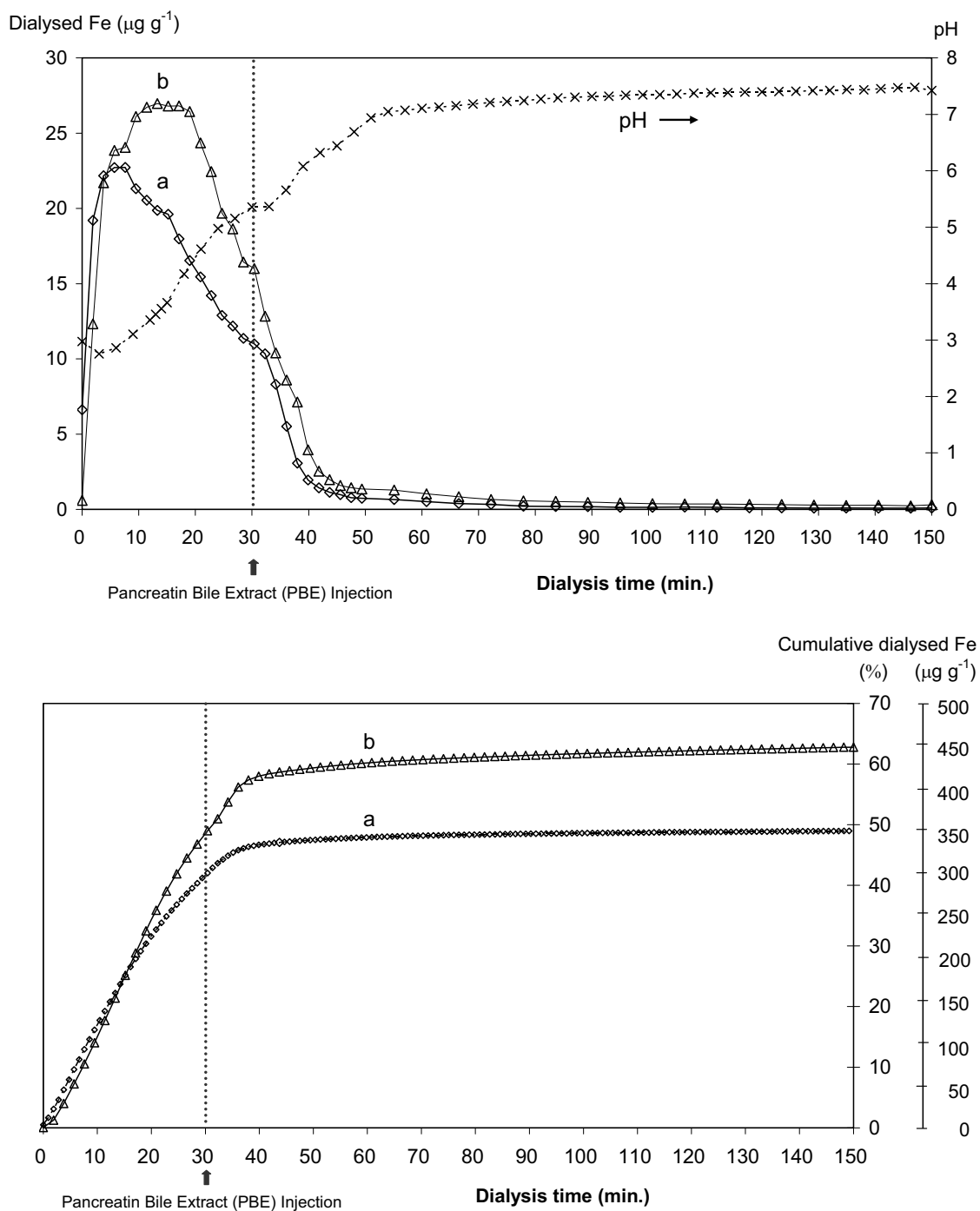
สารเสริมแร่ธาตุ (Fortificants)	ความเข้มข้นของแร่ธาตุ ($\mu\text{g g}^{-1}$ fortificant) ^a			
	ปริมาณทั้งหมด	ส่วนที่ไดอะไลซ์ได้ (Dialysed)	ส่วนที่เหลือจากการ ไดอะไลซ์ (Non-dialysed)	Dialysed + Non-dialysed
Calcium fortificants:				
Calcium carbonate	4890 $\pm$ 270	3630 $\pm$ 100 (74.2 $\pm$ 2.1)	1130 $\pm$ 210 (23.2 $\pm$ 4.2)	4750 $\pm$ 170 (98.8 $\pm$ 4.9)
Tri-calcium phosphate	4460 $\pm$ 260	3360 $\pm$ 110 (75.3 $\pm$ 2.5)	970 $\pm$ 110 (21.7 $\pm$ 2.5)	4340 $\pm$ 50 (95.7 $\pm$ 3.5)
Calcium lactate gluconate	3740 $\pm$ 270	2940 $\pm$ 90 (78.6 $\pm$ 2.4)	710 $\pm$ 80 (19.0 $\pm$ 2.2)	3660 $\pm$ 50 (96.5 $\pm$ 3.1)
Calcium citrate	4050 $\pm$ 230	3310 $\pm$ 100 (81.8 $\pm$ 2.5)	740 $\pm$ 90 (18.3 $\pm$ 2.1)	4060 $\pm$ 60 (99.0 $\pm$ 3.1)
Iron fortificants:				
Fe(II) sulphate	1200 $\pm$ 84	507 $\pm$ 16 (42.4 $\pm$ 1.3)	660 $\pm$ 15 (54.8 $\pm$ 1.3)	1170 $\pm$ 25 (97.3 $\pm$ 2.0)
Fe(II) fumarate	1280 $\pm$ 33	524 $\pm$ 16 (40.9 $\pm$ 1.2)	680 $\pm$ 6 (53.2 $\pm$ 1.0)	1210 $\pm$ 15 (94.5 $\pm$ 1.1)
Fe(II) lactate	1350 $\pm$ 53	609 $\pm$ 19 (45.0 $\pm$ 1.4)	751 $\pm$ 35 (55.5 $\pm$ 2.6)	1360 $\pm$ 44 (100.5 $\pm$ 3.3)
Sodium iron EDTA	1340 $\pm$ 50	1090 $\pm$ 30 (81.3 $\pm$ 2.2)	287 $\pm$ 20 (21.5 $\pm$ 1.0)	1380 $\pm$ 30 (102.8 $\pm$ 2.2)
Fe(III) ammonium citrate	1440 $\pm$ 54	364 $\pm$ 10 (25.2 $\pm$ 0.7)	994 $\pm$ 76 (73.5 $\pm$ 5.6)	1360 $\pm$ 78 (100.4 $\pm$ 5.8)
Zinc fortificants:				
Zinc sulphate	683 $\pm$ 9	363 $\pm$ 19 (53.1 $\pm$ 2.7)	323 $\pm$ 21 (48.1 $\pm$ 3.1)	692 $\pm$ 26 (101.2 $\pm$ 3.8)
Zinc oxide	1124 $\pm$ 20	516 $\pm$ 27 (46.1 $\pm$ 2.4)	586 $\pm$ 18 (52.4 $\pm$ 1.6)	1002 $\pm$ 39 (98.4 $\pm$ 3.4)
Zinc amino complex	1140 $\pm$ 30	514 $\pm$ 25 (45.0 $\pm$ 2.2)	577 $\pm$ 24 (50.5 $\pm$ 2.0)	1090 $\pm$ 20 (95.5 $\pm$ 1.6)

^aค่าที่อยู่ในวงเล็บแสดงความเข้มข้นของแร่ธาตุ

3.3.2.2 กราฟการเปลี่ยนแปลงของการไดอะไลซิส

ระบบไดอะไลซิสทั่วไป โดยเฉพาะในระบบ batch dialysis ให้คำตอบเฉพาะในเรื่องของค่าไดอะไลซิสเท่านั้น ส่วนในระบบการไหลแบบต่อเนื่อง (continuous-flow dialysis) นั้นให้ข้อมูลเพิ่มขึ้นมากกว่าคือได้ข้อมูลของการเปลี่ยนแปลงแร่ธาตุระหว่างไดอะไลซิส และข้อมูลการเปลี่ยนแปลงในช่วงเวลาต่างๆ (time-based dialysis profile) ระบบ CFD-ICP-OES ที่พัฒนาขึ้นนี้มีข้อมูลของกราฟสองรูปแบบ คือ การเปลี่ยนแปลงของแร่ธาตุและความเป็นกรดต่างระหว่างไดอะไลซิส (dialysis profiles and pH change) ดังแสดงในรูปที่ 3.9 (ด้านบน) และการเปลี่ยนแปลงแบบสะสมในช่วงเวลาต่างๆ (time-dependent cumulative plot) ดังแสดงในรูปที่ 3.9 (ด้านล่าง) ซึ่งข้อมูลของกราฟระหว่างความเข้มข้นของแร่ธาตุต่างๆ ที่ไดอะไลซิสได้เทียบกับเวลา ให้ข้อมูลในเชิงจลนศาสตร์ (kinetic information) ค่าอัตราการไดอะไลซิสสามารถคำนวณได้จากค่าความชัน (slope) ของกราฟระหว่างไดอะไลซิส

ค่า pH เปลี่ยนแปลงจากประมาณ 2.0 เป็นประมาณ 5.0 ภายใน 30 นาที และเปลี่ยนเป็น 7.0-7.5 หลังจาก 1 ชั่วโมงดังแสดงในรูปที่ 3.9 (ด้านบน) ส่วนกราฟสะสมของปริมาณเหล็กที่ไดอะไลซิสได้แสดงอยู่ด้านล่าง พบว่าธาตุเหล็กที่ไดอะไลซิสได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงก่อนฉีดเอนไซม์ PBE แล้วเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อย และสุดท้ายก็คงที่ ร้อยละของไดอะไลซิสสามารถคำนวณได้จากความชันของกราฟนี้ (กราฟด้านล่าง ขวามือ) ผลของสารต่างๆ ที่มีผลต่อการไดอะไลซิสสามารถแสดงได้อย่างชัดเจนด้วยกราฟนี้ เช่นในรูปที่ 3.9 ด้านล่าง พบว่าวิตามินซี (ascorbic acid) แสดงผลของการส่งเสริมการดูดซึมธาตุเหล็ก โดยเฉพาะในช่วงหลังจาก 20 นาที (ความเป็นกรดต่างมากกว่า 4) หลังจากไดอะไลซิส นอกจากนั้นจะเห็นได้ว่าการไดอะไลซิสของธาตุเหล็กไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อความเป็นกรดต่างมีค่ามากกว่า 6 ในทั้งกรณีที่มีและไม่มี ascorbic acid เป็นผลให้ธาตุเหล็กในรูปของซัลเฟตที่มีการเติมวิตามินซีมีค่าไดอะไลซิสร้อยละ 63 เมื่อเปรียบเทียบกับที่ไม่มีการเติมวิตามินซี (ร้อยละ 49) กราฟที่แสดงทั้งสองแบบนี้จะใช้ในการศึกษาการดูดซึมได้ของแร่ธาตุ รวมทั้งผลของสารส่งเสริมและสารยับยั้งการดูดซึม



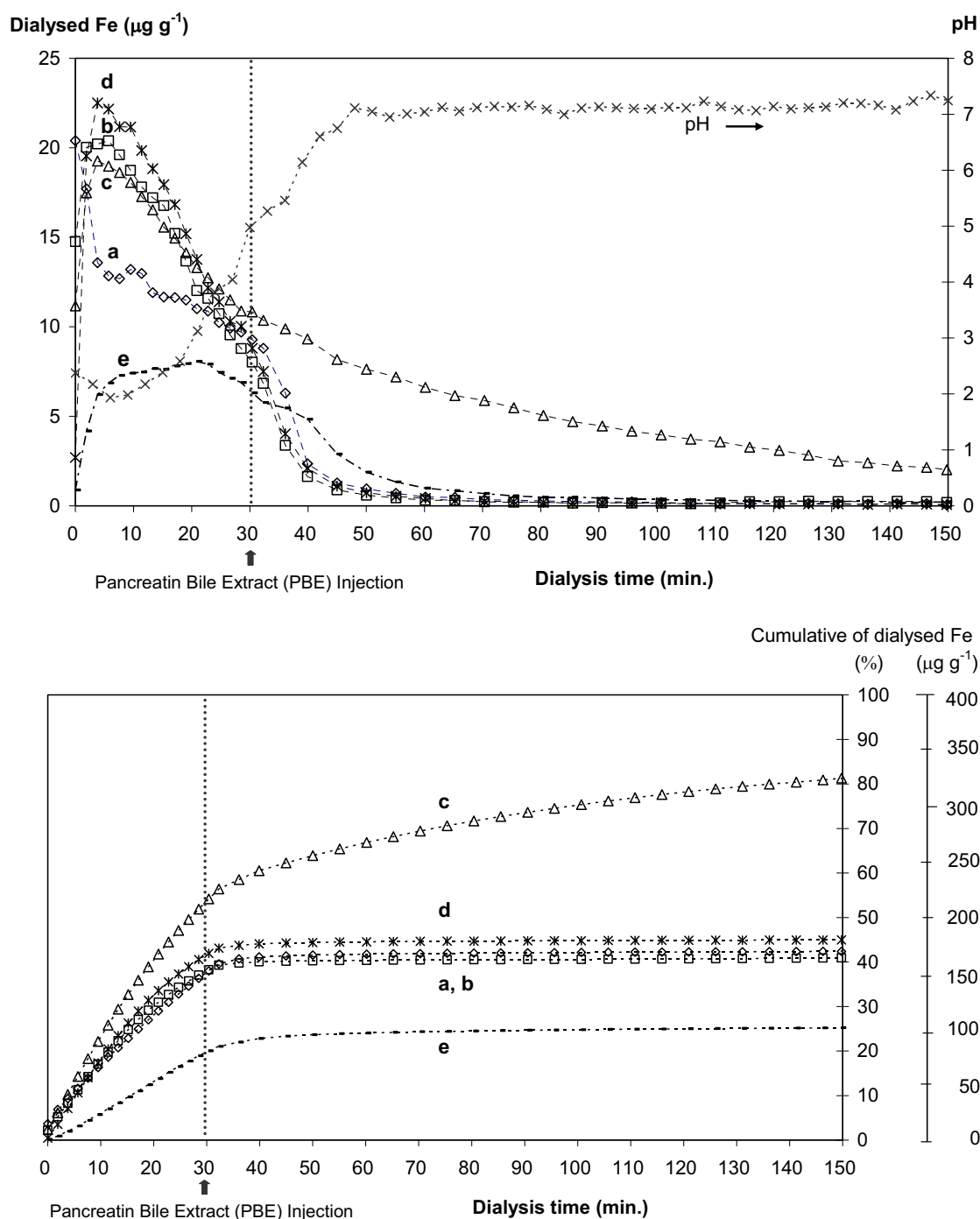
รูปที่ 3.9 กราฟการเปลี่ยนแปลงของไดอะไลซิสของธาตุเหล็กและค่า pH (รูปด้านบน) และกราฟการเปลี่ยนแปลงแบบสะสมในช่วงเวลาต่างๆ (cumulative plot) ของธาตุเหล็กและร้อยละของไดอะไลซิส (รูปด้านล่าง) สำหรับ FeSO_4 ที่ไม่มี ascorbic acid (a) และมี ascorbic acid (b)

3.3.2.3 กราฟการเปลี่ยนแปลงของไออะไลซิสของธาตุเหล็กในสารเสริมธาตุ เหล็กในรูปแบบต่างๆ ที่มีการเติมสารส่งเสริมและสารยับยั้งการดูดซึม

สารเสริมแร่ธาตุเหล็ก แคลเซียมและสังกะสี มีการใช้กันอย่างกว้างขวางในผลิตภัณฑ์อาหารที่เสริมแร่ธาตุต่างๆ ได้ทำการศึกษาทั้งสารเสริมธาตุเหล็ก (iron fortificants) สารเสริมธาตุแคลเซียม (calcium fortificants) และสารเสริมสังกะสี (zinc fortificants) แต่เพื่อให้เห็นภาพได้ชัดเจนของการใช้ข้อมูลที่ได้จากระบบ online CFD-ICP-OES จึงขอนำเสนอเฉพาะในส่วนที่เป็นสารเสริมธาตุเหล็กเท่านั้น

สารเสริมธาตุเหล็กที่นิยมใช้มีหลายรูปแบบ แต่ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือเหล็กในรูปแบบของ Fe(II) sulphate, Fe(II) fumarate, NaFe(III)EDTA, Fe(II) lactate และ Fe(III) ammonium citrate เนื่องจากความสามารถในการดูดซึม ราคาไม่สูงมาก และมีการใช้กันมาก กราฟการเปลี่ยนแปลงของธาตุเหล็กที่ไออะไลซิสได้ และการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในรูปแบบของสารเสริมธาตุเหล็กต่างๆ แสดงในรูปที่ 3.10 พบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มตามร้อยละของการไออะไลซิสคือกลุ่มที่มีค่าระดับต่ำ (ร้อยละ 25 สำหรับ Fe(III) ammonium citrate) ระดับกลาง (ร้อยละ 41-45% สำหรับ Fe(II) sulphate, Fe(II) fumarate และ Fe(II) lactate) และระดับสูง (ร้อยละ 81 สำหรับ NaFe(III)EDTA) กราฟการเปลี่ยนแปลงของไออะไลซิสของธาตุเหล็กในรูปแบบของ Fe(III) ammonium citrate พบว่ามีอัตราการไออะไลซิสต่ำในช่วง 30 นาทีแรกและคงที่ในที่สุด ทำให้มีค่าไออะไลซิสเพียงร้อยละ 25.2 เท่านั้น ส่วนกราฟการเปลี่ยนแปลงของไออะไลซิสของธาตุเหล็กในรูปแบบของ Fe(II) sulphate, Fe(II) lactate และ Fe(II) fumarate มีค่าไออะไลซิสร้อยละ 42, 45 และ 41 ตามลำดับ แต่จะเห็นได้ว่ากราฟเหล่านี้มีความซับซ้อนมากขึ้นเมื่อมีหลายรูปแบบของการเปลี่ยนแปลง ดังนั้นจึงได้มีการประมวลข้อมูลให้สามารถเข้าใจได้ง่ายด้วยการทำเป็นกราฟการเปลี่ยนแปลงของไออะไลซิสของธาตุเหล็กในรูปแบบของการสะสมปริมาณ (cumulative plot) ดังแสดงอยู่ในรูปที่ 3.10 (ด้านล่าง) ซึ่งแสดงทั้งปริมาณธาตุเหล็ก ($\mu\text{g g}^{-1}$) และร้อยละของการไออะไลซิสของสารเสริมธาตุเหล็กในรูปแบบต่างๆ ความชันของกราฟที่ได้นี้สามารถบ่งบอกถึงอัตราการไออะไลซิสของธาตุเหล็กในตัวอย่าง อัตราการไออะไลซีก่อนฉีดเอนไซม์ PBE มีค่าสูง และแตกต่างกันไปตามชนิดของสารเสริมธาตุเหล็ก สารเสริมธาตุเหล็กในรูปแบบของ NaFe(III)EDTA มีค่าการไออะไลซิสสูงสุด (ร้อยละ 81) ในขณะที่สารเสริมธาตุเหล็กในรูปแบบของ Fe(III) ammonium citrate มีค่าต่ำสุด (ร้อยละ 25) ทั้งนี้เนื่องจากค่าคงที่ (stability constant) ของสารประกอบ EDTA และ citrate กับเหล็ก(III) มีค่าแตกต่างกันมาก ($\log K = 25.7$ and 11.8 , respectively [Furia TE, 1980]) นอกจากนั้นยังเห็นชัดเจนได้จากอัตราการไออะไลซิสในช่วงระหว่าง 0-30 นาทีในรูปแบบของ NaFe(III)EDTA มีค่าสูงสุดในขณะที่ Fe(III) ammonium citrate มีค่าต่ำสุด ในขณะที่รูปแบบอื่นมีอัตราไออะไลซิสอยู่ระหว่างนี้ การเปลี่ยนจากเหล็ก(II) ไปเป็นเหล็ก(III) แล้วตกตะกอนเป็น $\text{Fe}(\text{OH})_3$ นั้นเกิดขึ้นที่ค่า pH มากกว่า 4 [Salovaara et al., 2003] ดังนั้นความสามารถในการไออะไลซิสของสารเสริมธาตุเหล็กในรูปแบบต่างๆ มีค่าคงที่หรือหยุดการไออะไลซิสหลังจากเวลาผ่านไป 30 นาที (ค่า pH ประมาณ 5) ยกเว้นรูปแบบของ NaFe(III)EDTA ซึ่งพบอัตราการไออะไลซิสสูงสุดตั้งแต่เริ่มกระบวนการไออะไลซิส นอกจากนั้นหลังจากฉีด PBE แล้ว (ค่า pH ประมาณ 5-7) รูปแบบนี้ยังคงไออะไลซิสได้อย่างต่อเนื่อง ร้อยละ

ของโคะไลซิสของฟอร์มนี้ในช่วงก่อนฉีด PBE นั้นมีค่าสูงถึงร้อยละ 58 เมื่อเทียบกับทั้งหมดที่โคะไลซิสได้ (ร้อยละ 81)



รูปที่ 3.10 กราฟการเปลี่ยนแปลงของโคะไลซิสของธาตุเหล็ก และค่า pH (รูปด้านบน) และกราฟการเปลี่ยนแปลงแบบสะสมในช่วงเวลาต่างๆ (cumulative plot) ของธาตุเหล็กและร้อยละของโคะไลซิส (รูปด้านล่าง) ในสารเสริมธาตุเหล็กในรูปแบบต่างๆ a) Fe(II) sulphate b) Fe(II) fumarate c) NaFe(III)EDTA d) Fe(II) lactate และ e) Fe(III) ammonium citrate

หลายรายงานที่ได้ศึกษาถึงผลของกรดอินทรีย์ต่างๆ (Organic acids) ที่มีผลต่อการดูดซึมได้ของธาตุเหล็ก พบว่าวิตามินซีมีผลส่งเสริมการดูดซึมของธาตุเหล็กในรูปที่เป็น non-heme iron ทั้งที่เป็นสารในธรรมชาติ และสารสังเคราะห์ [Hallberg and Brune, 1986] ทั้งการศึกษาในแบบหลอดทดลอง (*in vitro*) [Nayak and Nair, 2003, Salovaara et al., 2003] และในแบบการทดลองกับสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) [Siengenberget al., 1991; 50] ดังนั้นจึงมีการเติมวิตามินซีในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิดเพื่อป้องกันผลที่เกิดจากสารยับยั้งการดูดซึม ประเภทไฟเตทที่พบมาในพืชผักชนิดต่างๆ มีการศึกษาพบว่ากรดซิตริก (Citric acid) ที่เติมลงในอาหาร ทดสอบที่มีข้าวและถั่วเหลืองเป็นองค์ประกอบหลัก มีผลเพิ่มการดูดซึมของธาตุเหล็ก 2-3 เท่า [Gillooly et al, 1983, Derman et al., 1987] สารประกอบเหล่านี้ได้ใช้ในการศึกษาของสารส่งเสริมและสารยับยั้งการดูดซึมของธาตุเหล็ก รูปที่ 3.11 (ด้านบน) แสดงการเปลี่ยนแปลงของไดอะไลซิสของธาตุเหล็ก และค่า pH ของเหล็กในรูปของ Fe(II) sulphate ที่มีการเติมสารเสริมการดูดซึม (วิตามินซี กรดซิตริก) และสารยับยั้งการดูดซึม (กรดไฟติก แทนนิก และออกซาลิก) ที่สัดส่วนต่อธาตุเหล็กคือ 3:1 ถึง 4:1 ดังการศึกษาของ Lynch และ Stoltzfus [Lynch and Stoltzfus, 2003] จากการศึกษาพบว่าสารที่เติมลงในอาหาร (additives) มีผลอย่างมาก ต่อการเปลี่ยนแปลงของไดอะไลซิสของธาตุเหล็กในรูปของ Fe(II) sulphate โดยเฉพาะวิตามินซี เห็นได้ชัด ในช่วงแรก (0-30 นาที) ของการไดอะไลซิส ทั้งนี้เนื่องจากวิตามินซีลดอัตราการเปลี่ยนฟอร์มจาก Fe(II) ไปเป็น Fe(III) เมื่อค่า pH มีค่าสูงขึ้น วิตามินซีจะแสดงบทบาทนี้ได้ดีเมื่อค่า pH มีค่าน้อยกว่า 6.0 ถึง 6.8 เมื่อค่า pH สูงกว่านี้วิตามินซีจะไม่สามารถแสดงบทบาทนี้ [Derman et al., 1987] นอกจากนี้วิตามินซียังเกิดเป็น สารประกอบที่ละลายน้ำได้ (soluble complexes) กับเหล็กเมื่อค่า pH มีค่าต่ำทำให้สารประกอบนี้ยังคงละลายน้ำได้และดูดซึมได้ แต่เมื่อค่าเป็นกรดต่ำสูงขึ้นดังที่พบในบริเวณลำไส้เล็ก [Hurrell RF, 1997] ทำให้เกิดการเปลี่ยนจาก Fe(II) ไปเป็น Fe(OH)₃ ดังจะเห็นได้จากการหยุดการไดอะไลซิสของเหล็ก(II)ซัลเฟตที่เติมวิตามินซี เมื่อค่า pH มากกว่า 6 (รูปที่ 3.11 รูปด้านบน) อัตราการไดอะไลซิสของเหล็ก(II)ซัลเฟตที่เติมวิตามินซีและกรดซิตริกในช่วง 0-40 นาที (ค่า pH น้อยกว่า 6) มีค่าสูงมากกว่าที่ไม่ได้มีการเติมวิตามินซีและกรดซิตริก (รูปที่ 3.11 รูปด้านล่าง) ซึ่งเห็นได้อย่างชัดเจนว่าสามารถแบ่งแยกความแตกต่างระหว่างสารเพิ่มการดูดซึมและสารยับยั้งการดูดซึมของธาตุเหล็ก ส่วนผลการเพิ่มอัตราการไดอะไลซิสในช่วงก่อนฉีด PBE เมื่อเติมสารเพิ่มการดูดซึมพบได้ชัดในกรณีของวิตามินซี ในขณะที่กรดซิตริกแสดงบทบาทชัดเจนในช่วงหลังฉีด PBE ทั้งนี้เนื่องจากคุณสมบัติในการ chelate ของกรดซิตริกด้วยหมู่ carboxylic และ hydroxyl ที่ช่วยป้องกันไม่ให้ธาตุเหล็กเปลี่ยนไปเป็น iron hydroxides ซึ่งไม่สามารถละลายน้ำได้ และยังทำให้เกิดเป็น สารประกอบ Fe(III)-citrate ที่ยังคงละลายน้ำได้ [Salovaara et al., 2003] นอกจากนั้นจะเห็นได้จากการที่ค่าคงที่ (log K, stability constant) ของเหล็ก(III)กับกรดซิตริกสูงกว่ากรณีของเหล็ก(II) คือ 11.8 และ 3.2 ตามลำดับ ดังนั้นกรดซิตริกจึงสามารถเกิดสารประกอบได้กับทั้งเหล็ก(II) และเหล็ก(III) ที่ความเป็นกรดต่ำประมาณ 3-4 เหล็ก(II) สามารถเกิดเป็น tridentate complex กับกรดซิตริก [Fe(II) cit]⁻ ด้วยหมู่ carboxylic 2 ตัวและหมู่ hydroxyl 1 หมู่ กระบวนการ oxidation และ hydrolysis ของเหล็ก(II) ทำให้เกิดเป็นสารประกอบ tridentate ferric-citrate [Fe(III)OH cit]⁻ ซึ่งจะถูกไฮโดรไลซ์ไปเป็นสารประกอบ bidentate, [Fe(III)OH₂ cit]²⁻ ที่ละลายน้ำได้ [Salovaara et al., 2003]

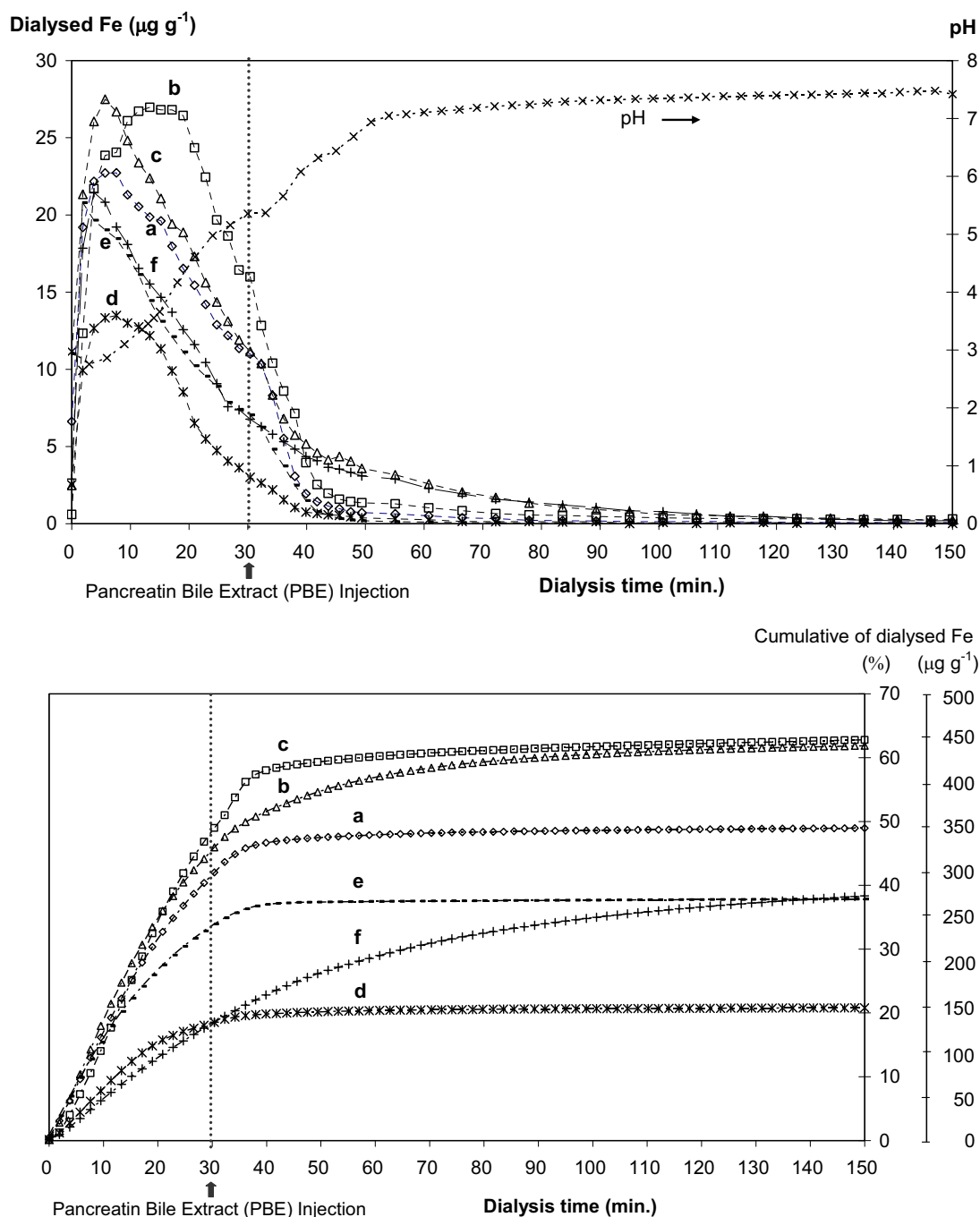
ในทางตรงกันข้าม ในกรณีที่มีสารยับยั้งการดูดซึมธาตุเหล็ก สารที่มีการศึกษากันมานานแล้วพบว่า มีผลชัดเจนคือกรดไฟติก (phytic acid) พบว่าถ้าเติมกรดไฟติกลงในเหล็ก(II)ซัลเฟต ปริมาณเหล็กที่ไคอะไลซ์ได้ต่ำมากกว่าที่ไม่ได้เติมโดยเฉพาะในช่วง 0-30 นาทีแรกของไคอะไลซิส (รูปที่ 3.11d ด้านล่าง) ทั้งนี้เนื่องจากกรดไฟติกมีประจุลบ (negatively charged) สามารถทำปฏิกิริยากับประจุบวกของเหล็กทำให้เหล็กดูดซึมได้ลดลง หลังจากฉีด PBE เข้าไปพบว่ากราฟการเปลี่ยนแปลงของปริมาณธาตุเหล็กระหว่างไคอะไลซิสของเหล็ก(II)ซัลเฟตที่เติมกรดออกซาลิก (oxalic acid) แสดงว่าไคอะไลซ์ได้น้อยลงเช่นกัน (รูปที่ 3.11f) ค่าคงที่ ($\log K$, stability constant) ของกรดออกซาลิกกับเหล็ก(III) มีค่า 9.4 โดยเมื่อพิจารณาที่ค่า effective stability constants ($\log K_{\text{eff}}$) ที่ค่า pH 5, 6 และ 7 มีค่า 2.9, 4.7 และ 6.1 ตามลำดับ [Furia TE, 1980] ด้วยเหตุนี้เหล็กที่เกิดสารประกอบกับออกซาลิกจึงยังคงไคอะไลซ์ได้แม้ว่าค่า pH มีค่ามากกว่า 5

ผลของความสามารถในการไคอะไลซ์ได้ของธาตุเหล็กที่มีสารส่งเสริมและสารยับยั้งการดูดซึม แสดงอยู่ในตารางที่ 3.10 โดยแสดงค่าเหล็กที่ไคอะไลซ์ได้เป็น สองช่วงคือช่วงก่อน และช่วงหลังการฉีด PBE เข้าไปในระบบ CFD เพื่อติดตามพฤติกรรมของสารที่ใช้ในศึกษาปริมาณธาตุเหล็กในรูปเหล็กซัลเฟตที่มีการเติมวิตามินซี และกรดซิตริก พบว่ามีค่าไคอะไลซ์ร้อยละ 62.8 ± 1.6 และ 61.9 ± 2.3 ตามลำดับ ในช่วงก่อนฉีด PBE ผลของวิตามินซีส่งผลเพิ่มการไคอะไลซ์ได้ชัดเจนมากกว่ากรดซิตริก (ร้อยละ 48.8 กรณีที่เติมวิตามินซี ร้อยละ 42.9 กรณีที่เติมกรดซิตริก เปรียบเทียบกับร้อยละ 41.6 ในกรณีที่เป็นเหล็กซัลเฟตที่ไม่ได้เติมสารใด) ในช่วงหลังฉีด PBE วิตามินซีกลับแสดงผลการส่งเสริมการไคอะไลซ์ของเหล็กได้น้อยกว่ากรดซิตริก (ร้อยละ 14.0 และ 18.9 เปรียบเทียบกับร้อยละ 7.4 กรณีที่ไม่เติมสารใด) สำหรับกรณีที่เติมกรดไฟติก พบว่ามีค่าไคอะไลซ์ต่ำกว่าที่ไม่ได้เติมประมาณครึ่งหนึ่ง ในขณะที่การเติมกรดแทนนิก และกรดออกซาลิก ส่งผลลดการไคอะไลซ์เล็กน้อย (ประมาณร้อยละ 40 เปรียบเทียบกับร้อยละ 49 ที่ไม่ได้เติมสารใด) โดยสรุปความสามารถในการไคอะไลซ์ของธาตุเหล็กในฟอร์มเหล็ก(II)ซัลเฟต เรียงลำดับจากมากไปน้อย ดังนี้คือกรณีที่เติมวิตามินซี (ร้อยละ 63) > กรณีเติมกรดซิตริก (ร้อยละ 62) > ไม่ได้เติมสารใด (ร้อยละ 49) > กรณีเติมกรดออกซาลิก (ร้อยละ 41) > กรณีเติมกรดแทนนิก (ร้อยละ 38) > กรณีเติมกรดไฟติก (ร้อยละ 21)

ตารางที่ 3.10 ปริมาณธาตุเหล็กทั้งหมดและเหล็กที่ไดอะไลซ์ได้ในเหล็ก(II)ซัลเฟต ที่มีการเติมสารส่งเสริมและสารยับยั้งการดูดซึม (n=3)

Iron fortificants	Fe(II) sulphate (FeSO ₄)	FeSO ₄ with ascorbic acid	FeSO ₄ with citric acid	FeSO ₄ with phytic acid	FeSO ₄ with tannic acid	FeSO ₄ with oxalic acid
Total Fe in each study is 1210 ± 24 ($\mu\text{g g}^{-1}$)						
Dialysed Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$) and percent dialysis (%)						
- Before 30 min	502 ± 20 (41.6) ^a	589 ± 15 (48.8)	518 ± 19 (42.9)	225 ± 31 (18.7)	407 ± 15 (33.7)	350 ± 9 (29.0)
- After 30 min	89 ± 4 (7.4)	169 ± 4 (14.0)	229 ± 9 (18.9)	26 ± 4 (2.2)	51 ± 2 (4.2)	146 ± 4 (12.1)
- Sum	592 ± 24 (49.0 $\pm$ 2.0)	758 ± 20 (62.8 $\pm$ 1.6)	747 ± 28 (61.9 $\pm$ 2.3)	251 ± 34 (20.8 $\pm$ 2.8)	458 ± 17 (37.9 $\pm$ 1.4)	496 ± 13 (41.1 $\pm$ 1.1)
Non-dialysed Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$)	564 ± 12 (46.7 $\pm$ 1.0)	396 ± 36 (32.8 $\pm$ 3.0)	520 ± 16 (43.1 $\pm$ 1.3)	952 ± 34 (78.9 $\pm$ 2.9)	704 ± 25 (58.3 $\pm$ 2.1)	700 ± 10 (58.0 $\pm$ 0.9)
Dialysed + non-dialysed Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$)	1156 ± 25 (95.7 $\pm$ 2.0)	1155 ± 47 (95.7 $\pm$ 3.9)	1267 ± 25 (101.4 $\pm$ 2.1)	648 ± 58 (99.7 $\pm$ 3.9)	1162 ± 23 (96.2 $\pm$ 1.9)	1196 ± 10 (99.1 $\pm$ 0.9)

^a ค่าที่อยู่ในวงเล็บแสดงค่าร้อยละของไดอะไลซิส



รูปที่ 3.11 กราฟการเปลี่ยนแปลงของไดอะไลซิสของธาตุเหล็กในฟอร์มเหล็ก(II)ซัลเฟต ที่เติมสารส่งเสริมและยับยั้งการดูดซึม (รูปด้านบน) และกราฟการเปลี่ยนแปลงแบบสะสมในช่วงเวลาต่างๆ (cumulative plot) ของธาตุเหล็กและร้อยละของไดอะไลซิส (รูปด้านล่าง) ในสารเสริมธาตุเหล็กในรูปฟอร์มเหล็ก(II)ซัลเฟตที่มีการเติมสารต่างๆ a) ไม่เติมสารใด b) เติมวิตามินซี c) เติมกรดซิตริก d) เติมกรดไฟตริก e) เติมกรดแทนนิก และ f) เติมกรดออกซาลิก

3.4 บทสรุป

ระบบ CFD-ICP-OES ที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นระบบที่ง่าย รวดเร็ว และสามารถตรวจวัดแร่ธาตุครั้งละหลายๆ ธาตุพร้อมกันได้อย่างต่อเนื่อง นอกจากนั้นยังสามารถติดตามความเป็นกรดต่าง และการเปลี่ยนแปลงของแร่ธาตุระหว่างไดอะไลซิสไปพร้อมๆ กัน ได้ทดสอบระบบที่พัฒนาขึ้นนี้กับตัวอย่างต่างๆ หลายชนิด ข้อมูลของความสามารถในการไดอะไลซิสของแร่ธาตุ กราฟการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรดต่าง และการเปลี่ยนแปลงของแร่ธาตุระหว่างไดอะไลซินั้น เป็นประโยชน์สำหรับการประเมินความสามารถในการดูดซึมได้ของแร่ธาตุ และใช้ในการศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการดูดซึมนั้น ทำให้เข้าใจการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นระหว่างไดอะไลซิส

ระบบ CFD-ICP-OES-pH ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้ในการติดตามกระบวนการไดอะไลซิสของแร่ธาตุต่างๆ และค่า pH ได้ในทุกช่วงเวลา (time-dependent dialysis) ระบบนี้ได้นำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาสารเสริมแร่ธาตุบางชนิดที่ใช้เติมในอาหาร และการศึกษาผลของสารส่งเสริมและสารยับยั้งการดูดซึมของแร่ธาตุ ซึ่งเป็นการใช้ระบบไดอะไลซิสในการศึกษาเป็นครั้งแรก กราฟการเปลี่ยนแปลงของไดอะไลซิสของแร่ธาตุ และกราฟการเปลี่ยนแปลงแบบสะสมในช่วงเวลาต่างๆ (cumulative plot) ของปริมาณแร่ธาตุและร้อยละของไดอะไลซิส ได้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนในการติดตามการเปลี่ยนแปลงระหว่างไดอะไลซิสที่มีผลมาจากสารที่เติมลงในอาหาร ซึ่งไม่สามารถเห็นได้ด้วยกระบวนการไดอะไลซิสแบบทั่วไป ระบบนี้จึงมีประโยชน์ในการใช้เป็นเครื่องมือสำหรับการประเมินค่าความสามารถในการดูดซึมได้ของแร่ธาตุในอาหาร และสารที่เติมลงในอาหาร

3.5 เอกสารอ้างอิง

1. D. Derman, D. Ballot, T. Bothwell, B. Macfarlane, R. Baynes, A. MacPhail and et al., *British Journal of Nutrition* 1987, **57(3)**, 345.
2. T.E. Furia, *CRC handbook of Food Additives* 2nd ed, CRC press, 1980.
3. M. Gillooly, T. Bothwell, J. Torrance, A. MacPhail, D. Derman, W. Bezwoda and et al., *British Journal of Nutrition* 1983, **49(3)**, 331.
4. R.F. Hurrell, *Nutrition Reviews* 1997, **55(6)**, 210.
5. L. Hallberg and M. Brune *Human nutrition Applied nutrition* 1986, **40(2)**, 97.
6. K. Judprasong, M. Ornthai, A. Siripinyanond and J. Shiowatana, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2005, **11**, 1191.
7. K. Judprasong, A. Siripinyanond and J. Shiowatana, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2007, **22**, 807.

8. S.R. Lynch and R.J. Stoltzfus, *The Journal of Nutrition* 2003, **133(9)**, 2978S.
9. D.D. Miller, B.R. Schriker, R.R. Rasmussen and D.V. Campen, *The American Journal of Clinical Nutrition* 1981, **34**, 2248.
10. B. Nayak and K. Nair, *Food Chemistry* 2003, **80**, 545.
11. J. Promchan and J. Shiowatana, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2005, **382(6)**, 1360.
12. S. Salovaara, A-S. Sandberg and T. Andlid, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003, **51(26)**, 7820.
13. D. Siengenber, R. Baynes, T. Bothwell, B. Macfarlane, R. Lamparelli, N. Car and et al., *The American Journal of Clinical Nutrition* 1991, **53**, 537.
14. J. Shiowatana, W. Kitthikhun, U. Sottimai, J. Promchan and K. Kunajiraporn, *Talanta* 2006, **68(3)**, 549.

ตอนที่ 4

การใช้ระบบเชื่อมต่อระหว่าง Flow field-flow fractionation กับ Inductively coupled plasma optical emission spectrometer ในการศึกษาการกระจายตัวตามขนาดของสารประกอบระหว่างธาตุเหล็กกับ Phytic acid และ Tannic acid ในอาหาร

4.1 บทนำ

4.2 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

- 4.2.1 สารเคมีและตัวอย่าง
- 4.2.2 วิธีการศึกษาการจับตัวระหว่างธาตุเหล็กกับ Phytic acid และ Tannic acid
- 4.2.3 วิธีการบ่มตัวอย่างในสภาวะกรดเบสเสมือนระบบการย่อยอาหารโดยปราศจากเอนไซม์
- 4.2.4 วิธีการจำลองการย่อยในระบบการย่อยในหลอดแก้ว
- 4.2.5 เครื่องมือ
- 4.2.6 วิธีการคำนวณการกระจายตัวของธาตุเหล็กตามขนาด

4.3 ผลการทดลองและวิจารณ์

- 4.3.1 การเทียบมาตรฐานของการแยกด้วยระบบ Flow field-flow fractionation (FIFFF)
- 4.3.2 การกระจายตัวของธาตุเหล็กเมื่อมี Phytic acid และ Tannic acid
- 4.3.3 การกระจายตัวของธาตุเหล็กในสารสกัดผักคะน้าและน้ำชาในสภาวะกรดเบสเสมือนระบบการย่อยอาหารโดยปราศจากเอนไซม์
- 4.3.4 การกระจายตัวของธาตุเหล็กในสารสกัดผักคะน้าและน้ำชาหลังการย่อยในระบบการย่อยในหลอดแก้ว

4.4 บทสรุป

4.5 เอกสารอ้างอิง

4.1 บทนำ

ปัญหาการขาดแคลนธาตุเหล็กจัดเป็นปัญหาทางโภชนาการที่พบมากทั่วโลก โดยคิดเป็นอัตราส่วนร้อยละ 20 ของประชากรโลก มีการนำเสนออาหารเสริมธาตุเหล็กและวิธีทางโภชนาการเพื่อเพิ่มปริมาณการรับและนำไปใช้ประโยชน์ของธาตุเหล็กในร่างกาย ธาตุเหล็กที่อยู่ในรูป non-heme iron จัดเป็นธาตุเหล็กที่ร่างกายได้รับจากอาหารมากที่สุด โดยร่างกายจะดูดซึมธาตุเหล็กชนิดนี้ที่เซลล์ลำไส้เล็กในรูปแบบของไอออนอิสระ ซึ่งปริมาณการดูดซึมและนำไปใช้ประโยชน์ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง โดยอาหารบางชนิดมักพบสารยับยั้งการดูดซึมธาตุเหล็กที่อยู่ในรูป non-heme iron เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ phytic acid และ tannic acid

Phytic acid เป็นสารประกอบ Myo-inositol ที่พบมากในอาหารจำพวกธัญพืชและผักบางชนิด จากการที่ phytic acid มีโครงสร้างที่มีหมู่ Phosphate เป็นองค์ประกอบถึง 6 หมู่ จึงส่งผลให้เป็นสารกีดขวางที่มีความสามารถสูงในการยึดจับกับธาตุหลายชนิดซึ่งรวมไปถึงธาตุเหล็กด้วย โดยในหลายงานวิจัยพบว่า สารประกอบของธาตุเหล็กกับ phytic acid เป็นสารประกอบที่ไม่สามารถดูดซึมได้ที่ลำไส้เล็ก

Tannic acid จัดเป็นสารประกอบ polyphenolic compound ที่พบได้ในเครื่องดื่มหลายชนิด เช่น ไวน์แดง เบียร์ กาแฟ ชาดำ และชาเขียว นอกจากนี้ยังพบได้ในอาหารหลายชนิดเช่น ข้าวฟ่าง องุ่น แพร่กล้วย ถั่วดำ ถั่วแขก และซ็อกโกแลต โดย tannic acid เมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรดจะทำให้เกิดหมู่ galloyl ที่มีผลยับยั้งการดูดซึมธาตุเหล็ก จากการที่องค์ประกอบของอาหารมีความสลับซับซ้อน ธาตุเหล็ก อาจมีการรวมตัวกับโมเลกุลยับยั้งการดูดซึมข้างต้นหรืออนุภาคขนาดต่างๆ ซึ่งส่งผลต่อความสามารถในการดูดซึมของแร่ธาตุเหล็ก การศึกษาการกระจายตัวของธาตุเหล็กตามขนาดจะให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์และมีความเข้าใจมากขึ้นในเรื่องของการดูดซึมของธาตุเหล็กในระบบการย่อยอาหาร

ในการศึกษาการกระจายตัวของธาตุเหล็กตามขนาดจะต้องใช้เทคนิคเชื่อมต่อกันระหว่างเทคนิคการแยกตัวอย่างตามขนาดอนุภาคและหน่วยตรวจวัดปริมาณธาตุความไวสูง เทคนิคทางโครมาโตกราฟีได้รับการนำเสนออย่างกว้างขวางในการศึกษาดังกล่าวเช่น การใช้เทคนิค gel chromatography ร่วมกับเทคนิค flame atomic absorption ในการศึกษาการกระจายตัวอย่างอิสระและยึดจับกับโมเลกุลอื่นของ แคดเมียม สังกะสี ทองแดง และเงินในค่อมน้ำย่อยของกุ้ง lobster การใช้เทคนิค size exclusion chromatography (SEC) ที่ต่อเข้ากับเทคนิค Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) ในการศึกษาการจับตัวและปลดปล่อยของโลหะในโปรตีนภายใต้สภาวะการทดลองต่างๆ และในการศึกษาการกระจายตัวของโลหะในสารประกอบที่มีขนาดโมเลกุลต่างๆ ในตัวอย่างเห็ด แต่ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีมีข้อจำกัดบางประการเช่น ต้องมีการเตรียมให้สารที่ต้องการวิเคราะห์มีความบริสุทธิ์ เช่นการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ซึ่งมีความยุ่งยาก ประกอบกับการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นตัวทำละลายและเฟสที่เคลื่อนที่ในคอลัมน์อาจทำให้เกิดปัญหา Carbon overloading ในการตรวจวัดด้วยเทคนิค ICP-MS

สำหรับเทคนิคการแยกแบบ non-chromatographic techniques อย่าง FIFFF ที่เชื่อมต่อเข้ากับเทคนิคตรวจวัดธาตุความไวสูงอย่าง ICP-OES หรือ ICP-MS ได้ถูกนำเสนอในหลายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ

การศึกษากการกระจายตัวตามขนาดของธาตุชนิดต่างๆ ในตัวอย่างหลายชนิดเช่น โปรตีน มหโมเลกุล และแบคทีเรียเป็นต้น จากตัวอย่างงานวิจัยของ Barnes และ Siripinyanond ได้นำเสนอเทคนิค FIFFF-ICP-MS เพื่อใช้ในการศึกษากการกระจายตัวตามขนาดของโลหะต่างๆ ในโปรตีนหลายชนิดเช่น metallothionein, carbonic anhydrase, ceruloplasmin, alcohol dehydrogenase และ thyroglobulin อีกตัวอย่างงานวิจัยหนึ่งคืองานของ Jackson et al ที่ได้นำเสนอการใช้เทคนิค FIFFF-ICP-MS เพื่อศึกษาพฤติกรรมการดูดซับธาตุยูเรเนียมของแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังมีอีกหลายงานวิจัยที่ประสบความสำเร็จในการใช้ FIFFF-ICP-MS และ FIFFF-ICP-OES ในการศึกษากการกระจายตัวตามขนาดของธาตุต่างๆ ในตัวอย่างหลายชนิด

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษากการจับตัวระหว่างธาตุเหล็กกับ phytic acid และ tannic acid โดยติดตามจากการกระจายตัวตามขนาดของธาตุเหล็ก นอกจากนี้ยังทำการศึกษากการกระจายตัวตามขนาดของธาตุเหล็กในตัวอย่างสารสกัดผักคะน้าและน้ำชาซึ่งมีรายงานว่า phytic acid และ tannic acid เป็นองค์ประกอบตามลำดับ โดยการทดลองจะศึกษากการกระจายตัวของธาตุเหล็กในตัวอย่างหลังบ่มในสภาวะกรดเบสเสมือนระบบการย่อยอาหารโดยปราศจากเอนไซม์ ซึ่งจะมีการปรับสภาพกรดเบสตัวอย่างให้เหมือนกับในระบบการย่อยอาหารของมนุษย์ นอกจากนี้ได้ทำการศึกษากการกระจายตัวของธาตุเหล็กในตัวอย่างหลังผ่านการย่อยในระบบการย่อยในหลอดแก้วโดยเติมเอนไซม์ pepsin และ pancreatic bile extract ลงในตัวอย่าง ระบบ FIFFF-ICP-OES ได้ถูกพัฒนาและนำมาใช้ในการศึกษากการกระจายตัวตามขนาดของธาตุเหล็กในตัวอย่างดังกล่าว

4.2 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

4.2.1 สารเคมีและตัวอย่าง

เอนไซม์ pepsin (P-7000, from porcine stomach mucosa)

เอนไซม์ pancreatin (P-1750, from porcine pancreas)

bile extract (B-6831, porcine) Sigma (St. Louis, MO, USA)

phytic acid (FW = 660.04 Da; Fluka, Italy)

tannic acid (FW = 1700.79 Da; Fluka, Italy)

monodisperse polystyrene sulfonate 4.3, 17 and 49 kDa (PSS) (Fluka, Italy)

สารละลายเหล็กมาตรฐาน (1000 มิลลิกรัมต่อลิตร)

การเตรียมสารละลาย pepsin: ละลาย pepsin 0.16 กรัม ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 โมลาร์ 1 มิลลิลิตร

การเตรียม pancreatin–bile extract (PBE) mixture: ละลาย pancreatin 0.004 กรัม และ bile extract 0.025 กรัม ในสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต 0.001 โมลาร์ 5 มิลลิลิตร

การเตรียมตัวอย่างผักคะน้า: ล้างผักคะน้าด้วยน้ำปราศจากไอออน อบที่อุณหภูมิ 65°C จนแห้งและมีน้ำหนักคงที่ บดให้ละเอียด

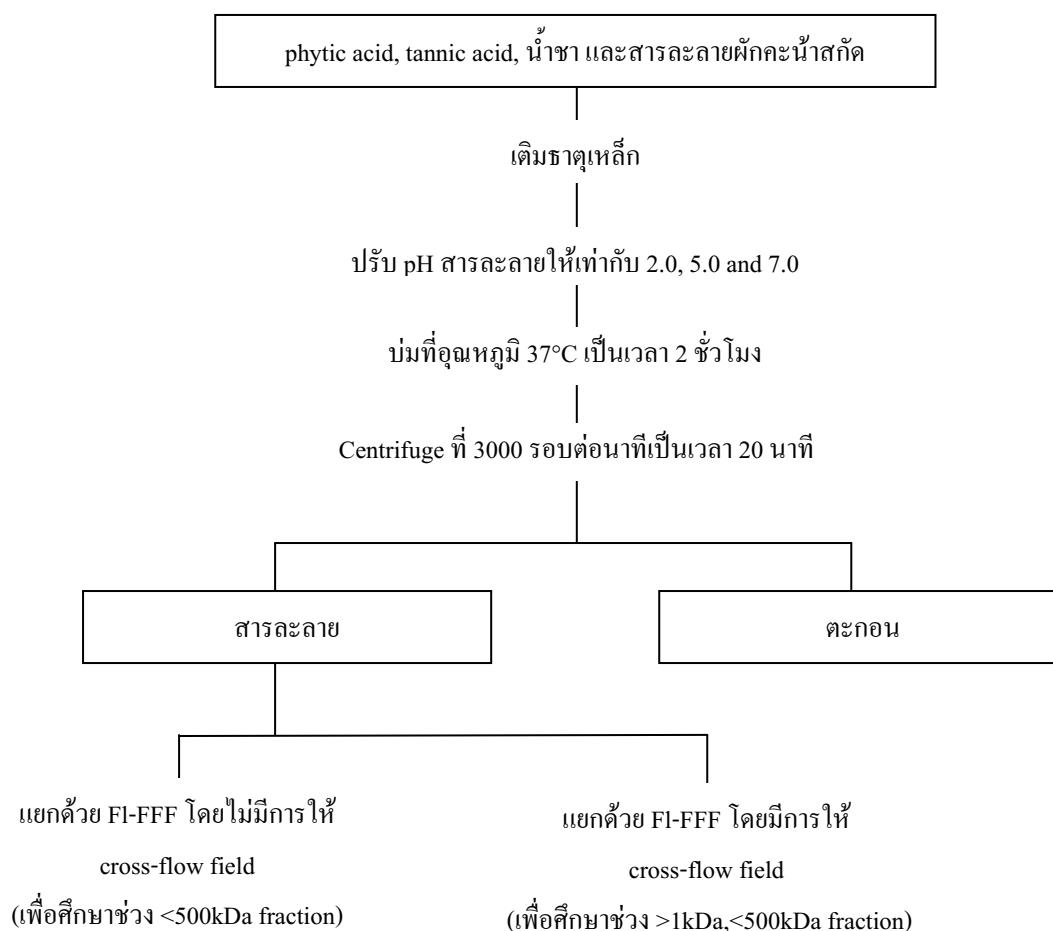
การเตรียมตัวอย่างน้ำชา: น้ำชาถุงสำเร็จรูปแช่ในน้ำ 120 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 10 นาที นำน้ำชามา centrifuge ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อทำการแยกส่วนละลาย

การเตรียม carrier liquid ของระบบ FIFFF ที่ pH 2.0: เจือจางสารละลาย 0.8 มิลลิลิตรของกรดไฮโดรคลอริก 37% ในน้ำปราศจากไอออน 1 ลิตร

การเตรียม carrier liquid ของระบบ FIFFF ที่ pH 5.0: เจือจางสารละลาย 0.8 มิลลิลิตรของกรดไฮโดรคลอริก 37% ในน้ำปราศจากไอออน 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ของสารละลายเท่ากับ 5 ด้วยสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต หลังจากนั้นทำการปรับปริมาตรของสารละลายเท่ากับ 1 ลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

การเตรียม carrier liquid ของระบบ FIFFF ที่ pH 7.0: เจือจางสารละลาย 0.8 มิลลิลิตรของกรดไฮโดรคลอริก 37% ในน้ำปราศจากไอออน 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ของสารละลายเท่ากับ 5 ด้วยสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต และปรับ pH ของสารละลายเท่ากับ 7 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ หลังจากนั้นทำการปรับปริมาตรของสารละลายเท่ากับ 1 ลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

4.2.2 วิธีการศึกษาการจับตัวระหว่างธาตุเหล็กกับ Phytic acid และ Tannic acid



รูปที่ 4.1 วิธีการบ่มตัวอย่างในสภาวะกรดเบสเสมือนระบบการย่อยอาหารโดยปราศจากเอนไซม์เพื่อใช้ในการศึกษาการกระจายตัวตามขนาดของธาตุเหล็ก

ทำการเตรียมตัวอย่างตามขั้นตอนดังแสดงในรูปที่ 4.1 โดยจะทำการเตรียมให้ตัวอย่างมีอัตราส่วนน้ำหนักระหว่างธาตุเหล็กและ phytic acid (หรือ tannic acid) เท่ากับ 1:10, 1:50 และ 1:100 โดยมีความเข้มข้นของธาตุเหล็กเท่ากับ 300 มิลลิกรัม ต่อ ลิตร สำหรับการปรับ pH ของสารละลายทำได้โดยการเติมสารละลายเจือจางของกรดไฮโดรคลอริก โซเดียมคาร์บอเนต หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์

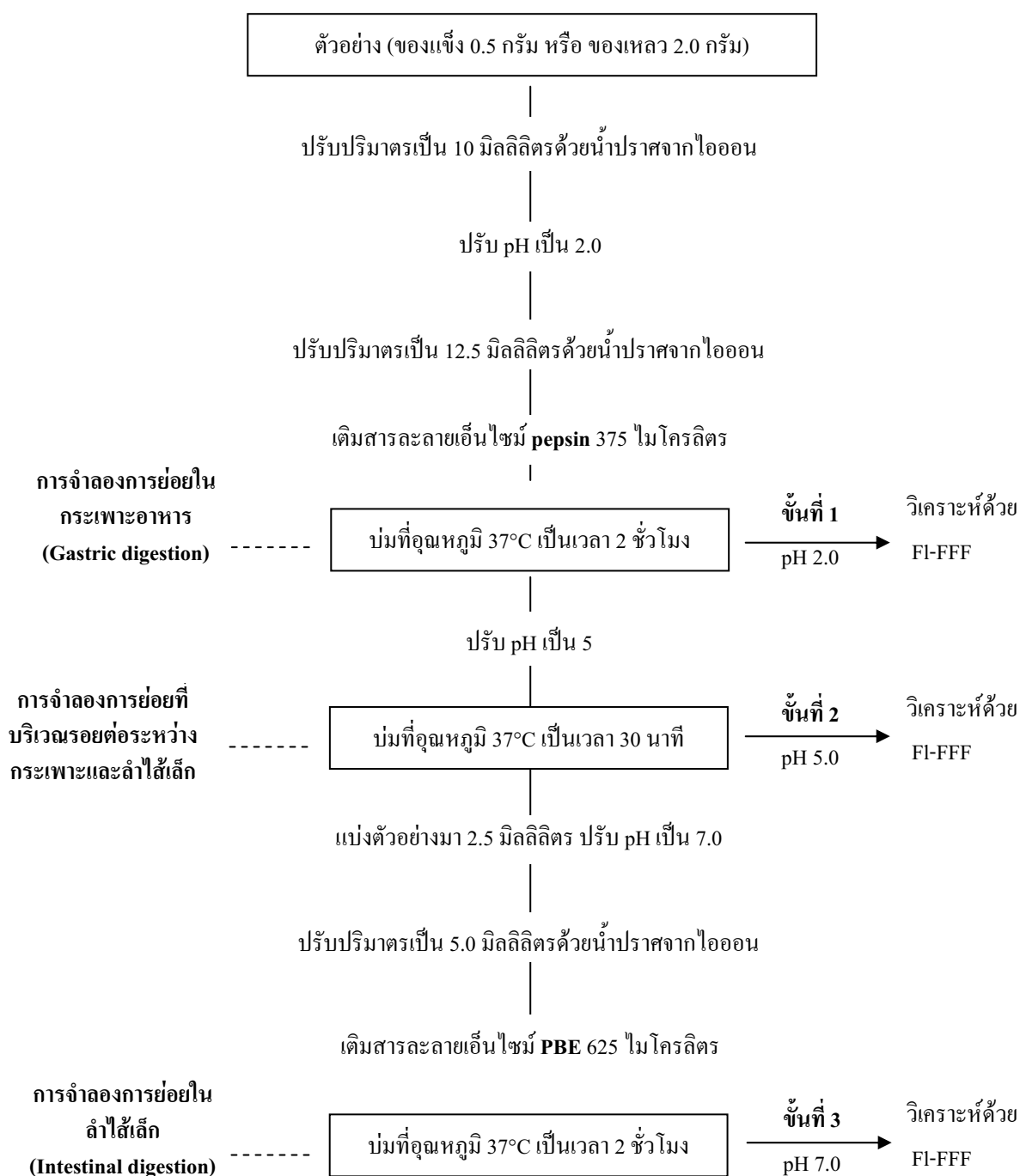
4.2.3 วิธีการบ่มตัวอย่างในสภาวะกรดเบสเสมือนระบบการย่อยอาหารโดยปราศจากเอนไซม์

ทำการเตรียมตัวอย่างตามขั้นตอนดังแสดงในรูปที่ 4.1 สำหรับตัวอย่างสารสกัดคะน้าจะทำการปรับ pH ตัวอย่าง 2.5 มิลลิลิตรให้เท่ากับ 2.0, 5.0 และ 7.0 และปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร สำหรับตัวอย่างสารสกัดคะน้าและน้ำชาที่ทำการเติมสารละลายเหล็กเพิ่ม ทำการเติม 1.5 มิลลิลิตรของสารละลาย

เหล็กมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในตัวอย่างที่มีปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรทำการปรับ pH ให้เท่ากับ 2.0, 5.0 และ 7.0 และปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร

4.2.4 วิธีการจำลองการย่อยในระบบการย่อยอาหารของร่างกาย

ในการจำลองการย่อยในระบบการย่อยในหลอดแก้ว ตัวอย่างจะถูกย่อยในระบบ gastric digestion ด้วยเอนไซม์ pepsin และย่อย pancreatic digestion ด้วยเอนไซม์ PBE ตามลำดับ โดยทำตามวิธีการใน รูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 วิธีการจำลองการย่อยในระบบการย่อยอาหารของร่างกาย

4.2.5 เครื่องมือ

pH meter, Denver Instrument Model 215 (USA)

Incubater shaker, Grant Instrument Model SS40-D2 (Cambridge, England)

FIFFF system (Model PN-1021-FO, Postnova Analytics, Landsberg, Germany)

ICP-OES system Spectro CirosCCD (SPECTRO Analytical Instruments, Kleve, Germany)

ในการทดลอง ระบบ FIFFF ที่มีหน่วยตรวจวัดเป็น UV spectrophotometer จะต่อเข้ากับ ICP-OES โดยทำการวิเคราะห์ภายใต้เงื่อนไขที่กำหนด ใน ตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 เงื่อนไขของเครื่องมือในการวิเคราะห์

FIFFF	
Carrier liquid	
- pH 2.0	0.01 M HCl
- pH 5.0	0.01 M HCl adjusted to pH 5.0 by NaHCO ₃
- pH 7.0	0.01 M HCl adjusted to pH 7.0 by NaOH
Membrane	1000 Da MWCO, poly(cellulose acetate)
Channel flow rate / mL min ⁻¹	0.75
Cross flow rate / mL min ⁻¹	2
ICP-OES	
RF generator frequency / MHz	27.2
RF power / W	1350
Nebulizer gas flow rate / L min ⁻¹	1
Coolant gas flow rate / L min ⁻¹	12
Auxiliary gas flow rate / L min ⁻¹	1

4.3 ผลการทดลองและวิจารณ์

4.3.1 การเทียบมาตรฐานของการแยกด้วยระบบ Flow field-flow fractionation (FIFFF)

ในการเทียบมาตรฐานของการแยกด้วยระบบ FIFFF นั้น เลือกใช้ monodisperse polystyrene sulfonate (PSS) ที่ขนาดโมเลกุลต่างๆ เป็นสารมาตรฐาน โดยจะทำการวิเคราะห์แยก PSS ขนาด 4.3, 17 และ 49 kDa ในระบบ FIFFF ที่ใช้ carrier liquid ที่มี pH 2.0, 5.0 และ 7.0 จากนั้นทำการสร้างกราฟ

มาตรฐานและคำนวณสมการความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างค่า logarithm ของ retention time (t_r) และขนาดโมเลกุล (M)

$$\log t_r = 0.572 \log M - 0.556, R^2 = 0.984 \quad \dots\dots\dots(1)$$

$$\log t_r = 0.437 \log M - 0.065, R^2 = 0.999 \quad \dots\dots\dots(2)$$

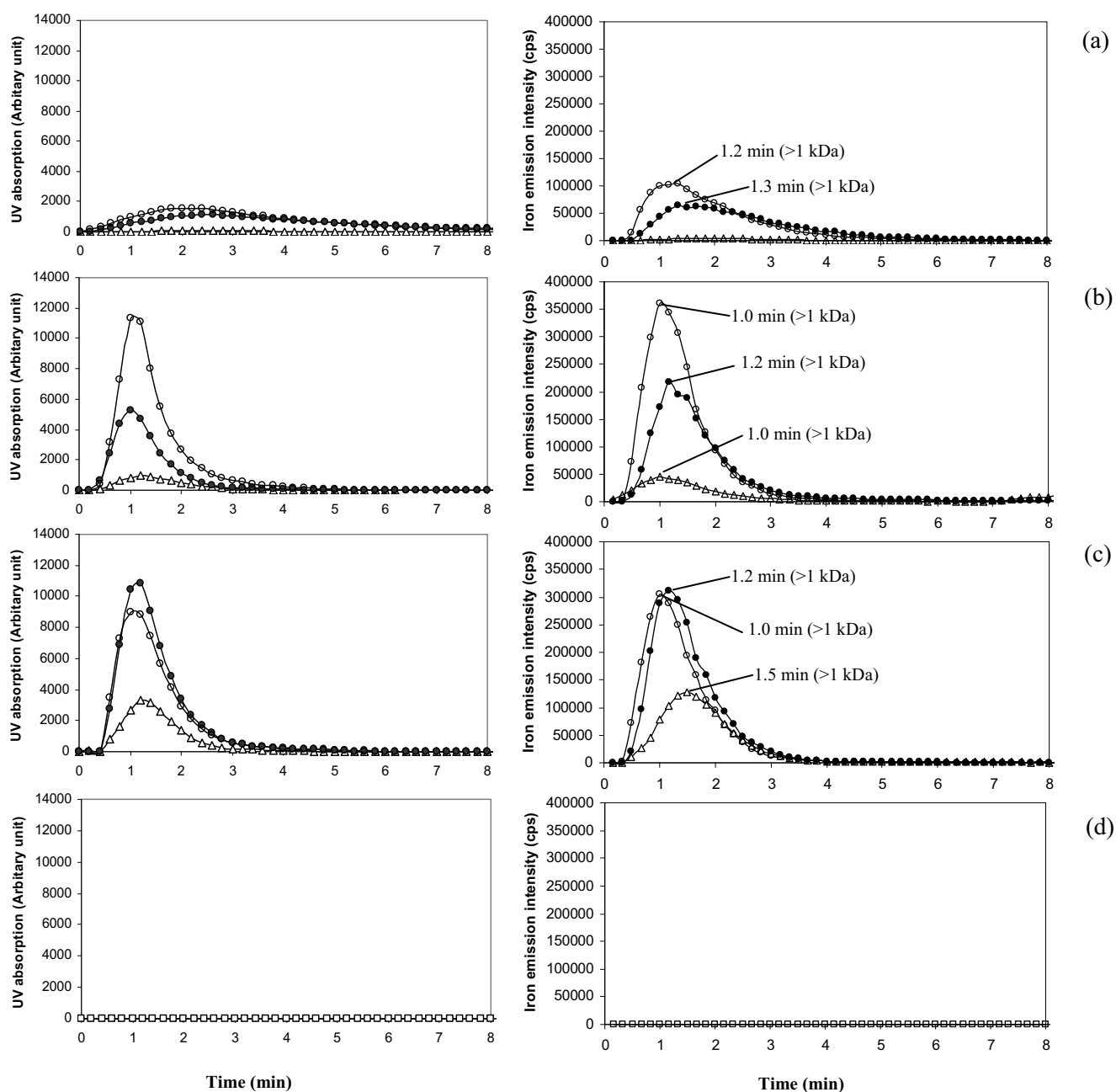
$$\log t_r = 0.526 \log M - 0.100, R^2 = 0.994 \quad \dots\dots\dots(3)$$

สมการที่ (1)-(3) เป็นสมการความสัมพันธ์เชิงเส้นที่ได้จากการแยก PSS ในระบบ FIFFF ที่ใช้ carrier liquid ที่มี pH 2.0, 5.0 และ 7.0 ตามลำดับ โดยสมการดังกล่าวนี้จะถูกนำไปใช้ในการคำนวณขนาดโมเลกุลของตัวอย่างแยกในระบบ FIFFF ที่ใช้ carrier liquid ที่มี pH 2.0, 5.0 และ 7.0 ตามลำดับ

4.3.2 การกระจายตัวของธาตุเหล็กเมื่อมี Phytic acid และ Tannic acid

เนื่องจากในระบบการย่อยอาหารของมนุษย์ pH จะมีการเปลี่ยนแปลงอย่างช้าๆ จาก 2.0 ที่กระเพาะอาหารไปเป็น 7.0 ที่บริเวณลำไส้เล็ก ซึ่งเป็นบริเวณที่ร่างกายมีการดูดซึมแร่ธาตุสูงที่สุด ในการวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาการกระจายตัวของธาตุเหล็กตามขนาดที่ pH 2.0, 5.0 และ 7.0 โดยใช้เทคนิค FIFFF-ICP-OES

จากรูปที่ 4.3(a-d) พบว่าเมื่อวิเคราะห์ธาตุเหล็กโดยไม่มีการเติม phytic acid ไม่พบว่ามี การกระจายตัวของธาตุเหล็กในช่วงที่วิเคราะห์ได้ในช่วง >1 kDa, >500 kDa (รูปที่ 4.3(d), ขวา) ทั้งนี้เกิดจาก ธาตุเหล็กอิสระมีขนาดเล็กกว่า membrane ในระบบ FIFFF ทำให้ธาตุเหล็กถูกกำจัดออกจากระบบ FIFFF ในกรณีที่มีการเติม phytic acid ธาตุเหล็กและ phytic acid จะเกิดเป็นสารประกอบที่มีขนาดใหญ่ขึ้น และจะให้สัญญาณธาตุเหล็กกระจายตัวในช่วงที่ FIFFF-ICP-OES สามารถวิเคราะห์ได้ในช่วง 1 – 1.5 นาทีแรกของการแยกหรือช่วงขนาดโมเลกุล ~ 1 kDa และการกระจายตัวของธาตุเหล็กดังกล่าวให้ผลสอดคล้องกับสัญญาณ molecular absorption ที่ได้จาก UV-spectrophotometer (รูปที่ 4.3 (a)-(c), ซ้าย) โดยให้ peak maxima ที่ตำแหน่งเดียวกันในทุกๆ กรณี นอกจากนี้สัญญาณของธาตุเหล็กในช่วงนี้จะสูงขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณ phytic acid ให้สูงขึ้น และจากการทดลองเมื่อพิจารณาให้ปริมาณ phytic acid คงที่ พบว่าเมื่อ pH สูงขึ้นการจับตัวระหว่างธาตุเหล็กและ phytic acid จะสูงขึ้นด้วยโดยสังเกตได้จากสัญญาณการกระจายตัวของธาตุเหล็กในช่วง ~ 1 kDa ที่สูงขึ้น



รูปที่ 4.3(a-d) การกระจายตัวของขนาดของธาตุเหล็ก (สัญญาณจาก UV spectrophotometer ซ้ายและICP-OES ขวา) เมื่อมี phytic acid ปริมาณต่างๆ โดยทำการศึกษาที่ pH 2.0 (a), 5.0 (b), และ 7.0 (c) รูป d แสดงการกระจายตัวของขนาดของธาตุเหล็กเมื่อไม่มีการเติม phytic acid; ธาตุเหล็ก : phytic acid เท่ากับ 1:10 (สามเหลี่ยม), 1:50 (วงกลมทึบ), และ 1:100 (วงกลมโปร่ง)

การกระจายตัวของธาตุเหล็กตามขนาดถูกจำแนกออกเป็นสามช่วงคือ

(a) <1 kDa

(b) >1 kDa แต่ <500 kDa

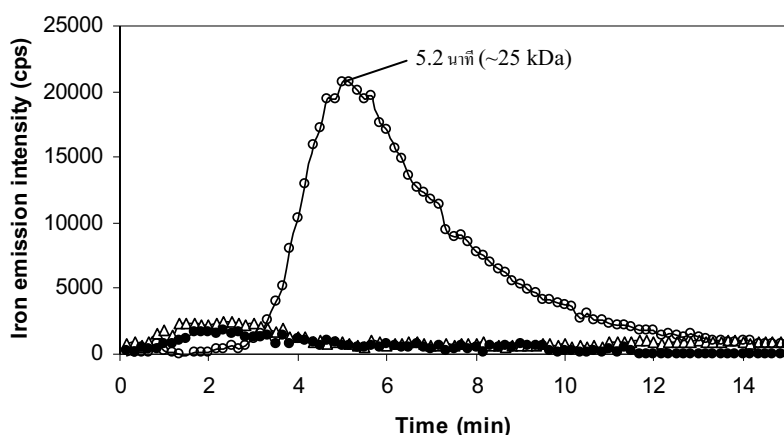
(c) >500 kDa

ตารางที่ 4.2 ร้อยละการกระจายตัวตามขนาดของธาตุเหล็กเมื่อมี phytic acid และ tannic acid ปริมาณต่างๆ โดยทำการบ่มตัวอย่างในสภาวะกรดเบสเสมือนระบบการย่อยอาหาร โดยปราศจากเอนไซม์ที่ pH 2.0, 5.0 และ 7.0

ตัวอย่าง	pH	ร้อยละการกระจายตัวตามขนาดของธาตุเหล็ก (%)		
		<1 kDa	>1 kDa, <500 kDa	>500 kDa
ธาตุเหล็ก : phytic acid (1:10)	2.0	16.0	2.0	81.9
	5.0	3.9	25.5	70.7
	7.0	6.0	45.5	48.4
ธาตุเหล็ก : phytic acid (1:50)	2.0	49.6	50.4	0.0
	5.0	19.8	66.0	14.2
	7.0	0.0	93.8	6.2
ธาตุเหล็ก : phytic acid (1:100)	2.0	45.2	54.8	0.0
	5.0	17.2	82.8	0.0
	7.0	4.5	95.5	0.0
ธาตุเหล็ก : tannic acid (1:10)	2.0	98.9	1.1	n.d.
	5.0	0.5	0.4	99.1
	7.0	0.1	0.6	99.3
ธาตุเหล็ก : tannic acid (1:50)	2.0	98.9	1.2	0.0
	5.0	0.9	0.7	98.4
	7.0	1.1	0.6	98.2
ธาตุเหล็ก : tannic acid (1:100)	2.0	98.9	1.1	n.d.
	5.0	2.5	16.1	81.5
	7.0	1.7	1.7	96.6

ตารางที่ 4.2 แสดงการกระจายตัวของธาตุเหล็กตามขนาดโดยแสดงเป็นสัดส่วนร้อยละของการกระจายตัวตามขนาดในช่วงต่างๆ ที่กำหนดข้างต้น จากผลการทดลองพบว่า phytic acid มีประสิทธิภาพในการยึดจับธาตุเหล็กสูง โดยการทดลองที่อัตราส่วนน้ำหนักร้อยละ 1:10 ธาตุเหล็กตกตะกอนร่วมกับ phytic acid (>500 kDa) ในการทดลองที่ทุกๆ pH สำหรับการทดลองที่อัตราส่วน 1:50 และ 1:100 ธาตุเหล็กส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง <1 kDa และเมื่อ pH สูงขึ้นเป็น 5.0 และ 7.0 จะเปลี่ยนไปกระจายตัวสูงขึ้นในช่วง >1 kDa, <500 kDa

สำหรับผลการทดลองของ tannic acid พบว่า ธาตุเหล็กส่วนใหญ่จะกระจายตัวในช่วง <1 kDa เมื่อ pH เท่ากับ 2.0 และตกตะกอนทันทีเมื่อ pH สูงขึ้นเป็น 5.0 และ 7.0 กระจายตัวในช่วง >500 kDa ยกเว้นการทดลองที่อัตราส่วน 1:100 จะพบธาตุเหล็กประมาณร้อยละ 16 กระจายตัวในช่วง >1 kDa, <500 kDa ที่ pH เท่ากับ 5.0 ดังแสดงใน รูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 การกระจายตัวตามขนาดของธาตุเหล็กเมื่อมีสัดส่วนโดยน้ำหนักธาตุเหล็กต่อ phytic acid เท่ากับ 1 : 100 โดยทำการบ่มตัวอย่างในสภาวะกรดเบสเสมือนระบบการย่อยอาหารโดยปราศจากเอนไซม์ ที่ pH 2.0 (สามเหลี่ยม), 5.0 (วงกลมโปร่ง) และ 7.0 (วงกลมทึบ)

จะเห็นได้ว่าธาตุเหล็กมีความสามารถในการยึดจับได้ดีกับทั้ง phytic acid และ tannic acid โดยเฉพาะที่ pH 5.0 และ 7.0 ซึ่งเป็นช่วง pH ที่สอดคล้องกับสภาวะที่ลำไส้เล็ก ดังนั้นจะเห็นได้ว่า phytic acid และ tannic acid มีผลยับยั้งการดูดซึมของธาตุเหล็ก

4.3.3 การกระจายตัวของธาตุเหล็กในสารสกัดผักคะน้าและน้ำชาในสภาวะกรดเบสเสมือนระบบการย่อยอาหารโดยปราศจากเอนไซม์

จากการที่ผักคะน้าและน้ำชามีสารยับยั้งการดูดซึมธาตุเหล็กเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ phytic acid และ tannic acid ตามลำดับ ซึ่งสามารถส่งผลยับยั้งการดูดซึมธาตุเหล็กได้ ในการทดลองนี้จึงได้ทำการศึกษาการกระจายตัวตามขนาดของธาตุเหล็กในสารสกัดผักคะน้า และน้ำชา โดยตัวอย่างจะถูกเตรียมด้วยวิธีการบ่มตัวอย่างในสภาวะกรดเบสเสมือนระบบการย่อยอาหารโดยปราศจากเอนไซม์ และวิธีการจำลองการย่อยในระบบการย่อยในหลอดแก้วแบบเดิมเอ็นไซม์ โดยจะทำการศึกษาที่ pH 2.0, 5.0 และ 7.0 แต่เนื่องจากปริมาณธาตุเหล็กที่มีอยู่เดิมในน้ำชาอยู่ในระดับต่ำ ดังนั้นจึงได้ทำการเติมธาตุเหล็กลงในตัวอย่างน้ำชาให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากผลการกระจายตัวตามขนาดของธาตุเหล็กหลังการบ่มในสภาวะกรดเบสเสมือนระบบการย่อยอาหารโดยปราศจากเอนไซม์ที่ในตารางที่ 4.3 พบว่าที่ pH 2.0 ธาตุเหล็กจะอยู่ในรูปธาตุเหล็กอิสระคือกระจายตัวในช่วงขนาด <1 kDa แต่การกระจายตัวของธาตุเหล็กดังกล่าวจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทันทีเมื่อ pH สูงขึ้นเป็น 5.0 และ 7.0 โดยในตัวอย่างสารสกัดผักคะน้าจะพบการกระจายตัวของธาตุเหล็กใน

ช่วง >1 kDa, <500 kDa ดังแสดงในรูปที่ 4.5(a) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ phytic acid ก่อนหน้านี้ แต่ในกรณีตัวอย่างสารสกัดคั้นน้ำที่มีการเติมธาตุเหล็กจะตกตะกอนอย่างเฉียบพลันเมื่อ pH สูงขึ้นเป็น 5.0 และ 7.0 และพบว่าธาตุเหล็กกระจายตัวอยู่ในช่วงดังกล่าวคือ >500 kDa แต่ยังคงพบธาตุบางส่วนกระจายตัวในช่วง >1 kDa, <500 kDa เช่นกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.5(b)

ตารางที่ 4.3 ร้อยละการกระจายตัวตามขนาดของธาตุเหล็กในสารสกัดผักคะน้า สารสกัดผักคะน้าที่มีการเติมธาตุเหล็ก น้ำชาที่มีการเติมธาตุเหล็ก โดยทำการบ่มตัวอย่างในสภาวะกรดเบสเสมือนระบบการย่อยอาหารโดยปราศจากเอนไซม์ที่ pH 2.0, 5.0 และ 7.0

ตัวอย่าง	pH	ร้อยละการกระจายตัวตามขนาดของธาตุเหล็ก (%)		
		<1 kDa ^(a)	>1 kDa, <500 kDa ^(b)	>500 kDa ^(c)
สารสกัดผักคะน้า	2.0	100.0	0.0	0.0
	5.0	36.5	63.5	0.0
	7.0	4.2	95.8	0.0
สารสกัดผักคะน้าที่มีการเติมธาตุเหล็ก	2.0	100.0	n.d.	n.d.
	5.0	3.3	3.9	92.8
	7.0	3.0	3.5	93.5
น้ำชาที่มีการเติมธาตุเหล็ก	2.0	91.9	n.d.	8.1
	5.0	21.0	18.5	60.5
	7.0	18.5	7.2	74.3

(a) พื้นที่ใต้กราฟการกระจายตัวของธาตุเหล็กเมื่อไม่ให้ cross flow field หักลบด้วย (b)

(b) พื้นที่ใต้กราฟการกระจายตัวของธาตุเหล็กเมื่อให้ cross flow field

(c) ปริมาณธาตุเหล็กทั้งหมดหักลบด้วย (a) และ (b)

n.d. มีความเข้มข้นต่ำกว่า detection limit (0.2 มิลลิกรัม ต่อ ลิตร)

ในกรณีของตัวอย่างน้ำชาที่มีการเติมธาตุเหล็ก พบว่าเมื่อ pH สูงขึ้นเป็น 5.0 และ 7.0 เกิดการตกตะกอนอย่างเฉียบพลัน และพบว่าธาตุเหล็กกระจายตัวอยู่ในช่วงดังกล่าวคือ >500 kDa และพบธาตุบางส่วนกระจายตัวในช่วง >1 kDa, <500 kDa ที่ pH 5.0 และมีลักษณะการกระจายตัวดังแสดงในรูปที่ 4.5(b) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ tannic acid ก่อนหน้านี้

4.3.4 การกระจายตัวของธาตุเหล็กในสารสกัดผักคะน้าและน้ำชาหลังการย่อยในระบบการย่อยในหลอดแก้ว

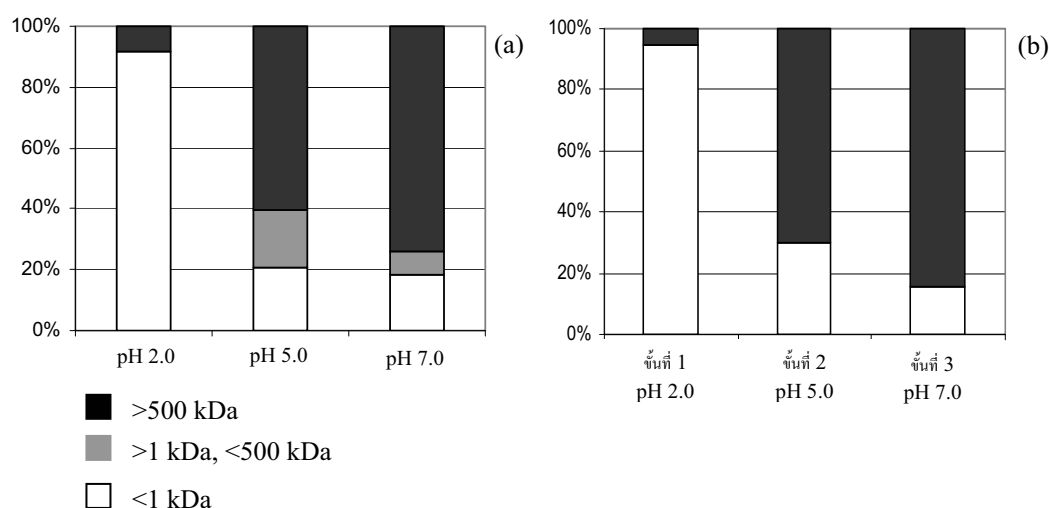
ตารางที่ 4.4 แสดงการกระจายตัวตามขนาดของธาตุเหล็กหลังการย่อยด้วยระบบการย่อยอาหารในหลอดแก้ว โดยจากผลการทดลองพบว่าหลังผ่านการย่อยในทุกๆ ขั้นตอน ทุกตัวอย่างแสดงการกระจายตัวในสองช่วงคือ <1 kDa และ >500 kDa ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการเติมเอนไซม์จะช่วยย่อย

สารประกอบที่อยู่ในช่วง >1 kDa, <500 kDa ไปเป็นสารประกอบที่มีขนาด <1 kDa ซึ่งเป็นส่วนที่คาดว่าร่างกายสามารถดูดซึมได้ ทำให้ไม่พบการกระจายตัวในช่วง >1 kDa, <500 kDa สำหรับธาตุเหล็กที่กระจายตัวในช่วง >500 kDa คาดว่าเป็นธาตุเหล็กที่จับตัวอยู่กับสารยับยั้งการดูดซึมและเกิดการตกตะกอนโดยเป็นส่วนที่ไม่สามารถย่อยได้

ตารางที่ 4.4 ร้อยละการกระจายตัวตามขนาดของธาตุเหล็กในสารสกัดผักคะน้าที่มีการเติมธาตุเหล็ก และน้ำชาที่มีการเติมธาตุเหล็ก หลังการย่อยในระบบการย่อยในหลอดแก้วที่ pH 2.0, 5.0 และ 7.0

ตัวอย่าง	ชั้นที่	ร้อยละการกระจายตัวตามขนาดของธาตุเหล็ก (%)		
		<1 kDa	>1 kDa, <500 kDa	>500 kDa
สารสกัดผักคะน้า	1 (pH 2.0)	94.8	nd	5.2
	2 (pH 5.0)	29.7	nd	70.3
	3 (pH 7.0)	15.5	nd	84.5
น้ำชาที่มีการเติมธาตุเหล็ก	1 (pH 2.0)	82.8	nd	17.2
	2 (pH 5.0)	27.5	nd	72.5
	3 (pH 7.0)	21.2	nd	78.8

รูปที่ 4.6 แสดงกราฟเปรียบเทียบการกระจายตัวตามขนาดของธาตุเหล็กในตัวอย่างน้ำชาที่มีการเติมธาตุเหล็กหลังผ่านการบ่มในสภาวะกรดเบสเสมือนระบบการย่อยอาหารโดยปราศจากเอนไซม์ และหลังการย่อยในระบบการย่อยในหลอดแก้ว จากผลแสดงให้เห็นว่าธาตุเหล็กที่จับอยู่กับสารยับยั้งการดูดซึมบางส่วนสามารถถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์และทำให้เพิ่มธาตุเหล็กที่กระจายตัวในช่วงที่ร่างกายสามารถดูดซึมได้คือ <1 kDa



รูปที่ 4.6 ร้อยละการกระจายตัวตามขนาดของธาตุเหล็กในน้ำชาที่มีการเติมธาตุเหล็กโดยเปรียบเทียบระหว่างผลการบ่มในสภาวะกรดเบสเสมือนระบบการย่อยอาหารโดยปราศจากเอนไซม์ (a) และหลังการย่อยในระบบการย่อยในหลอดแก้ว (b)

4.4 บทสรุป

เทคนิค FIFFF-ICP-OES มีศักยภาพในการศึกษาการกระจายตัวตามขนาดของธาตุเหล็กในอาหารระหว่างการย่อยในขั้นตอนต่างๆ ในระบบการย่อยจำลอง ระบบที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ในการศึกษาพฤติกรรมการยึดจับตัวของธาตุเหล็กกับองค์ประกอบอื่นของอาหารที่ส่งผลยับยั้งการดูดซึมในลำไส้เล็กเช่น phytic acid และ tannic acid และระบบที่พัฒนาขึ้นนี้มีข้อได้เปรียบที่เหนือระบบการแยกแบบโครมาโตกราฟีคือ สามารถแยกตัวอย่างในช่วงขนาดและ pH ที่กว้างกว่า อย่างไรก็ตามการแยกด้วยระบบ FIFFF ยังคงมีข้อจำกัดในด้านประสิทธิภาพของการแยกที่ด้อยกว่า

จากผลการทดลองการยึดจับตัวของธาตุเหล็กกับ phytic acid พบว่ามีการยึดจับที่ดีในทุกๆ pH ในขณะที่ tannic acid ให้ผลการยึดจับธาตุเหล็กที่ดีที่ pH 5.0 และ 7.0 และผลการทดลองของสารสกัดคั้นและน้ำชาให้ผลที่สอดคล้องกับ phytic acid และ tannic acid ตามลำดับ และผลการทดลองยังแสดงให้เห็นความสามารถในการยับยั้งการดูดซึมธาตุเหล็กที่ดีของสารยับยั้งการดูดซึมในสารสกัดคั้นและน้ำชา

4.5 เอกสารอ้างอิง

1. N. Martinez-Navarrete, M.M. Camacho, J. Martinez-Lahuerta, J. Martinez-Monzo and P. Fito, *Food Res Int*, 2002, **35**, 225.
2. H.W. Lopez, F. Leenhardt, C. Coudray and C. Remesy, *Int J Food Sci Technol*, 2002, **37**, 727.
3. R.P. Glahn, G.M. Wortley, P.K. South and D.D. Miller, *J Agric Food Chem*, 2002, **50**, 390.
4. P. Brigide and S.G. Canniatti-Brazaca, *Food Chem*, 2006, **98**, 85.
5. E. Graf, J.R. Mahoney, R.G. Bryant and J.W. Eaton, *J Biol Chem*, 1984, **259**, 3620.
6. E. Graf, K. Empson and J. Eaton, *J Biol Chem*, 1987, **262**, 11647.
7. E. Graf E and J.W. Eaton, *Free Radical Biol Med*, 1990, **8**, 61.
8. E. Vasca, S. Materazzi, T. Caruso, O. Milano, C. Fontanella and C. Manfredi, *Anal Bioanal Chem*, 2002, **374**, 173.
9. A.S. Sandberg and U. Svanberg, *J Food Sci*, 1991, **56**, 1330.
10. R. Engle-Stone, A. Yeung, R. Welch and R. Glahn, *J. Agric Food Chem*, 2005, **53**, 10276.
11. P.K. South and D.D. Miller, *Food Chem*, 1998, **63**, 167.
12. A. King and G. Young, *J Am Diet Assoc*, 1999, **99**, 213.
13. K-T. Chung, T.Y. Wong, C-I. Wei, Y-W. Huang, and Y. Lin, *Crit Rev Food Sci and Nutr*, 1998, **38**, 421.
14. M. Brune, L. Hallberg and A.B. Skaanberg, *J Food Sci*, 1991, **56**, 128.

15. C.L. Chou, J.F. Uthe and R.D. Guy, *J AOAC Inter*, 1993, **76**, 794.
16. B.B.M. Sadi, A.P. Vonderheide, J.S. Becker and J.A. Caruso, *ACS Symp Ser*, 2005, **893**, 168.
17. R.G. Wuilloud, S.S. Kannamkumarath and J.A. Caruso, *J Agri Food Chem*, 2004, **52**, 1315.
18. A. Siripinyanond and R.M. Barnes, *J Anal At Spectrom*, 1999, **14**, 1527.
19. B. Stolpe, M. Hasselov, K. Andersson and D.R. Turner, *Anal Chim Acta*, 2005, **535**, 109.
20. L.J. Gimbert, K.N. Andrew, P.M. Haygarth and P.J. Worsfold, *Trends Anal Chem*, 2003, **22**, 615.
21. C. Contado, G. Blo, F. Fagioli, F. Dondi and R. Beckett, *Colloids Surf A*, 1997, **120**, 47.
22. E. Bolea, M.P. Gorriz, M. Bouby, F. Laborda, J.R. Castillo and H. Geckeis, *J Chromatogr A*, 2006, **1129**, 236.
23. B.P. Jackson, J.F. Ranville and A.L. Neal, *Anal Chem*, 2005, **77**, 1393.
24. F. Hurrell Richard, *J Nutr*, 2003, **133**, 2973S.
25. W.J. Evans and C.J. Martin, *J Inorg Biochem*, 1991, **41**, 245.

ตอนที่ 5

บทสรุป

งานวิจัยนี้ มีองค์ประกอบหลัก 2 ส่วนๆแรกเป็นการศึกษาพัฒนาระบบและวิธีการใหม่ และเพื่อเป็นการยืนยันถึงศักยภาพและประโยชน์ของระบบที่พัฒนาขึ้น งานวิจัยนี้จึงได้นำระบบที่พัฒนาไปศึกษาวิจัยเชิงประยุกต์ ดังแบ่งได้เป็นสองกลุ่มดังนี้ ทั้งนี้ งานวิจัยเชิงประยุกต์ ยังคงดำเนินต่อไป เพื่อนำเสนอแนวทางการใช้ประโยชน์จากเทคนิคที่พัฒนาขึ้น

5.1 การประยุกต์ใช้ระบบการสกัดเป็นลำดับขั้นแบบไหลต่อเนื่อง

จากที่ได้มีการพัฒนาระบบการสกัดเป็นลำดับขั้นแบบไหลต่อเนื่องขึ้นดังรายละเอียดในรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ตามสัญญาเลขที่ BRG05/2543 นั้น ทำให้สามารถวิเคราะห์ประเมินความสามารถในการเคลื่อนตัว การดูดซึมหรือการนำไปใช้ได้ของโลหะหนักหรือแร่ธาตุต่างๆ ที่แตกต่างกัน ซึ่งทำให้มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและชีวิตของมนุษย์ที่ต่างกันด้วย งานวิจัยนี้ได้ประยุกต์ใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นดังนี้ (รายละเอียดในภาคผนวก)

- ประเมินผลกระทบของการปนเปื้อนของโลหะหนักจากกิจกรรมอุตสาหกรรมหลอมโลหะและอุตสาหกรรมการถลุงแร่
- ศึกษาถึงความสามารถในการเคลื่อนตัวของตะกั่วและแคดเมียมที่ปนเปื้อนอยู่ในดิน ดินตะกอนและอากาศในบริเวณใกล้ๆ กับโรงงานหลอมตะกั่ว และแหล่งถลุงโลหะสังกะสี
- ศึกษาถึงรูปฟอร์มของตะกั่วหนักที่เกาะอยู่ในท่อนำส่งแก่ธรรมชาติ

5.2 การประยุกต์ใช้วิธีวิเคราะห์แบบไหลต่อเนื่องเพื่อศึกษาการดูดซึมหรือการนำไปใช้ได้ของแร่ธาตุในอาหาร

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์แบบไหลต่อเนื่องเพื่อศึกษาการดูดซึมหรือการนำไปใช้ได้ของแร่ธาตุในอาหาร ระบบที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นการจำลองหลอดแก้วให้เสมือนเป็นระบบการย่อยในกระเพาะอาหารและการดูดซึมสารอาหารในลำไส้เล็ก โดยอาศัยวิธีแบบเบทซ์ในการจำลองการย่อยในกระเพาะอาหาร และใช้ระบบการซึมผ่านเยื่อบางแบบไหลต่อเนื่อง (continuous-flow dialysis, CFD) ในการจำลองการดูดซึมสารอาหารในลำไส้เล็ก ด้วยระบบ CFD ทำให้สามารถเก็บสารละลายตัวอย่างที่ซึมผ่านเยื่อบางออกมาเพื่อการวิเคราะห์ปริมาณแร่ธาตุโดยใช้หน่วยตรวจวัดประเภทต่างๆ ได้ นอกเหนือจากที่ได้สรุปไว้ในรายงานในตอนๆที่ 1-4 แล้ว ได้มีการประยุกต์ใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นดังนี้ (รายละเอียดในภาคผนวก)

- ศึกษาอิทธิพลของกรดอินทรีย์ต่อการนำไปใช้ได้ของธาตุแคลเซียมในผักต่างๆ
- ศึกษาอิทธิพลของกรดอินทรีย์ในอาหารไทยต่อการนำไปใช้ได้ของธาตุแคลเซียม

Atmospheric Deposition of Metals Associated with Air Particulate Matter: Fractionation of Particulate-Bound Metals Using Continuous-Flow Sequential Extraction

Atitaya Samontha,^a Weerawan Waiyawat,^a Juwadee Shiowatana^{a*} and Ronald G. McLaren^b

^aDepartment of Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Rd., Bangkok 10400, Thailand.

^bSoil and Physical Sciences Group, Agriculture and Life Sciences Division, PO Box 84, Lincoln University, Canterbury, New Zealand.

* Corresponding author, E-mail: scysw@mahidol.ac.th

Received 26 Jan 2007

Accepted 4 Jun 2007

ABSTRACT: The fractionation and elemental association of some heavy metals in air particulate matter from two different sources, a smelter and heavy vehicle traffic, were investigated using a continuous-flow sequential extraction procedure. Air particulate matter (a combination of wet and dry deposition) was collected monthly for one year and was analyzed by a four-step continuous-flow sequential extraction procedure employing a modified Tessier scheme. Examination of crustal enrichment factors (EF_{crust}) suggested that the Cd, Zn and Pb in the air particulate matter were predominantly of anthropogenic origin. Total Pb deposition in the dry season was found to be higher than that in the wet season, and may be attributed to soil dust. However, the fractional distribution of metals between forms did not differ between seasons. The results showed that the reducible phase (Fe/Mn oxides) was the largest fraction of Pb in air particulate matter from both the smelter and heavy traffic sites. The overlain metal extraction profiles demonstrated a close elemental association between Al and Pb in the acid-soluble phase of air particulate matter. In the reducible fraction, Pb was found to dissolve earlier than Fe indicating that Pb could occur adsorbed onto Fe oxide surfaces in the air particulate matter.

KEYWORDS: air particulate matter, continuous-flow sequential extraction, enrichment factor.

INTRODUCTION

Air particulate matter, together with associated metal contaminants, can be formed as the result of both natural and anthropogenic processes. Typical natural sources are the sea, giving rise to saline particles, or wind-blown dust derived from the land. Human activity produces air particulate matter as a result of industrial activities, traffic emissions and combustion processes. In particular, mining and smelting activities are important sources of heavy metals in the environment. For example, lead smelters are one of the most important sources of Pb pollution in the environment. Another source of Pb, still important in some countries, is the combustion of leaded gasoline. Lead is a toxic element and is dangerous to human health even at relatively low levels. Knowledge of the bulk concentrations of metal contaminants is essential for an assessment of ecosystem risk. Lead contamination in the vicinity of smelters is mainly airborne and represents a long-term pollution effect on the environment.

Environmental risk assessment of metals associated with air particulates has usually been based on the total

concentrations of the metals. This can provide information on the degree of contamination, however, the mobility of metals in the environment depends not only on their total concentration but also on the associations and forms present in the solid phase by which they are bound. These forms include the following broad categories: soluble; exchangeable; carbonate-bound; Fe and Mn oxide-bound; organic matter-bound and residual¹. Understanding the mode of occurrence of metals in air particulates is essential for the environmental assessment of this form of contamination.

One approach to the study of the distribution of metals among these physicochemical phases is the use of phase-selective chemical extractions involving multiple extracting reagents². The reagents employed in sequential extractions have been chosen on the basis of their selectivity and specificity towards particular physicochemical forms. Sequential extraction techniques are widely used to fractionate metals in solid samples on the basis of the leachability/extractability of different metal forms^{3,4}.

In our previous work, a continuous-flow extraction system has been developed to perform chemical

speciation by sequential extraction of both metals⁵ and nonmetals⁶ in solid materials. Compared with batch extraction systems, the procedure is rapid, has less risk of contamination, has the possibility of further automation, and is easy to perform. The system has also been found to have less problems of readsorption due to the shorter extraction times required⁷. In addition, the extractogram (a graphical plot of concentration versus extraction volume) offers additional information about chemical association of metals in the solid phases.

This study aims to investigate the use of a continuous-flow sequential extraction system to determine the fractionation of metals in air particulate matter. Another objective was to use the extractograms obtained from the dynamic extraction system for interpretation of elemental associations in the various air particulate fractions. Results obtained from this work should improve our understanding of the forms and elemental associations of metals in air particulate matter.

MATERIALS AND METHODS

Sampling Sites

The study sites are an area surrounding a small lead smelter located in Saraburi province, approximately 110 km north of Bangkok, Thailand and a heavy traffic area in central Bangkok, Thailand. The smelter has been operating for the last 10 years and its main activity is to recycle lead from old batteries. The criterion for the location of monitoring stations of air particulate matter was that each site should be clear of shelter from the wind and not overhung by electricity cables or tall trees. For sampling at the lead smelter site, three sampling locations were chosen at distances of 2 km, 1 km and 300 m from the smelter. The site in central Bangkok was located in one of the busiest traffic junctions (near Victory Monument). At each site, atmospheric deposition of particulates and metals was monitored for a period of one year. At all sites, duplicate samplers were installed within 20 m of each other.

Design of Air Particulate Collectors

Passive air particulate collectors provide a relatively simple method for monitoring dust particles deposited by both dry and wet deposition. The plastic cones used as collectors were constructed from polyethylene funnels and were 25 cm in diameter with an internal depth of 12.5 cm. The edges of the plastic funnels were cut in a zigzag shape to discourage birds from perching and thus minimize contamination from bird excreta (Fig. 1). At each monitoring site, the plastic funnels were mounted on posts 1.6-1.8 m above ground level to avoid contamination by saltating soil particles. The tubing connecting the plastic funnels to the receiving bottles, and the bottles themselves, were shielded with

black plastic sheeting to prevent algal growth. Rainfall and particles passively deposited into the plastic funnel were collected in a 4-L bottle which was replaced monthly. A known volume of high purity water was used to flush particles out of the plastic funnel down the tube into the bottle at the time of sample collection. After collection and transport to the laboratory, samples were filtered through a glass microfibre filter (Whatman GF/B (Maidstone, UK), 47 mm diameter, 1 micron particle retention) and the sample volume determined. The pH of the samples was also measured. The particulate matter retained on the filter was then subjected to continuous flow extraction, and the filtered solutions containing soluble constituents were analysed separately.

The volume of samples for wet season months (June-October) was quite consistent at approximately 3 L, and in dry season months at approximately 0.1 L. Air particulates in August were chosen to represent the wet season, and air particulates in March, the dry season. These two months were selected because they are in the middle of the wet and dry seasons, respectively, and less likely to be affected by instability of changing weather.

Chemicals and Apparatus

All chemicals used were of analytical grade. Multi-

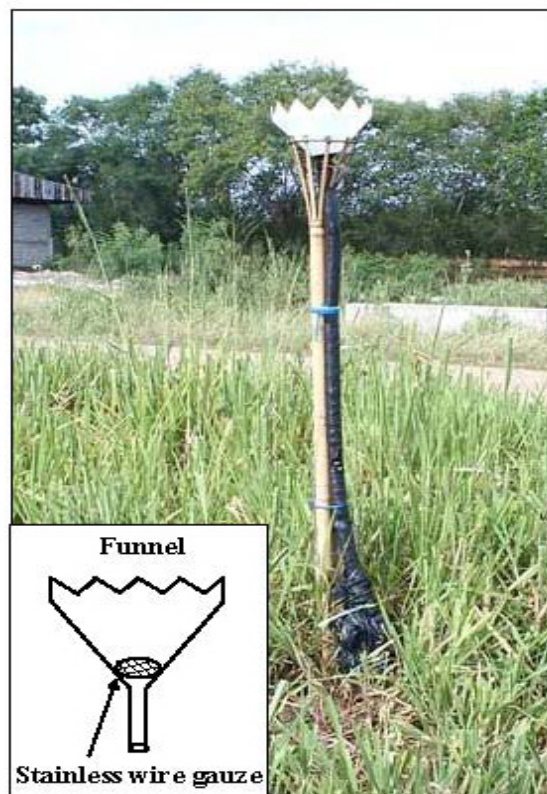


Fig 1. The photograph of an air particulate collector.

element stock solution for ICP-MS (AccuStandard, Inc. CT, USA) was used for the preparation of standard solutions. An inductively coupled plasma quadrupole mass spectrometer (ICP-QMS, Perkin Elmer ELAN 6000) was used for the elemental determination of air particulate extracts.

Fractionation Scheme

A modified Tessier sequential extraction scheme² was carried out using the following solutions:

Step 1 (F1): 0.01 M $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (exchangeable fraction)

Step 2 (F2): 0.11 M CH_3COOH (acid soluble fraction; carbonate or specifically sorbed)

Step 3 (F3): 0.01 M $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ adjusted to pH 2 with HNO_3 , 85°C (reducible fraction; Fe/Al/Mn oxide-bound)

Step 4 (F4): 8:3 v/v (30% H_2O_2 :0.02 M HNO_3), 75°C (oxidizable fraction; organic-bound)

Step 5 (F5): Aqua Regia (residue fraction)

Continuous-Flow Extraction System

Extraction Chamber

An extraction chamber was designed to allow containment and stirring of air particulate samples. Extractants could flow sequentially through the chamber and leach metals from the targeted phases. The chambers and their covers were constructed from borosilicate glass to have a capacity of approximately 10 mL. The outlet of the chamber was furnished with a glass microfibre filter GF/B (47 mm diameter, 1 μm particle retention, Whatman, Maidstone, UK) to allow dissolved matter to flow through. Extractant was pumped through the chamber using a peristaltic pump (Micro tube pump, MP-3N, EYELA, Tokyo Rikakikai Co. Ltd.) at varying flow rates using tygon tubing. Heating of the extractant in steps 3 and 4 was carried out by passing the extractant through a glass heating coil approximately 120 cm in length, which was placed in a water bath. The flow extraction setup is shown in Fig. 2.

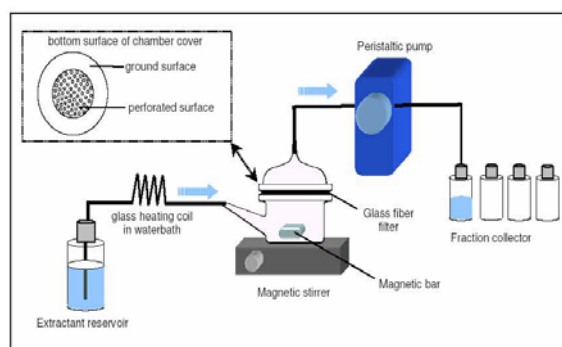


Fig 2. The set-up of the continuous-flow extraction system.

Extraction Procedure

Since it was impossible to remove air particulate matter from the filters collected from the samplers without loss of material, the whole central portion of the filter through which the solution had passed was cut from the filter and transferred to a clean extraction chamber. Following addition of a magnetic bar, a glass microfibre filter was then placed on the outlet followed by a silicone rubber gasket, and the chamber cover was securely clamped in position. The chamber was connected to the extractant reservoir and the collector vial using tygon tubing and placed on a magnetic stirrer. The magnetic stirrer and peristaltic pump were switched on to start the extraction. The extracting reagents continuously flowed through the chamber to effect sequential extraction. The extract passing the membrane filter was collected at 30 mL volume intervals to obtain six subfractions for each extractant. Extraction was carried out until all four extraction steps were completed. Elemental concentrations in extracts were determined by ICP-QMS.

Dissolution of Residues

A closed-vessel microwave digestion system (Milestone model MLS-1200 Mega, Bergamo, Italy) was used for pseudo-total digestion of air particulate matter residues. Residues from the extraction chamber were transferred to the digestion vessels together with concentrated HNO_3 (4 mL) and 37% HCl (2 mL). The vessel was then tightly sealed and subjected to microwave digestion. After cooling, the digested solutions were made up to volume in volumetric flasks before ICP-QMS measurements. The total amounts of metals associated with the particles were determined by summation of metals in exchangeable, acid soluble, reducible, oxidizable and residual fractions.

Quality Control

Analytical quality assurance was addressed by undertaking duplicate analysis of all extracted solutions. Blank analysis was performed frequently and every time a change of reagents or materials was used.

RESULTS AND DISCUSSION

Total Metal Deposition and Enrichment Factors

The samples were obtained in this study using sample collectors modified from Gray et al.⁸ as described in section 2.2. The material collected would have resulted from a combination of both wet and dry deposition processes. Total metal deposition was calculated from a combination of the amounts of soluble metals, as determined in the original sample filtrates, and the amounts of metals determined in the various particulate matter fractions. At each sampling, at all

four sites, solution and air particulate samples from both duplicate samplers were analyzed. The volume and pH of the rainwater harvested by the samplers, together with total metal depositions (solution plus particulate) are shown in Table 1.

In the dry season, harvested rainwater ranged from 1.6 to 13.2 mm month⁻¹, and from 52 to 70 mm month⁻¹ in the wet season. The rainwater pH was around 8 in the wet season and varied from 4 to 7 in the dry season. The higher pH of rainwater harvested in the wet season was attributed to activities including biomass burning which produces oxides of Ca, Mg and K to neutralize the acidity of rainwater. In the wet and dry seasons, photochemical processes, driven by sunlight presumably cause oxidation of SO₂ and NO_x to give acidic rainwater⁹.

Pb, Cd and Zn are the most common toxic metal contaminants in air particulates because they appear in gasoline, car components, oil lubricants and are widely used in industry. Sources of metal contamination in air particulates have been reviewed¹⁰. Table 1 shows that the concentration of Pb in air particulate matter adjacent to the lead smelter area (L1) is distinctly elevated and decreases with distance from the smelter in both dry and wet seasons, implicating the lead smelter as the point source of contamination. The highest Zn content was obtained at sampling site L4, most likely originating from traffic-related sources (vehicle tyres).

Total Pb depositions at locations L1 and L2 were substantially higher in the dry compared with the wet season, in spite of the much higher rainfall in the latter. This may be related to a greater deposition of wind-blown dust material in the dry season. Nriagu¹¹ has indicated that wind-blown dusts are a major source of Pb emissions worldwide.

Trace metals in aerosols are derived from a variety of sources including the earth's crust, the oceans, the biosphere, and a number of anthropogenic processes. The degree to which a trace metal in an aerosol is enriched, or depleted, relative to a specific source can be assessed to a first approximation using an enrichment factor (EF_{crust})¹². The enrichment factor

(EF_{crust}) of an element in an aerosol sample is defined as

$$EF_{crust} = \left(\frac{(C_{xatm}/C_{Alatm})}{(C_{xcrust}/C_{Alcrust})} \right)$$

where (C_{xatm}) and (C_{Alatm}) are the concentrations of the atmospheric trace metal and Al, respectively, and (C_{xcrust}) and (C_{Alcrust}) are their concentrations in average crustal material. The enrichment factor (EF_{crust}) was determined in this study based on the total depositions of trace elements and Al relative to their average crustal concentrations as reported by Mason and Moore¹³.

As an approximate guide, values of EF_{crust} lower than 10 (in effect 10 times the level of samples with no enrichment) are believed to have originated from normal weathering of crustal material. Values of EF_{crust} larger than about 10¹ are referred to as enriched elements and may have some sources other than crustal weathering, possibly anthropogenic. The higher the value of EF_{crust}, the more likely that an anthropogenic source is involved.

The high enrichment factors (10¹ – 10³) for Pb, Cd and Zn suggest a substantial anthropogenic input for these three metals. Not only the lead smelter, but also vehicular exhaust emission was a major source of Pb contamination. Pb is still persistent in road dust from earlier vehicular exhaust emission before leaded gasoline was banned, because of its long residence time in the environment¹⁴. Similar to earlier reports^{10,15}, particulate Zn in ambient air probably has its origin from automobile sources, i.e., wear and tear of vulcanized rubber tyres, lubricating oil and corrosion of galvanized vehicular parts. Cadmium is being emitted mainly from industrial activities and industrial and domestic wastes related with paints and batteries. In contrast, iron (Fe) shows no enrichment (EF_{crust} H•1) and EF_{crust} for Al by definition is 1.0. The metals Pb, Cd and Zn are all relatively volatile metals, and because they are readily transported in air, have been referred to as atmosphere elements¹⁶. Previous studies have reported the accumulation of Pb and Cd in the soil

Table 1. Rainwater volumes, pH and total metal depositions (g ha⁻¹ month⁻¹) for representative dry and wet season months (n = 2).

Location	Rainfall (mm month ⁻¹)		pH of rainfall		Pb		Cd		Zn	
	Dry	Wet	Dry	Wet	Dry	Wet	Dry	Wet	Dry	Wet
L1	1.6	52.0	8.04	7.25	78.51 ± 64.50	10.26 ± 7.25	0.41 ± 0.33	0.91 ± 0.00	106.2 ± 34.92	116.7 ± 33.73
L2	2.0	65.2	8.51	7.57	8.25 ± 1.83	0.92 ± 0.083	1.25 ± 0.17	0.34 ± 0.17	71.3 ± 36.25	70.9 ± 5.83
L3	2.2	67.8	8.06	6.14	0.22 ± 0.008	0.26 ± 0.092	1.16 ± 0.00	0.33 ± 0.25	54.0 ± 22.33	52.4 ± 9.20
L4	13.2	70.3	8.34	4.59	2.84 ± 0.33	2.42 ± 1.04	1.42 ± 0.33	0.17 ± 0.00	110.2 ± 25.00	233.3 ± 51.53

L1, L2, L3: 0.3, 1 and 2 km from lead smelter, respectively.
L4: Heavy traffic area.

surrounding the smelter^{17,18}.

Fractionation of Metals in Air Particulate Samples

For Pb and Zn, concentrations of these metals in the filtered solutions obtained from the air samplers were all below detection limits, i.e. all of the Pb and Zn were associated with the air particulate matter. In the case of Cd, for three samples (L2 and L3 wet season, L4 dry season) some Cd was detected in the water-soluble fraction, equivalent to depositions of between 0.42 and 1.24 g Cd ha⁻¹ month⁻¹, and accounting for between 23 and 84% of the total Cd deposition for those samples. For the other samples, all of the Cd was associated with the air particulate matter.

Information on the fractionation of metals in air particulate matter is essential for considering their mobility, mechanisms of transformation and also their environmental risk. The fractionation of Pb, Cd and Zn in air particulate matter has been studied previously using sequential extraction procedures^{1,19,20}. These studies found that Pb was strongly associated with carbonate and Fe-Mn oxide phases.

Metal fractionation data for the four sites is shown in Table 2. However, it should be noted that for sites L2 and L3 in particular, the concentrations of metals in several fractions were close to the detection limits. The samples from the most contaminated sites (L1 and L4) provide the most complete sets of data. For these sites,

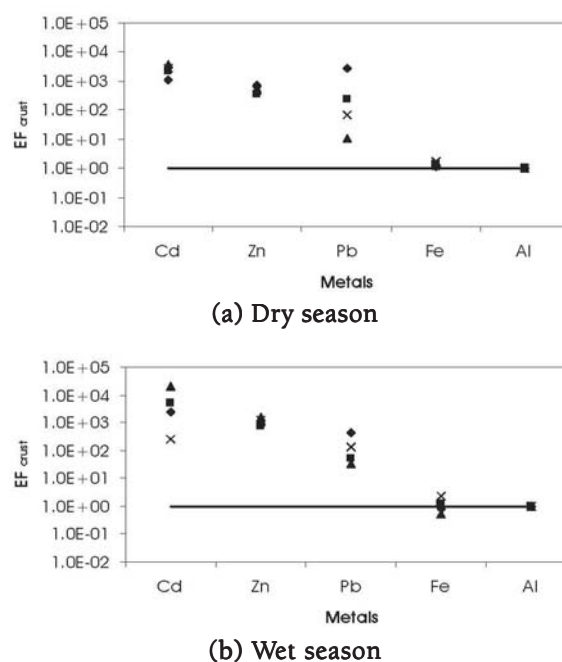


Fig. 3. Mean EF_{crust} values for metals (Pb, Cd, Zn, Fe and Al) deposited at different sites (L1-L4).

Table 2. Fractional distribution of metals in representative air particulate matter from dry and wet seasons as determined using a continuous-flow sequential extraction procedure.

Fraction	Metal deposition in air particulate fractions (g ha ⁻¹ month ⁻¹)							
	L1		L2		L3		L4	
	Dry season	Wet season	Dry season	Wet season	Dry season	Wet season	Dry season	Wet season
Lead								
F1	ND (<0.04)	ND (<0.04)	ND (<0.04)	ND (<0.04)	ND (<0.04)	ND (<0.04)	ND (<0.04)	ND (<0.04)
F2	5.25 ± 4.50	0.42 ± 0.25	ND (<0.04)	ND (<0.04)	ND (<0.04)	ND (<0.04)	0.50 ± 0.00	ND (<0.04)
F3	61.92 ± 61.50	6.25 ± 8.08	ND (<0.16)	ND (<0.16)	ND (<0.16)	ND (<0.16)	1.67 ± 0.17	1.25 ± 0.33
F4	9.67 ± 2.75	1.42 ± 2.00	6.75 ± 2.17	ND (<0.04)	ND (<0.04)	ND (<0.04)	ND (<0.04)	0.17 ± 0.17
F5	1.67 ± 1.17	2.17 ± 0.92	1.50 ± 0.33	0.92 ± 0.083	0.22 ± 0.008	0.26 ± 0.092	0.67 ± 0.17	1.00 ± 0.08
Sum	78.51 ± 64.50	10.26 ± 7.25	8.25 ± 1.83	0.92 ± 0.083	0.22 ± 0.008	0.26 ± 0.092	2.84 ± 0.33	2.42 ± 1.04
Cadmium								
F1	ND (<0.01)	ND (<0.01)	ND (<0.01)	ND (<0.01)	ND (<0.01)	ND (<0.01)	ND (<0.01)	ND (<0.01)
F2	0.33 ± 0.33	0.83 ± 0.08	ND (<0.0003)	ND (<0.0003)	ND (<0.0003)	ND (<0.0003)	1.25 ± 0.08	ND (<0.0003)
F3	ND (<0.002)	ND (<0.002)	1.08 ± 0.17	0.17 ± 0.17	1.08 ± 0.08	0.33 ± 0.25	ND (<0.002)	ND (<0.002)
F4	ND (<0.001)	ND (<0.001)	ND (<0.001)	ND (<0.001)	ND (<0.001)	ND (<0.001)	ND (<0.001)	ND (<0.001)
F5	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.17 ± 0.00	0.17 ± 0.00	0.08 ± 0.08	ND (<0.003)	0.17 ± 0.00	0.17 ± 0.00
Sum	0.41 ± 0.33	0.91 ± 0.00	1.25 ± 0.17	0.34 ± 0.17	1.16 ± 0.00	0.33 ± 0.25	1.42 ± 0.33	0.17 ± 0.00
Zinc								
F1	2.1 ± 2.92	4.1 ± 5.83	ND (<0.12)	1.2 ± 1.67	ND (<0.12)	0.7 ± 0.92	ND (<0.12)	2.8 ± 4.00
F2	25.5 ± 21.17	22.0 ± 2.90	ND (<0.22)	ND (<0.22)	ND (<0.22)	ND (<0.22)	38.5 ± 11.00	6.8 ± 5.33
F3	8.2 ± 11.58	1.1 ± 1.50	ND (<0.08)	ND (<0.08)	ND (<0.08)	ND (<0.08)	34.3 ± 8.83	9.3 ± 3.75
F4	2.1 ± 3.00	2.2 ± 3.08	10.0 ± 1.17	ND (<0.25)	3.8 ± 5.33	4.0 ± 5.58	6.6 ± 1.25	7.4 ± 2.25
F5	68.3 ± 44.50	87.3 ± 54.17	61.3 ± 35.08	69.7 ± 4.25	50.2 ± 17.00	47.7 ± 0.17	30.8 ± 43.67	207.0 ± 39.92
Sum	106. ± 34.92	116.7 ± 33.73	71.3 ± 36.25	70.9 ± 5.83	54.0 ± 22.33	52.4 ± 9.20	110. ± 25.00	233.3 ± 51.53

ND: Not detectable.

L1, L2, L3: 0.3, 1 and 2 km from lead smelter, L4: Heavy traffic area.

F1: Exchangeable, F2: Acid soluble, F3: Reducible, F4: Oxidizable, F5: Residue fractions.

it was observed that Pb occurred predominantly in the reducible fraction, with much smaller amounts occurring in the acid-soluble, oxidizable and residual fractions. There was no Pb in the exchangeable fraction. The predominance of Pb in the Fe-Mn oxide (reducible) fraction is in broad agreement with previous reports for air particles^{1,19,20} and soil dusts^{15,21}. The adsorption of Pb cations onto the Fe-Mn oxide phase is considered as a reasonably universal fixation process.

Cadmium occurred predominantly in the acid soluble or reducible phases, while the highest proportions of Zn occurred mainly in the residual phase. Zinc in this fraction is unlikely to be easily released under natural conditions, however at sites L1 and L4 there were also reasonable amounts of Zn present in the acid-soluble fraction.

Elemental Associations of Lead in Air Particulate Samples Based on Extractograms

For investigation of elemental associations, comparison of extractograms obtained from continuous-flow sequential extraction can be used (graphic plots of metal concentrations in subfractions versus subfraction number). It is possible to evaluate the elemental associations in the various extracted solid phases by comparing the details of peak profiles and peak shapes of overlain extractograms.

The distribution and chemical associations of Pb and major elements (Al and Fe) in air particulate matter for contaminated air particulate samples (300 m from lead smelter and heavy traffic area) can be evaluated using the extractograms shown in Fig. 4. Chemical associations of Pb in air particulate matter were not studied at sampling sites L2 and L3 because of the low concentrations of Pb in each fraction (Table 2).

For the contaminated air particulate matter at the lead smelter site (L1), although the Pb occurred

predominantly in the reducible phase, Pb and Al had similar dissolution patterns within the acid soluble phase in both wet and dry seasons (Fig. 4: 1a and b). This indicates a close association between Pb and Al in the acid soluble phase of contaminated air particulate matter. In contrast, in the reducible phase, the Pb peak was found to increase rapidly early in the fraction, preceding the bulk of the Fe (and Al) dissolution in this phase. This has been taken as an indication that the Pb is mostly adsorbed on oxide (Fe/Al) surfaces; the results being very similar to the extractograms of soil samples collected at the same site¹⁷. The air particulates are probably therefore derived mainly from wind-blown dust at the site.

Extractograms for contaminated air particulate matter from the heavy traffic area site (L4) also show associations of Pb with the Fe/Al oxide phases (Fig. 4: 2a and b). Therefore, irrespective of the source of the contamination, the extractograms appear quite similar.

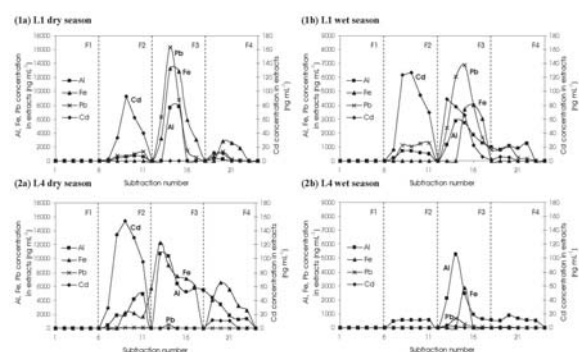


Fig 4. Extractograms for air particulate matter obtained using the continuous-flow sequential extraction procedure for contaminated air particulate: L1 in the dry season (1a) and L1 in the wet season (1b), L4 in the dry season (2a) and L4 in the wet season (2b).

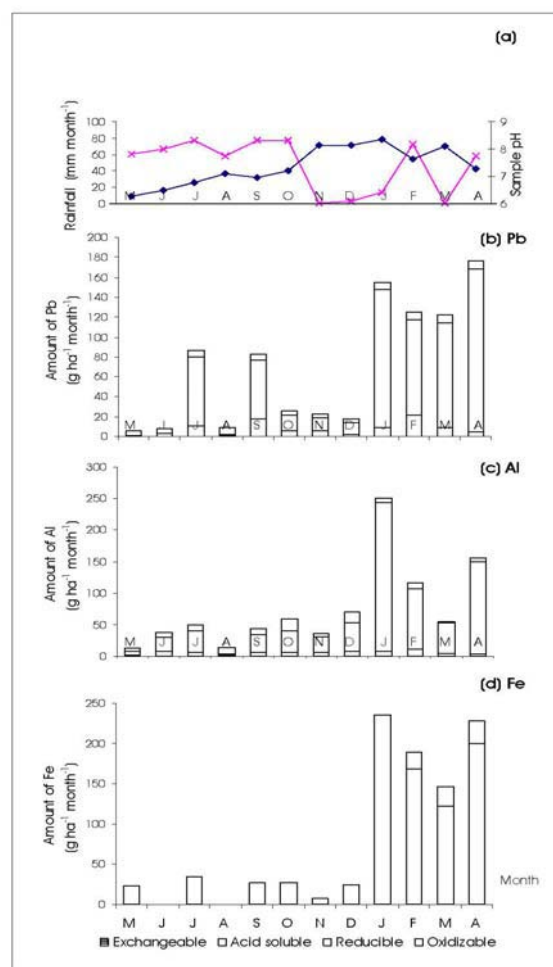


Fig 5. Monthly rainfall data (a) and fractional distribution of Pb (b), Al (c), and Fe (d) for air particulate matter collected near a lead smelter (site L1).

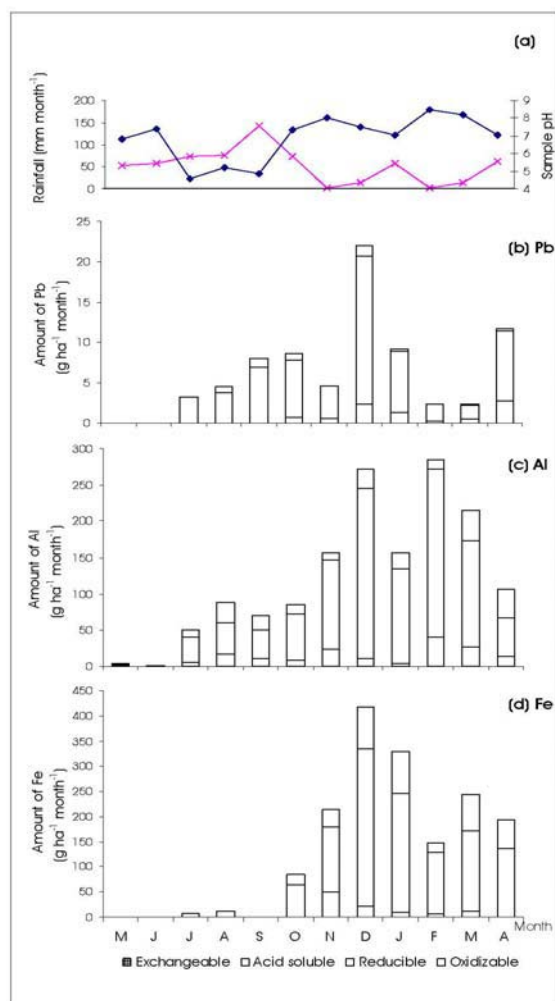


Fig 6. Monthly rainfall data (a) and fractional distribution of Pb (b), Al (c), and Fe (d) for air particulate matter collected near a heavy traffic area (site L4).

Monthly Fractional Distribution of Pb in Air Particulate Matters

Monthly data for the fractional distribution of Pb in air particulate matter are shown in Fig. 5-6. The data are shown together with rainfall (mm) and pH from May, 2004 to April, 2005.

At both sites, the fractional distribution of Pb, Al and Fe between chemical forms in contaminated air particulate matter was quite similar for all months, with no obvious differences between the dry and wet seasons. It can therefore be concluded that seasonal change does not affect the distribution of chemical forms of Pb, Al and Fe in air particulate matter. Considering the metal content of the particulate matter, it was clearly observed that total metal concentrations were higher in the dry compared with the wet months (Fig. 5 and 6). This was most clearly observed at sampling site L1. Soil aerosols normally make the largest contribution to

atmospheric pollution with Al and Fe as the most abundant metals acting as markers^{22,23}. In the dry season, wind-blown dusts are likely to be more abundant at both the smelter and heavy traffic sites with resulting deposition of particulate matter occurring by sedimentation or diffusion.

CONCLUSION

A continuous-flow sequential extraction system was used to study the fractionation and elemental association of metals in air particulate matter. For air particulate matter from the lead smelter and traffic-related dust examined in this study, Pb was predominantly present in the reducible fraction, with moderate amounts occurring in the oxidizable and residual fractions, and a small amount being associated with the acid soluble phase. Examination of extractograms showed close associations between Al and Pb in the acid soluble phase for the contaminated air particulate matter from the lead smelter. In contrast, in the reducible fraction, Pb appeared to dissolve earlier than Fe and Al suggesting that Pb is adsorbed on Fe/Al oxide surfaces in air particulate matter. Similar extractograms for soil collected from the same location suggests wind-blown dust to be the source of the particulate matter. Extractograms of Pb in particulate matter from a heavy traffic area also showed close associations of Pb with the major elements Al and Fe. Total Pb deposition in the dry season was found higher than in the wet season supporting the suggestion that soil dust is the predominant source of the atmospheric particulate matter. The fractional distribution of Pb, Al and Fe in particulate matter was very similar for both dry and wet seasons.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to gratefully thank the Thailand Research Fund and the Postgraduate Education and Research Program in Chemistry (PERCH), Higher Education Development Project of the Commission on Higher Education for financial support.

REFERENCES

1. Harrison RM, Laxen DPH and Wilson SJ (1981) Chemical associations of lead, cadmium, copper, and zinc in street dusts and roadside soils. *Environ Sci Technol* **15**, 1378-83.
2. Tessier A, Campbell PGC and Bisson M (1979) Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Anal Chem* **51**, 844-51.
3. Gleyzes C, Tellier S and Astruc M (2002) Fractionation studies of trace elements in contaminated soils and sediments: a review of sequential extraction procedures. *Trac-Trend Anal*

- Chem* **21**, 451-67.
4. Sahuquillo A, Rigol A and Rauret G. (2003) Overview of the use of leaching/extraction tests for risk assessment of trace metals in contaminated soils and sediments. *Trac-Trend Anal Chem* **22**, 152-59.
 5. Shiowatana J, Tantidanai N, Nookabkaew S and Nacapricha D (2001) A flow system for the determination of metal speciation in soil by sequential extraction. *Environ Inter* **26**, 381-87.
 6. Shiowatana J, McLaren RG, Chanmekha N and Samphao A (2001) Heavy metals in the environment. *J Environ Qual* **30**, 1940-49.
 7. Chomchoei R, Shiowatana J and Pongsakul P (2002) Continuous-flow system for reduction of metal readsorption during sequential extraction of soil. *Anal Chim Acta* **472**, 147-59.
 8. Gray CW, McLaren RG and Roberts AHC (2003) Atmospheric accessions of heavy metals to some New Zealand pastoral soils. *Sci Total Environ* **305**, 105-15.
 9. Railsback LB (1997) Lower pH of acid rain associated with lightning: evidence from sampling within 14 showers and storms in the Georgia Piedmont in summer 1996. *Sci Total Environ* **198**, 233-41.
 10. Fang GC, Wu YS, Huang SH and Rau JY (2005) Review of atmospheric metallic elements in Asia during 2000-2004. *Atmos Environ* **39**, 3003-13.
 11. Nriagu JO (1979) Global inventory of natural and anthropogenic emissions of trace metals to the atmosphere. *Nature* **279**, 409-11.
 12. Duce RA, Hoffman GL and Zoller WH (1974) Atmospheric trace metals at remote northern and southern hemispheric sites: pollution and natural. *Science* **187**, 59-61.
 13. Mason B and Moore CB (1982) Principles of Geochemistry, 4th ed. John Wiley and Sons, Inc.
 14. Karar K, Gupta AK, Kumar A and Biswas AK (2006) Characterization and identification of the sources of chromium, zinc, lead, cadmium, nickel, manganese and iron in PM10 particulates at the two sites of Kolkata, India. *Environ Monit Assess* **120**, 347-60.
 15. Banerjee ADK (2003) Heavy metal levels and solid phase speciation in street dusts of Delhi, India. *Environ Pollut* **123**, 95-105.
 16. Wang X, Sato T, Xing B, Tamamura S and Tao S (2005) Source identification, size distribution and indicator screening of airborne trace metals in Kanazawa, Japan. *J Aerosol Sci* **36**, 197-210.
 17. Tongtavee N, Shiowatana J and McLaren RG (2005) Fractionation of lead in soils affected by smelter activities using a continuous-flow sequential extraction system. *Intern J Environ Anal Chem* **85**, 567-83.
 18. Tongtavee N, Shiowatana J, McLaren RG and Gray CW (2005) Assessment of lead availability in contaminated soil using isotope dilution techniques. *Sci Total Environ* **348**, 244-56.
 19. Fernández AJ, Ternero M, Barragán FJ and Jiménez JC (2000) An approach to characterization of sources of urban airborne particles through heavy metal speciation. *Chemosphere Global Change Science* **2**, 123-36.
 20. Espinosa AJF, Rodríguez MT, Rosa FJB and Sánchez JCJ (2002) A chemical speciation of trace metals for fine urban particles. *Atmos Environ* **36**, 773-80.
 21. Li X, Poon CS and Liu PS (2001) Heavy metal contamination of urban soils and street dusts in Hong Kong. *Appl Geochem* **16**, 1361-68.
 22. Peirson DH, Cawse PA, Salmon L and Cambray RS (1973) Trace elements in the atmospheric environment. *Nature* **241**, 252-56.
 23. Querol X, Alastuey A, Rosa JDL, Campa ASDL, Plana F and Ruiz CR (2002) Source apportionment analysis of atmospheric particulates in an industrialised urban site in southwestern Spain. *Atmos Environ* **36**, 3113-25.

Fractionation of lead in soils affected by smelter activities using a continuous-flow sequential extraction system

NAMFON TONGTAVEE*[†], JUWADEE SHIOWATANA[†] and
RONALD G. McLAREN[‡]

[†]Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University,
Rama VI Road, Bangkok 10400, Thailand

[‡]Soil and Physical Sciences Group, Agriculture and Life Sciences Division,
PO Box 84, Lincoln University, Canterbury, New Zealand

(Received 15 December 2004; in final form 29 March 2005)

A continuous-flow sequential extraction system was used to study the distribution of Pb, and its association with other elements (Fe, Al and Ca), in soils around a Pb smelter. Soil samples were analysed by a four-step continuous-flow sequential extraction procedure employing a modified Tessier/BCR scheme. Recoveries of Pb using the flow system (88–111%) were higher than those obtained using a conventional batch extraction system. There were also some differences in Pb distribution between fractions as determined using the two extraction systems. The most abundant fraction of Pb was extracted during the dissolution of soil oxides (Fe/Al). Extractograms (plots of concentration of elements *vs.* extractant volume/time) indicated that anthropogenic Pb was predominantly adsorbed onto Fe oxide surfaces in contaminated soils. In soil profiles, the highest amounts of Pb were found in the topsoil surface layers (0–5 cm) of the contaminated soils with only limited movement into subsurface layers.

Keywords: Continuous-flow extraction system; Elemental association; Sequential extraction; Pb; Smelter

1. Introduction

Many heavy metals are very common in industrial and domestic usage. Consequently, wastes containing heavy metals have been dispersed into the environment through their improper management and disposal. Metal smelters are important industrial point sources of heavy metals. Toxic metals emitted into the atmosphere can be re-deposited onto the land and accumulate in the soil. Moreover, the accumulated metals in soil may be taken up by plants, which could cause human health problems through the food chain. Therefore it is important to assess soil contamination in order to understand the potential adverse effects and to impose appropriate control measures.

*Corresponding author. Fax: +662-259 2097. Email: namfon@swu.ac.th

In most circumstances, risk assessment to human health from contamination of soils by heavy metals has usually been based on total concentrations of metals in soil. This can provide information on the degree of contamination [1]. Unfortunately, the potential risk from contaminated soil is not dependent on the total concentration of the element alone, but on the chemical reactivity of the element or the chemical species of the element of interest. The identification of chemical species or forms and their quantitative data should be used to assess the bioavailability, toxicity and environmental impact of contaminant metals. In recent years, there has been development of chemical testing procedures to measure bioavailability to plants of metals and metalloids in soil [2]. In general, sequential extraction using a series of chemicals of increasing strength is a widely used method for metal fractionation and evaluation of the potential of metal leaching [3]. The sequential extraction approach can provide detailed information about the origin, mode of occurrence, biological and physicochemical availability, mobilization, and transport of metals [4]. Elements extracted in the same extraction steps have been used as evidence of their chemical association (e.g. [5]). However, this may not always be absolutely correct, because elements extracted from the same phase may not have dissolved simultaneously but at different times during the same extraction step. In our previous work, we have developed a continuous-flow system for sequential extraction [6, 7], which has shown many advantages over the batch system such as speed, ease of operation, less vulnerability to variation in extraction conditions, high extraction efficiency and freedom from operational contamination. The flow system has also been proved to reduce the problem of metal readsorption and redistribution during extraction in comparison with the batch system [8]. Extractograms, i.e. plots of concentration of element extracted *vs.* subfraction number (in effect time) obtained using the system also provides kinetic information and information on solid phase elemental associations [9].

The purpose of the present study is to investigate the use of a continuous flow extraction system to determine the distribution of Pb in soils contaminated by atmospheric fallout from a metal smelter. The study compares the results obtained using the flow system with those obtained for the same soils using a traditional batch extraction system. A secondary objective was to use the extractograms obtained from the flow extraction system for interpretation of elemental associations in the various soil fractions. Results obtained from this work should help improve our understanding of the transformations of contaminant Pb at an industrially contaminated field site.

2. Materials and methods

2.1 Soil samples

Surface soil samples (0–5 cm) were sampled from the area surrounding a small Pb smelter located in Saraburi Province, approximately 110 km north of Bangkok, Thailand (figure 1). The smelter has been operating for the last 10 years and it is used essentially to recycle Pb from old batteries. Sampling was carried out at distances of between 0 and 2.5 km from the smelter by taking several subsamples with a trowel, and bulking from an area of approximately 0.5 m² at each location. Since the land surrounding the smelter has many different private owners, only parts of the area were accessible. The areas sampled were all uncultivated grassland. A preliminary

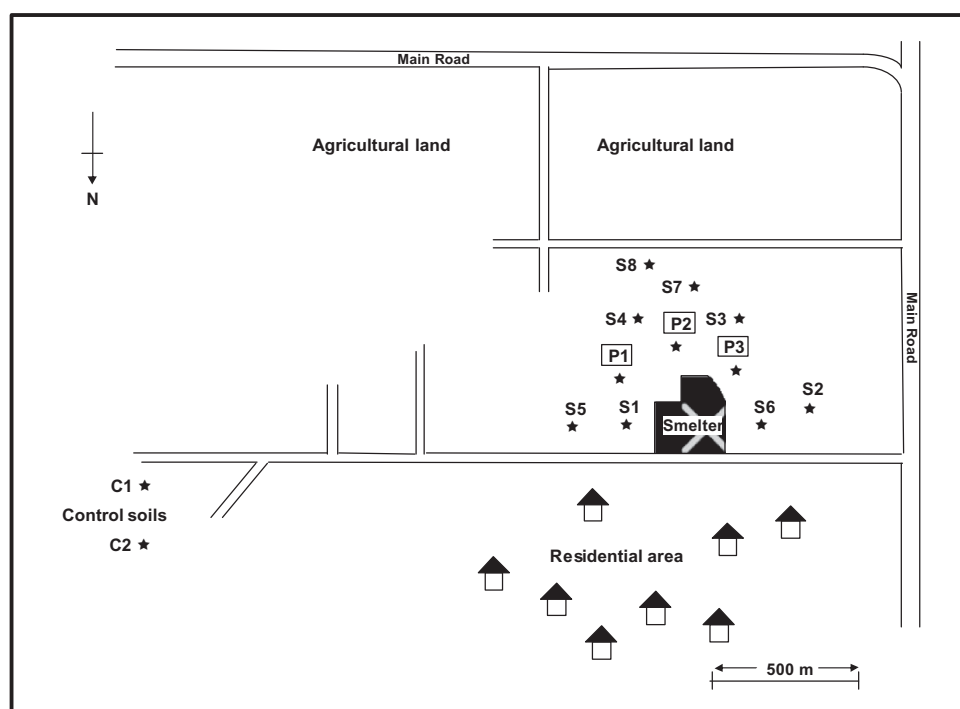


Figure 1. Map showing the sampling sites in the area adjacent to the smelter.

Table 1. General soil characteristics.

Soil	Total Pb (mg kg ⁻¹)	pH	Sand (%)	Silt (%)	Clay (%)	Org. C (%)	Total Fe (%)	Total Al (%)	Total Ca (mg kg ⁻¹)
Control C1	21.2	5.54	21.3	56.9	21.8	2.23	5.1	1.8	2844
Soil S1	69.9	6.51	20.5	63.6	15.9	2.89	7.6	1.2	3282
Soil S2	99.2	6.17	24.6	61.9	13.5	1.47	4.7	0.8	2259
Soil S3	143.0	5.91	17.1	65.1	17.8	1.81	3.3	1.1	1875
Soil S4	246.6	5.73	20.5	61.4	18.1	2.65	3.4	1.1	2251

sampling of topsoils from the site was carried out and the total concentrations of Pb in these samples were determined. The results showed that total Pb concentrations varied in the range of 20–250 mg kg⁻¹ Pb. Five of the topsoil samples were then chosen for further study to represent a range from background to high concentrations of Pb (Samples C1, S1, S2, S3 and S4). Background topsoil samples were sampled at a distance of 2 km from the smelter. The chemical and physical properties of these five soils are shown in table 1. For studying the distribution of Pb with soil depth, three soil profiles were sampled at depths of 0–5 and 5–10 cm from the surface at distances of less than 200 m from the Pb smelter (locations P1, P2 and P3, figure 1). A further sample was taken from the base of each profile (20–30 cm) in the expectation that the soil at this depth would most likely be completely unaffected by the smelter emissions. Soil samples were dried at 30°C in an oven for 5 d. All the samples were then ground and sieved through a 2-mm stainless steel sieve. All soils were stored in

a desiccator prior to laboratory analysis. Soil pH was measured in a water suspension using a soil/solution ratio of 1:2.5 after the suspensions were shaken for 24 h on a reciprocating shaker at 20°C [10]. Total carbon content was determined by a LECO CNS 2000 Analyser. Soil texture was obtained using the Malvern Laser Sizer method [11]. Total Pb, Fe, Al and Ca were determined by acid digestion as described by Kovacs *et al.* [12] followed by atomic absorption spectrophotometric detection.

2.2 Standard reference material (SRM)

SRM 2711 was purchased from the National Institute of Standards and Technology (NIST) (Gaithersburg, MD). This is a moderate contaminated soil (particle size < 74 µm) from Montana. It has been prepared to achieve a high degree of homogeneity with certified total elemental concentrations provided. Hence, it is suitable for use to validate the proposed continuous-sequential extraction method. The SRM is guaranteed for homogeneity provided that analyses are performed using a minimum sample size of 250 mg.

2.3 Preparation of standard solutions and glassware

The chemical reagents in this work were of analytical grade. Ultra-pure water from a MilliQ water purification unit (Millipore, Bedford, MA) was used throughout this work. All glassware used was cleaned and soaked in 10% HNO₃ and rinsed with ultrapure water before use. Standard stock solutions (1000 mg L⁻¹) were purchased from Merck, (Darmstadt, Germany) or prepared in-house from pure metals. Working standard solutions for calibration of graphite furnace atomic absorption spectrophotometry (GFAAS) measurements were prepared by diluting the stock solution with ultrapure water or with extracting reagents before use.

2.4 Fractionation scheme

The fractionation scheme used was based essentially on the Tessier *et al.* [13] and BCR [14] schemes but with substantial modifications to enable its use with the flow extraction system. The geochemical phase at each extraction step is operationally defined according to the reagents used as shown in table 2. The phases extracted should be considered as nominal rather than absolute chemical fractions. For step I

Table 2. Sequential fractionation procedure.

Step	Nominal fraction	Extractant	Extraction conditions (Batch method)
I	Exchangeable	0.01 M Mg(NO ₃) ₂ ^a	Shaken 24 h, 25°C
II	Acid-soluble (carbonate or specifically sorbed)	0.11 M CH ₃ COOH ^b	Shaken 16 h, 25°C
III	Reducible (Fe/Al/Mn oxide-bound)	0.1 M NH ₂ OH · HCl, pH 2 ^b	Shaken 6 h, 96°C
IV	Oxidizable (organic-bound)	30% H ₂ O ₂ : 0.02 M HNO ₃ (8 : 3 v/v) ^a	Shaken 5 h, 85°C
V	Residual	HNO ₃ + H ₂ O ₂ ^c	Acid digestion

^a Modification from Tessier *et al.* scheme [13, 15].

^b Modification from BCR scheme [14].

^c Acid digestion, Kovacs *et al.* procedure [12].

(exchangeable phase), which is not required in the BCR scheme, 0.01 M $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ was used as the extractant. Many authors use 1 M MgCl_2 for this phase following the Tessier *et al.* [13] scheme. However, using a nitrate salt reduces the background absorption when determining Pb with GFAAS. The lower strength salt was used to simulate desorption of the most weakly bound ions (exchangeable) into the soil solution (e.g. [15, 16]). For Steps II and III the reagents used in the BCR sequential extraction scheme were used [14]. Step IV was modified from the Tessier *et al.* [13] scheme by using only 30% H_2O_2 :0.02 M HNO_3 (8:3 v/v) because intermittent addition of NH_4OAc during extraction is not practical in the flow system. The last step (Step V) was performed using the $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ digestion procedure of Kovacs *et al.* [10]. Such digestions are often referred to as pseudo-total analyses [17] since they do not include metals trapped within the lattices of silicate minerals. However, true total analyses are not considered necessary for the assessment of metal-contaminated soils since only those metals potentially available for leaching and biological processes are usually of interest [18].

In the batch extraction system, the soil sample was weighed accurately into a centrifuge tube and the extractions at each step were carried out using the equilibration times as shown in table 2. A water bath was used for the extraction steps where higher temperatures were required. Centrifugation (10,000 rpm for 10 min), decantation and filtration steps (Whatman filter paper, No. 52) were used for separation of the liquid and solid phases at each step. This differs from the Tessier *et al.* [13] procedure in which supernatants were removed by pipette. In this work, the original five soil samples (C1, S1–S4) were fractionated using both batch and continuous-flow extraction systems to examine the accuracy and efficiency of these two extraction systems. The sets of samples taken from different depths (P1–P3) were fractionated using the flow extraction system only.

2.5 Continuous-flow extraction system

2.5.1. The extraction chamber. An extraction chamber was designed to allow containment and stirring of a weighed sample of soil. Extractants are pumped sequentially through the chamber and leach metals from the targeted phases. The chambers and covers were constructed from borosilicate glass to have a capacity of approximately 10 mL [6, 7]. The outlet of the chamber was furnished with a filter (Whatman [Maidstone, UK]) glass microfibre filter GF/B, 47-mm diameter, 1- μm particle retention). Extractant was pumped through the chamber using a peristaltic pump (Micro tube pump, MP-3N, EYELA [Tokyo Rikakikai Co., Ltd.]) at varying flow rates using tygon tubing of 2.25 mm inner diameter. Heating of the extractants in Steps III and IV was carried out by passing the extractants through a glass heating coil approximately 120 cm in length, placed in a water bath. However, because of heat loss problems, even when the glass heating coil was immersed in a thermostat water bath controlled at 95°C, the maximum temperatures achieved in the extraction chamber were between 80 and 85°C. Thus, for Step IV in particular, the temperatures used were somewhat lower than those used for the batch system (table 2).

2.5.2. Extraction procedure. A weighed sample (1.00 g) was transferred to a clean extraction chamber together with a magnetic bar. A glass microfibre filter was then

placed on the outlet followed by a silicone rubber gasket, and the chamber cover was securely clamped in position. The chamber was connected to the extractant reservoir and the collector vial using tygon tubing and placed on a magnetic stirrer. The magnetic stirrer and peristaltic pump were switched on to start the extraction. The extracting reagents were continuously and sequentially pumped through the chamber. The extracts passing through the membrane filter were collected in subfractions of 10–30 mL volume intervals until all four leaching steps were completed. For most soils examined, it was found that 120–180 mL were sufficient to leach the metals completely for each step.

2.5.3. Residue digestion. Residue digestion was performed using an acid digestion method [12] on a heating block. This system was equipped with a heating program. Amounts of 0.5–1.0 g of dried soil sample or residue from the extraction chamber were transferred to digestion tubes together with 5 mL of HNO_3 (70%) and 5 mL of H_2O_2 (30%). The digestion tubes were placed on a heating block and the digestion was operated following the recommended heating program for 6 h [12]. The digest solutions were cooled to room temperature, and filtered through Whatman filter paper No. 52, were then made up to volume in a volumetric flask. Total metal concentrations were determined by both a single digestion of non-fractionated soil and by summation of extractable metals in each subfraction of the exchangeable, acid-soluble, reducible, oxidizable and residual fractions.

2.6 Analysis of extracts and acid digests

Lead concentrations in extracts were determined using graphite furnace atomic absorption spectrophotometry (GFAAS). The GFAAS measurements were performed with a Perkin Elmer (Norwalk, CT) Analyst 100 equipped with a deuterium background corrector and an HGA-800 heated graphite atomizer. The sample was introduced to the atomizer using an AS-72 autosampler. Flame atomic absorption (FAAS) measurements for Fe, Al and Ca were performed using a Perkin Elmer Model 3100 spectrometer equipped with deuterium background correction. Concentrations of metals were obtained by the matrix-matched standard calibration method. Working standard solutions were prepared in the same extracting reagent as the sample solutions.

3. Results and discussion

3.1 Validation of the continuous-flow sequential extraction system using a standard reference material

We initially evaluated the proposed continuous-flow sequential extraction system by carrying out a sequential extraction of 0.25 g of NIST standard reference material (SRM 2711). The resulting analytical data are shown in table 3. The sums of each element determined (Pb, Fe, Al and Ca) found in all fractions (I + II + III + IV + Residue) were compared with the reference values of acid leaching data provided by NIST. It was found that they agreed reasonably well within the range of reference values provided indicating that the extraction data obtained from the continuous-flow extraction system are reliable.

Table 3. Comparison of analytical results for summation of elemental concentrations determined using the continuous-flow sequential extraction system for SRM 2711 ($\text{mg kg}^{-1} \pm \text{s.d.}$, $n = 3$).

Element	Step I	Step II	Step III	Step IV	Residue	Sum of fractions	Leached value ^a	Certified value ^b
Pb	3.7 ± 0.5	309 ± 9	710 ± 90	23 ± 8	91 ± 17	1138 ± 56	$930\text{--}1500$	1162 ± 31
Fe	ND	228 ± 12	964 ± 119	123 ± 10	14860 ± 460	16170 ± 460	$17000\text{--}26000$	28900 ± 600
Al	ND	ND	1290 ± 107	160 ± 18	20660 ± 550	22100 ± 430	$12000\text{--}23000$	28800 ± 800
Ca	3970 ± 90	11920 ± 700	3820 ± 140	25 ± 4	89 ± 13	19820 ± 660	$20000\text{--}25000$	65300 ± 900

ND = non-detectable.

^a Acid leaching values for SRM 2711 provided by NIST.

^b Certified values for total concentrations of SRM 2711 provided by NIST.

3.2 Comparison of Pb fractionation obtained using continuous-flow and batch sequential extraction techniques

Table 4 compares the distribution of Pb in soils obtained using the flow system and a conventional batch method. In the flow system, the amounts of Pb in each individual phase were obtained by summation of the amounts in all subfractions of each step. In general, the flow system gave better recoveries of Pb compared to the batch system for all samples analysed. The summation of Pb fractions obtained using the flow method also showed good agreement with the total concentrations from a single total analysis. The recoveries in the batch system were poorer, probably as a result of losing particulate matter at each stage during centrifugation and filtration. However, the flow extraction is a closed system, which effectively solves this problem. The precision (repeatability) of the flow system appears to be slightly lower than for the batch system (see standard deviations in table 4). This is probably due to the summation of data from several subfractions for each fraction in the flow system.

Although the overall recoveries of Pb was higher using the flow system, in the first two exchangeable and acid soluble phases, the amounts of Pb extracted using the flow system were lower than those obtained using the batch system. Lead is very strongly sorbed onto soil and the flow rate of extractant at $3\text{--}5\text{ mL min}^{-1}$ (calculated as approximately 0.5 h total contact time) may have been too fast to allow adequate equilibration between solution and solid phases. In contrast, in the batch system, equilibration was carried out for 16 or 24 h for these fractions (table 2). In addition, although not significant in terms of overall recoveries, the Pb concentrations in subfractions of Steps I and II were often near or below detection limits. For the soil oxides (Fe/Al); extraction step, the amounts of Pb extracted using the flow system were higher than those obtained using the batch system. Conversely in the following step (oxidizable), the amounts of Pb extracted using the flow system were lower than those obtained using the batch system. These observations can be explained by the readsorption of Pb in the batch system. Chomchoei *et al.* [8] have investigated and compared the readsorption process in both batch and flow systems. For Pb, their results clearly showed that for the conventional batch system, there was significant readsorption in both the reducible and oxidizable steps. Some Pb extracted in the reducible phase was readsorbed and could be dissolved in the next step; the oxidizable phase. Hence the batch system tends to underestimate the Pb associated with the Fe/Al oxides and overestimates the Pb associated with the oxidizable fraction. In contrast, readsorption is not observed for the continuous-flow extraction system [8]. Little readsorption occurs in the flow system because the extracted Pb is gradually removed from the system in the flowing extractant before it can be readsorbed on the solid phase. According to the results of the present work, the amount of Pb in the reducible step appears to be more completely dissolved and removed in the flow system. It can be observed from the extractograms (figure 2) that the concentration of Pb approaches the baseline towards the end of the reducible step. However, this is not the case for the oxidizable step, which normally takes a longer time to complete because of clogging of the filter paper by dispersed soil. This is often found in the flow extraction for this step because the oxidizable phase is often complex and the extraction temperature achievable is not high enough for rapid dissolution of organic matter in this phase. The concentration of some elements remained well above the baseline when the extraction (Step IV) was discontinued. This also suggests an additional reason

Table 4. Comparison of analytical results for batch and flow sequential extraction methods of Pb for soil samples ($\text{mg kg}^{-1} \pm \text{s.d.}$, $n=2$).

Sample	Method	Step I	Step II	Step III	Step IV	Residue	Sum of fractions	Total
Control C1	Flow	0.11 ± 0.00	0.06 ± 0.01	11.7 ± 3.9	0.87 ± 0.25	8.77 ± 1.06	21.54 ± 3.05	20.8 ± 2.9
	Batch	0.19 ± 0.06	0.99 ± 0.17	7.44 ± 0.5	1.23 ± 0.09	4.6 ± 0.15	14.45 ± 0.30	
Soil S1	Flow	0.16 ± 0.01	0.06 ± 0.01	41.6 ± 3.1	0.78 ± 0.11	19.53 ± 3.04	62.16 ± 0.15	69.9 ± 9.0
	Batch	0.27 ± 0.07	2.21 ± 0.38	21.4 ± 1.1	5.42 ± 0.17	14.15 ± 1.43	43.36 ± 0.90	
Soil S2	Flow	0.14 ± 0.05	0.71 ± 0.10	96.8 ± 1.2	1.68 ± 0.53	11.23 ± 2.72	110.54 ± 2.19	99.2 ± 8.5
	Batch	0.25 ± 0.08	3.01 ± 0.22	54.0 ± 3.1	11.67 ± 0.29	7.30 ± 0.10	76.22 ± 1.60	
Soil S3	Flow	0.19 ± 0.10	1.73 ± 0.07	124.0 ± 0.1	1.99 ± 0.42	17.42 ± 2.86	145.29 ± 3.90	143.0 ± 2.1
	Batch	0.45 ± 0.04	3.52 ± 0.15	78.0 ± 0.2	15.89 ± 0.98	10.60 ± 0.20	108.46 ± 0.52	
Soil S4	Flow	0.03 ± 0.01	3.52 ± 0.27	229.5 ± 0.3	4.12 ± 0.09	21.81 ± 2.50	259.00 ± 2.95	246.6 ± 6.7
	Batch	0.19 ± 0.04	4.78 ± 0.83	131.2 ± 8.8	25.9 ± 0.87	18.70 ± 2.90	180.86 ± 4.70	

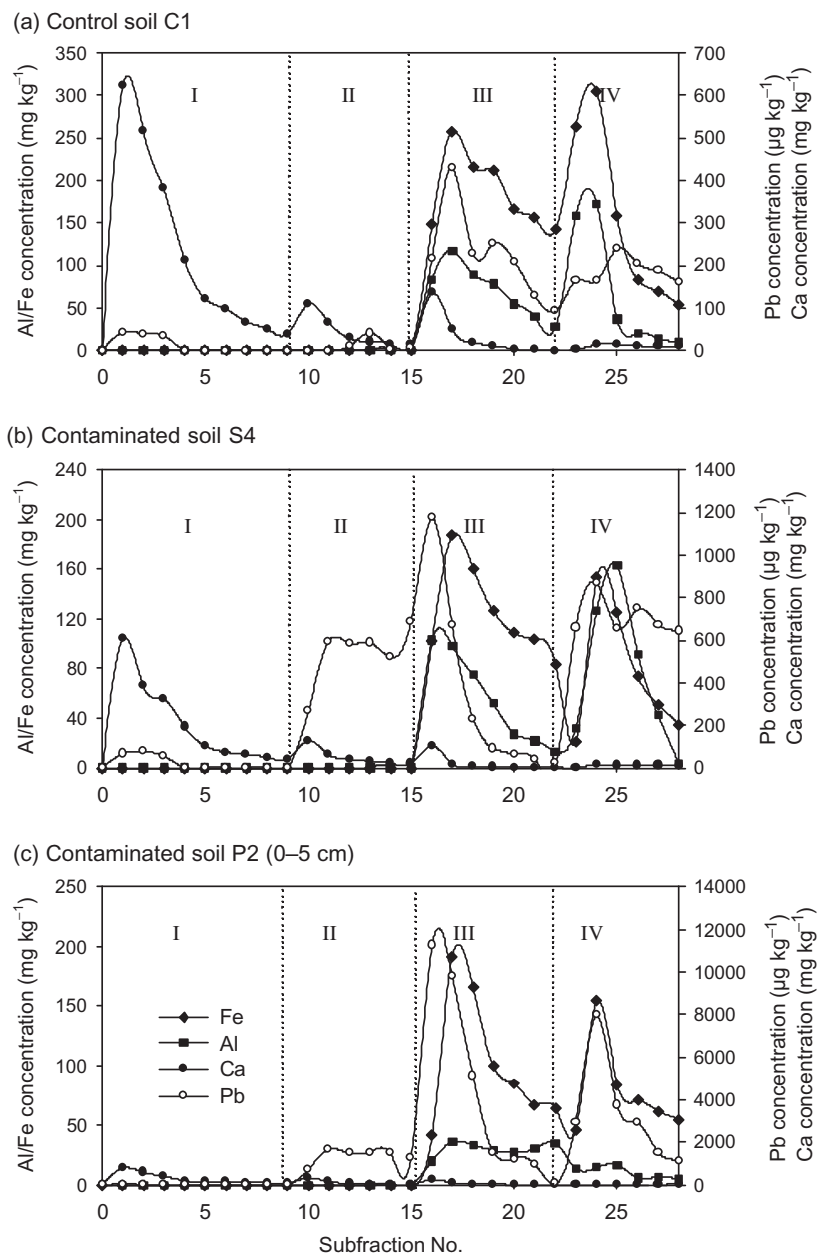


Figure 2. Extractograms obtained using the continuous-flow method for (a) control C1, (b) contaminated soil S4, and (c) contaminated soil P2 (0–5 cm). For purposes of clarity, Pb concentrations in fraction III have been scaled down by factors of 10 (C1 and P2) or 100 (S4).

why the amounts of Pb extracted in this step in the flow system are lower than those obtained in the batch system (table 4), with some of Pb in effect being carried over to the residual phase. The mean proportions of Pb present in individual fractions obtained from the both batch and flow extraction systems are shown in figure 3.

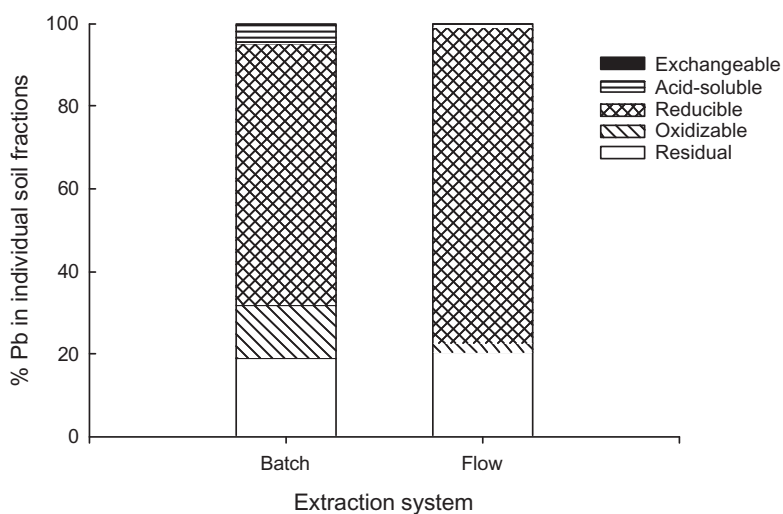


Figure 3. A comparison of mean fractional distributions of Pb in soils as determined by batch and continuous-flow methods.

Table 5. The distribution of contaminant Pb determined using the flow sequential extraction system.

Sample	Contaminant Pb ^a (mg kg ⁻¹)					Sum
	Step I	Step II	Step III	Step IV	Residue	
Soil S1	0.05	0.00	29.86	-0.09	10.76	40.85
Soil S2	0.03	0.65	85.05	0.81	2.46	89.00
Soil S3	0.08	1.67	112.26	1.12	8.65	123.78
Soil S4	-0.08	3.46	217.77	3.25	13.04	237.44
Mean %	0.005	0.88	87.89	0.74	10.44	
Control C1 %	0.51	0.28	54.41	4.04	40.75	

^a Pb concentrations in fractions of control C1 have been subtracted.

Although clearly there are differences between the two systems, in both systems the highest proportion of Pb was found in the reducible fraction (60–80%), followed by the residual (10–40%), organic/sulphide bound (1–15%), acid-soluble (0.8%) and exchangeable (0.005%) fractions. However, for the following parts of this study, only the flow system has been used. This system was selected because of advantages in reducing soil loss, potential contamination and readsorption phenomena, and providing better overall Pb recoveries.

3.3 Examination of anthropogenic Pb in the soil using the flow system

When anthropogenic Pb is deposited and incorporated into the soil, it can be distributed and fixed by different soil phases [19]. Table 5 shows the differences in amounts of Pb (mg kg⁻¹) in individual fractions between the control and the contaminated samples (i.e. anthropogenic Pb) as determined using the flow extraction system. It can be seen that in the contaminated soils, the anthropogenic Pb is distributed between all the individual phases. However, the distribution is substantially

different to that of the native soil Pb found in the control soil. Considering each fraction, there are very small proportions of contaminant Pb in the exchangeable, acid soluble phases, and oxidizable phases; 0.005, 0.883 and 0.74% respectively. Most of the contaminant Pb appears in the reducible phases (88%), with an approximate 10% in the residual fraction. This result is in agreement with earlier reports that soil oxides are important scavengers of heavy metals in soils (e.g., [20]). However, previous studies, including soils with relatively high organic matter contents, have shown that in such soils, anthropogenic Pb may occur predominantly in the oxidisable fraction [21, 22].

The above results demonstrate considerable soil pollution with Pb in the vicinity of the smelter. Our sequential extraction data also agrees with some previous studies, which have measured metal concentrations of soils affected by smelters [23–25]. Such studies have suggested that sequential extraction investigations are good tools to distinguish between contaminated and native soils. The mineral phases that hold heavy metals appear to be significantly different in the native soils compared to contaminated soils. The typically lithogenic metals Fe, Al, Ca and Pb usually occur in uncontaminated soils predominantly in the most stable fractions. Lead of anthropogenic origin has considerably higher proportions in mobile fractions and correspondingly lower proportions in residual phases.

3.4 Lead fractionation in samples from different depths

Data on metal fractionation of soil at different soil depths is essential for considering the processes of metal transformation, mobility and bioavailability as well as the long-term risk assessment. Total Pb concentrations in different layers of polluted soils have been measured and monitored previously [23, 24]. These studies found that Pb fractionation differed between topsoils and subsoils. Mobile Pb (exchangeable and acid soluble fractions) was high in topsoils and much lower in subsoils.

In this present study, in order to assess the vertical extent of soil contamination, topsoil and subsoil concentrations of Pb were compared using the flow sequential extraction technique (table 6). In all three profiles sampled, at a distance of 0.2 km from the emission point source, the highest concentrations of Pb were found in the topsoils, ranging from 350–450 mg kg⁻¹ (table 6). However, Pb concentrations in the subsurface layers (5–10 cm and 20–30 cm) were much lower and differed from one point to another. The concentrations of Pb at a depth of 30 cm are the lowest and similar to background concentrations (ca 10–15 mg kg⁻¹). This indicates that the Pb of anthropogenic origin showed high accumulations at the soil surface and only moves slowly downward through the soil profile. The Pb fractionation data for the different depth samples are summarized in table 6. The results demonstrate that there are significant increases of anthropogenic Pb (mg kg⁻¹) in topsoil samples found in the first two most mobile fractions; the exchangeable and acid-soluble fractions. However, most anthropogenic Pb was present in the reducible fraction due to the ability of soil oxides (Fe/Al) to fix Pb. The enhancement of the available/mobile pool in the topsoil is probably responsible for the limited movement of Pb down into the deeper layers. However, most of the Pb leached from the topsoil appears to be fixed by soil oxides in the 5–10 cm layer, limiting any further movement to deeper layers. These results are similar to those reported in many previous studies [23, 24, 26]. For example, Ettler *et al.* [26] have estimated downward penetration rates of between

Table 6. Fractionation of Pb in soil profiles ($\text{mg kg}^{-1} \pm \text{s.d.}$, $n=2$).

Sample	Depth (cm)	Step I	Step II	Step III	Step IV	Residue	Sum of fractions	Total
P1	0-5	0.040 ± 0.002 (0.012)	8.36 ± 0.20 (2.63)	313.19 ± 13.26 (86.50)	2.29 ± 0.26 (0.63)	38.02 ± 10.75 (10.50)	361.8 ± 5.3	337 ± 25
	5-10	0.009 ± 0.002 (0.002)	0.73 ± 0.03 (2.29)	18.47 ± 0.12 (57.95)	1.76 ± 0.08 (5.62)	10.89 ± 1.87 (34.17)	31.87 ± 1.8	35 ± 2
	20-30	0.009 ± 0.001 (0.073)	0.11 ± 0.03 (0.903)	9.78 ± 0.56 (80.29)	0.41 ± 0.15 (3.36)	1.95 ± 0.01 (16.00)	12.18 ± 0.79	15 ± 0.5
P2	0-5	0.041 ± 0.002 (0.009)	8.02 ± 0.03 (1.809)	391.57 ± 17.81 (88.38)	20.85 ± 6.47 (4.70)	22.85 ± 5.78 (5.15)	443.3 ± 5.5	376 ± 55
	5-10	0.031 ± 0.006 (0.110)	0.63 ± 0.04 (2.26)	13.25 ± 1.45 (47.57)	1.70 ± 0.06 (6.10)	12.24 ± 1.29 (43.94)	27.85 ± 2.55	31 ± 4
	20-30	0.003 ± 0.001 (0.13)	0.07 ± 0.004 (3.07)	1.76 ± 0.01 (77.19)	0.08 ± 0.01 (3.50)	0.35 ± 0.00 (15.35)	2.28 ± 0.07	3.7 ± 0.2
P3	0-5	0.028 ± 0.006 (0.006)	6.04 ± 0.02 (1.47)	366.64 ± 11.69 (89.50)	16.29 ± 0.01 (3.97)	20.64 ± 1.23 (5.03)	409.3 ± 10.9	420 ± 45
	5-10	0.030 ± 0.001 (0.055)	0.71 ± 0.05 (1.32)	37.77 ± 0.10 (70.18)	4.18 ± 1.04 (7.76)	11.13 ± 0.18 (20.68)	53.82 ± 0.52	69 ± 1
	20-30	0.005 ± 0.001 (0.030)	0.071 ± 0.002 (0.42)	14.16 ± 0.89 (87.46)	0.18 ± 0.05 (1.11)	1.78 ± 0.30 (10.99)	16.19 ± 0.80	11 ± 0.07

Figures in parenthesis show % of total concentration in each fraction.

0.3 and 0.36 cm y^{-1} for Pb in soils surrounding a Pb smelter. On this basis, since the smelter in the current study has been operating for only 10 years, it is probably not surprising that Pb movement downwards appears to be somewhat limited.

3.5 Chemical associations of Pb and major elements (Fe, Al and Ca) in soil fractions using extractograms

One of the problems when using batch sequential extraction to study chemical associations is the non-absolute evidence of elemental associations. Elements extracted in the same extraction step have been used as evidence of their chemical associations. However, this may not always be absolutely correct, because elements extracted in the same extraction step may not have dissolved simultaneously but at different times during the extraction step. For the continuous-flow sequential extraction, the extractants were continuously and sequentially pumped through the chamber containing the soil samples. The extracts were collected at set volume intervals (subfractions) with time until each extraction step was completed, as indicated by the extraction profiles reaching baseline. The graphical plot of metal concentrations in subfractions vs. subfraction number is called an extractogram. Using overlayed extractograms for different elements, and by comparing detailed peak profiles and peak shapes, it is possible to evaluate the elemental associations in the various extracted solid phases [9, 27]. If two elements are closely associated in a particular geochemical phase, they should show similar peak shapes, and a high correlation between amounts extracted in each subfraction of the particular phase. Metals, which are not closely associated, but are leached in the same extraction step, will show peak profiles, which do not coincide with time during the extraction. As a result, the extractogram enables a detailed examination of possible associations between elements, and therefore provides an insight into the sources of elements present in each fraction.

The distribution and chemical associations of Pb and major elements in soil (Fe, Al and Ca) for a control and contaminated soils (topsoils) can be evaluated using the extractograms shown in figure 2. Variations in the Pb extraction profiles between the control and contaminated soils are most likely due to the difference between the lithogenic and anthropogenic origin of Pb particularly in the reducible phase. The extractograms for the exchangeable phase show little difference in extraction profiles of Pb between the contaminated and control soils. In the exchangeable fraction, very small amounts of Pb were found and extracted along with Ca extracted in the early stages.

Some previous studies of the Pb smelting process have reported that the Pb emission from smelters is predominantly in the form of Pb sulphates (PbSO_4 , anglesite) [28, 29], or as a combination of Pb sulphates and chlorides (PbCl_2 , cotunnite) [25]. Although PbSO_4 is less soluble than PbCl_2 , both compounds will dissolve in the soil, and therefore the very small amounts of Pb in the exchangeable fraction found in this work may be derived from these sources. The more soluble PbCl_2 in particular could also be responsible for the slight downward movement of Pb observed in this study. Li and Thornton [29] also suggested that the large amounts of Ca (55%) present in the exchangeable fraction were due to the possible presence of CaSO_4 in the area surrounding the smelter. However, they could also be due to Ca adsorbed by the exchange complex.

In the acid soluble phase, it is difficult to see the profile of Pb present in the control soil since Pb in this particular fraction was found at very low concentrations. However, the Pb profile seems to be lagging behind the Ca profile in both the control and contaminated samples. The small amounts of Ca extracted most probably results from the low contents of CaCO_3 in our soil samples. The concentrations of Pb found in the contaminated soils in the acid soluble step remained relatively high with no sign of approaching the baseline. These continuous leaching signals are possibly a contribution from Pb sorbed on the surface of soil oxides. Dissolution of Fe oxide was negligible as no Fe peak was observed in this particular step.

In the reducible and oxidizable steps, Fe and Al were found in significant amounts. The predominant fraction for Pb appeared in the reducible fraction. However, there are some significant visual differences observed in the extractograms between the control and contaminated soils. It can be seen in the extractogram of the control soil (figure 2a) that Pb does appear to dissolve at the same time as Fe and Al in the reducible fraction (Step III). This indicates a close association between Pb and soil oxides. In contrast, for the contaminated soils, the initial Pb peak was found to rise rapidly in the early part of this stage, and preceded the bulk of the Fe and Al dissolution. Data obtained using batch methods are unable to provide this type of information.

On the basis of the above patterns observed in the extractograms, it could be concluded that Pb was predominantly absorbed on the Fe/Al oxide surfaces, indicating an anthropogenic origin. The results also suggest that Fe/Al oxides are the major components of importance in fixing heavy metals in the soils at this contaminated site.

In the oxidizable fractions, the extraction step could not be carried out to completion as discussed previously. However enough data was produced to consider the chemical associations in this step. The extractograms of Pb do not show up as well-defined peaks decreasing to the baseline by the end of the fraction, and there is no clear correlation of the Pb extractograms with those Fe, Al and Ca.

The visual interpretation of elemental associations using the extractogram is strongly supported by examination of the extraction data using plots of mole ratios of Pb/Fe in the reducible phase. The mole ratio of Pb/Fe in each subfraction was plotted against subfraction number for this particular phase as shown in figure 4. It can be seen that high ratios of Pb/Fe were found in the early subfractions in contaminated soils and correspond to Pb adsorbed on the Fe oxide surfaces. According to the plots of the Pb/Fe mole ratios of the contaminated soils, the Pb/Fe mole ratios decreased with subfraction number and approached a constant value. The more highly contaminated soils show higher Pb/Fe mole ratios in the early subfractions. This mole ratio plot can be used as a tool for identification of anthropogenic origin and degree of contamination.

4. Conclusions

A continuous-flow extraction procedure was applied to contaminated soils from an area adjacent to a Pb smelter. The results obtained from this study demonstrate that the flow system was an effective and accurate method for fractionating soil Pb. The sum of Pb in all subfractions obtained using this method gave good recoveries when compared with results of total concentration obtained from total digestion.

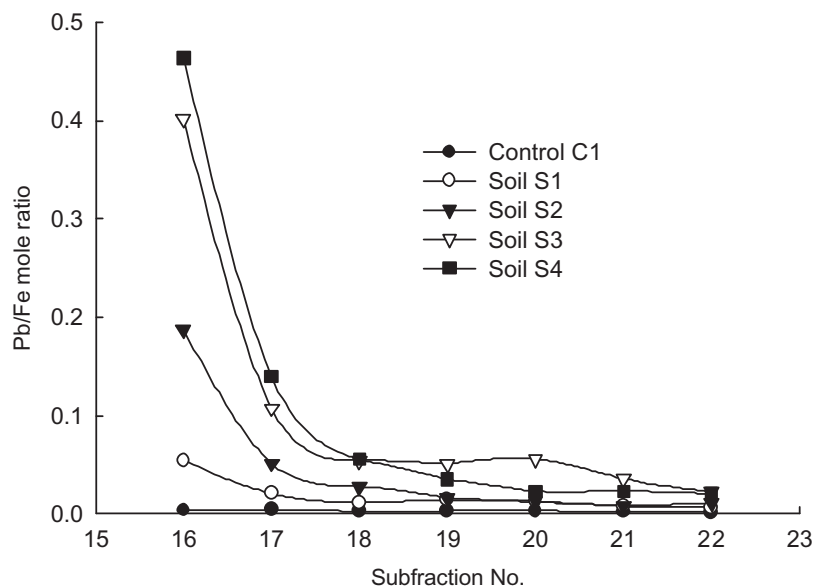


Figure 4. Pb/Fe mole ratio plots for subfractions in the reducible phases of the control and contaminated soils.

In addition, the continuous-flow system eliminates some tedious procedures, such as centrifugation and manual filtration that are required for the batch method. However, it must be recognized that the results obtained using the continuous-flow system, in terms of Pb distribution between fractions, are likely to differ to some extent from those obtained using conventional batch techniques. The reasons for this have been fully discussed above. For the soil samples examined in this study, Pb was predominantly present in the reducible and residual phases. The most predominant fractions for Fe and Al are the residual phases, followed by the reducible phases. In contrast, most Ca is in the exchangeable and residual phases.

An additional advantage of the flow system is the detailed information obtained from the extractogram. Detailed investigations using extractograms, particularly for inter-element comparisons, can clearly provide useful information not possible with the batch technique. The flow system has a high potential for evaluating elemental associations and the modes of occurrence of Pb in soil samples. The fractionation profiles/extractograms of Pb were found to depend strongly on the metal origin. For contaminated soils in this study, the extractograms have shown that Pb was predominantly adsorbed on soil oxide surfaces, especially in topsoil samples, indicating anthropogenic origin. The visual interpretation of Pb adsorption on the surface using extractograms is strongly supported by an examination of the Pb/Fe mole ratio plots. Total concentrations of anthropogenic Pb were much higher in topsoils than in subsoils. However, enhancement of Pb in the most available/mobile fractions (exchangeable and acid soluble) in the topsoil (0–5 cm) had resulted in a limited movement of Pb into the underlying soil (5–10 cm). There was no further detectable movement of Pb below this layer.

Acknowledgements

The authors would like to gratefully thank the Royal Golden Jubilee Grant and the Thailand Research Fund for funding this project, and the Postgraduate Education and Research Program in Chemistry (PERCH) for partial support.

References

- [1] R.L. Chaney, J.A. Ryan. *Risk Based Standards for As, Pb, and Cd in Urban Soils*, p. 25, DECHEMA, Frankfurt, Germany (1994).
- [2] M.J. McLaughlin, B.A. Zarcinas, D.P. Stevens, N. Cook. *Commun. Soil. Sci. Plant Anal.*, **31**, 1661 (2000).
- [3] A.V. Filgueiras, I. Lavilla, C. Bendicho. *J. Environ. Monit.*, **4**, 823 (2002).
- [4] A.K. Das, R. Chakraborty, M.L. Cervara, M. de la Guardia. *Talanta*, **42**, 1007 (1995).
- [5] Z. Li, R.G. McLaren, A.K. Metherell. *Aust. J. Soil Res.*, **39**, 951 (2001).
- [6] J. Shiowatana, N. Tantidanai, S. Nookabkaew, D. Nacapricha. *J. Environ. Qual.*, **30**, 1195 (2001).
- [7] J. Shiowatana, N. Tantidanai, S. Nookabkaew, D. Nacapricha. *Environ. Inter.*, **26**, 381 (2001).
- [8] R. Chomchoei, J. Shiowatana, P. Pongsakul. *Anal. Chim. Acta*, **472**, 147 (2002).
- [9] D. Hinsin, L. Pdungsap, J. Shiowatana. *Talanta*, **58**, 1365 (2002).
- [10] L.C. Blakemore, P.L. Searle, B.K. Daly. *Methods for Chemical Analysis of Soils*, New Zealand Soil Bureau, Wellington (1987).
- [11] J.K. Singer, J.B. Anderson, M.T. Ledbetter, I.N. McCave, K.P.N. Jones, R.J. Wright. *Sediment. Petrol.*, **58**, 534 (1988).
- [12] B. Kovács, J. Prokisch, Z. Györi, A.B. Kovács, A.J. Palencsár. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, **31**, 1949 (2000).
- [13] A. Tessier, P.G.C. Campbell, M. Bisson. *Anal. Chem.*, **51**, 844 (1979).
- [14] C.M. Davidson, P.C.S. Ferreira, A.M. Ure. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **363**, 446 (1999).
- [15] C.W. Gray, R.G. McLaren, A.H.C. Roberts, L.M. Condon. *Aust. J. Soil Res.*, **36**, 199 (1998).
- [16] D. Singh, R.G. McLaren, K.C. Cameron. *Aust. J. Soil Res.*, **35**, 1253 (1997).
- [17] H. Hödrejör, A. Vaarmann. *Anal. Chim. Acta*, **396**, 293 (1999).
- [18] Y.K. Soon, S. Abboud. In *Soil Sampling and Methods of Analysis*, M.R. Carter (Ed.), pp. 101–108, Lewis Publishers, Boca Raton (1993).
- [19] R.G. McLaren, K.C. Cameron. *Soil Science. An Introduction to the Properties and Management of New Zealand Soils*, pp. 237–247, Oxford University Press, Auckland, New Zealand (1996).
- [20] R.M. McKenzie. *Aust. J. Soil Res.*, **18**, 61 (1980).
- [21] J.R. Bacon, I.J. Hewitt, P. Cooper. *J. Environ. Monit.*, **6**, 766 (2004).
- [22] J.R. Bacon, I.J. Hewitt, P. Cooper. *Sci. Total Environ.*, **337**, 191 (2005).
- [23] J.F. Verner, M.H. Ramsey. *Appl. Geochem.*, **11**, 11 (1996).
- [24] A. Karczewska. *Appl. Geochem.*, **11**, 35 (1996).
- [25] V. Ettler, A. Vaněk, M. Mihaljevič, P. Bezdička. *Chemosphere*, **58**, 1449 (2005).
- [26] V. Ettler, M. Mihaljevič, M. Komárek. *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**, 311 (2004).
- [27] J. Shiowatana, R.G. McLaren, N. Chanmekha, A. Samphao. *J. Environ. Qual.*, **30**, 1940 (2001).
- [28] D.J. Oyedele, I.B. Obioh, J.A. Adejumo, A.F. Oluwole, P.O. Aina, O.I. Asubiojo. *Sci. Total Environ.*, **172**, 189 (1995).
- [29] X. Li, I. Thornton. *Appl. Geochem.*, **16**, 1693 (2001).

Evaluation of Distribution and Chemical Associations between Cobalt and Manganese in Soils by Continuous-Flow Sequential Extraction

N. Tongtavee and J. Shiowatana

Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University,
Bangkok, Thailand

R. G. McLaren

Soil and Physical Sciences Group, Agriculture and Life Sciences
Division, Lincoln University, Canterbury, New Zealand

J. Buanuam

Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University,
Bangkok, Thailand

Abstract: In this study, a strong association between cobalt (Co) and manganese (Mn) in different geochemical soil phases (fractions) was evaluated using a continuous-flow sequential extraction technique employing a modified Tessier extraction scheme. With the flow system, detailed extraction profiles of Co and Mn in soils could be obtained by plotting concentrations of the elements extracted against extraction time (plots referred to as extractograms). Extractograms may be used as an indicator of whether the elements dissolving in the same extraction step are closely associated, or are merely extractable with the same reagent. From the soil samples studied, the coincidence of Co and Mn peaks seems to indicate a close association of these elements in the exchangeable, reducible, and oxidizable fractions. Analysis of flow extraction data suggested that the association between Co and Fe is not as strong as reported in previous studies based on the statistical analysis of batch fractionation data.

Keywords: Manganese oxides, flow, sequential extraction, fractionation

Received 22 February 2004, Accepted 6 April 2005

Address correspondence to J. Shiowatana, Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road, Bangkok 10400, Thailand. E-mail: scysw@mahidol.ac.th

INTRODUCTION

Most micronutrients in the soil have been inherited from soil parent materials, in which the micronutrients occur in the crystal structure of various primary and secondary minerals. During soil development, micronutrients are released as soluble ions, which can either be lost from the soil by leaching, be reincorporated into new secondary minerals, or react in a variety of ways with other soils constituents (McLaren and Cameron, 1996). Cobalt (Co), although not essential for all plants, is required for the fixation of nitrogen by rhizobium bacteria. It is also essential in the diets of ruminant animals for the formation of vitamin B₁₂. Deficiency results in anemia, loss of appetite, and poor growth rates. Deficiencies are likely to occur in cows and sheep if pasture Co levels are less than 0.08 mg Co/kg dry matter (McLaren and Cameron, 1996). Soil Co availability to plants is very dependent on both soil pH and soil moisture status (McLaren, 2002). It has also been demonstrated that soil Co reactivity and solubility are also significantly influenced by soil manganese (Mn) status through the strong fixing ability and redox reactions of Mn oxides (Taylor et al., 1964; McKenzie, 1969; Taylor and McKenzie, 1966). In a soil fractionation study, Li et al. (2001b) have also shown a significant correlation between soil Co and Mn. This study indicated the presence of substantial amounts of Co and Mn in soil iron (Fe) oxide fractions, and multiple regression analysis suggested that Fe and Mn oxides have a considerable influence on the distribution of Co in soils. The chemistry of Co, and its availability to plants, therefore appears to be dominated by its association with Mn oxide minerals. Understanding the relationship between these two elements could be important for the management of pastures that are deficient in Co for grazing animals. Indeed, some previous studies have attempted to investigate the importance of the sorption of Co by Mn minerals in soils in relation to plant Co uptake (Adams et al., 1969; Tiller et al., 1969).

Sequential extraction using batch methods to fractionate metals in solid materials has become widely used and well recognized and is a useful technique for determining chemical phases of metals in soil materials. Elements extracted in the same extraction steps have been used as evidence of their chemical association. However, this may not always be absolutely correct, because elements extracted from the same phase may not have dissolved simultaneously but at different times during the same extraction step.

In previous work, a continuous-flow system was developed for the sequential extraction of soils (Shiowatana et al., 2001a, 2001b), which has shown many advantages over the batch system including speed, ease of operation, less vulnerability to variation in extraction conditions, high extraction efficiency and freedom from operational contamination. The flow system has been proven to reduce the problem of metal readsorption and redistribution during extraction in comparison with the batch system (Chomchoei et al., 2002). Extractograms, i.e., plots of concentration of element extracted

vs. subfraction number (in effect time) obtained using the system also provides kinetic information and information on solid-phase elemental associations.

The aim of the present study is to use the continuous-flow sequential extraction system to investigate the elemental associations between Co, Mn, and Fe in a range of soil samples.

MATERIALS AND METHODS

Soil Samples and Standard Reference Material

Four soil samples, from the study by Li et al. (2001b), differing substantially in Co and Mn status, and in chemical and physical properties, were selected for this study. The chemical properties of the experimental soils are given in Table 1. Soil samples were air-dried and ground to pass through a 2 mm stainless steel sieve, and were stored in a desiccator prior to laboratory analysis.

For the validation of the detection method and the extraction system, a standard reference material (SRM 2711) was also used. This material (particle size <74 μm) was a moderately contaminated soil from Montana in the United States.

Preparation of Standard Solutions and Glassware

The chemical reagents in this work were of analytical grade. Ultra-pure water from a MilliQ water purification unit (Millipore, Bedford, MA) was used

Table 1. Properties of the soils used for cobalt and manganese fractionation^a

	Soil			
	Waimakariri	Mangaotaki	Magaopiko	Makarewa
New Zealand classification ^b	Recent soil	Allophanic soil	Recent soil	Gley soil
Soil pH	5.61	4.92	4.97	4.95
Sand (%)	52.4	26.1	49.8	47.6
Silt (%)	33.1	48.9	40.2	42.6
Clay (%)	14.5	25.0	10.0	9.8
Org.C (%)	2.37	5.53	9.81	6.18
Total Fe (%)	2.08	2.44	3.04	4.08
Total Al (%)	1.16	2.28	6.92	3.22
Total Co (mg/kg)	6.09	6.37	7.57	14.0
Total Mn (mg/kg)	301	697	965	1030

^aData from Li et al. (2001a).

^bHewitt (1993).

throughout this work. All glassware used was cleaned and soaked in 10% HNO_3 and rinsed with ultra-pure water before use. Standard metal solutions (1000 mg/L) were purchased from Merck, (Darmstadt, Germany) or prepared in-house from pure metals. Working standard solutions were prepared by diluting the stock solution with ultrapure water or with extracting reagents before use.

Fractionation Scheme

The fractionation scheme used was slightly modified from the Tessier scheme (Tessier et al., 1979). The geochemical phases at each step are largely operationally defined by the reagents used as shown in Table 2. The phases extracted should be considered as nominal rather than absolute chemical fractions. All soil samples and SRM 2711 were fractionated using both the batch and the continuous-flow extraction systems.

Continuous-Flow Extraction System

The Extraction Chamber

An extraction chamber was designed to allow containment and stirring of a weighed sample of soil. Extractants are pumped sequentially through the chamber and leach metals from the targeted phases. The chambers and covers, as shown in Fig. 1, were constructed from borosilicate glass to have a capacity of approximately 10 mL. The outlet of the chamber was furnished with a filter [Whatman (Maidstone, U.K.) glass microfiber filter GF/B, 47-mm diameter, 1- μm particle retention] to allow dissolved matter to flow through. Extractant was pumped through the chamber using a peristaltic pump [Micro tube pump, MP-3 N, EYELA (Tokyo Iwakikai Co., Ltd.)] at varying flow rates using tygon tubing of 2.25 mm inner diameter. Heating of

Table 2. Sequential fractionation procedure for soil cobalt and manganese

Step	Nominal fraction	Extractant	Extraction conditions (Batch method)
I	Exchangeable	0.01 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	Shake 24 h, 25°C
II	Acid-soluble (specifically sorbed)	0.11 M CH_3COOH	Shake 16 h, 25°C
III	Reducible (Fe/Mn oxides)	0.1 M NH_2OH . HCl, pH 2	Shake 6 h, 96°C
IV	Oxidizable (Organic-bound)	30% H_2O_2 : 0.02 M HNO_3 (8:3 v/v)	Shake 5 h, 85°C
V	Residual	$\text{HNO}_3 + \text{HF}$	Microwave digestion

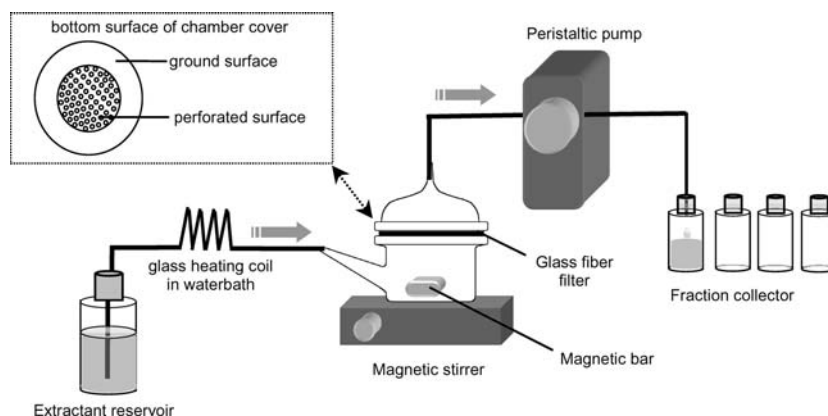


Figure 1. Continuous-flow extraction system (modified from Shiowatana et al., 2001b).

the extractants in Steps III and IV was carried out by passing the extractants through a glass heating coil approximately 120 cm in length, placed in a water bath. However, because of heat-loss problems, even when the heating coil was immersed in a thermostat water bath controlled at 95°C, the maximum temperatures achieved in the extraction chamber were between 80 and 85°C. Thus, for Step IV in particular, the temperatures used were somewhat lower than used for the batch system (Table 2).

Extraction Procedure

A weighed sample (0.25–1.00 g) was transferred to a clean extraction chamber together with a magnetic bar. A glass microfiber filter was then placed on the outlet followed by a silicone rubber gasket, and the chamber cover was securely clamped in position. The chamber was connected to the extractant reservoir and the collector vial using tygon tubing and placed on a magnetic stirrer. The magnetic stirrer and peristaltic pump were switched on to start the extraction. The extracting reagents were continuously and sequentially pumped through the chamber. The extracts passing through the membrane filter were collected in subfractions of 10–30 mL volume intervals until all four leaching steps were completed. For most soils examined, it was found that 120–180 mL were sufficient to leach the metals completely for each step.

Residue Digestion

Residue digestion was performed using a Milestone microwave digestion system model MLS-1200 Mega. This system was equipped with a MLS-1200 plus EM-45 Exhaust Module for operations with MDR Microwave

digestion Rotors and 240 control Terminal. Amounts of 0.1 g of dried soil sample or residue from the extraction chamber was transferred to each vessel together with 4 mL of HNO_3 (70%), 4 mL of H_2O_2 (30%), and 2 mL of HF (48%). The vessels were placed in a microwave digester and the digestion was carried out following the recommended heating program for 30 min. The clear digest solutions were cooled to room temperature, and were then brought up to a final volume of 50.00 mL in a volumetric flask. Total metal concentrations were determined by both a single digestion of non-fractionated soil and by summation of extractable metals in each subfraction of the exchangeable, acid-soluble, reducible, oxidizable, and residual fractions.

Analysis of Extracts and Digests

Cobalt concentrations in the extracts were determined using graphite furnace atomic absorption spectrophotometry (GFAAS). The GFAAS measurements were performed with a Perkin Elmer (Norwalk, CT) Analyst 100 equipped with a deuterium-arc background corrector and an HGA-800 heated graphite atomizer. The sample was introduced to the atomizer using an AS-72 auto-sampler. Flame atomic absorption (FAAS) for Mn and Fe was performed using a Perkin Elmer Model 3100 spectrometer equipped with deuterium background correction. Concentrations of metals were obtained by the standard matrix-matching calibration method. Working standard solutions were prepared in the same extracting reagent as the sample solutions to be measured.

RESULTS AND DISCUSSION

Distributions of Cobalt and Manganese in Soil Determined by Flow and Batch Systems

In order to evaluate the flow extraction system, both the batch and flow extraction systems were used for the same sets of samples. For examination of the accuracy and precision of the proposed flow system, SRM 2711 was analyzed and the results were compared with the certified values. The analytical results are shown in Table 3. It was found that both flow extraction and batch extraction methods gave good recoveries for the elements studied. This indicates that the extraction data obtained from the continuous-flow extraction system is reliable. Based on these findings, the four soil samples were then extracted to study the distributions and chemical association between Co, Mn, and Fe in soils.

Table 4 compares the distributions of Co, Mn, and Fe in soil samples using the flow system and a conventional batch method. In the proposed

Table 3. Comparison of analytical results for batch and flow sequential extraction methods for SRM 2711 (mg/kg $\pm$ s.d., $n = 2$)

Element	Method	Step I	Step II	Step III	Step IV	Residue	Sum of fractions	Total	Certified value
Co	Batch	$<0.1 \pm 0.00$	1.6 ± 0.00	1.7 ± 0.21	0.3 ± 0.00	4.1 ± 0.24	7.8 ± 0.14	7.6 ± 0.47	10.00^a
	Flow	$<0.1 \pm 0.00$	2.1 ± 0.10	0.8 ± 0.02	$<0.1 \pm 0.00$	3.0 ± 0.29	5.9 ± 0.15		
Mn	Batch	1.4 ± 0.10	239 ± 5	121 ± 13	21 ± 0.5	231 ± 22	613 ± 12	616 ± 19	638 ± 38
	Flow	2.4 ± 0.02	278 ± 2	101 ± 3	1.2 ± 0.32	201 ± 30	584 ± 18		
Fe	Batch	0.6 ± 0.21	7.8 ± 0.44	2532 ± 410	503 ± 35	18142 ± 498	21185 ± 546	26413 ± 453	28900 ± 600
	Flow	$<0.1 \pm 0.00$	285 ± 58	1854 ± 78	499 ± 69	19742 ± 193	22380 ± 765		

^aNon-certified value.

Table 4. Comparison of analytical results for batch and flow sequential extraction methods for soil samples (mg/kg $\pm$ s.d., $n = 2$)

Soil/element	Method	Step I	Step II	Step III	Step IV	Residue	Sum of fractions	Total
Soil 1								
Co	Batch	0.1 $\pm$ 0	0.6 $\pm$ 0	1.3 $\pm$ 0.03	0.2 $\pm$ 0.01	3.3 $\pm$ 0.24	5.4 $\pm$ 0.11	4.9 $\pm$ 0.31
	Flow	<0.1 $\pm$ 0	0.2 $\pm$ 0.12	1.3 $\pm$ 0.06	0.2 $\pm$ 0.02	2.3 $\pm$ 0.35	4.2 $\pm$ 0.15	
Mn	Batch	14.7 $\pm$ 0.13	37.3 $\pm$ 0.15	71 $\pm$ 3	11.7 $\pm$ 0.11	198 $\pm$ 7	333 $\pm$ 3	354 $\pm$ 5
	Flow	18.6 $\pm$ 0.48	20.5 $\pm$ 2.89	93 $\pm$ 3	14.7 $\pm$ 2.56	175 $\pm$ 22	322 $\pm$ 10	
Fe	Batch	0.8 $\pm$ 0	15.9 $\pm$ 3.47	3016 $\pm$ 30	991 $\pm$ 10	15390 $\pm$ 780	19414 $\pm$ 390	25918 $\pm$ 907
	Flow	<0.1 $\pm$ 0	<0.1 $\pm$ 0	1995 $\pm$ 333	756 $\pm$ 56	17984 $\pm$ 1357	20735 $\pm$ 807	
Soil 2								
Co	Batch	0.1 $\pm$ 0	0.3 $\pm$ 0.04	2.4 $\pm$ 0.02	0.3 $\pm$ 0	3.3 $\pm$ 0.09	6.4 $\pm$ 0.04	6.0 $\pm$ 0.30
	Flow	0.1 $\pm$ 0.03	0.1 $\pm$ 0.06	1.9 $\pm$ 0.03	0.3 $\pm$ 0.12	3.0 $\pm$ 0.07	5.3 $\pm$ 0.07	
Mn	Batch	94 $\pm$ <1	104 $\pm$ 14	298 $\pm$ 63	39.8 $\pm$ 0.42	269 $\pm$ 12	805 $\pm$ 30	974 $\pm$ 32
	Flow	105 $\pm$ 10	54 $\pm$ 13	411 $\pm$ 12	54 $\pm$ 15	292 $\pm$ 15	915 $\pm$ 13	
Fe	Batch	15.5 $\pm$ 0.63	13.1 $\pm$ 0.83	8080 $\pm$ 2173	5481 $\pm$ 257	17573 $\pm$ 2020	31163 $\pm$ 1332	33296 $\pm$ 3911
	Flow	<0.1 $\pm$ 0	<0.1 $\pm$ 0	2878 $\pm$ 537	1179 $\pm$ 112	25781 $\pm$ 3553	29840 $\pm$ 2076	
Soil 3								
Co	Batch	0.2 $\pm$ 0	0.5 $\pm$ 0.07	2.0 $\pm$ 0.11	0.4 $\pm$ 0.02	3.4 $\pm$ 2.81	6.4 $\pm$ 1.26	8.8 $\pm$ 1.51
	Flow	0.1 $\pm$ 0.04	<0.1 $\pm$ 0.03	1.4 $\pm$ 0.05	0.2 $\pm$ 0.03	5.5 $\pm$ 2.44	7.3 $\pm$ 1.09	
Mn	Batch	62 $\pm$ 1	83 $\pm$ 5	309 $\pm$ 23	23.7 $\pm$ 1.81	300 $\pm$ 4	778 $\pm$ 11	854 $\pm$ 31
	Flow	77 $\pm$ 2	41 $\pm$ 13	291 $\pm$ 3	31.6 $\pm$ 4.96	533 $\pm$ 16	974 $\pm$ 8	
Fe	Batch	9.9 $\pm$ 0.59	10.3 $\pm$ 0.44	4560 $\pm$ 1	1795 $\pm$ 111	23344 $\pm$ 988	29720 $\pm$ 445	38759 $\pm$ 1847
	Flow	<0.1 $\pm$ 0	<0.1 $\pm$ 0	2700 $\pm$ 90	815 $\pm$ 96	25410 $\pm$ 2159	28926 $\pm$ 2962	
Soil 4								
Co	Batch	0.1 $\pm$ 0	0.5 $\pm$ 0.07	2.3 $\pm$ 0.06	0.2 $\pm$ 0	3.3 $\pm$ 0.44	6.4 $\pm$ 0.20	6.4 $\pm$ 0.03
	Flow	0.2 $\pm$ 0.09	<0.1 $\pm$ 0.03	1.8 $\pm$ 0.22	0.4 $\pm$ 0.16	3.4 $\pm$ 0.35	5.8 $\pm$ 0.21	
Mn	Batch	68 $\pm$ 7	114 $\pm$ 14	406 $\pm$ 3	11.3 $\pm$ 0.49	258 $\pm$ 39	858 $\pm$ 18	719 $\pm$ 33
	Flow	73 $\pm$ 17	35 $\pm$ 3	498 $\pm$ 27	60 $\pm$ 22	201 $\pm$ 30	778 $\pm$ 18	
Fe	Batch	1.0 $\pm$ 2.99	3.4 $\pm$ 1.29	5212 $\pm$ 55	1602 $\pm$ 61	27123 $\pm$ 901	33940 $\pm$ 856	37150 $\pm$ 1850
	Flow	<0.1 $\pm$ 0	<0.1 $\pm$ 0	2212 $\pm$ 276	654 $\pm$ 45	27953 $\pm$ 1830	30819 $\pm$ 724	

flow system, the amount of each element in an individual phase was obtained by summation of the amounts in all subfractions of each step. For all samples analyzed, the concentrations of Co extracted were found to be slightly lower for the flow system compared to the batch method, probably because of limitations of analytical detection in each subfraction, especially in the exchangeable and acid-soluble phases. Cobalt in some subfractions was not detectable because of a dilution effect. However, it can be seen from the results in Table 4 that the summation of Co fractions was, on average, within $\pm 10\%$ of the single total Co determinations.

For Mn fractionation, the summation of Mn fractions obtained using the flow method showed reasonable agreement with those obtained using both the conventional batch method, and with the single total Mn determination. For Fe fractionations, the summation of Fe fractions was found to be consistently 20% lower than the total Fe determinations. These errors were probably caused by high concentrations of Fe in the subfractions. Each subfraction needed a considerable dilution prior to measurement by FAAS. In general, for all elements, the repeatability of the flow system appears to be as acceptable as that obtained using the batch system.

The elemental distributions between fractions on a proportional basis using both the batch and flow methods are shown in Fig. 2. Considerable variations in elemental distributions between the different soils, depending on the geochemical composition of each soil were observed. For most soils, very small proportions of Co were found in the first two fractions (exchangeable and acid-soluble) while the largest proportion in most soils was found in the residual fraction. For Mn, small amounts of Mn were found in the oxidizable (organic-bound) fraction, and the largest proportions were found in the residual and reducible (Fe-Mn oxides) fractions. For Soils 1, 2, and 4, the distributions of Co and Mn between fractions were similar for the batch and flow systems. However, there appeared to be some differences between the two methods for Soil 3. In this case, both the proportions of Co and Mn in the Fe-Mn oxides fraction were smaller, and those in the residual fraction were higher in the flow compared to the batch system. Overall the mean proportions of total soil Co present in different fractions decreased in the order: Residual > Fe-Mn oxides > organic-bound $\approx$ acid-soluble > exchangeable fractions. The proportional distribution of Mn in each fraction differed slightly from that for Co decreasing in the order: Residual > Fe-Mn oxides > acid-soluble $\approx$ exchangeable > organic-bound fractions.

For Fe fractionations, the highest proportions of Fe were found in the residual and in the Fe-Mn oxides fractions. For all samples, the distributions of Fe determined with the flow system appeared slightly different from those distributions determined using the batch system. The proportions of Fe determined in the Fe-Mn oxides and organic-bound fractions as determined using the flow system were smaller than those obtained using the batch system. The greatest proportion (>86%) of Fe extracted using the flow system was found in the residual fraction. This can be explained by the fact

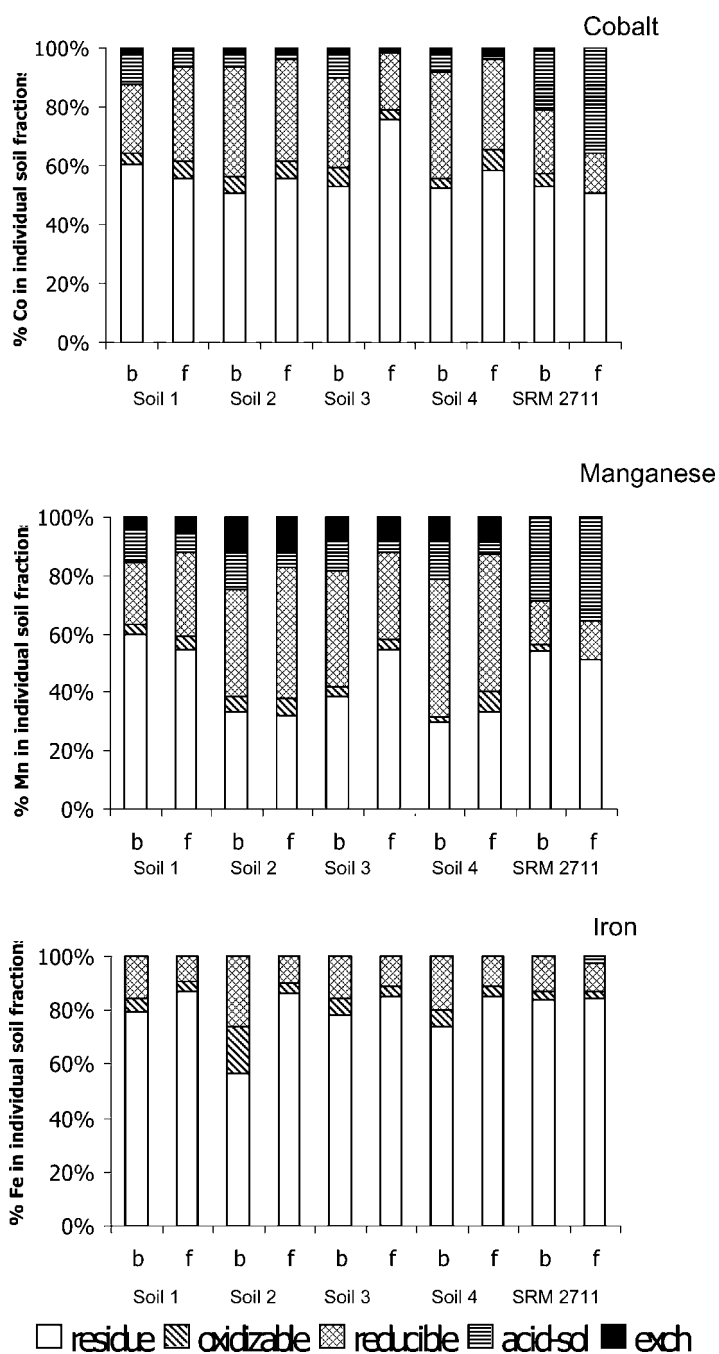


Figure 2. Comparison of elemental distribution (Co, Mn, Fe) in soils, on a proportional basis, as determined by batch (b) and continuous-flow (f) methods.

that the temperature in the heated Steps (III and IV) in the flow system was about 15–20°C lower than the temperatures achieved in the batch system. As discussed, this is due to heat loss during the transfer of the extractant from the heating bath to the extraction chamber. The temperature was probably not high enough to dissolve all of the crystalline iron oxide forms in the reducible fraction. Particularly in Soil 2, there was a large difference between the flow and batch systems in the proportion of Fe determined in the residual phase (Fig. 2). This was probably caused by a high content of silt and clay in this soil, resulting in low extraction efficiency for the flow system. On average, the distribution of Fe in each fraction decreased in the order: Residual $\gg$ Fe-Mn oxides > organic-bound $\gg$ acid-soluble $\approx$ exchangeable.

Evaluation of Elemental Distributions and Associations Using Extractograms

The distributions and chemical association between Co, Mn, and Fe in soils were evaluated employing the continuous-flow extraction system, in which the extractants were continuously and sequentially pumped through the chamber containing the soil sample. The extracts were collected at set volume intervals (subfractions) with time until each extraction step was completed, as indicated by the extraction profiles reaching baseline.

By using overlayed extractograms for different elements, and by comparing detailed peak profiles and peak shapes, it is possible to evaluate the elemental associations in the various extracted solid phases (Shiowatana et al., 2001c; Hinsin et al., 2002). If two elements are closely associated in a particular geochemical phase, it is expected that they should show similar peak shapes, and a high correlation between amounts extracted in each subfraction of the particular phase. These metals, which are not closely associated, but are leached in the same extraction step, will show peak profiles, which do not coincide with time during the extraction. As a result, correlations between concentrations of the different elements in the subfractions will be poor.

Elemental distributions and chemical associations of Co, Mn, and Fe for the four soils in the present study can be evaluated using the extractograms shown in Figs. 3a and 3b. Variations between the four sets of extractograms are due to the geochemical/mineralogical differences between the soils. The extractograms show some evidence for the association of Co and Mn. Although not explicit in the first two phases (exchangeable and surface adsorbed) since Co in particular was found in very small concentrations. However, for Soil 1, the extractograms clearly show a close association between Co and Mn in the acid-soluble phase (II). For all four samples, the extractograms show that the predominant phase (excluding the residual fraction) for both Co and Mn is the reducible phase (Fe-Mn oxides). In this phase, the strong coincidence of the peak shapes for Co and Mn indicate