



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การประเมินชีวภาพความพร้อมของโลหะหนักในหอยนางรมโดยวิธี
Physiologically Based Extraction Test และเทคนิค Inductively Coupled
Plasma Optical Emission Spectrometry

Evaluation of Bioaccessibility of Heavy Metals in Oysters using
Physiologically Based Extraction Test Followed by Inductively Coupled
Plasma Optical Emission Spectrometry Technique

ดร.มารีสา อินทวงศ์

สิงหาคม 2554

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การประเมินชีวภาพความพร้อมของโลหะหนักในหอยนางรมโดยวิธี
Physiologically Based Extraction Test และเทคนิค Inductively Coupled
Plasma Optical Emission Spectrometry

Evaluation of Bioaccessibility of Heavy Metals in Oysters using
Physiologically Based Extraction Test Followed by Inductively Coupled
Plasma Optical Emission Spectrometry Technique

ดร.มาริสา อินทวงศ์
สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี

ชุดโครงการ “การประเมินคุณภาพและความปลอดภัยตลอดห่วงโซ่
การผลิตหอยนางรม จ.สุราษฎร์ธานี”

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่ได้สนับสนุนทุนการวิจัยชุดโครงการ “การประเมินคุณภาพและความปลอดภัยตลอดห่วงโซ่การผลิตหอยนางรม จ.สุราษฎร์ธานี” เพื่อใช้ในการดำเนินงานวิจัยในโครงการ “การประเมินชีวภาพความพร้อมของโลหะหนักในหอยนางรม โดยวิธี Physiologically Based Extraction Test และเทคนิค Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry” โดยมีระยะเวลาของโครงการ 1 ปี 6 เดือน นับตั้งแต่วันที่ 1 กันยายน 2553 ถึงวันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2554 ในการดำเนินงานวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้รับการอนุเคราะห์ในด้านต่างๆ จากหน่วยงาน/บุคลากรดังต่อไปนี้ จึงขอขอบคุณไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

ฝ่ายพัฒนาและส่งเสริมอาชีพการประมง สำนักงานประมงจังหวัดสุราษฎร์ธานี สำหรับการให้ข้อมูลการเพาะเลี้ยงหอยนางรม

คุณอัญชลี ฤกษ์ดี และคุณทองแหวน คงปัญญา ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างหอยนางรม

ศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี สำหรับสถานที่การทำวิจัย เครื่องมือวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry และอุปกรณ์ต่างๆ

ผู้วิจัย

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ	RDG5220069
ชื่อโครงการ	การประเมินชีวภาพความพร้อมของโลหะหนักในหอยนางรมโดยวิธี Physiologically Based Extraction Test และเทคนิค Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry
ผู้วิจัย	ดร.มาริสา อินทวงศ์ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี
Email	marisa131@yahoo.com
ระยะเวลาโครงการ	1 กันยายน 2552 – 28 กุมภาพันธ์ 2554

การวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักทั้งหมดของ Cd, Pb และ Hg ในหอยนางรมด้วยเทคนิค ICP-OES ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเตรียมตัวอย่างโดยใช้ระบบการย่อยด้วยไมโครเวฟ ออกแบบการทดลองโดยใช้ Full factorial design และ Central point replication ตัวแปรที่ศึกษาได้แก่ องค์ประกอบของกรดที่ใช้ย่อย กำลังของคลื่นไมโครเวฟ และเวลาที่ใช้ย่อย พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ องค์ประกอบของกรดเป็น 8 mL 69% HNO₃; 2 mL 30% H₂O₂ กำลังของคลื่นไมโครเวฟ 1000 วัตต์ และใช้เวลาย่อย 15 นาที ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์พบว่า สำหรับ Hg ค่าร้อยละการกลับคืนของตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานมีค่า 91.7% และค่าร้อยละการกลับคืนของสารอ้างอิง SRM1566b Oyster Tissue เท่ากับ 98.0 และ 92.0% สำหรับ Cd และ Pb ตามลำดับ และค่า %RSD มีค่าต่ำกว่า 11% สำหรับทุกธาตุที่วิเคราะห์ ภายหลังจากการวิเคราะห์ปริมาณโลหะทั้งหมด ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการจำลองระบบการย่อยอาหาร เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณชีวภาพความพร้อมของโลหะหนักในตัวอย่างหอยนางรม พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ ใช้น้ำย่อยในกระเพาะอาหารที่มี pH เท่ากับ 1.5 ใช้น้ำย่อยในลำไส้เล็กที่มี pH เท่ากับ 7.0 และเวลาที่ใช้ในการย่อยของแต่ละเฟสเป็น 2 ชั่วโมง ปริมาณชีวภาพความพร้อมซึ่งคิดเทียบกับปริมาณโลหะหนักทั้งหมดของ Cd และ Pb ในตัวอย่างหอยนางรมมีค่าเท่ากับ 33.8-59.2% และ 28.3-51.4% ตามลำดับ สำหรับ Hg ไม่สามารถตรวจพบได้ (มีค่าน้อยกว่า 0.019 mg/kg น้ำหนักสด) เนื่องจากปริมาณ Hg ทั้งหมดที่มีอยู่ในหอยนางรมมีค่าน้อยมาก (มีค่าน้อยกว่า 0.110 mg/kg น้ำหนักสด)

คำสำคัญ ชีวภาพความพร้อม การจำลองระบบการย่อยอาหาร หอยนางรม โลหะหนัก
แคดเมียม ตะกั่ว ปรอท

ABSTRACT

Project Code RDG5220069

Project Title Evaluation of Bioaccessibility of Heavy Metals in Oysters using Physiologically Based Extraction Test Followed by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry Technique

Researcher Dr.Marisa Intawongse, Chemistry Department, Faculty of Sciences and Technology, Surattthani Rajabhat University

Email marisa131@yahoo.com

Project Period 1 September 2009 – 28 February 2011

A microwave digestion procedure was optimized for the determination of total Cd, Pb and Hg in Oyster tissue by ICP-OES. The optimization was carried out using a full factorial design and a central point replication involving the factors: components of the acid mixture, microwave power and radiation time. The optimized conditions were 8 mL of 69% HNO₃; 2 mL of 30% H₂O₂ , 1000 Watt and 15 min for the three factors, respectively. The recoveries of the spike (91.7% Hg) and the SRM1566b Oyster Tissue (98.0% Cd, 92.0% Pb) demonstrated the accuracy of the method. The relative standard deviations of the method were found below 11% for the three elements. After total metal determination, a physiologically based extraction test was optimized and applied for the determination of bioaccessible concentrations of the metals from oyster tissues. The optimized conditions were pH 1.5 in the gastric phase, pH 7.0 in the intestinal phase, and 2 hour digestion time of each phase. The bioaccessibilities (relative to respective total metal concentrations) of Cd and Pb in the oyster samples were 33.8-59.2% and 28.3-51.4%, respectively. The bioaccessibility of Hg was non-detectable (less than 0.019 mg/kg wet wt) due to the very low levels of Hg in the oyster samples (less than 0.110 mg/kg wet wt).

Keyword Bioaccessibility, *In vitro* gastrointestinal digestion, Oysters, Heavy metals, Cadmium, Lead, Mercury

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

สัญญาเลขที่ RDG5220069

โครงการวิจัย การประเมินชีวภาพความพร้อมของโลหะหนักในหอยนางรมโดยวิธี
Physiologically Based Extraction Test และเทคนิค Inductively Coupled
Plasma Optical Emission Spectrometry

ผู้วิจัย ดร.มาริสา อินทวงศ์ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี

โทรศัพท์ 083 273 5301 โทรสาร 077 355 664 Email marisa131@yahoo.com

ระยะเวลาดำเนินงานวิจัย 1 กันยายน 2552 – 28 กุมภาพันธ์ 2554

ความเข้มข้นทั้งหมด (Total Concentration) ของโลหะหนักแต่ละชนิดที่เจือปนในอาหาร เป็นปริมาณที่ถูกนำไปใช้พิจารณา เพื่อกำหนดเกณฑ์มาตรฐานสารปนเปื้อนในอาหารของหน่วยงานต่างๆ ที่เกี่ยวข้องทั้งในและต่างประเทศ รวมทั้งใช้ในการประเมินความเสี่ยงต่อมนุษย์จากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนโลหะหนัก ในปัจจุบันเป็นที่ทราบกันว่าปริมาณที่สะสมอยู่ไม่ใช่ทั้งหมดที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพและมีผลต่อมนุษย์และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ แต่สารมลพิษนี้ในปริมาณเพียงเศษส่วนหนึ่งเท่านั้นที่อาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตได้ ดังนั้นเศษส่วนของปริมาณโลหะที่ผ่านการย่อยและถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์ในร่างกายได้เทียบกับปริมาณของโลหะหนักทั้งหมดที่มีอยู่ในอาหาร เรียกว่าปริมาณชีวภาพความพร้อม (Bioaccessibility) ในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณชีวภาพความพร้อมของโลหะหนักที่ปนเปื้อนในหอยนางรม โดยวิธี Physiologically Based Extraction Test (PBET) ซึ่งทำได้โดยการจำลองกระบวนการที่เกิดขึ้นจริงในระบบการย่อยอาหาร เช่น องค์ประกอบทางเคมีของน้ำย่อย สภาวะความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะและลำไส้เล็ก การผสมของอาหารกับน้ำย่อย อุณหภูมิของร่างกาย ตลอดจนระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยในแต่ละขั้นตอน หลังจากนั้นจึงนำเอาของเหลวที่ได้จากการย่อยไปวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักที่สนใจศึกษา คือ แคดเมียม ตะกั่ว และปรอท โดยเทคนิค Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) ในการหาความเข้มข้นของโลหะหนักทั้งหมด (Total Metal Concentration) ในตัวอย่างหอยนางรม ได้เตรียมตัวอย่างโดยวิธีการย่อยด้วยระบบไมโครเวฟ แล้ววิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักโดยเทคนิค ICP-OES

ผลการศึกษาพบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยด้วยระบบไมโครเวฟ คือ องค์กรประกอบของกรดเป็น 8 mL 69% HNO_3 ; 2 mL 30% H_2O_2 กำลังของคลื่นไมโครเวฟ 1000 วัตต์ และใช้เวลาย่อย 15 นาที ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์พบว่า สำหรับ Hg ค่าร้อยละการกลับคืนของตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานมีค่า 91.7% และค่าร้อยละการกลับคืนของสารอ้างอิง SRM1566b Oyster Tissue เท่ากับ 98.0 และ 92.0% สำหรับ Cd และ Pb ตามลำดับ และค่า %RSD มีค่าต่ำกว่า 11% สำหรับทุกธาตุที่วิเคราะห์ ในส่วนของการศึกษาปริมาณชีวภาพ ความพร้อมของโลหะหนักในหอยนางรม พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ ใช้น้ำย่อยในกระเพาะอาหารที่มี pH เท่ากับ 1.5 ใช้น้ำย่อยในลำไส้เล็กที่มี pH เท่ากับ 7.0 และเวลาที่ใช้ในการย่อยของแต่ละเฟสเป็น 2 ชั่วโมง ปริมาณชีวภาพความพร้อมซึ่งคิดเทียบกับปริมาณโลหะหนักทั้งหมดของ Cd และ Pb ในตัวอย่างหอยนางรมมีค่าเท่ากับ 33.8-59.2% และ 28.3-51.4% ตามลำดับ สำหรับ Hg ไม่สามารถตรวจพบได้ (มีค่าน้อยกว่า 0.019 mg/kg น้ำหนักสด) เนื่องจากปริมาณ Hg ทั้งหมดที่มีอยู่ในหอยนางรมมีค่าน้อยมาก (มีค่าน้อยกว่า 0.110 mg/kg น้ำหนักสด)

ผลการศึกษานี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับผู้บริโภค และหน่วยงานด้านการดูแลสุขภาพแก่ผู้บริโภคที่เกี่ยวข้อง เช่น สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) กรมอนามัย และกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในด้านการนำข้อมูลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ในการติดตามเฝ้าระวังหรือประเมินความเสี่ยงต่อผู้บริโภค รวมทั้งสามารถนำเทคนิคการวิเคราะห์นี้ไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างอาหารประเภทอื่นๆ ในการติดตามเฝ้าระวังความปลอดภัยแก่ผู้บริโภค นอกจากนี้ ผลงานวิจัยนี้อาจนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานให้แก่กลุ่มนักวิจัยเชื่อมโยงในต่างประเทศ เพื่อใช้เป็นข้อมูลประกอบในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ให้เป็นวิธีมาตรฐานสากลต่อไป หน่วยงานหรือองค์กรที่มีการใช้ข้อมูลชีวภาพความพร้อม หรือมีการผลักดันให้มีการนำค่าชีวภาพความพร้อมของโลหะไปใช้ประโยชน์ในการประเมินอันตราย หรือความเสี่ยงต่อผู้บริโภค ได้แก่ The Bioaccessibility Research Group of Europe (BARGE), British Geological Survey (BGS), United Kingdom Environmental Agency (UK EA), Bioaccessibility Research Canada (BARC), United States Environmental Protection Agency (US EPA), National Institute of Public Health and the Environment (the Netherlands) เป็นต้น

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
ABSTRACT	ค
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	ง
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ณ
สารบัญรูป	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 การตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 หอยนางรม	4
2.1.1 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับหอยนางรม	4
2.1.2 การเลี้ยงหอยนางรมในจังหวัดสุราษฎร์ธานี	5
2.2 การปนเปื้อนของโลหะหนักในหอยนางรม	7
2.2.1 แคดเมียม	8
2.2.2 ตะกั่ว	9
2.2.3 ปรอท	10
2.3 การวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักโดยวิธีทางเคมี	11
2.4 การประเมินชีวภาพความพร้อมของโลหะหนัก	14
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	19
3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี	19
3.2 การเก็บและเตรียมตัวอย่างหอยนางรม	20
3.2.1 การเก็บตัวอย่างหอยนางรม	20
3.2.2 การเตรียมตัวอย่างหอยนางรม	21

3.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ระบบการย่อยด้วยไมโครเวฟ	21
3.4 การวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักโดยวิธี Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES)	24
3.5 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)	25
3.5.1 การหาความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีการวิเคราะห์	25
3.5.2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (LOD) และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจหาปริมาณได้ (LOQ)	26
3.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนการย่อยตัวอย่างด้วยระบบ PBET	26
3.7 การวิเคราะห์ปริมาณชีวภาพความพร้อมของโลหะหนักในตัวอย่างหอยนางรม	29
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล	31
4.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ระบบการย่อยด้วยไมโครเวฟ	31
4.2 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ (Method Validation)	33
4.2.1 การหาความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีการวิเคราะห์	33
4.2.2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (LOD) และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจหาปริมาณได้ (LOQ)	34
4.3 การวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักในตัวอย่างหอยนางรมโดยเทคนิค ICP-OES	35
4.4 การศึกษาปริมาณชีวภาพความพร้อมของโลหะหนักในตัวอย่างหอยนางรม	39
4.4.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนการย่อยตัวอย่างด้วยระบบ PBET	39
4.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณชีวภาพความพร้อมของโลหะหนักในตัวอย่างหอยนางรม	41
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	46
5.1 สรุปผลการวิจัย	46
5.2 ข้อเสนอแนะ	48
เอกสารอ้างอิง	49
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก.	54
ตาราง ผ-1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการจำลองการย่อยด้วยระบบ PBET	55

ตาราง ผ-2 ปริมาณ (ในหน่วย $\mu\text{g/g Wet Wt}$) และร้อยละชีวภาพความพร้อมของ แคดเมียม และตะกั่วในตัวอย่างหอยนางรม	56
ภาคผนวก ข. ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ และกิจกรรมที่ ดำเนินการมา และผลที่ได้รับตลอดโครงการ	58
ภาคผนวก ค. บทความวิชาการหรือการตีพิมพ์	59

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 รายการวัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้	19
3.2 พารามิเตอร์ที่ใช้ในศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยด้วยระบบไมโครเวฟ	23
3.3 การออกแบบการทดลองแบบ Two-Level Factorial Design และ Central Point Replication	23
3.4 โปรแกรมการให้ความร้อนของระบบการย่อยไมโครเวฟ	24
3.5 พารามิเตอร์ของเครื่อง ICP-OES ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนัก	25
3.6 พารามิเตอร์ที่ใช้ในศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการจำลองระบบการย่อยอาหาร	27
3.7 การออกแบบการทดลองแบบ Two-Level Factorial Design และ Central Point Replication	27
4.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมโดยการย่อยด้วยระบบไมโครเวฟ	32
4.2 ผลการวิเคราะห์ SRM 1566b (Oyster tissue) ซึ่งเตรียมตัวอย่างโดยการย่อยด้วยระบบ ไมโครเวฟ และวิเคราะห์หาปริมาณ Cd, Pb และ Hg ด้วยเทคนิค ICP-OES	33
4.3 ขีดจำกัดต่ำสุดของวิธีวิเคราะห์ (LOD และ LOQ) ของวิธีการย่อยตัวอย่างหอยนางรม ด้วยระบบไมโครเวฟและวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ICP-OES	34
4.4 ปริมาณโลหะหนักในตัวอย่างหอยนางรมจากพื้นที่เก็บตัวอย่างทั้ง 5 แหล่ง เทียบกับเกณฑ์มาตรฐาน	38
4.5 ร้อยละของปริมาณชีวภาพความพร้อมของ Cd ที่ได้จากการย่อยใน Gastric Phase และ Intestinal Phase ที่ค่า pH และเวลาต่างๆ	41

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 (ก) ลักษณะภายนอก และ (ข) ลักษณะภายในของหอยนางรม	4
2.2 ระบบการย่อยอาหารของคน	15
3.1 พื้นที่เก็บตัวอย่างหอยนางรมในแหล่งเพาะเลี้ยงหอยนางรมอำเภอบ้านดอน จ.สุราษฎร์ธานี	21
3.2 แผนผังขั้นตอนการจำลองระบบการย่อยอาหารในกระเพาะอาหาร (Gastric Digestion) และลำไส้เล็ก (Intestinal Digestion)	30
4.1 ปริมาณโลหะหนัก (Cd, Pb และ Hg) ในตัวอย่างหอยนางรมจากพื้นที่เก็บตัวอย่าง S1-S5 จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค ICP-OES	37
4.2 ปริมาณชีวภาพความพร้อมของ Cd และ Pb ในตัวอย่างหอยนางรม	44
4.3 ร้อยละของปริมาณชีวภาพความพร้อมของ Cd และ Pb ในตัวอย่างหอยนางรม	45

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันว่า ความเข้มข้นทั้งหมด (Total Concentration) ของสารมลพิษ (Pollutant) ชนิดใดชนิดหนึ่งที่สะสมอยู่ในสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำ อาหาร ดิน ตะกอน ปริมาณที่สะสมอยู่นี้ไม่ใช่ปริมาณทั้งหมดที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และมีผลต่อมนุษย์และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ แต่สารมลพิษนี้ในปริมาณเพียงเศษส่วนหนึ่งเท่านั้นที่อาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตได้ ปริมาณนี้เรียกว่า ชีวปริมาณออกฤทธิ์ (Bioavailability) (Kendall *et al.*, 2001) ในกรณีที่สารมลพิษ เช่น โลหะหนักที่สะสมอยู่ในหอยนางรม ถูกนำเข้าสู่ร่างกายโดยการกิน ผ่านเข้าสู่ระบบทางเดินอาหาร เศษส่วนของสารมลพิษที่ผ่านการย่อย และถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์ในร่างกายได้เทียบกับความเข้มข้นทั้งหมดที่มีอยู่ในอาหาร เรียกว่า ชีวภาพความพร้อม (Bioaccessibility) (Oomen *et al.*, 2002) ซึ่งค่านี้สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการประเมินความเสี่ยงต่อมนุษย์ จากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนสารมลพิษ วิธีการหนึ่งที่สามารถนำไปใช้ในการหาปริมาณชีวภาพความพร้อม ได้แก่ Physiologically Based Extraction Test (PBET) หรือ *In vitro* Gastrointestinal Extraction วิธีการนี้ทำได้โดยการจำลองกระบวนการที่เกิดขึ้นจริงในระบบการย่อยอาหาร เริ่มต้นตั้งแต่ในปาก กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก โดยการจำลองสภาวะต่างๆ ได้แก่ องค์ประกอบทางเคมีของน้ำย่อย สภาวะความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะและลำไส้เล็ก การผสมของอาหารกับน้ำย่อย สัดส่วนของอาหารต่อน้ำย่อย อุณหภูมิของร่างกาย ตลอดจนระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยในแต่ละขั้นตอนตั้งแต่ในปาก กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก หลังจากนั้นจึงนำเอาของเหลวที่ได้จากการย่อยไปวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษที่สนใจศึกษา อีกวิธีหนึ่งที่ได้มีการนำไปใช้ในการหาปริมาณชีวภาพความพร้อมคือ วิธีการใช้สัตว์ทดลอง (*In vivo* Approaches) แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสองวิธีนี้พบว่าการใช้สัตว์ทดลองมีข้อจำกัด เช่น การแปลผลข้อมูลอาจทำได้ไม่สมบูรณ์เนื่องจากความแตกต่างทางด้านสรีรระหว่างคนและสัตว์ที่นำมาทดลอง อีกทั้งยังต้องใช้ระยะเวลานานและมีความยุ่งยากมากกว่าในการทดลอง และมีค่าใช้จ่ายสูงโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อต้องการวิเคราะห์ตัวอย่างเป็นจำนวนมากๆ รวมทั้งการหลีกเลี่ยงการใช้และทารุณสัตว์ในการทดลอง

จังหวัดสุราษฎร์ธานีเป็นแหล่งผลิตหอยนางรมที่สำคัญ ประชาชนในท้องถิ่นนิยมบริโภคหอยนางรมกันอย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ตามหอยนางรมเหล่านี้อาจมีสารมลพิษปนเปื้อนอยู่ หากนำมาจากแหล่งเพาะเลี้ยงที่อยู่ใกล้กับแหล่งของสารมลพิษที่มีกิจกรรมต่างๆ เช่น การระบายน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม น้ำทิ้งจากชุมชน การใช้ปุ๋ยและสารเคมีในการเกษตร โลหะหนักที่ถูก

ปล่อยสู่บรรยากาศจากการเผาไหม้ของเครื่องยนต์ อาจตกลงมาในรูปอนุภาคขนาดเล็กหรือตกลงมาพร้อมกับฝนลงสู่แหล่งน้ำ โลหะหนักเป็นสารมลพิษที่ไม่สามารถย่อยสลายได้โดยแบคทีเรีย เมื่อปนเปื้อนอยู่ในแหล่งน้ำจึงมีแนวโน้มที่จะสะสมอยู่ในสัตว์น้ำและพืช (Bioaccumulation) ทำให้มีปริมาณการสะสมมากขึ้น ตามลำดับขั้นของห่วงโซ่อาหาร ผู้วิจัยจึงเห็นความสำคัญในประเมินความเป็นพิษของโลหะหนักในหอยนางรม เพื่อเป็นข้อมูลแก่ผู้บริโภค รวมทั้งหน่วยงานด้านการดูแลสุขภาพแก่ผู้บริโภคต่างๆที่เกี่ยวข้อง เช่น สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) กรมอนามัย และกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สามารถนำข้อมูลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ในการติดตามเฝ้าระวังหรือประเมินความเสี่ยง และสามารถนำเทคนิคในการวิเคราะห์ไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างอาหารประเภทอื่นๆ ในการติดตามเฝ้าระวังความปลอดภัยแก่ผู้บริโภค นอกจากนี้ข้อมูลที่จะได้จากการวิจัยครั้งนี้ อาจถูกนำไปใช้ประโยชน์เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานให้แก่กลุ่มนักวิจัยเชื่อมโยงในต่างประเทศเพื่อนำไปสู่การพัฒนานิเวศการวิเคราะห์ให้เป็นวิธีการมาตรฐานต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ชีวภาพความพร้อมของโลหะหนักในหอยนางรม โดยวิธี Physiologically Based Extraction Test และเทคนิค Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry
- 2) เพื่อประเมินชีวภาพความพร้อม (Bioaccessibility) ของโลหะหนักในหอยนางรม

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

- 1) ใช้ตัวอย่างหอยนางรมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใน จ.สุราษฎร์ธานี
- 2) โลหะหนักที่วิเคราะห์ ได้แก่ แคดเมียม ตะกั่ว และปรอท
- 3) ในการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักทั้งหมด เตรียมตัวอย่างโดยวิธี Microwave Digestion และในการศึกษาชีวภาพความพร้อม เตรียมตัวอย่างโดยวิธี Physiologically Based Extraction Test
- 4) เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียม ตะกั่ว ได้แก่ Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer
- 5) ในการวิเคราะห์ปริมาณปรอท ใช้เทคนิค Vapor Generation และตามด้วยการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer
- 6) เกณฑ์ที่ใช้เป็นตัวชี้วัดความเป็นพิษอิงตามเกณฑ์มาตรฐานระดับชาติ/นานาชาติ ดังนี้

- เกณฑ์มาตรฐานของสหรัฐอเมริกา (FDA U.S. Food and Drug Administration, 2001) ซึ่งกำหนดค่ามาตรฐานแคดเมียมและตะกั่วในหอยนางรม ไม่เกิน 4.0 และ 1.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (น้ำหนักสด) ตามลำดับ
- เกณฑ์มาตรฐานของประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 (พ.ศ. 2529) ซึ่งกำหนดค่าปรอทในอาหารที่มีสารปนเปื้อนไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (น้ำหนักสด)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

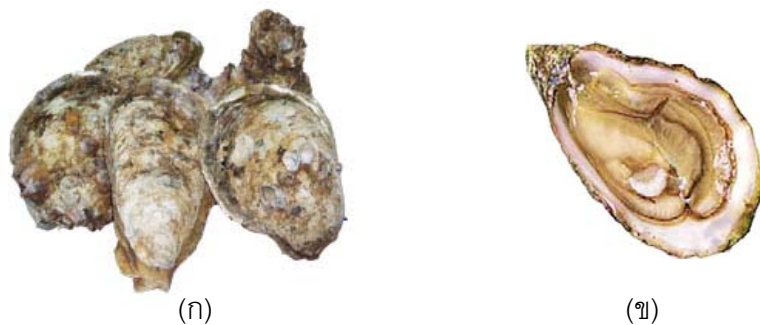
- 1) ผู้บริโภคและหน่วยงานด้านการดูแลสุขภาพแก่ผู้บริโภคต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) กรมอนามัย และกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สามารถนำข้อมูลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ในการติดตามเฝ้าระวังหรือประเมินความเสี่ยงต่อผู้บริโภค
- 2) สามารถนำเทคนิคในการวิเคราะห์ไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างอาหารประเภทอื่นๆ ในการติดตามเฝ้าระวังความปลอดภัยแก่ผู้บริโภค
- 3) ได้ข้อมูลพื้นฐานให้แก่กลุ่มนักวิจัยเชื่อมโยงในต่างประเทศ เพื่อใช้เป็นข้อมูลประกอบในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ให้เป็นวิธีมาตรฐานสากล

บทที่ 2 การตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 หอยนางรม

2.1.1 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับหอยนางรม

หอยนางรม (Oyster) มีหลายสายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงกันส่วนใหญ่ ได้แก่ *Crassostrea*, *Saccostrea* และ *Ostrea* (กรมประมง, 2550) ลักษณะเป็นหอยสอง 2 ฝา (รูปที่ 2.1ก) ฝาทั้งสองด้านมีขนาดไม่เท่ากัน ด้านที่มีเนื้อจะเว้าลึกลงไปคล้ายรูปถ้วยและยึดติดกับวัตถุแข็ง เช่น ก้อนหิน ไม้หลัก หรือเปลือกหอยที่จมอยู่ในทะเล ส่วนฝาปิดอีกด้านหนึ่งมีลักษณะแบนบาง องค์ประกอบส่วนใหญ่ของเปลือกหอยนางรมเป็นสารประกอบแคลเซียมคาร์บอเนต ภายในเปลือกแข็งมีส่วนที่เป็นเนื้อหอย ซึ่งประกอบด้วยแผ่นเนื้อเยื่อบาง ๆ เรียกว่าเนื้อเยื่อแมนเทิล (Mantle) ห่อหุ้มอวัยวะภายใน มีลักษณะเป็นริ้วแผ่ขยายออกไปถึงบริเวณช่องปาก และเชื่อมติดกับเปลือกหอยด้านใน (รูปที่ 2.1ข) หอยนางรมมีเหงือก 2 คู่ ทำหน้าที่กรองอาหารจากน้ำ อาหารหลักของหอยนางรม ได้แก่ แพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์ที่แขวนลอยอยู่ในแหล่งน้ำเค็ม เหงือกยังทำหน้าที่หายใจและช่วยขับถ่ายของเสีย บริเวณกึ่งกลางลำตัวมีกล้ามเนื้อขนาดใหญ่ 1 อัน ทำหน้าที่ยึดฝาเปลือกหอยตลอดจนบังคับให้ฝาอำเปิดปิดตามความต้องการ ภายในเปลือกหอยยังเป็นที่รวบรวมของอวัยวะต่าง ๆ เช่น ระบบการย่อยอาหาร ระบบประสาท ระบบขับถ่ายของเสีย การไหลเวียนโลหิตและระบบสืบพันธุ์ (ประทีป, 2544)



รูปที่ 2.1 (ก) ลักษณะภายนอก และ (ข) ลักษณะภายในของหอยนางรม (อัษฎสิทธิ์, 2551)

หอยนางรมที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทยมี 3 ชนิด ได้แก่ หอยนางรมพันธุ์เล็ก เรียกว่าหอยปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) มีเลี้ยงกันมากทางภาคตะวันออก และหอยนางรมพันธุ์ใหญ่เรียกว่าหอยตะโกรมซึ่งแบ่งเป็นหอยตะโกรมกรมดำ (*Crassostrea Iredalei* หรือ *Crassostrea lugubris*) และหอยตะโกรมกรมขาว (*Crassostrea belcheri*) มีการเลี้ยงบ้างในภาคตะวันออกแต่ส่วนใหญ่มีมากในภาคใต้ (กรมประมง, 2550) พื้นที่ที่เหมาะสมแก่การเพาะเลี้ยง

หอยนางรมได้แก่บริเวณน้ำตื้นชายเกาะ ชายฝั่งทะเล หรือแหล่งน้ำที่มีอาณาเขตติดต่อกับทะเล การเลือกพื้นที่เป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งในการเลี้ยงหอยนางรม หลักเกณฑ์สำคัญที่ควรคำนึงถึงได้แก่ เป็นแหล่งที่มีน้ำกร่อยหรือน้ำทะเลท่วมถึงเกือบทั้งปี (อย่างน้อย 7-8 เดือนในหนึ่งปี) เนื่องจากหอยจะมีอัตราการตายสูงหากเลี้ยงในแหล่งน้ำที่มีความเค็มต่ำมาก แหล่งเลี้ยงหอยควรเป็นแหล่งธรรมชาติ มีอาหารอุดมสมบูรณ์ ปลอดภัยจากกระแสน้ำและคลื่นลมแรง และที่สำคัญควรเป็นแหล่งที่ห่างจากโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งอาจส่งผลก่อให้เกิดมลพิษกับหอยรวมทั้งผู้บริโภค นอกจากนี้พื้นที่เลี้ยงหอยควรอยู่ในพื้นที่ที่สะดวกต่อการจัดหาวัสดุในการเลี้ยงหอย มีการคมนาคมที่สะดวกเหมาะสมต่อการขนส่งผลผลิตออกไปจำหน่าย

หอยนางรมเป็นอาหารทะเลที่นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลาย และเป็นอาหารที่จัดได้ว่ามีคุณค่าทางโภชนาการสูง เนื้อหอยนางรมนอกจากจะใช้รับประทานสด และปรุงอาหารได้หลายอย่าง ยังนำไปแปรรูปเป็นอาหารสำเร็จรูปได้อีก เช่น หอยนางรมดอง หอยรมควัน และสกัดเป็นน้ำมันหอย ส่วนเปลือกหอยสามารถนำไปใช้ทำปูนขาวที่ใช้ในการก่อสร้าง การเกษตรกรรม และอุตสาหกรรมหลายประเภท

2.1.2 การเลี้ยงหอยนางรมในจังหวัดสุราษฎร์ธานี

การเลี้ยงหอยนางรม เป็นอาชีพหนึ่งที่สามารถสร้างรายได้และชื่อเสียงให้กับจังหวัดสุราษฎร์ธานีเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีผู้นิยมบริโภคกันมากแต่ผลผลิตยังไม่เพียงพอ ส่งผลให้หอยนางรมมีราคาสูงมากเมื่อเทียบกับหอยแครง หอยแมลงภู่ หรือหอยชนิดอื่นๆ จังหวัดสุราษฎร์ธานีได้มีการส่งเสริมให้เลี้ยงหอยนางรมในราวปี พ.ศ. 2503 ในพื้นที่อำเภอกาญจนดิษฐ์ พื้นที่ที่เลี้ยงกันมากคือ หอยตะกรมกรมขาว (*Crassostrea belcheri*) (กรมประมง, 2550)

จากข้อมูลผู้เพาะเลี้ยงหอยนางรม ที่ขึ้นทะเบียนผู้เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำกับสำนักงานประมงจังหวัดสุราษฎร์ธานี (สำนักประมงจังหวัดสุราษฎร์ธานี, 2553) พบว่า จังหวัดสุราษฎร์ธานีมีพื้นที่การเพาะเลี้ยงหอยนางรมทั้งหมด 12,150 ไร่ โดยมีบริเวณแหล่งเพาะเลี้ยงอยู่ใน 2 อำเภอ คือ อำเภอกาญจนดิษฐ์ มีพื้นที่เพาะเลี้ยง 11,238 ไร่ (คิดเป็นร้อยละ 92.5) และอำเภอไชยา มีพื้นที่เพาะเลี้ยง 912 ไร่ (คิดเป็นร้อยละ 7.5)

พื้นที่เพาะเลี้ยงหอยนางรมของจังหวัดสุราษฎร์ธานีตั้งอยู่ในบริเวณอ่าวบ้านดอน ซึ่งเป็นอ่าวขนาดใหญ่ที่สุดในภาคใต้ ครอบคลุมพื้นที่ 6 อำเภอ ได้แก่ ไชยา ท่าฉาง พุนพิน เมืองกาญจนดิษฐ์ และดอนสัก มีพื้นที่ประมาณ 477 ตารางกิโลเมตร มีความยาวของแนวชายฝั่งประมาณ 120 กิโลเมตร ระดับน้ำขึ้น-ลงในแต่ละวันแตกต่างกันประมาณ 2.1 เมตร มีความเร็ว

กระแสน้ำ 2.04 กิโลเมตร/ชั่วโมง พื้นที่ดังกล่าวได้รับอิทธิพลลมมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือ ในช่วงเดือนตุลาคม - มีนาคม และลมมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ในช่วงเดือนพฤษภาคม - กันยายน มีผลทำให้มีฝนตกชุกในช่วงเดือนพฤศจิกายน - มกราคม ของทุกปี สภาพโดยทั่วไปของอ่าวบ้านดอนส่วนใหญ่เป็นหาดโคลน มีแม่น้ำไหลลงสู่อ่าว ได้แก่ แม่น้ำตาปี แม่น้ำพุมดวง และคลองอีก 7 สาย (กรมส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม, 2553) อ่าวบ้านดอนเป็นพื้นที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์และมีความหลากหลายของระบบนิเวศทางทะเล มีป่าชายเลน หญ้าทะเล ปะการัง แพลงก์ตอนพืช แพลงก์ตอนสัตว์ และสัตว์น้ำนานาชนิด

ปัจจุบันการเพาะพันธุ์ลูกหอยมีต้นทุนสูง และยังทำได้ไม่มากนัก ดังนั้นลูกพันธุ์ของหอยนางรมที่นำมาเพาะเลี้ยงในปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นลูกหอยจากธรรมชาติ ซึ่งได้มาโดยการนำวัสดุล่อให้ลูกหอยมาเกาะ วัสดุที่ใช้ได้แก่ ไม้ไผ่ ก้อนหิน เปลือกหอยนางรม แผ่นกระเบื้อง หลอดซีเมนต์ เป็นต้น การเลี้ยงหอยนางรมมีหลายวิธี เช่น การเลี้ยงบนก้อนหิน การเลี้ยงในกระบะไม้ การเลี้ยงแบบใช้แท่งซีเมนต์ การเลี้ยงโดยใช้หลักไม้ การใช้หลอดหรือท่อซีเมนต์ การเลี้ยงแบบพวงอุบะแขวน สำหรับการเลี้ยงหอยนางรมในจังหวัดสุราษฎร์ธานีใช้วิธีเลี้ยงในกระบะไม้ในยุคแรก ๆ แต่ในปัจจุบันส่วนใหญ่นิยมใช้วิธีการเลี้ยงแบบหลอดหรือท่อซีเมนต์ การใช้หลอดหรือท่อซีเมนต์เหมาะสำหรับแหล่งเลี้ยงที่มีน้ำท่วมอยู่ตลอดเวลาได้แก่ ที่ดินชายฝั่งทะเล ปากแม่น้ำลำคลอง และทะเลสาบ พื้นดินเป็นโคลนหรือโคลนอ่อนปนทราย ขั้นแรกต้องปักหลักไม้ที่อาจหาได้ในท้องที่ เช่น โกงกาง หลักไม้ไผ่ โดยปักเรียงเป็นแถวให้มีช่องว่างระหว่างแถวห่างกันประมาณ 1 เมตร จากนั้นเตรียมหลอดซีเมนต์กลวงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร ยาว 40 เซนติเมตร ล่อโดยใช้ปูนซีลเฟตทนเค็ม ติดหอย 20 ตัวต่อหลอด นำหลอดซีเมนต์ที่เตรียมไว้นี้สวมลงในหลักไม้ที่ปักเป็นแถวไว้ แต่ละแถวห่างกัน 30 เซนติเมตร แต่ละท่อห่างกัน 20 เซนติเมตร พร้อมกันนั้นใช้ไม้วางพาดเป็นฐานรองรับท่ออีกชั้นหนึ่ง เพื่อป้องกันไม่ให้ท่อจมโคลน หรือถ้าใช้ท่อซีเมนต์ที่มีปากเปิดข้างเดียวสามารถนำไปสวมลงบนหลักไม้ได้โดยตรง ด้วยวิธีดังกล่าวสามารถวางท่อได้ประมาณ 1,600 ท่อต่อไร่ นอกจากหลอดซีเมนต์ที่ได้กล่าวมาแล้ว ปัจจุบันเกษตรกรได้มีการพัฒนาขยายขนาดหลอดให้ใหญ่ขึ้นมีลักษณะเป็นท่อซีเมนต์เพื่อเพิ่มพื้นที่ยึดเกาะของลูกหอย และใช้ฐานซีเมนต์เพื่อรองรับท่อที่มีขนาดใหญ่ขึ้น แทนที่จะใช้ไม้เป็นตัวรองรับเช่นเดิม ทำให้อายุการใช้งานนานขึ้นและการจัดการสะดวก (กรมประมง, 2550)

2.2 การปนเปื้อนของโลหะหนักในหอยนางรม

หอยนางรมมีธรรมชาติการกินอาหารในลักษณะการดูดและกรอง (Filter feeding) ทำให้ทั้งอาหารและของเสียหรือสิ่งแขวนลอยอื่นๆ ที่อยู่ในน้ำ หรือในตะกอนดินมีโอกาสที่จะเข้าไปสะสมอยู่ในตัวหอยได้ง่าย และในระหว่างการเจริญเติบโตตัวหอยนางรมจะติดอยู่กับวัสดุที่ยึดเกาะ ไม่มีการเคลื่อนที่ไปไหนเหมือนสัตว์น้ำชนิดอื่นๆ ทำให้ต้องมีการกรองน้ำเป็นปริมาณมากๆ เพื่อให้ได้สารอาหารที่เพียงพอ ด้วยเหตุนี้จึงทำให้สารปนเปื้อนต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโลหะหนักที่ยึดอยู่กับตะกอนดินอนุภาคเล็กๆ ที่แขวนลอยอยู่ในน้ำมีโอกาสที่ถูกละสมมากขึ้นเป็นทวีคูณในเนื้อเยื่อของหอยนางรม (Widmeyer, 2008) ในขณะที่พื้นที่เลี้ยงหอยส่วนใหญ่ตั้งอยู่บริเวณปากแม่น้ำหรือป่าชายเลน ซึ่งเป็นบริเวณที่มีโอกาสเกิดการสะสมของของเสียต่างๆ จากชุมชน เกษตรกรรม หรืออุตสาหกรรม ที่ถูกพัดมาด้วยน้ำลำคลอง จะเห็นได้ว่าเมื่อพิจารณาธรรมชาติการกินอาหารของหอยนางรมประกอบกับพื้นที่แหล่งเลี้ยงหอยแล้ว ทำให้มีแนวโน้มของการสะสมหรือปนเปื้อนของของเสียในสัตว์น้ำ ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องมีการตรวจติดตามเฝ้าระวัง ทั้งนี้เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค มีการรายงานโดย Jarempornnipat (2003) เกี่ยวกับสาเหตุที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อแหล่งทรัพยากรสัตว์น้ำในอำเภอบ้านดอน พบว่าสาเหตุหลักของปัญหาดังกล่าวมาจากการปล่อยน้ำเสียจากโรงงานน้ำมันและนาุ้งลงสู่แม่น้ำตาปี นอกจากนี้ยังมีสาเหตุอื่นๆ อีก ได้แก่ การใช้เรืออวนลาก การจับปลาที่ยังไม่โต การจับปลาในฤดูวางไข่ การทำลายป่าโกงกาง

Franco *et al.* (2002) ศึกษาปริมาณของโลหะหลายชนิด (Cd, Cu, Zn, Pb, Cr, Ni, Hg, As และ Ag) ในตัวอย่างสัตว์น้ำจำพวกหอย เพื่อนำข้อมูลไปใช้ในการตรวจติดตามและเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารพิษเหล่านี้ในแหล่งน้ำ ตัวอย่างสัตว์น้ำที่ศึกษาในงานวิจัยนี้คือ หอยแมลงภู่และหอยนางรม ที่เก็บมาจากบริเวณปากแม่น้ำ แอ่งชายฝั่งทางตอนเหนือของประเทศสเปน ในช่วงระยะเวลา 11 ปีของการตรวจติดตามและเฝ้าระวังตั้งแต่ปี ค.ศ. 1990-2001 การเตรียมตัวอย่างทำได้โดยการย่อยด้วยกรด HNO_3 เข้มข้น โดยใช้เครื่องมือโครเมท แล้วจึงวิเคราะห์หาปริมาณโลหะด้วยเครื่อง Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometer (GF-AAS) ยกเว้นปรอทและสารหนูวิเคราะห์โดยเทคนิค Cold Vapour Generation และเทคนิค Hydride Generation ตามลำดับ ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ทำได้โดยการวิเคราะห์สารมาตรฐาน BCR 278R (Mussel Tissue) พบว่า ร้อยละการกลับคืน (% Recovery) ของโลหะทุกชนิดมีค่าเกินกว่าร้อยละ 90 ยกเว้นปรอทมีค่าร้อยละ 88 ผลการวิจัยพบว่า ปริมาณเฉลี่ยของ Cu, Zn และ Ag ในหอยนางรมมีค่ามากกว่าในหอยแมลงภู่ ($p < 0.01$) ในขณะที่ Pb ได้ผลตรงกันข้ามกัน ในขณะที่ธาตุโลหะอื่นๆ คือ Cd, Cr, Ni, Hg, As พบว่ามีปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมี

นัยสำคัญระหว่างหอยต่างชนิดกันซึ่งปริมาณเฉลี่ยของแต่ละธาตุในหอยแมลงภู่และในหอยนางรม (ตามลำดับ) ในหน่วย มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (น้ำหนักแห้ง) มีดังนี้ Cd (3.11 และ 2.91), Cu (47 และ 417), Zn (1206 และ 3084), Pb (5.68 และ 3.25), Cr (3.15 และ 2.80), Ni (4.35 และ 3.96), Hg (0.53 และ 0.44), As (2.85 และ 2.66), Ag (1.81 และ 6.00)

2.2.1 แคดเมียม

เป็นที่ทราบกันดีว่าโลหะหนักหลายชนิดมีความเป็นพิษสูง แคดเมียมมีผลในการรบกวนการทำงานของสังกะสีในขั้นตอนการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ การทำงานของระบบเมตาโบลิซึมสำคัญๆ ในร่างกาย แคดเมียมถูกจัดประเภทเป็นสารก่อมะเร็งและสารก่อกลายพันธุ์ (Fairbridge, 1999) แคดเมียมเป็นสารพิษที่มีอยู่ในปริมาณน้อยในสิ่งแวดล้อม แต่มีกิจกรรมที่เกิดจากการกระทำของมนุษย์หลายๆ อย่าง ที่ทำให้มีการสะสมของแคดเมียมสูงขึ้น เช่น การกำจัดของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ไม่เหมาะสม การใช้แบตเตอรี่ชนิด Ni-Cd ที่ใช้สำหรับผลิตภัณฑ์พลาสติกหรือการเผาไหม้พลาสติก มีรายงานว่า การปนเปื้อนของแคดเมียมสามารถก่อให้เกิดผลเสียต่อระบบนิเวศเป็นอย่างมาก ส่งผลกระทบต่อหลายระดับในห่วงโซ่อาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งทำให้เกิดผลกระทบต่อผู้บริโภคที่นิยมบริโภคอาหารทะเล (Cabrera, 1994) มีผลงานวิจัยไม่มากนักที่รายงานเกี่ยวกับระดับการปนเปื้อนของแคดเมียมในหอยนางรมที่เพาะเลี้ยงในประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2549 สุนทร และประทุมวัลย์ ได้ศึกษาการปนเปื้อนของปริมาณแคดเมียมในหอยตะโกรม (*Crassostrea belcheri*) จากอ่าวบ้านดอน จังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างหอยตะโกรมทั้งหมด 430 ตัวอย่าง พบว่าหอยตะโกรมมีการปนเปื้อนของแคดเมียม 0.3352 ± 0.5730 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งมีค่าไม่เกินเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของปริมาณแคดเมียมในหอยตะโกรม จากแหล่งเลี้ยงในระยะห่างจากชายฝั่งทะเล 1, 2 และ 3 กิโลเมตร ($p > 0.05$) ในปี พ.ศ. 2551 มีรายงานผลการศึกษาการปนเปื้อนของโลหะหนักในหอยนางรม บริเวณอำเภอกาญจนดิษฐ์ จังหวัดสุราษฎร์ธานี (อัญชลี, 2551) พบว่ามีปริมาณแคดเมียม 1.128 ± 0.126 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (น้ำหนักสด) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับเกณฑ์มาตรฐาน พบว่าต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานแคดเมียมในหอยนางรมของสำนักงานอาหารและยาประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ได้กำหนดไว้สูงสุดไม่เกิน 4.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมาตรฐานทางด้านอาหารของออสเตรเลียกับนิวซีแลนด์ (Standard 1.4.1 Contaminants and Natural Toxicants) กำหนดไว้สูงสุดไม่เกิน 2.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แต่มีค่าสูงเกินกว่าเกณฑ์มาตรฐาน

แคดเมียมในหอยนางรมที่กำหนดโดยคณะกรรมการการประชาคมยุโรป (European Commission, EC) เลขที่ 1881/2006 ที่กำหนดไว้สูงสุดไม่เกิน 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

หอยนางรมมีลักษณะเฉพาะตัวที่สามารถสะสมแคดเมียมได้ในเนื้อเยื่อ ในระดับที่สูงกว่าปกติ (Hyperaccumulate) มีรายงานว่าเมื่อนำหอยนางรมไปเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีระดับของแคดเมียมต่ำเพียง 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นเวลา 40 สัปดาห์ พบว่าหอยนางรมมีระดับของแคดเมียมสูงถึง 10.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Zaroogian และ Cheer, 1976) ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบหอยนางรมกับหอยสองฝาชนิดอื่นๆ เช่น mussels, scallops, clams ที่เพาะเลี้ยงในรัฐบริติชโคลัมเบีย พบว่า หอยเหล่านี้สะสมแคดเมียมในระดับที่ต่ำกว่าหอยนางรม (Bendell, 2009) มีรายงานระดับการปนเปื้อนของแคดเมียมในหอยนางรมที่เพาะเลี้ยงในรัฐบริติชโคลัมเบีย ประเทศแคนาดา โดยหน่วยงาน Canadian Food Inspection Agency (CFIA) พบว่าหอยนางรมดังกล่าวมีปริมาณแคดเมียมในระดับเฉลี่ย 2.6 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (น้ำหนักสด) ซึ่งอยู่ในระดับที่เกินเกณฑ์ของคณะกรรมการการประชาคมยุโรป (EC) ที่อนุญาตให้มีปริมาณแคดเมียมในหอยไม่เกิน 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (น้ำหนักสด) (Bendell, 2009) ในราวปลายปี ค.ศ. 1999 ถึงต้นปี ค.ศ. 2000 รัฐบริติชโคลัมเบียเคยประสบปัญหาการส่งออกหอยนางรมไปยังฮ่องกง ทำให้ฮ่องกงต้องส่งสินค้ากลับคืนเป็นจำนวนมาก เนื่องจากมีปริมาณแคดเมียมเกิน 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (น้ำหนักสด) ตามมาตรฐานที่กำหนดไว้โดย Hong Kong Food and Environmental Hygiene Department ทำให้หน่วยงาน CFIA และ Health Canada ต้องทำการประเมินความเสี่ยงต่อการบริโภคหอยนางรม (Kruzynski, 2004) ต่อมาจึงได้ตีพิมพ์เอกสารการแนะนำสำหรับผู้บริโภค โดยการแนะนำให้จำกัดปริมาณการบริโภคหอยนางรมได้ไม่เกิน 460 กรัม (น้ำหนักหอยนางรมตัวละประมาณ 40 กรัม) ต่อเดือน (สำหรับผู้ใหญ่) และไม่เกิน 60 กรัมต่อเดือน (สำหรับเด็ก) ข้อมูลการประเมินความเสี่ยงนี้ ได้มาจากการประมาณค่าชีวภาพความพร้อมของแคดเมียมในหอยนางรมเพียงร้อยละ 5 เนื่องจากในขณะนั้นยังไม่มีข้อมูลที่แน่นอนของค่าชีวภาพความพร้อมนี้ (IPCS, 1992) ถึงแม้ในภายหลังจะมีรายงานว่าปริมาณชีวภาพความพร้อมของแคดเมียมในอาหารอาจสูงถึงร้อยละ 20-30 (Diamond *et al.*, 1997)

2.2.2 ตะกั่ว

ตะกั่วมีการใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น ตะกั่วเตตระเอทิล ใช้เป็นสารออกเทน และใช้ผลิตน้ำมันใช้เป็นสารกันน็อค หรือเป็นสารป้องกันการกระตุกของเครื่องยนต์ ตะกั่วเนพทาเลตนำมาใช้ในการทำสีให้แห้ง ตะกั่วไดออกไซด์ ใช้เป็นขั้วอิเล็กโตรดของแบตเตอรี่และใช้ทำเป็นสีโลหะเพื่อกันสนิม ตะกั่วอาร์ซีนัดและตะกั่วอาร์ซีนิตใช้เป็นยาฆ่าแมลงและยาปราบศัตรูพืช ตะกั่ว

เป็นอีกธาตุหนึ่งที่มีความเป็นพิษสูงทั้งแบบเรื้อรังและแบบเฉียบพลัน ความเป็นพิษแบบเรื้อรังคือทำให้เกิดภาวะโลหิตจาง ส่วนความเป็นพิษแบบเฉียบพลันมักเกิดจากสารตะกั่วอินทรีย์ อาการทั่ว ๆ ไปที่พบคือเบื่ออาหาร คลื่นไส้ อาเจียน กระหายน้ำ ปวดศีรษะ ปวดท้องอย่างรุนแรง อุจจาระมีสีดำ อ่อนเพลีย เป็นลมล้มสลับ บางรายอาจมีอาการทางสมอง และอาจเสียชีวิตได้ การปนเปื้อนของตะกั่วเข้าสู่สิ่งแวดล้อมที่มาจากกิจกรรมของมนุษย์ ได้แก่ น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับตะกั่ว ได้แก่ โรงงานผลิตแบตเตอรี่ สี เครื่องประดับสตรี ภาชนะเคลือบ เซรามิก พลาสติก อุตสาหกรรมหล่อตัวพิมพ์ อุตสาหกรรมเคมี ชุบโลหะ เชื่อมบัดกรี โรงงานซ่อมแบตเตอรี่ เป็นต้น

การศึกษาการปนเปื้อนของตะกั่วในหอยนางรมในประเทศไทย มีดังนี้ ในปี พ.ศ. 2549 สุนทรและประทุมวัลย์ ได้รายงานการปนเปื้อนของปริมาณตะกั่วในหอยตะกั่วจากอ่าวบ้านดอน จังหวัดสุราษฎร์ธานี เมื่อพิจารณาจากค่าเฉลี่ยในช่วงระยะเวลา 2 ปี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546 ถึง พ.ศ. 2547 พบว่าหอยตะกั่วมีปริมาณตะกั่ว 0.1519 ± 0.3480 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งมีค่าไม่เกินเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด ต่อมาในปี พ.ศ. 2549 มีรายงานโดยสมชาย และคณะ เกี่ยวกับการศึกษาการปนเปื้อนของตะกั่วในหอยนางรมบริเวณอ่าวบ้านดอน จังหวัดสุราษฎร์ธานี เป็นระยะเวลา 4 ปี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2542 ถึง พ.ศ. 2545 พบว่ามีค่าความเข้มข้นเฉลี่ยเพิ่มขึ้น 0.400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีค่าพิสัยอยู่ในช่วง $0.059 - 0.902$ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (อ้างถึงใน อัญชลี, 2551) ในปี พ.ศ. 2551 มีรายงานผลการศึกษาการปนเปื้อนของโลหะหนักในหอยนางรมบริเวณแหล่งเพาะเลี้ยงอำเภอกาญจนดิษฐ์ จังหวัดสุราษฎร์ธานี (อัญชลี, 2551) พบว่ามีปริมาณตะกั่ว 0.210 ± 0.063 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (น้ำหนักสด) ซึ่งมีค่าต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานของประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 (พ.ศ. 2529) ซึ่งกำหนดค่ามาตรฐานของตะกั่วในอาหารไม่เกิน 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

2.2.3 ปรอต

ปรอตสามารถนำไปใช้ประโยชน์หลาย ๆ ด้าน เช่น ใช้ผลิตเทอร์โมมิเตอร์ ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Catalyst) ในกระบวนการทางเคมีต่าง ๆ ใช้เป็นส่วนผสมของยารักษาโรค และการอุดฟัน การเกษตร ใช้เป็นส่วนประกอบของยาฆ่าแมลง อุตสาหกรรมชุบโลหะ อุตสาหกรรมผลิตคลอรีนและโซดาไฟ ด้านความเป็นพิษของปรอตนั้นพบว่าปรอตในรูปสารประกอบอินทรีย์มีความเป็นพิษต่อทางเดินอาหารได้สูงแต่ขับออกมาในรูปของเสียได้น้อยมาก เนื่องจากเป็นสารที่เสถียรมากไม่ค่อยแตกตัวเป็นสารอินทรีย์ ปรอตรูปนี้สามารถยึดกับเม็ดเลือดแดง และแพร่กระจายไปยังทุก

ส่วนของร่างกาย ปรอทสามารถแทรกซึมผ่านเยื่อหุ้มสมองเข้าสู่ประสาทส่วนกลาง ซึ่งทำอันตรายต่อเนื้อเยื่อสมองส่วนที่ควบคุมการมองเห็นและความรู้สึก ทำให้ผู้รับสารปรอทมีอาการผิดปกติเกี่ยวกับระบบประสาทการมองเห็นและความรู้สึก ปรอทในรูปไลโอะสามารถถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายทางผิวหนังและลมหายใจได้ง่าย นอกจากนี้ปรอทสามารถทำลายอวัยวะอื่นๆ ที่กระจายไปถึง เช่น เนื้อเยื่อตับ ไพเบอร์ของกล้ามเนื้อหัวใจ หลอดไต กระเพาะ และลำไส้ส่วนดูโอดินัม (Duodenum) และทำให้การผลิตเซลล์เม็ดเลือดแดงของไขกระดูกลดลง กิจกรรมที่เกิดจากการกระทำของมนุษย์หลายๆ อย่างนำไปสู่การปนเปื้อนของปรอทในสิ่งแวดล้อม ได้แก่ การเผาขยะและของเสีย การเผาไหม้ของเชื้อเพลิง โรงถลุงโลหะเหมืองแร่ที่มีปรอทปนเปื้อน การใช้ผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ที่มีสารปรอท เช่น หลอดฟลูออเรสเซนต์ ถ่านไฟฉาย เทอร์โมมิเตอร์ อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ สีบางชนิด วัสดุอุดฟัน ยาฆ่าเชื้อรา ปรอทจากแหล่งต่าง ๆ เหล่านี้ มีทั้งที่ลงสู่แหล่งน้ำหรือพื้นดินโดยตรง แต่ส่วนใหญ่จะมาจากการระเหยหรือการเผาไหม้ และปลดปล่อยสู่บรรยากาศ ซึ่งในที่สุดจะตกกลับลงสู่พื้นดินเมื่อมีกิจกรรมการใช้ที่ดิน เช่น การเกษตร การขุดดิน การทำเหมือง การทำถนน เป็นต้น เมื่อมีการเปิดหน้าดิน ปรอทที่สะสมอยู่ในดินจะถูกทำให้เปลี่ยนแปลงรูปแบบทางเคมี มาอยู่ในรูปแบบที่ละลายน้ำได้มากขึ้น และส่งผลต่อการเคลื่อนตัวของปรอทจากดินเข้าสู่แหล่งน้ำ (จิรวัดณ์, 2549)

ในปี พ.ศ. 2551 มีรายงานผลการศึกษากการปนเปื้อนของโลหะหนักในหอยนางรม บริเวณแหล่งเพาะเลี้ยงอำเภอกาญจนดิษฐ์ จังหวัดสุราษฎร์ธานี (อัญชลี, 2551) พบว่ามีปริมาณปรอท 0.069 ± 0.002 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (น้ำหนักสด) ซึ่งมีค่าต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานของประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 (พ.ศ. 2529) ที่ได้กำหนดค่ามาตรฐานของปรอทในอาหารไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักโดยวิธีทางเคมี

การวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักในตัวอย่างต่างๆ ในสิ่งแวดล้อม เช่น อาหาร พืช สัตว์ ดิน น้ำ และอากาศ สามารถนำไปสู่การบ่งชี้ถึงภาวะการปนเปื้อนหรือภาวะมลพิษของสิ่งแวดล้อมนั้นๆ ได้ การตรวจสอบการปนเปื้อนของโลหะหนักมีความสำคัญ เนื่องจากเป็นที่ทราบกันดีถึงผลกระทบหรืออันตรายของโลหะหนักหลายๆ ชนิดต่อทั้งพืช สัตว์ และคน เพราะในที่สุดโลหะหนักเหล่านี้จะถูกสะสมอยู่ในห่วงโซ่อาหาร

การวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของสารต่างๆ ในสิ่งแวดล้อมนั้นจำเป็นต้องใช้วิธีการสกัดหรือแยกเอาสารเหล่านั้นออกมาจากตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์เสียก่อน ขั้นตอนนี้เป็นเรื่องที่ยุ่งยากเนื่องจากความหลากหลายและซับซ้อนของเมทริกซ์ของตัวอย่างแต่ละชนิด เทคนิคการสกัด

ตัวอย่างสามารถแบ่งอย่างกว้างๆ ได้ 2 แบบ คือวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม (Traditional Extraction Approaches) ได้แก่ วิธี Soxhlet, การสกัดด้วยของเหลว (Liquid Extraction), การสกัดโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication) เป็นต้น และวิธีการสกัดแบบสมัยใหม่ (Modern Extraction Approaches) ได้แก่ การสกัดโดยใช้คลื่นไมโครเวฟ (Microwave Assisted Extraction, MAE) การสกัดโดยใช้ของไหลเหนือวิกฤติ (Supercritical Fluid Extraction, SFE) เป็นต้น เทคนิคการสกัดแบบดั้งเดิมมีข้อจำกัดคือ ใช้เวลานานในการสกัดตัวอย่าง และใช้ตัวทำละลายหรือสารเคมีในปริมาณมาก ในที่สุดย่อมทำให้เกิดปัญหาด้านการกำจัดของเสียหรือสารเคมีที่ใช้แล้ว ซึ่งเทคนิคการสกัดสมัยใหม่มีข้อจำกัดของปัญหาดังกล่าวน้อยกว่ามาก

การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก โดยทั่วไปสามารถทำได้ 3 วิธี ได้แก่ 1. Dry Ashing 2. Acid Digestion และ 3. Fusion วิธี Acid Digestion เป็นวิธีที่มีการนำไปใช้กันมากที่สุด วิธี Dry Ashing ไม่เหมาะสำหรับใช้เตรียมตัวอย่างเพื่อหาปริมาณโลหะหนักชนิดที่ระเหยเป็นไอได้ เช่น Hg, Pb, Cd, As, และ Cu ทำให้เกิดการสูญหายไปของธาตุเหล่านี้ในระหว่างการเตรียมตัวอย่าง และการทำให้เถ้าจากการเผาละลายด้วยตัวทำละลายนั้นค่อนข้างยุ่งยาก ส่วนวิธี Fusion เหมาะสำหรับสารตัวอย่างที่มีซิลิกาและออกไซด์เป็นองค์ประกอบ แต่มีข้อด้อยคือสารตัวอย่างมีโอกาสปนเปื้อนสูง จากการเติมสารเคมีบางชนิดลงไปให้มากเกินไปเพื่อให้สารตัวอย่างหลอมละลายได้ดียิ่งขึ้นจนทำให้ความร้อน ตัวอย่างสารเคมีที่ใช้เติมลงไป เช่น Sodium carbonate, Lithium tetraborate และ Potassium pyrosulfate (Dean, 2003)

การย่อยด้วยกรด (Acid Digestion) เป็นการย่อยโดยใช้กรดและความร้อนในการทำให้เมทริกซ์ของตัวอย่างสลายตัว การเลือกใช้กรดชนิดใดหรือส่วนผสมระหว่างกรดชนิดใดนั้นขึ้นอยู่กับลักษณะของเมทริกซ์ของสารตัวอย่างที่ต้องการสลายตัว เช่น ถ้าต้องการย่อยตัวอย่างที่มีซิลิกาเป็นองค์ประกอบต้องใช้กรดไฮโดรฟลูออริก (HF) ส่วนกรดไนตริกสามารถใช้ย่อยตัวอย่างชีวสาร (Biological samples) ได้ดี การย่อยด้วยกรดมี 2 แบบ คือ การย่อยแบบดั้งเดิมโดยใช้แผ่นความร้อน (Hotplate หรือ Heating block) และการใช้เตาไมโครเวฟ การย่อยด้วยระบบไมโครเวฟเป็นที่นิยมใช้มากขึ้นเนื่องจากมีความสะดวกและรวดเร็วกว่า ไม่ทำให้เกิดปัญหาการสูญหายไปของธาตุที่ระเหยเป็นไอได้เนื่องจากกระทำในระบบปิด นอกจากนี้ยังช่วยลดการปนเปื้อนที่อาจเกิดขึ้นในการวิเคราะห์ เนื่องจากการใช้ปริมาณกรดน้อยลงและทำการย่อยในระบบปิด Bou *et al.* (2004) ได้ศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในขั้นตอนการสลายตัวของ Se, Zn, Fe และ Cu ในตัวอย่างเนื้อไก่ พบว่าการย่อยตัวอย่างด้วยระบบไมโครเวฟให้ค่าร้อยละการกลับคืนเป็น 103-105, 107-108, 97-100 และ 89-94 สำหรับการวิเคราะห์ Zn, Fe, Se และ Cu ตามลำดับ สภาวะที่เหมาะสม

ในการย่อยตัวอย่างเป็นดังนี้ ใช้ตัวอย่างเนื้อไก่ 0.6 กรัม (น้ำหนักสด, ในกรณี CRM ใช้ 0.3 กรัม น้ำหนักแห้ง) เติมกรด HNO_3 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และ H_2O_2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปย่อยด้วยระบบไมโครเวฟโดยการตั้งโปรแกรมอุณหภูมิและเวลา 4 ขั้นตอน คือ 1. อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที 2. อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที 3. อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที 4. อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที โดยใช้อัตราการเพิ่มของอุณหภูมิเป็น 10 องศาเซลเซียสต่อนาทีในทุกขั้นตอน ในการหาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ทำได้โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อไก่ที่เติมสารละลายมาตรฐานที่ทราบค่าความเข้มข้นที่แน่นอน โดยมีจำนวนครั้งที่วิเคราะห์ 10 ครั้ง และการหาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทำได้โดยการวิเคราะห์สารอ้างอิง (Certified Reference Material, CRM 184 Bovine Muscle) โดยมีจำนวนครั้งที่วิเคราะห์ 10 ครั้ง ผลการย่อยตัวอย่างเนื้อไก่ด้วยระบบไมโครเวฟโดยใช้กรด HNO_3 ผสมกับ H_2O_2 ทำให้สามารถย่อยตัวอย่างได้ดี ทำให้โลหะทุกชนิดละลายตัวอย่างออกมาอยู่ในตัวทำละลายได้ทั้งหมด และเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการย่อยโดยระบบเปิดโดยใช้ Digestion block พบว่ามีการแปรปรวนของผลการวิเคราะห์น้อยกว่า

Yang และ Swami (2007) ได้วิเคราะห์หาปริมาณโลหะ 27 ชนิด ในสัตว์น้ำจำพวกปลา และปู โดยใช้วิธีการย่อยด้วยไมโครเวฟสำหรับเตรียมตัวอย่างและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CVAAS (สำหรับ Hg) และเทคนิค ICPMS (สำหรับธาตุอื่นๆ ทั้งหมด) ในการวิเคราะห์ พบว่าส่วนผสมของสารเคมีที่ใช้ย่อยตัวอย่างที่เหมาะสมประกอบด้วย HNO_3 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และ H_2O_2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และ HF ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร โดยใช้ปริมาณของตัวอย่าง 0.15 กรัม (น้ำหนักแห้ง) และในการย่อยด้วยไมโครเวฟแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน โดยใช้อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที และ อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที ในขั้นตอนที่ 1 และ 2 ตามลำดับ โดยที่ในตอนเริ่มต้นของการย่อยทั้งสองขั้นตอนจะต้องใช้เวลาระยะหนึ่งในการค่อยๆ ปรับอุณหภูมิให้สูงขึ้นให้ได้ตามที่ต้องการ ในทำนองเดียวกันกับเมื่อสิ้นสุดการย่อยในแต่ละขั้นตอน ต้องใช้เวลาระยะหนึ่งในการค่อยๆ ปรับอุณหภูมิให้ลดต่ำลง ผู้วิจัยสรุปว่าวิธีการนี้เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหลายชนิดในตัวอย่างชีวสาร และผลจากการวิเคราะห์สารอ้างอิง 2 ชนิด คือ หอยนางรม (SRM1566b) พบว่ามีโลหะหลายชนิด (Na, Al, K, V, Co, Zn, Se, Sr, Ag, Cd, Ni และ Pb) ให้ค่าร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 90-110 และสารอ้างอิงของเนื้อปลา (Dogfish, DORM-2) มีโลหะหลายชนิด (Al, Cr, Mn, Se และ Hg) ให้ค่าร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 90-110

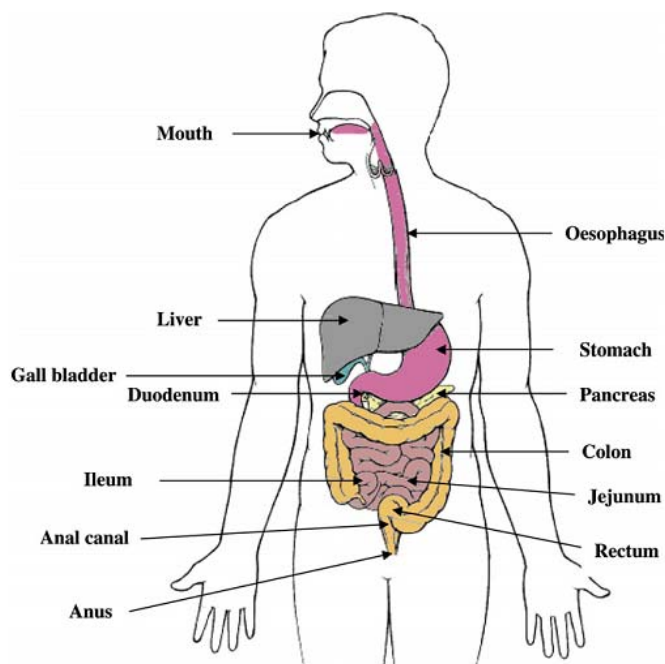
Brisbin และ Caruso (2002) ได้เปรียบเทียบวิธีการสกัดสารตัวอย่างระหว่างการสกัดด้วยไมโครเวฟกับวิธีอื่นๆ ได้แก่ การสกัดแบบ Soxhlet, การสกัดแบบ Sonication, การสกัดโดยใช้

Supercritical CO₂ และการสกัดโดยใช้ Subcritical H₂O โดยทุกวิธีใช้สารอ้างอิง Lobster (TORT-2, NRCC) ในการสกัด ผลการศึกษาพบว่า การสกัดตัวอย่างโดยใช้ระบบไมโครเวฟมีประสิทธิภาพในการสกัดเทียบเท่ากับเทคนิคอื่นๆ แต่ใช้ปริมาณตัวทำละลาย และใช้เวลาในการสกัดน้อยกว่า มีความสะดวกในการใช้งาน และให้ผลวิเคราะห์ซ้ำที่ดีกว่า

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมทางด้านการวิเคราะห์ทางเคมี แบ่งเป็น 2 รูปแบบ ได้แก่ 1) Univariate Methodology และ 2) Multivariate Methodology วิธีแรกเป็นการศึกษาผลของตัวแปรที่เกี่ยวข้องครั้งละ 1 ตัวแปร มีข้อดีคือ การแปรผลทำได้ง่าย แต่มีข้อเสียคือ สิ้นเปลืองสารเคมี และเวลา และไม่มีการพิจารณาผลของ Interactions ระหว่างตัวแปร ส่วนวิธีที่สองมีข้อดีคือ ใช้เวลาในการทดลองน้อยกว่าทำให้สิ้นเปลืองสารเคมีและเวลาน้อยกว่า และมีการพิจารณาผลของ Interactions ระหว่างตัวแปรทำให้ได้ผลการศึกษาที่ดีกว่า (Santelli, 2006)

2.4 การประเมินชีวภาพความพร้อมของโลหะหนัก

การประเมินความเสี่ยงจากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนสารเคมีต่างๆ สามารถวัดได้จากค่าชีวภาพความพร้อม (Bioaccessibility) ของสารนั้นๆ วิธีการหนึ่งที่ใช้วัดค่าชีวภาพความพร้อม เรียกว่า Physiologically Based Extraction Test (PBET) หรือ *In vitro* gastrointestinal extraction เป็นวิธีซึ่งจำลองระบบการย่อยอาหารเพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปทำนายปริมาณชีวภาพความพร้อมของสารนั้นๆ ที่คนจะได้รับจากการบริโภคอาหารแต่ละชนิด วิธีการนี้ทำได้โดยการจำลองกระบวนการย่อยอาหารต่างๆ เริ่มตั้งแต่การย่อยโดยกรดเคี้ยวอาหารและเอนไซม์ในปาก กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก ระบบทางเดินอาหารของคน (รูปที่ 2.2) ประกอบด้วยอวัยวะที่เกี่ยวข้องต่างๆ ดังนี้ (วิกิพีเดีย, 2553; Dean และ Ma, 2007)



รูปที่ 2.2 ระบบการย่อยอาหารของคน (Dean และ Ma, 2007)

1) ปาก (Mouth) เป็นอวัยวะแรกของระบบย่อยอาหาร ภายในประกอบด้วยฟันทำหน้าที่บดเคี้ยวอาหารให้มีขนาดเล็กลง เพื่อเพิ่มปริมาณพื้นที่ผิวของอาหารให้เหมาะสำหรับการย่อยในกระเพาะต่อไป ลิ้นทำหน้าที่ส่งอาหารให้ฟันบดเคี้ยว และคลุกเคล้าอาหารให้อ่อนตัว ต่อมน้ำลายมีหน้าที่ผลิตเอนไซม์ในน้ำลายคืออะไมเลส (ร้อยละ 98 ของน้ำลายคือน้ำ) น้ำลายมี pH 6.5 กระบวนการย่อยที่เกิดขึ้นภายในปากใช้เวลาตั้งแต่ไม่กี่วินาทีจนถึงประมาณ 2-3 นาที

2) หลอดอาหาร (Oesophagus) ทำหน้าที่หดตัว บีบอาหารลงสู่กระเพาะอาหาร หลอดอาหารมีผนังมีกล้ามเนื้อที่ยึดและหดตัวได้ บริเวณคอหอยมีช่องที่เปิดเข้าสู่หลอดลมและหลอดอาหาร โดยส่วนบนของหลอดลมจะมีแผ่นกระดูกอ่อนปิดกั้นกันอาหารไม่ให้เข้าสู่หลอดลม ไม่มีต่อมสร้างน้ำย่อยแต่มีต่อมขับน้ำเมือกช่วยให้อาหารไหลผ่านได้สะดวก

3) กระเพาะอาหาร (Stomach) ทำหน้าที่ผลิตกรดไฮโดรคลอริก น้ำย่อยเปปซินและเรนินย่อยอาหารประเภทโปรตีน กระเพาะอาหารมีลักษณะเป็นถุง รูปร่างคล้ายตัว J ปกติกระเพาะอาหารที่ไม่มีอาหารจะมีขนาดประมาณ 45 มิลลิลิตร และสามารถขยายตัวเพื่อบรรจุอาหารได้ 1-1.5 ลิตร กระเพาะอาหารสามารถย่อยได้โดยการบีบตัวทำให้อาหารแตกเป็นชิ้นเล็กๆ คลุกเคล้ากับน้ำย่อยในกระเพาะ

4) ลำไส้เล็ก (Small intestine) มีความยาวประมาณ 3 เมตร ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ Duodenum, Jejunum และ Ileum ลำไส้เล็กทำหน้าที่ผลิตน้ำย่อยอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต

โปรตีน ไขมัน และดูดซึมสารอาหารเข้าสู่เซลล์ในร่างกาย ในลำไส้เล็กมีน้ำย่อยหลายชนิดช่วยย่อยอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีน ถ้าน้ำย่อยในลำไส้เล็กไม่พอจะมีน้ำย่อยจากตับ (Liver) และตับอ่อน ตับจะสร้างน้ำดีสะสมไว้ในถุงน้ำดี (Gall bladder) สำหรับย่อยไขมันให้มีขนาดเล็กลง นอกจากนี้ ลำไส้เล็กยังมีหน้าที่ดูดซึมสารอาหารเกือบทุกชนิด

5) ลำไส้ใหญ่ (Colon) ทำหน้าที่ดูดซึมน้ำ แร่ธาตุ วิตามินบางชนิดและกลูโคสเข้าสู่กระแสเลือดซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นน้ำ ในลำไส้ใหญ่จะไม่มีการย่อยอาหาร ส่วนต้นของลำไส้ใหญ่มีไส้ติ่งซึ่งไม่ได้ช่วยย่อยอาหารแต่อย่างใด ส่วนปลายของลำไส้ใหญ่เป็นไส้ตรง เชื่อมต่อไปยังทวารหนัก

6) ทวารหนัก (Anus) ขับถ่ายกากอาหาร

วิธี *In vitro* gastrointestinal extraction เป็นการจำลองสภาวะต่างๆ ในการย่อยอาหาร ได้แก่ องค์ประกอบทางเคมีของน้ำย่อย สภาวะความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะและลำไส้เล็ก การผสมของอาหารกับน้ำย่อย สัดส่วนของอาหารต่อน้ำย่อย อุณหภูมิของร่างกาย ตลอดจนระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยในแต่ละขั้นตอนตั้งแต่ในปาก กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก แต่ในการจำลองในห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่มักจะไม่รวมขั้นตอนการย่อยในปาก ด้วยเหตุผลที่ว่าอาหารอยู่ในช่องปากในระยะเวลาที่น้อยมาก โดยเฉลี่ยประมาณ 10 วินาที ถึง 2 นาที (Dean และ Ma, 2007) หลังจากนั้นจึงนำของเหลวที่ได้จากการย่อยไปวิเคราะห์หาปริมาณสารที่สนใจศึกษา อีกวิธีหนึ่งที่ได้มีการนำไปใช้หาปริมาณชีวภาพความพร้อม คือการใช้สัตว์ทดลอง (*In vivo* approaches) เมื่อเปรียบเทียบสองวิธีนี้พบว่าการใช้สัตว์ทดลองมีข้อจำกัดบางประการ เช่น การแปลผลข้อมูลอาจทำได้ไม่สมบูรณ์เนื่องจากความแตกต่างทางด้านสรีรระหว่างคนและสัตว์ที่นำมาทดลอง อีกทั้งยังต้องใช้ระยะเวลานาน และมีความยุ่งยากมากกว่าในการทดลอง และมีค่าใช้จ่ายสูงโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อต้องการวิเคราะห์ตัวอย่างเป็นจำนวนมากๆ รวมทั้งการหลีกเลี่ยงไม่ใช้และทารุณสัตว์ในการทดลองในห้องปฏิบัติการ

ในปี ค.ศ. 1969 Jacobs และ Greenman นักวิจัยจาก Welsh National School of Medicine ประเทศเวลส์ ได้ศึกษาชีวปริมาณออกฤทธิ์ (Bioavailability) ของธาตุเหล็กในอาหาร 25 ชนิด เช่น เนื้อบด เบคอน สเต็ก กะหล่ำปลี ฯลฯ โดยใช้น้ำย่อยที่เตรียมโดยการผสมเปปซิน (ร้อยละ 0.5) ในกรด HCl (0.1 นอร์มอล) แล้วจึงปรับ pH ให้ได้ประมาณ 1.5-2 แล้วจึงนำไปย่อยที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง แต่ในงานวิจัยนี้ไม่ได้มีการจำลองระบบการย่อยในลำไส้เล็ก ผลการศึกษานี้พบว่า ปริมาณของธาตุเหล็กมากกว่าครึ่งหนึ่งถูกชะออกมาสู่สารละลายหรือน้ำย่อย และปริมาณที่ถูกชะออกมานี้ยังขึ้นอยู่กับกรรมวิธีการปรุงอาหาร และ

อาหารบางชนิดอาจมีสารที่สามารถยึดจับกับธาตุเหล็กได้ดีแตกต่างกัน ต่อมาในปี ค.ศ. 1978 Rao และ Prabhavathi นักวิจัยจาก Indian Council of Medical Research ประเทศอินเดีย ได้ศึกษาวิธีการจำลองการย่อยอาหารด้วยวิธีการเช่นเดียวกันกับของ Jacobs และ Greenman เพื่อทำนายค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์ของธาตุเหล็กในอาหารชนิดต่างๆ เช่น ธัญพืช ผัก น้ำตาล ฯลฯ แต่ได้ศึกษาเพิ่มเติมในส่วนการจำลองการย่อยในลำไส้เล็ก โดยการนำส่วนที่เหลือจากการย่อยในกระเพาะไปปรับ pH ให้ได้ 7.5 แล้วจึงนำไปย่อยต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอีก 1.5 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่าค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์ของธาตุเหล็กสัมพันธ์กับปริมาณของธาตุเหล็กที่ถูกดูดซึมได้ในคนเมื่อบริโภคอาหารชนิดนั้นๆ ในปี ค.ศ. 1981 Miller และคณะนักวิจัยจากมหาวิทยาลัย Cornell และ US Plant, Soil and Nutrition Laboratory ได้ศึกษาเกี่ยวกับวิธีการหาค่าชีวภาพความพร้อม เพื่อประมาณระดับของธาตุเหล็กที่ร่างกายสามารถดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ทางระบบย่อยอาหาร โดยใช้อาหารชนิดต่างๆ เช่น ไข่ เนื้อบด แยม ข้าว ผักขม นม ชีส น้ำส้ม ซากาแฟ ฯลฯ คณะผู้วิจัยพบว่าวิธีการหาค่าชีวภาพความพร้อมนี้เป็นวิธีที่สามารถทำได้รวดเร็ว มีค่าใช้จ่ายไม่มากนัก และให้ผลการศึกษาที่ถูกต้อง ต่อมาจึงได้มีความพยายามพัฒนาวิธีการหาค่าชีวภาพความพร้อมทั้งในทวีปอเมริกาและยุโรป (Crews *et al.*, 1985; Rotard *et al.*, 1995; Minekus *et al.*, 1995; Ruby *et al.*, 1996; Rodriguez *et al.*, 1999; Oomen *et al.*, 2002) วิธี PBET สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้กับตัวอย่างต่างๆ ทางสิ่งแวดล้อม ซึ่งส่วนใหญ่เป็นดิน (Ruby *et al.*, 1993; Ruby *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 1998; Rodriguez *et al.*, 1999; Oomen *et al.*, 2003; Schroder *et al.*, 2003) และมีรายงานการประยุกต์ใช้กับตัวอย่างอาหาร (Crews *et al.*, 1985; Bermejo *et al.*, 2002; Lopez *et al.*, 2002; Mounicou *et al.*, 2002; Intawongse and Dean, 2008) รวมทั้งอาหารประเภทอาหารทะเล (Cabanero *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2008)

Navarro *et al.* (2008) ได้ประเมินค่าชีวภาพความพร้อม (Bioaccessibility) ของโลหะ 8 ชนิด ได้แก่ Ag, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb และ Sn โดยวิธี *In vitro* Physiologically Based Extraction Test (PBET) โดยทำการศึกษาในตัวอย่างหอยแมลงภู่ (*Mytilus galloprovincialis*) ที่เก็บมาจากชายฝั่งตะวันออกเฉียงเหนือในประเทศสเปนในเดือนเมษายน ปี ค.ศ. 2004, 2005 และ 2006 ผลการศึกษาพบว่า การใช้วิธี PBET เป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ได้ดีเพื่อประเมินชีวภาพความพร้อมของโลหะในตัวอย่างดังกล่าว นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังได้ทำการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation) ของวิธีการ PBET โดยการวิเคราะห์สารอ้างอิง (SRM 2977 Mussel Tissue) และยังได้ศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการเปรียบเทียบปริมาณโลหะทั้งหมดในตัวอย่าง

หอยแมลงภู่ที่เก็บมาจากจุดเก็บตัวอย่างที่แตกต่างกัน Cabanero *et al.* (2004) ได้ประเมินอันตรายจากการปนเปื้อนของซีลีเนียมและปรอทในปลา โดยพิจารณาจากค่าชีวภาพความพร้อมซึ่งได้ศึกษาจากตัวอย่างของปลาชนิดต่างๆ ที่ได้จากตลาดในประเทศสเปน ได้แก่ Swordfish (*Aphanopus carbo*), Sardine (*Sardina pilchardus*) และ Tuna (*Thunnus spp.*) เทคนิค Atomic Fluorescence Spectroscopy (AFS) ใช้สำหรับการหาความเข้มข้นทั้งหมดของซีลีเนียมและปรอท และวิเคราะห์ปริมาณชีวภาพความพร้อมโดยการจำลองระบบการย่อยในกระเพาะอาหารและลำไส้ จากผลการศึกษาพบว่า ความสามารถในการละลายของซีลีเนียมในของเหลวที่ได้จากระบบการย่อยในกระเพาะอาหารของ Swordfish และ Sardine (มีค่าร้อยละ 76 และ 83 ตามลำดับ) มีค่าสูงกว่า Tuna (มีค่าร้อยละ 50) ในขณะที่ความสามารถในการละลายของปรอทในของเหลวที่ได้จากระบบการย่อยในกระเพาะอาหารนั้น มีค่าค่อนข้างต่ำในทุกตัวอย่างที่ศึกษา (มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 9-17) นอกจากนี้ระบบการจำลองการย่อยอาหารดังกล่าวยังทำให้สามารถระบุสารประกอบโลหะอินทรีย์ชนิด Selenomethionine (SeMet) และสารประกอบอินทรีย์ของปรอทในตัวอย่างปลาทั้ง 3 ชนิดนี้ โดยการนำตัวอย่างของเหลวที่ได้จากระบบการจำลองการย่อยอาหารไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-ICP-MS ซึ่งเป็นเครื่องมือที่เชื่อมต่อเข้าด้วยกันระหว่างเครื่อง Liquid Chromatograph (LC) และเครื่อง Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer (ICP-MS) ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้พบว่า สารประกอบอินทรีย์ของปรอทมีมากกว่าร้อยละ 92 ของปริมาณปรอททั้งหมดที่มีอยู่ในตัวอย่างปลา

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

รายการวัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ พร้อมทั้งรายละเอียดบริษัทผู้ผลิตแสดงไว้ในตารางที่ 3.1 ก) และ ข)

ตารางที่ 3.1 รายการวัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้

ก) วัสดุ อุปกรณ์

วัสดุ อุปกรณ์ / รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
1. เครื่อง Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES) รุ่น JY238 Ultratrace – Ultima2	Jobin Yvon Horibaz, Longjumeau, France
2. เครื่อง Concomitant Metals Analyzer (CMA)	Jobin Yvon Horibaz, Longjumeau, France
3. เครื่องไมโครเวฟ รุ่น Multiwave	Anton Paar GmbH, Graz, Austria
4. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ Memmert	Memmert GmbH + Co.KG, Germany
5. Milli-Q™ Millipore Water Purification System	Millipore SA, Molsheim, France
6. pH Meter (SevenEasy)	Metler-Toledo AG, Switzerland
7. Centrifuge Tube Screwcap PP 50 mL	Sarstedt, Germany
8. Syringe filter nylon 0.45 µm, 25 mm	Filtrex Filtration, Singapore

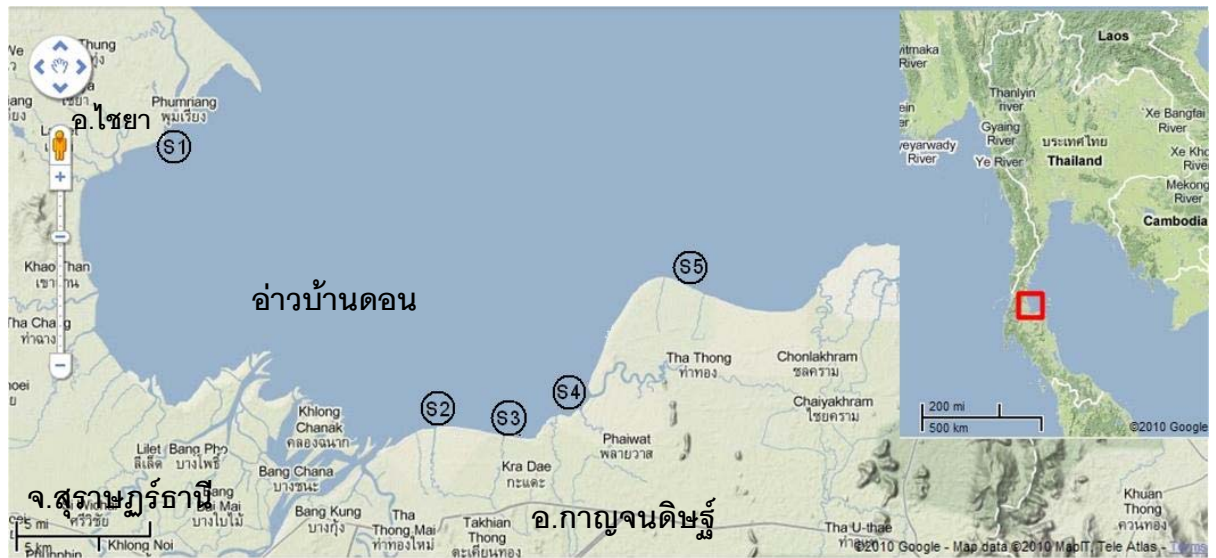
ข) สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
1. SRM 1566b Oyster Tissue	National Institute of Standards & Technology, Gaithersburg, MD, USA
2. ICP Multi Element Standard Solution	AccuStandard, Inc., CT, USA
3. Ar gas 99.999% (UHP)	Praxair, Thailand
4. Sodiumborohydride > 99%	Sigma, Germany
5. Malicacid disodium salt	Sigma, Japan
6. Bile salt	Sigma, New Zealand
7. Pancreatin	Sigma, USA
8. Pepsin	Fluka, USA
9. Lactic acid	BDH, England
10. Trisodiumcitrate	Prolabo, VWR International, Belgium
11. Sodium hydrogen carbonate	Merck, Germany
12. Acetic acid	Merck, Germany
13. Hydrochloric acid 37% w/w	Merck, Germany
14. Nitric acid 69% w/w	Merck, Germany
15. Hydrogen peroxide 30% w/w	Merck, Germany

3.2 การเก็บและเตรียมตัวอย่างหอยนางรม

3.2.1 การเก็บตัวอย่างหอยนางรม

พื้นที่ศึกษา คือแหล่งเพาะเลี้ยงหอยนางรมในจังหวัดสุราษฎร์ธานี ตั้งอยู่ที่อำเภอบ้านดอน จ.สุราษฎร์ธานี จุดเก็บตัวอย่างทั้งหมดอยู่ห่างจากชายฝั่งโดยประมาณ 1.5 กิโลเมตร ตลอดทั้งปี อำเภอบ้านดอนรับน้ำที่ระบายมาจากแม่น้ำสายหลัก คือ แม่น้ำตาปี และแม่น้ำพุมดวง และคลองอีก 7 สาย (กรมส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม, 2553) นอกจากนี้ยังรับน้ำที่ระบายมาจากชุมชน โรงงาน อุตสาหกรรม และการทำการเกษตร ในการศึกษาครั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างหอยนางรมจากทั้งหมด 5 พื้นที่ ดังต่อไปนี้ 1. ตำบลพุมเรียง อำเภอไชยา 2. ตำบลตะเคียนทอง 3. ตำบลกะแดะ 4. ตำบลพลายวาส และ 5. ตำบลท่าทอง อำเภอกาญจนดิษฐ์ ดังแสดงในรูปที่ 3.1 ในการเก็บตัวอย่างได้ดำเนินการเก็บตัวอย่างในเดือนมกราคม พ.ศ. 2553 โดยใช้หอยนางรมพื้นที่ละ 3 ตัวอย่าง (ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ) นำหอยนางรมบรรจุในถุงพลาสติกรักษาตัวอย่าง และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนการเตรียมตัวอย่าง



รูปที่ 3.1 พื้นที่เก็บตัวอย่างหอยนางรมในแหล่งเพาะเลี้ยงหอยนางรมอ่าวบ้านดอน จ.สุราษฎร์ธานี ทั้ง 5 พื้นที่ ได้แก่ S1. ตำบลพุมเรียง อำเภอไชยา S2. ตำบลตะเคียนทอง S3. ตำบลกะแดะ S4. ตำบลพลาญวาส และ S5. ตำบลท่าทอง อำเภอกาญจนดิษฐ์

3.2.2 การเตรียมตัวอย่างหอยนางรม

นำหอยนางรมที่ล้างสะอาดแล้วมาแกะเปลือกออก ล้างให้สะอาดด้วยน้ำประปา หลังจากนั้นจึงล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนอีก 2-3 ครั้ง แล้วจึงตัดเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปใส่ภาชนะเพื่ออบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (มีความชื้นโดยเฉลี่ยร้อยละ 80.2) หลังจากอบแห้งแล้วจึงนำไปบดด้วยเครื่องบดจนละเอียด แล้วร่อนด้วยตะแกรงร่อนสเตนเลส (Seive, ขนาด 0.25 mm) บรรจุใส่ถุงซิปลงไปเก็บไว้ในเดซิเคเตอร์สำหรับการวิเคราะห์ต่อไป

3.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ระบบการย่อยด้วยไมโครเวฟ

ศึกษาโดยใช้ระบบไมโครเวฟซึ่งประกอบด้วยแหล่งให้กำเนิดคลื่นไมโครเวฟ (Magnetron) ความถี่ 2.45 GHz สามารถปรับกำลังของเครื่องได้สูงสุด 1000 W ใช้ภาชนะบรรจุตัวอย่าง (Vessel) ที่ทำด้วย TFM (Fluoroplastics) ขนาด 100 มิลลิลิตร เตรียมตัวอย่างได้ครั้งละ 12 ตัวอย่าง (Rotor 12) สามารถย่อยตัวอย่างภายใต้ความดันสูงสุด 290 psi และอุณหภูมิสูงสุด 300 องศาเซลเซียส

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการย่อยตัวอย่างหอยนางรมด้วยระบบไมโครเวฟใช้วิธีมาตรฐาน EPA 3052 (USEPA, 1996) เป็นวิธีอ้างอิง พารามิเตอร์ที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมมี 3 พารามิเตอร์ ได้แก่ องค์ประกอบของสารที่ใช้ในการย่อย (Components of acid mixture, CM) กำลังของคลื่นไมโครเวฟ (Microwave power, MP) และ เวลาที่ใช้ในการย่อย (Digestion time, DT) ซึ่งเป็นตัวแปรที่สำคัญที่สุดในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ระบบการย่อยด้วยไมโครเวฟ (Santelli, 2006) ได้ศึกษาพารามิเตอร์เหล่านี้ใน 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ ปานกลาง และสูง ดังแสดงในตารางที่ 3.2 และใช้การออกแบบการทดลองแบบ Two-Level Factorial Design และ Central Point Replication (Soylak *et al.*, 2007) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม ดังแสดงในตารางที่ 3.3 มีการตั้งโปรแกรมการให้ความร้อนของระบบการย่อยไมโครเวฟดังแสดงในตารางที่ 3.4 ประกอบด้วย 4 ขั้นตอนคือ ขั้นแรกที่กำลัง 250 วัตต์เป็นเวลา 2 นาที ขั้นที่ 2 หยุดการให้กำลังเป็นเวลา 2 นาที ขั้นที่ 3 ที่กำลัง 250 วัตต์เป็นเวลา 2 นาที และขั้นที่ 4 ซึ่งเป็นขั้นสุดท้ายนี้จะต้องมีการเปลี่ยนค่าของกำลังของคลื่นไมโครเวฟ (Microwave Power) และเวลา ให้สอดคล้องกับแต่ละการทดลองตามที่ระบุในตารางที่ 3.3

ในการย่อยตัวอย่างเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมแบ่งออกเป็น 2 กรณีดังนี้คือ

3.3.1 กรณีที่ใช้สารอ้างอิง 1566b (Oyster Tissue) จะใช้สารปริมาณ 0.5 กรัม ต่อการย่อย 1 ข้ำ และเมื่อย่อยตามสภาวะในการทดลองในตารางที่ 3.3 เสร็จแล้ว นำสารตัวอย่างไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 41 ใส่ในขวดวัดปริมาตรและปรับปริมาตรให้ได้ 10 mL แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณ Cd และ Pb โดยใช้เทคนิค ICP-OES ตามรายละเอียดในข้อ 3.4

3.3.2 กรณีที่ใช้ตัวอย่างหอยนางรม จะใช้ตัวอย่างหอยนางรมปริมาณ 0.5 กรัม ต่อการย่อย 1 ข้ำ ตัวอย่างหอยนางรมที่นำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมแต่ละตัวอย่างจะถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้ ส่วนที่ 1 นำไปย่อยโดยไม่ต้อง spike สารมาตรฐาน (Unspiked Sample) และส่วนที่ 2 มีการ Spike สารละลายมาตรฐานของ Hg ที่ทราบปริมาณที่แน่นอน คือ 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Spiked Sample) แล้วจึงนำไปย่อยด้วยระบบไมโครเวฟ ภายหลังการย่อยตามสภาวะในการทดลองในตารางที่ 3.3 แล้วจึงนำสารตัวอย่างไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 41 ใส่ในขวดวัดปริมาตรและปรับปริมาตรให้ได้ 25 mL แล้วจึงนำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณ Hg โดยใช้เทคนิค ICP-OES ตามรายละเอียดในข้อ 3.4 ซึ่งร้อยละการกลับคืนของ Hg คำนวณได้จากสมการข้างล่างนี้

$$\text{ร้อยละการกลับคืน} = \frac{C_{\text{spiked sample}} - C_{\text{unspiked sample}}}{C_{\text{added}}} \times 100$$

เมื่อ $C_{\text{spiked sample}}$ คือ ปริมาณสารในตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน

$C_{\text{unspiked sample}}$ คือ ปริมาณสารที่มีในตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสารละลายมาตรฐาน

C_{added} คือ ปริมาณสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไปในตัวอย่าง

ตารางที่ 3.2 พารามิเตอร์ที่ใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยด้วยระบบไมโครเวฟ

พารามิเตอร์	หน่วย	ระดับต่ำ (-)	ระดับปานกลาง (0)	ระดับสูง (+)
องค์ประกอบของสารที่ใช้ในการย่อย, CM (conc. $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2 : \text{H}_2\text{O}$)	mL	4:2:4	6:2:2	8:2:0
Microwave Power, MP	Watt	500	750	1000
เวลาที่ใช้ในการย่อย, DT	นาที	5	10	15

ตารางที่ 3.3 การออกแบบการทดลองแบบ Two-Level Factorial Design และ Central Point Replication

การทดลอง	CM ($\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}$)	MP	DT
1	+ (8:2:0)	+ (1000)	+ (15)
2	+ (8:2:0)	+ (1000)	- (5)
3	+ (8:2:0)	- (500)	- (5)
4	+ (8:2:0)	- (500)	+ (15)
5	- (4:2:4)	+ (1000)	+ (15)
6	- (4:2:4)	+ (1000)	- (5)
7	- (4:2:4)	- (500)	+ (15)
8	- (4:2:4)	- (500)	- (5)
9	0 (6:2:2)	0 (750)	0 (10)

ตารางที่ 3.4 โปรแกรมการให้ความร้อนของระบบการย่อยไมโครเวฟ

ขั้นตอน	Power (Watt)	เวลา (นาที)
1	250	2
2	0	2
3	250	2
4	500	5
Cooling	0	5

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักโดยวิธี Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES)

สารอ้างอิง SRM 1566b (Oyster tissue) ที่ย่อยได้จากข้อ 3.3.1 ตัวอย่างหอยนางรมที่ย่อยได้จากข้อ 3.3.2 และตัวอย่างหอยนางรมทั้งหมดจากทั้ง 5 พื้นที่เก็บตัวอย่าง ซึ่งได้จากการย่อย ณ สภาวะที่เหมาะสม ถูกนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ Cd Pb และ Hg โดยใช้เครื่อง ICP-OES ที่ต่อเข้ากันกับเครื่อง Concomitant Metals Analyzer (CMA) ซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชันของธาตุ ทำให้ธาตุ (Hg) ในตัวอย่างระเหยกลายเป็นไอเย็น (Cold Vapor) โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ตามที่ระบุไว้ในตารางที่ 3.5 และวิเคราะห์ปริมาณของ Cd Pb และ Hg โดยใช้วิธี External Calibration โดยที่สารละลายมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ต้องเตรียมให้มีลักษณะของ Matrix ใกล้เคียงกับ Matrix ของสารละลายตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์มากที่สุด

ในการวิเคราะห์ทุกครั้งจะต้องมีการวิเคราะห์แบลงค์ (Blank analyses) 2 ชนิด คือ Calibration blank เพื่อนำไปใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) และ Method blank เพื่อนำไปใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์ โดยการนำค่าสัญญาณของแบลงค์ไปหักออกจากค่าสัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง

ตารางที่ 3.5 พารามิเตอร์ของเครื่อง ICP-OES ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนัก

พารามิเตอร์ (หน่วย)	ค่าที่ใช้
RF Power (W)	1000
Plasma gas flow (Lmin ⁻¹)	12
Auxiliary gas flow (Lmin ⁻¹)	0.2
Nebulizer model	Meinhard Nebulizer Model: TR-50-C1
Nebulizer gas flow (psi)	45.0
Sample flow (mLmin ⁻¹)	1.0
Drain flow (mLmin ⁻¹)	4.0
6 M HCl flow (mLmin ⁻¹)	0.6
0.5% w/v NaBH ₄ in 0.5 M NaOH flow (mLmin ⁻¹)	1.2
Rinse delay (s)	30
Number of replicates	3
Wavelengths (nm)	
Cd	228.802
Pb	220.353
Hg	194.163

3.5 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)

3.5.1 การหาความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีการวิเคราะห์

การหาความแม่นยำทำได้โดยการวิเคราะห์สารอ้างอิง SRM 1566b ซ้ำ 7 ครั้ง ซึ่งเตรียมตัวอย่างโดยการย่อยด้วยระบบไมโครเวฟตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.3 และนำตัวอย่างที่ย่อยได้นี้ไปวิเคราะห์หาปริมาณ Cd และ Pb ด้วยเครื่อง ICP-OES ตามสภาวะที่ใช้ในวิธีการทดลองในข้อ 3.4 แล้วเปรียบเทียบค่าที่วิเคราะห์ได้กับค่าที่รับรอง (Certified Value) เพื่อตรวจสอบความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์ สำหรับ Hg เนื่องจาก SRM 1566b มีปริมาณของธาตุชนิดนี้เท่ากับ 0.037 µg/g ซึ่งน้อยกว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจหาปริมาณได้ (LOQ) จึงใช้วิธีการวิเคราะห์ Spiked Sample ที่ระดับความเข้มข้นที่ใกล้เคียงกับระดับที่มีอยู่ในตัวอย่าง (50 µg/g) จำนวน 7 ซ้ำ

การหาความเที่ยงทำได้โดยการวิเคราะห์สารอ้างอิง SRM 1566b (สำหรับ Cd และ Pb) และ Spiked Sample (สำหรับ Hg) ซ้ำ 7 ครั้ง แล้วคำนวณหาค่า % RSD เพื่อตรวจสอบความเที่ยงที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำๆ ในสภาวะเดียวกัน (Repeatability)

3.5.2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (LOD) และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจหาปริมาณได้ (LOQ)

นำ Method blank ที่เตรียมได้จากการทดลอง ณ สภาวะที่เหมาะสมตามที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.3 ไปทำการวิเคราะห์ซ้ำ 7 ครั้ง ตามวิธีการวิเคราะห์ในข้อ 3.4 แล้วคำนวณค่าเฉลี่ย (Mean) ของสัญญาณการวิเคราะห์ (Peak Intensity) ของ Cd, Pb และ Hg และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของสัญญาณการวิเคราะห์นั้น ค่า LOD และ LOQ สามารถคำนวณได้จากสมการข้างล่างนี้

$$\text{LOD} = 3\text{SD}/m$$

$$\text{และ } \text{LOQ} = 10\text{SD}/m$$

โดยที่ SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณการวิเคราะห์ที่ได้จากการวิเคราะห์ Method Blank จำนวน 7 ครั้ง และ m คือ slope ของกราฟมาตรฐานของโลหะหนักที่วิเคราะห์

3.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนการย่อยตัวอย่างด้วยระบบ PBET

พารามิเตอร์ที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ pH ของน้ำย่อยทั้งในกระเพาะและลำไส้เล็ก และเวลาที่ใช้ในการย่อย (DT) ซึ่งได้ศึกษาพารามิเตอร์นี้ใน 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ ปานกลาง และสูง ดังแสดงในตารางที่ 3.6 และใช้การออกแบบการทดลองแบบ Two-Level Factorial Design และ Central Point Replication (Soylak *et al.*, 2007) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม ดังแสดงในตารางที่ 3.7 ก) และ ข)

ตารางที่ 3.6 พารามิเตอร์ที่ใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการจำลองระบบการย่อยอาหาร

พารามิเตอร์	หน่วย	ระดับต่ำ (-)	ระดับปานกลาง (0)	ระดับสูง (+)
<i>Gastric Phase</i>				
pH	-	1.5	2.5	3.5
เวลาที่ใช้ในการย่อย (DT)	ชั่วโมง	1	2	3
<i>Intestinal Phase</i>				
pH	-	6.0	7.0	8.0
เวลาที่ใช้ในการย่อย (DT)	ชั่วโมง	1	2	3

ตารางที่ 3.7 การออกแบบการทดลองแบบ Two-Level Factorial Design และ Central Point Replication

ก) การจำลองการย่อยอาหารในกระเพาะอาหาร (Gastric Phase)

การทดลอง	Gastric Phase		Intestinal Phase	
	pH	DT	pH	DT
1	+ (3.5)	+ (3)	7.0	2
2	+ (3.5)	- (1)	7.0	2
3	- (1.5)	+ (3)	7.0	2
4	- (1.5)	- (1)	7.0	2
5	0 (2.5)	0 (2)	7.0	2

ข) การจำลองการย่อยอาหารในลำไส้เล็ก (Intestinal Phase)

การทดลอง	Gastric Phase		Intestinal Phase	
	pH	T	pH	T
1	1.5	2	+ (8.0)	+ (3)
2	1.5	2	+ (8.0)	- (1)
3	1.5	2	- (6.0)	+ (3)
4	1.5	2	- (6.0)	- (1)
5	1.5	2	0 (7.0)	0 (2)

วิธีการที่ใช้ ได้แก่ วิธี PBET ซึ่งถูกพัฒนาขึ้นมาโดย Ruby *et al.* (1996) และวิธีการนี้ได้ถูกปรับเปลี่ยนในบางขั้นตอน เพื่อให้สามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการได้ดีขึ้น โดย British Geological Survey (BGS) (Cave *et al.*, 2003) ผู้วิจัยจึงได้นำวิธีนี้มาใช้เพื่อประเมินชีวภาพความพร้อมของโลหะหนักในตัวอย่างหอยนางรม โดยการจำลองระบบการย่อยอาหารซึ่งประกอบด้วย 2 ขั้นตอนหลัก คือการจำลองระบบการย่อยในกระเพาะอาหาร และระบบการย่อยในลำไส้เล็ก ดังแสดงในรูปที่ 3.2 ซึ่งมีวิธีการทดลองโดยละเอียดดังต่อไปนี้

3.6.1) ชั่งสารอ้างอิง SRM 1566b (0.3000 g) ใส่ในหลอดเหวี่ยงชนิดโพลีโพรพิลีน (Polypropylene Centrifuge Tube) แล้วนำไปเติม Gastric Solution ปริมาตร 30 mL (ซึ่งเตรียมโดยการเติม Pepsin ปริมาณ 0.625 g, Malate ปริมาณ 0.25 g, Citrate ปริมาณ 0.25 g, Acetic Acid ปริมาตร 250 μ L และ Lactic Acid ปริมาตร 250 μ L และนำมาปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน (DI) ให้ครบ 500 mL และปรับ pH เป็น 1.5 [ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม: ให้เปลี่ยนค่า pH ตามที่ระบุไว้ในตารางที่ 3.7 ก] แล้วจึงปิดฝาให้สนิท

3.6.2) นำสารตัวอย่างที่เตรียมได้ไปย่อยด้วยเครื่อง Shaking Water Bath โดยกำหนดให้มีการเขย่าที่ 100 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง [ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม: ให้เปลี่ยนเวลาที่ใช้ในการย่อยตามที่ระบุไว้ในตารางที่ 3.7 ก]

3.6.3) นำสารตัวอย่างไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงชนิดโพลีโพรพิลีน ที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงปิเปตสารละลายตัวอย่างส่วนที่ใสปริมาตร 5 mL ใส่ในหลอดเก็บตัวอย่างและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C (เป็นตัวอย่างที่ย่อยจากน้ำย่อยในกระเพาะ: Gastric Phase, GP)

3.6.4) นำสารตัวอย่างที่เหลือจากการย่อยใน Gastric Phase ไปเติม Gastric Solution ปริมาตร 5 mL และเติม Bile Salts ปริมาณ 26.2 mg และ Pancreatin ปริมาณ 7.5 mg เขย่าสารตัวอย่างให้เข้ากัน ปรับ pH ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Sodium bicarbonate ให้ได้ pH เป็น 7.0 [ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม: ให้เปลี่ยนค่า pH ตามที่ระบุไว้ในตารางที่ 3.7 ข]

3.6.5) นำสารตัวอย่างไปย่อยในเฟสต่อไปด้วยเครื่อง Shaking Water Bath โดยกำหนดให้มีการเขย่าที่ 100 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง [ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม: ให้เปลี่ยนเวลาที่ใช้ในการย่อยตามที่ระบุไว้ในตารางที่ 3.7 ข]

3.6.6) นำสารตัวอย่างไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงชนิดโพลีโพรพิลีน ที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงปิเปตสารละลายตัวอย่างส่วนที่ใสปริมาตร 5 mL ใส่ในหลอดเก็บตัวอย่างและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C (เป็นตัวอย่างที่ย่อยจากน้ำย่อยในลำไส้เล็ก: Intestinal Phase, IP)

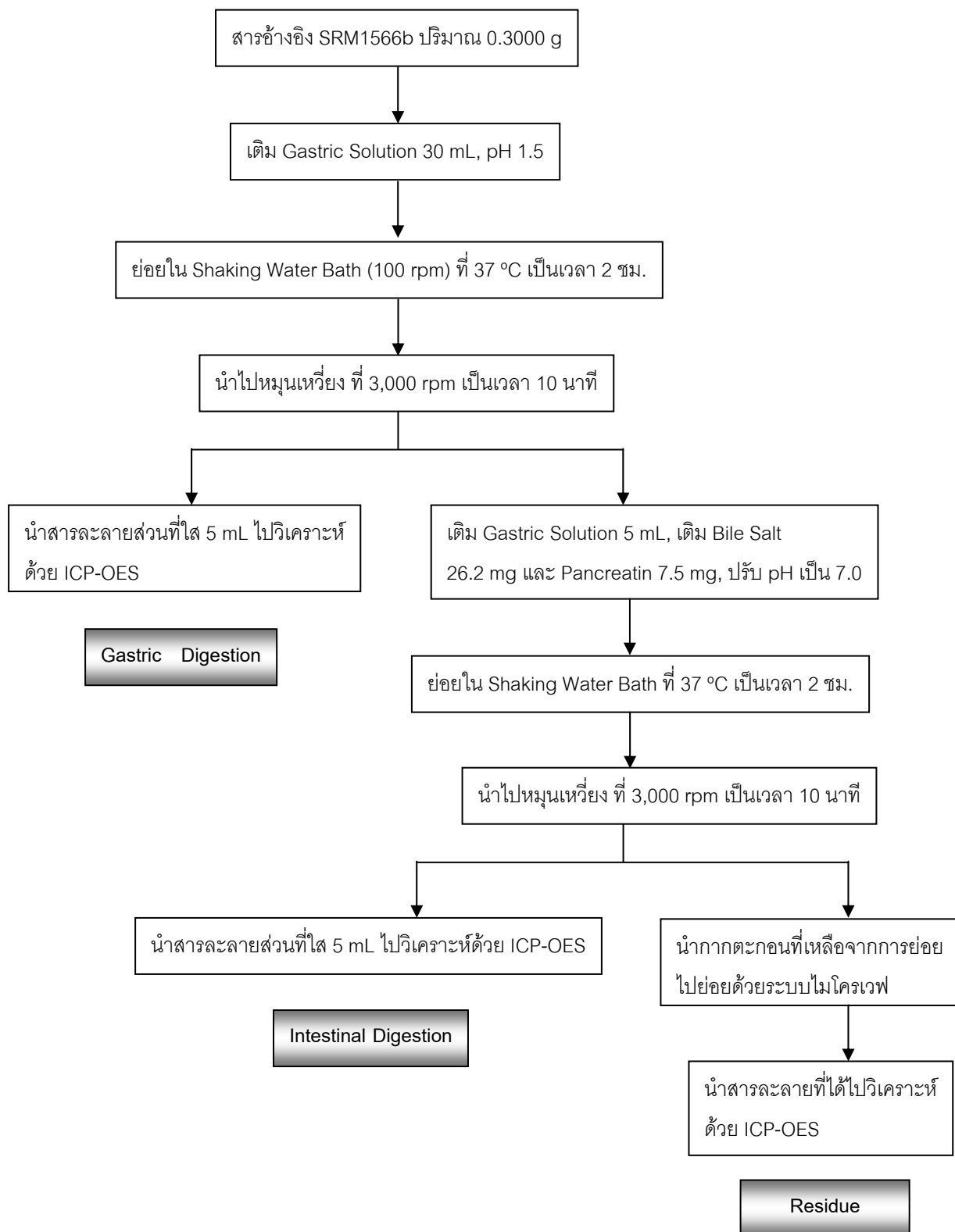
3.6.7) นำกากตะกอนที่เหลือจากการย่อยจาก Intestinal Phase ไปย่อยด้วยระบบไมโครเวฟ โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.3 สารละลายที่ได้นี้กำหนดให้เป็นส่วนของ Residue

3.6.8) นำสารตัวอย่างที่ย่อยได้ทั้ง 3 ชนิด (สารละลาย GP, IP และ Residue) ไปวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักด้วยเครื่อง ICP-OES ตามวิธีการที่ระบุไว้ในข้อ 3.4

3.7 การวิเคราะห์ปริมาณชีวภาพความพร้อมของโลหะหนักในตัวอย่างหอยนางรม

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมตามที่ได้ศึกษาในหัวข้อ 3.6 แล้วจึงนำตัวอย่างหอยนางรมที่ได้จากพื้นที่เก็บตัวอย่างทั้ง 5 แห่งไปศึกษาปริมาณชีวภาพความพร้อมตามขั้นตอนที่ระบุไว้ในหัวข้อ 3.6.1 ถึง 3.6.8 โดยที่ค่าร้อยละของปริมาณชีวภาพความพร้อม (% Bioaccessibility) ของโลหะหนักในตัวอย่างหอยนางรมสามารถคำนวณได้จากความสัมพันธ์ดังสมการข้างล่างนี้ (Oomen *et al.*, 2002)

$$\% \text{ Bioaccessibility} = \frac{\text{ปริมาณโลหะหนักที่วิเคราะห์ได้จากระบบการจำลองการย่อยอาหาร (mg)} \times 100}{\text{ปริมาณโลหะหนักที่มีอยู่ในตัวอย่างหอยนางรมก่อนการย่อย (mg)}}$$



รูปที่ 3.2 แผนผังขั้นตอนการจำลองระบบการย่อยอาหารในกระเพาะอาหาร (Gastric Digestion) และลำไส้เล็ก (Intestinal Digestion)

บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

4.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ระบบการย่อยด้วยไมโครเวฟ

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ระบบการย่อยด้วยไมโครเวฟในระบบปิด ในกรณีของการศึกษาธาตุ Cd และ Pb ใช้สารอ้างอิง SRM 1566b (น้ำหนัก 0.5 กรัม) และในกรณีของธาตุ Hg ใช้ตัวอย่างหอยนางรม (น้ำหนัก 0.5 กรัม) ที่เติมสารละลายมาตรฐานของ Hg ปริมาณที่ทราบค่าแน่นอนลงไป ซึ่งภายหลังการย่อย ทั้งสารอ้างอิง SRM 1566b และตัวอย่างหอยนางรมถูกนำไปวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ Cd, Pb และ Hg ด้วยเทคนิค ICP-OES ตัวแปรที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ องค์ประกอบของสารที่ใช้ในการย่อย (CM) กำลังของคลื่นไมโครเวฟที่ใช้ในการย่อย (MP) และเวลาที่ใช้ในการย่อย (DT) และจากการใช้การออกแบบการทดลองแบบ Two-Level Factorial Design และ Central Point Replication เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมได้ค่าร้อยละการกลับคืน (% Recovery) ของแต่ละธาตุที่วิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 4.1 ก) และ ข) เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาที่ได้ตั้งแต่การทดลองที่ 1-9 พบว่าการทดลองที่ 1 ให้ค่าร้อยละการกลับคืนดีที่สุดที่สุด เท่ากับ 91.4, 104.7 และ 105.8 สำหรับ Cd, Pb และ Hg ตามลำดับ และสารละลายที่ได้จากการย่อยมีลักษณะใส แสดงว่าองค์ประกอบของตัวอย่างที่เป็นสารอินทรีย์ถูกย่อยสลายสมบูรณ์ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย่อยตัวอย่างหอยนางรมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนัก คือ ใช้อัตราส่วนของสารที่ใช้ย่อยระหว่าง conc. HNO_3 : H_2O_2 : H_2O เป็น 8 : 2 : 0 mL ใช้กำลังของคลื่นไมโครเวฟ 1000 วัตต์ และใช้เวลาในการย่อยเท่ากับ 15 นาที

ตารางที่ 4.1 ผลการศึกษาสภาพที่เหมาะสมโดยการย่อยด้วยระบบไมโครเวฟ

ก) Cd และ Pb

การทดลองที่	Cd ($\mu\text{g/g}$, DW), n=3		Pb ($\mu\text{g/g}$, DW), n =3	
	ค่าที่รับรอง = $2.48 \pm 0.08 \mu\text{g/g}$		ค่าที่รับรอง = $0.308 \pm 0.009 \mu\text{g/g}$	
	ค่าที่วิเคราะห์ได้	ร้อยละการกลับคืน	ค่าที่วิเคราะห์ได้	ร้อยละการกลับคืน
1	2.266 ± 0.067	91.4	0.323 ± 0.017	104.7
2	2.174 ± 0.142	87.6	0.353 ± 0.035	114.7
3	2.004 ± 0.208	80.8	0.316 ± 0.020	102.5
4	2.100 ± 0.252	84.7	0.282 ± 0.034	91.7
5	1.842 ± 0.141	74.3	0.246 ± 0.009	79.7
6	1.799 ± 0.209	72.5	0.337 ± 0.010	109.3
7	1.747 ± 0.096	70.4	0.263 ± 0.020	85.3
8	1.548 ± 0.093	62.4	0.219 ± 0.013	71.1
9	2.014 ± 0.162	81.2	0.342 ± 0.027	111.2

ข) Hg

การทดลองที่	Hg ($\mu\text{g/g}$, DW), n=3		
	ค่าที่เติมในตัวอย่าง (C_{added}) = $0.050 \mu\text{g/g}$		
	$C_{\text{spiked sample}}$	$C_{\text{unspiked sample}}$	ร้อยละการกลับคืน
1	0.253 ± 0.004	0.201 ± 0.020	105.8
2	0.354 ± 0.010	0.300 ± 0.032	106.4
3	0.333 ± 0.006	0.289 ± 0.007	86.7
4	0.287 ± 0.008	0.228 ± 0.021	118.1
5	0.262 ± 0.015	0.212 ± 0.021	100.4
6	0.202 ± 0.015	0.145 ± 0.014	113.8
7	0.239 ± 0.018	0.209 ± 0.018	60.6
8	0.266 ± 0.012	0.233 ± 0.008	65.9
9	0.238 ± 0.005	0.203 ± 0.006	69.0

4.2 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ (Method Validation)

4.2.1 การหาความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีการวิเคราะห์

ตารางที่ 4.2 ก) และ ข) แสดงผลการวิเคราะห์สารอ้างอิง (SRM 1566b Oyster tissue) และตัวอย่างหอยนางรมที่เติมสารละลายมาตรฐาน (Spiked Sample) โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำ 7 ครั้ง ค่าที่ได้จากวิธีการวิเคราะห์ตัวอย่างซึ่งเตรียมโดยการย่อยด้วยระบบไมโครเวฟและวิเคราะห์หาปริมาณ Cd, Pb และ Hg ด้วยเทคนิค ICP-OES พบว่ามีค่าร้อยละการกลับคืนเฉลี่ย 98.0, 92.0 และ 91.7 ตามลำดับ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 5.3, 6.0 และ 11.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงว่าวิธีการวิเคราะห์นี้มีความถูกต้องและความเที่ยงเหมาะสมต่อการวิเคราะห์ตัวอย่างหอยนางรม

ตารางที่ 4.2 ผลการวิเคราะห์ SRM 1566b (Oyster tissue) ซึ่งเตรียมตัวอย่างโดยการย่อยด้วยระบบไมโครเวฟ และวิเคราะห์หาปริมาณ Cd, Pb และ Hg ด้วยเทคนิค ICP-OES

ก) Cd และ Pb

ครั้งที่ วิเคราะห์	Cd		Pb	
	ค่าที่รับรอง = 2.48 ± 0.08 µg/g		ค่าที่รับรอง = 0.308 ± 0.009 µg/g	
	ค่าที่วิเคราะห์ได้ (µg/g)	ร้อยละ การกลับคืน	ค่าที่วิเคราะห์ได้ (µg/g)	ร้อยละ การกลับคืน
1	2.425	97.8	0.301	97.7
2	2.216	89.4	0.266	86.2
3	2.298	92.7	0.263	85.3
4	2.508	101.1	0.280	90.9
5	2.574	103.8	0.295	95.9
6	2.521	101.6	0.305	98.9
7	2.478	99.9	0.274	89.0
ค่าเฉลี่ย, n=7	2.431	98.0	0.283	92.0
SD	0.129	5.2	0.017	5.5
% RSD	5.3	5.3	6.0	6.0

๗) Hg

ครั้งที่ วิเคราะห์	Hg (µg/g, Dry Wt.)			
	ค่าที่เติมในตัวอย่าง (C_{spiked}) = 0.050 µg/g			
	$C_{\text{spiked sample}}$	$C_{\text{unspiked sample}}$	C_{found}	ร้อยละ การกลับคืน
1	0.361	0.314	0.047	93.8
2	0.319	0.263	0.056	111.6
3	0.321	0.277	0.044	87.4
4	0.311	0.268	0.043	86.1
5	0.356	0.315	0.041	82.1
6	0.304	0.262	0.042	84.8
7	0.364	0.316	0.048	96.2
ค่าเฉลี่ย, n=7			0.046	91.7
SD			0.005	10.1
% RSD			11.0	11.0

4.2.2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (LOD) และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจหาปริมาณได้ (LOQ)

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (LOD) และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจหาปริมาณได้ (LOQ) ของวิธีการย่อยตัวอย่างหอยนางรมด้วยระบบไมโครเวฟและวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักด้วยเครื่อง ICP-OES

ตารางที่ 4.3 ขีดจำกัดต่ำสุดของวิธีวิเคราะห์ (LOD และ LOQ) ของวิธีการย่อยตัวอย่างหอยนางรมด้วยระบบไมโครเวฟและวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ICP-OES

ธาตุที่วิเคราะห์	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)
Cd	2.8	9.4
Pb	5.8	19.4
Hg	5.7	18.9

4.3 การวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักในตัวอย่างหอยนางรมโดยเทคนิค ICP-OES

เมื่อนำตัวอย่างหอยนางรมมาเตรียมตัวอย่างโดยการย่อยด้วยระบบไมโครเวฟตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากผลการศึกษาในข้อ 4.1 คือ ใช้อัตราส่วนของสารที่ใช้ย่อยระหว่าง $\text{conc. HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2 : \text{H}_2\text{O}$ เป็น 8 : 2 : 0 mL ใช้กำลังของคลื่นไมโครเวฟ 1000 วัตต์ และใช้เวลาในการย่อย เท่ากับ 15 นาที หลังจากนั้นจึงนำตัวอย่างที่ย่อยได้ไปวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ Cd, Pb และ Hg ด้วยเทคนิค ICP-OES รูปที่ 4.1 แสดงปริมาณ Cd, Pb และ Hg ในตัวอย่างหอยนางรมที่เก็บมาจากบริเวณแหล่งเพาะเลี้ยงในจังหวัดสุราษฎร์ธานี ทั้งหมด 5 พื้นที่ ได้แก่ S1, S2, S3, S4 และ S5 ตารางที่ 4.4 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณโลหะหนักในตัวอย่างหอยนางรมดังกล่าวกับเกณฑ์มาตรฐานของ FDA & EPA Safety Levels in Regulations and Guidance (4.0 และ 1.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักสด สำหรับ Cd และ Pb ตามลำดับ) และเกณฑ์มาตรฐานของประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529 (0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักสด สำหรับ Hg) พบว่าปริมาณเฉลี่ยของ Cd / Pb / Hg ในตัวอย่างหอยนางรมจากพื้นที่ S1, S2, S3, S4 และ S5 มีค่าเท่ากับ 0.698 ± 0.114 / 0.256 ± 0.095 / 0.110 ± 0.077 , 0.550 ± 0.039 / 0.368 ± 0.066 / 0.083 ± 0.039 , 0.430 ± 0.044 / 0.300 ± 0.076 / 0.106 ± 0.051 , 0.423 ± 0.059 / 0.218 ± 0.044 / 0.049 ± 0.042 และ 0.343 ± 0.020 / 0.233 ± 0.071 / 0.031 ± 0.015 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (น้ำหนักสด) ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าทุกตัวอย่างจากพื้นที่เก็บตัวอย่างทั้ง 5 แหล่งมีปริมาณ Cd, Pb และ Hg ในระดับที่ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดไว้ แสดงให้เห็นว่า หอยนางรมจากแหล่งเลี้ยงทั้ง 5 แหล่งนี้ มีระดับการปนเปื้อนของโลหะหนักทั้ง 3 ชนิดนี้อยู่ในระดับที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค และเมื่อพิจารณาระดับการปนเปื้อนของโลหะหนักในหอยนางรมจากแหล่งเลี้ยงต่างๆ พบว่า ระดับการปนเปื้อนของ Cd โดยเฉลี่ยในระดับที่สูงที่สุดพบในหอยนางรมจากแหล่งเลี้ยง S1 รองลงมาคือ S2, S3, S4 และ S5 ตามลำดับ สำหรับระดับการปนเปื้อนของ Pb โดยเฉลี่ยในระดับที่สูงที่สุดพบในหอยนางรมจากแหล่งเลี้ยง S2 รองลงมาคือ S3, S1, S5 และ S4 ตามลำดับ ส่วน Hg พบว่ามีระดับการปนเปื้อนโดยเฉลี่ยในระดับที่ต่ำมาก นั่นคือต่ำกว่า 0.110 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากตัวอย่างหอยนางรมทั้ง 5 แหล่ง

ในด้านความสัมพันธ์ของแหล่งที่ตั้งของพื้นที่เก็บตัวอย่าง กับระดับการปนเปื้อนของโลหะหนักทั้ง 3 ชนิดที่ศึกษา พบว่าปริมาณการปนเปื้อนของ Cd แปรผันตามแหล่งที่ตั้งดังนี้คือ ปริมาณการปนเปื้อนเพิ่มสูงขึ้นเมื่อพื้นที่เก็บตัวอย่างอยู่ใกล้กับชุมชน โรงงานอุตสาหกรรม และพื้นที่การเกษตร นั่นคือบริเวณ S1 มีการปนเปื้อนของ Cd สูงที่สุด รองลงมาคือบริเวณ S2, S3, S4 และ S5 ตามลำดับ ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากการปล่อยน้ำเสียจากชุมชน และโรงงานลงสู่แม่น้ำลำคลอง

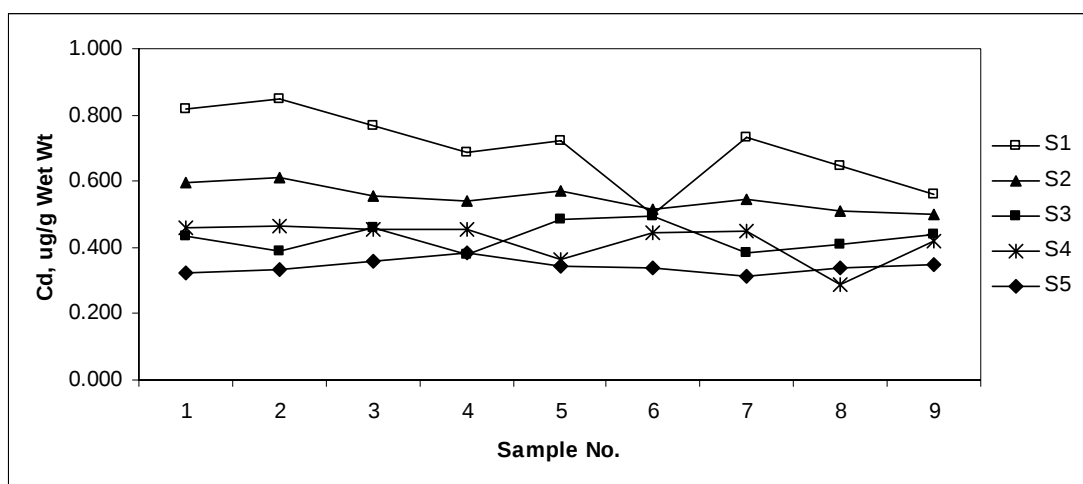
รวมทั้งจากการชะล้างของหน้าดินโดยน้ำฝนจะชะโลหะหนักจากแหล่งมลพิษที่มีโลหะหนักอยู่ เช่น กองขยะ การทำเหมืองแร่ ลงสู่แม่น้ำลำคลอง สำหรับปริมาณการปนเปื้อนของโลหะอีก 2 ชนิดคือ Pb และ Hg นั้น พบว่ามีความสัมพันธ์กับแหล่งเลี้ยวหอยนางรมในทำนองเดียวกันกับ Cd คือ บริเวณ S1, S2 และ S3 ซึ่งตั้งอยู่ใกล้กับชุมชน โรงงานอุตสาหกรรม และพื้นที่การเกษตร จะมียกระดับการปนเปื้อนที่สูงกว่าบริเวณ S4 และ S5 ซึ่งตั้งอยู่ห่างไกลออกมา

เมื่อเปรียบเทียบระดับการปนเปื้อนโลหะหนักทั้ง 3 ชนิดที่ศึกษาในครั้งนี้นี้กับผลงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่าในปี พ.ศ. 2549 มีรายงานการปนเปื้อนของ Cd ในหอยนางรมเท่ากับ 0.3352 ± 0.5730 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (สุนทร และประทุมวัลย์, 2549) และในปี พ.ศ. 2551 มีรายงานมีรายงานการปนเปื้อนของ Cd ในหอยนางรมเท่ากับ 1.128 ± 0.126 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (น้ำหนกสด) ในขณะที่ในงานวิจัยนี้พบว่ามียกระดับการปนเปื้อนเฉลี่ยของ Cd อยู่ในช่วง 0.343 ± 0.020 ถึง 0.698 ± 0.114 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (น้ำหนกสด) ซึ่งไม่สามารถสรุปแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงที่แน่นอนได้ เนื่องจากเมื่อเวลาผ่านไประดับการปนเปื้อนมีทั้งเพิ่มขึ้นและลดลง จำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมเพื่อดูแนวโน้มการปนเปื้อนในช่วงเวลาเดียวกันของแต่ละปี หรือในภาพรวมของแต่ละปีในทุกๆ ปีอย่างต่อเนื่องกัน ในกรณีของ Pb พบว่าในปี พ.ศ. 2549 มีรายงานโดยสมชาย และคณะ เกี่ยวกับการศึกษาการปนเปื้อนของตะกั่วในหอยนางรมบริเวณอ่าวบ้านดอน เป็นระยะเวลา 4 ปี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2542 ถึง พ.ศ. 2545 พบว่ามีค่าความเข้มข้นเฉลี่ยเพิ่มขึ้น 0.400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีค่าพิสัยอยู่ในช่วง $0.059 - 0.902$ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (อ้างถึงใน อัญชลี, 2551) ต่อมา มีรายงานการปนเปื้อนเฉลี่ยในช่วงระยะเวลา 2 ปี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546 ถึง พ.ศ. 2547 เป็นปริมาณ 0.1519 ± 0.3480 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (สุนทร และประทุมวัลย์, 2549) และในปี พ.ศ. 2551 มีรายงานผลการศึกษาการปนเปื้อนของโลหะหนักในหอยนางรม บริเวณแหล่งเพาะเลี้ยงอำเภอกาญจนดิษฐ์ จังหวัดสุราษฎร์ธานี (อัญชลี, 2551) พบว่ามีปริมาณตะกั่ว 0.210 ± 0.063 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (น้ำหนกสด) ในงานวิจัยครั้งนี้พบว่ามียกระดับการปนเปื้อนเฉลี่ยของ Pb อยู่ในช่วง 0.218 ± 0.044 ถึง 0.368 ± 0.066 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (น้ำหนกสด) แนวโน้มการเปลี่ยนแปลงในช่วงระยะเวลาหลายปีที่ผ่านมาพบว่าระดับการปนเปื้อนของ Pb มีการเพิ่มขึ้นและลดลงไม่แน่นอน ควรมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมเพื่อดูแนวโน้มการปนเปื้อนในช่วงเวลาเดียวกันของแต่ละปี หรือในภาพรวมของแต่ละปีในทุกๆ ปีอย่างต่อเนื่องกันในการทำนองเดียวกันกับ Cd สำหรับแนวโน้มการปนเปื้อนของ Hg นั้น พบว่าในปี พ.ศ. 2551 มีรายงานผลการศึกษาการปนเปื้อนของ Hg ในหอยนางรม บริเวณแหล่งเพาะเลี้ยงอำเภอกาญจนดิษฐ์ จังหวัดสุราษฎร์ธานี เท่ากับ 0.069 ± 0.002 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (น้ำหนกสด) (อัญชลี, 2551) สำหรับในงานวิจัยนี้มี

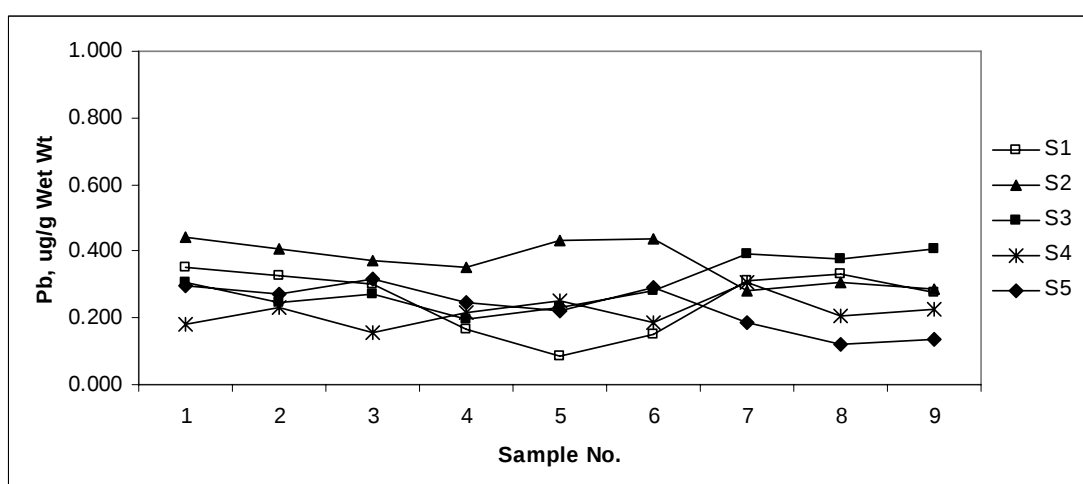
ผลการปนเปื้อนในระดับ 0.031 ± 0.015 ถึง 0.110 ± 0.077 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (น้ำหนักสด) ซึ่งมีระดับการปนเปื้อนอยู่ในระดับที่ต่ำและมีแนวโน้มอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามควรมีการติดตามเฝ้าระวังระดับการปนเปื้อนต่อไปเช่นเดียวกันกับโลหะหนัก และสารมลพิษชนิดอื่นๆ

รูปที่ 4.1 ปริมาณโลหะหนัก (Cd, Pb และ Hg) ในตัวอย่างหอยนางรมจากพื้นที่เก็บตัวอย่าง S1-S5 จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค ICP-OES

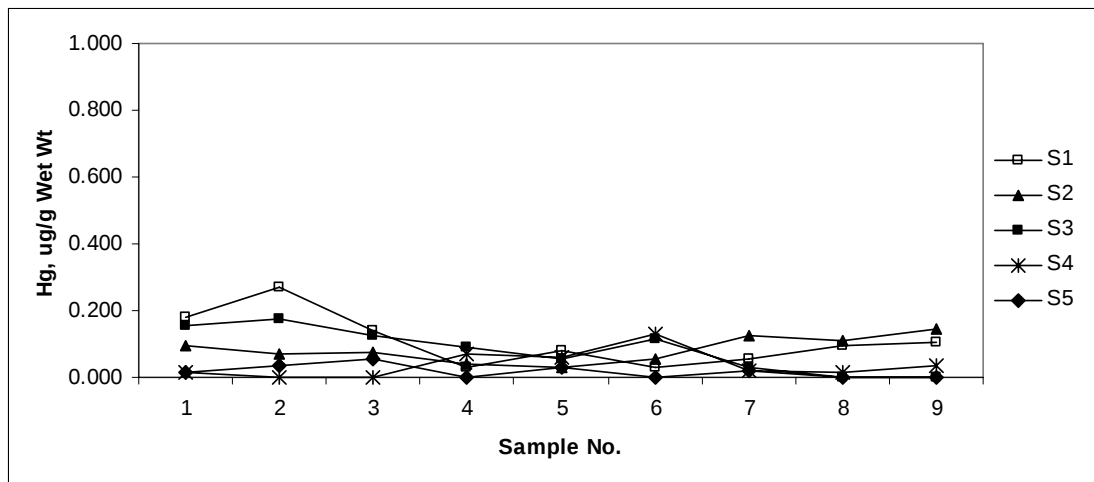
ก) Cd



ข) Pb



ค) Hg



ตารางที่ 4.4 ปริมาณโลหะหนักในตัวอย่างหอยนางรมจากพื้นที่เก็บตัวอย่างทั้ง 5 แหล่ง เทียบกับ เกณฑ์มาตรฐาน

พื้นที่เก็บตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ยปริมาณโลหะหนัก $\pm$ SD ($\mu\text{g/g}$, Wet Wt.), n=9		
	Cd	Pb	Hg
S1	0.698 ± 0.114	0.256 ± 0.095	0.110 ± 0.077
S2	0.550 ± 0.039	0.368 ± 0.066	0.083 ± 0.039
S3	0.430 ± 0.044	0.300 ± 0.076	0.106 ± 0.051
S4	0.423 ± 0.059	0.218 ± 0.044	0.049 ± 0.042
S5	0.343 ± 0.020	0.233 ± 0.071	0.031 ± 0.015
เกณฑ์มาตรฐาน ในหน่วย $\mu\text{g/g}$, น้ำหนักสด	4.0^a	1.7^a	0.5^b

^a ค่าที่กำหนดตามเกณฑ์มาตรฐานของ FDA & EPA Safety Levels in Regulations and Guidance

^b ค่าที่กำหนดตามเกณฑ์มาตรฐานของประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 (พ.ศ. 2529)

4.4 การศึกษาปริมาณชีวภาพความพร้อมของโลหะหนักในตัวอย่างหอยนางรม

4.4.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนการย่อยตัวอย่างด้วยระบบ PBET

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนการย่อยตัวอย่างหอยนางรม ด้วยระบบ PBET ทำการศึกษาโดยแบ่งเป็น 2 เฟส คือ เฟสการย่อยในกระเพาะอาหาร (Gastric Phase, GP) และเฟสการย่อยในลำไส้เล็ก (Intestinal Phase, IP) โดยที่การจำลองการย่อยในแต่ละเฟสจะเน้นการศึกษาผลของ pH ของน้ำย่อยในแต่ละเฟส และเวลาที่ใช้ในการย่อยของแต่ละเฟส ตารางที่ 4.5 แสดงร้อยละของปริมาณชีวภาพความพร้อมของ Cd ที่ได้จากการย่อยใน Gastric Phase และ Intestinal Phase ที่ค่า pH และเวลาต่างๆ พบว่าในเฟส GP การใช้น้ำย่อยที่มี pH แตกต่างกัน มีผลต่อปริมาณชีวภาพความพร้อม คือ เมื่อค่า pH ของน้ำย่อยในเฟส GP สูงขึ้นจะมีแนวโน้มทำให้ค่าร้อยละของปริมาณชีวภาพความพร้อมลดลง ยกเว้นที่ pH 2.5 ที่ค่าร้อยละชีวภาพความพร้อมใกล้เคียงกันกับที่ pH 1.5 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะแอสคอร์บิกแอซิดของเอนไซม์ในกระเพาะอาหารมีค่าอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกันในช่วง pH ตั้งแต่ 1.5 ถึง 2.5 ทั้งนี้ค่า pH ของน้ำย่อยเท่ากับ 1.5 ให้ค่าปริมาณชีวภาพความพร้อมสูงที่สุด ในขณะที่การเปลี่ยนแปลง pH ของน้ำย่อยในเฟส IP ตั้งแต่ pH 6.0, 7.0 และ 8.0 มีผลดังนี้คือ ที่ pH 6.0 จะให้ค่าร้อยละของปริมาณชีวภาพความพร้อมต่ำที่สุด เมื่อเทียบกับ pH 7.0 และ 8.0 ทั้งนี้เนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงแอสคอร์บิกแอซิดของเอนไซม์ที่แตกต่างกันเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่า pH และค่า pH ของน้ำย่อยเท่ากับ 7.0 ให้ค่าร้อยละของปริมาณชีวภาพความพร้อมสูงที่สุด และจากการศึกษาผลของเวลาที่ใช้ในการย่อยของแต่ละเฟส พบว่าเมื่อทำการย่อยที่สภาวะ pH เดียวกัน โดยใช้เวลาที่ใช้ในการย่อยต่างกันคือ 1 และ 3 ชั่วโมง พบว่าเวลาที่ใช้ในการย่อยในช่วงนี้ไม่มีผลต่อปริมาณชีวภาพความพร้อมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) สำหรับการย่อยทั้งในเฟส GP และในเฟส IP ดังแสดงในตารางที่ 4.5 ดังนั้นจึงเลือกใช้เวลาในการย่อยเท่ากับ 2 ชั่วโมงเนื่องจากผลของการย่อยในเฟส IP พบว่าที่เวลาการย่อยเท่ากับ 2 ชั่วโมงจะให้ค่าปริมาณชีวภาพความพร้อมสูงที่สุด ทั้งนี้ระยะเวลาที่อาหารอยู่ในกระเพาะหรือลำไส้ นั้น จะมีความแตกต่างกันระหว่างตัวบุคคล ชนิด และปริมาณของอาหารที่ย่อย อาจใช้เวลาตั้งแต่ 1-4 ชั่วโมง สำหรับการย่อยในกระเพาะอาหาร และ 1-5 ชั่วโมง สำหรับการย่อยในลำไส้เล็ก ดังนั้นจึงได้ศึกษาโดยควบคุมสัดส่วนของปริมาณอาหารต่อน้ำย่อยเท่ากับ 1:100 แล้วจึงหาเวลาที่เหมาะสมที่ควรใช้ในการย่อย ในช่วง 1-3 ชั่วโมง และเลือกเงื่อนไขของเวลาที่ใช้ย่อยที่ให้ผลของปริมาณการดูดซึมได้สูงสุด เนื่องจากต้องการให้ข้อมูลที่ได้นี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการประเมินความเสี่ยงต่อผู้บริโภค ทำให้ผู้บริโภคปลอดภัยมากกว่า หากมีการประมาณค่าโดยใช้ปริมาณของสารพิษที่สามารถถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้สูงสุด (maximum oral bioaccessibility)

จึงสรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมของการย่อยตัวอย่างด้วยระบบ PBET คือ การใช้น้ำย่อยที่ใช้สำหรับเฟส GP และ IP ที่มีค่าเท่ากับ pH 1.5 และ 7.0 ตามลำดับ และใช้เวลาในการย่อยสำหรับเฟส GP และ IP เฟสละ 2 ชั่วโมง เนื่องจากสภาวะดังกล่าวให้ค่าปริมาณชีวภาพความพร้อมสูงสุด ซึ่งทำให้สามารถนำผลที่ได้จากการวิเคราะห์ปริมาณชีวภาพความพร้อมตามสภาวะดังกล่าวไปประเมินความเสี่ยงสูงสุดที่ผู้บริโภคจะได้รับหากบริโภคอาหารที่มีโลหะหนักปนเปื้อน

นอกจากนี้ จากตารางที่ 4.5 ค่าปริมาณชีวภาพความพร้อมเมื่อระยะเวลาย่อยนานกว่า มีค่าน้อยกว่าระยะเวลาย่อยที่สั้นกว่าในบางตัวอย่าง นั้น พบว่า ค่าที่แตกต่างกันนั้นมีค่าน้อยมาก ค่าที่แตกต่างกันมากที่สุด มีค่าเพียง 0.047 µg/g เท่านั้น ซึ่งอยู่ในช่วง SD ของผลการวิเคราะห์ปริมาณของโลหะหนักที่พบในหอยนางรมจากแต่ละแหล่ง และอาจเนื่องมาจากความไม่เป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างโดยสมบูรณ์ ถึงแม้ได้มีการพยายามเตรียมตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกันมากที่สุดแล้วก็ตาม

หมายเหตุ ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการจำลองการย่อยอาหาร ใช้สารอ้างอิง SRM 1566b เป็นตัวอย่างในการย่อย และศึกษาเฉพาะธาตุ Cd (มีปริมาณ 2.48 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) เนื่องจากมีปริมาณของธาตุในระดับที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ สำหรับ Hg (มีปริมาณ 0.037 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) และ Pb (มีปริมาณ 0.308 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) มีปริมาณต่ำกว่าระดับที่จะตรวจวิเคราะห์ได้ เนื่องจากในการวิเคราะห์แต่ละครั้งใช้ SRM 1566b น้ำหนัก 0.3 g

ตารางที่ 4.5 ร้อยละของปริมาณชีวภาพความพร้อมของ Cd ที่ได้จากการย่อยใน Gastric Phase และ Intestinal Phase ที่ค่า pH และเวลาต่างๆ

Conditions	Exp.#	Cd, $\mu\text{g/g DW}$ Mean $\pm$ SD, n=3	Cd Bioaccessibility, %	T-Test (Paired two sample for means)
Gastric Phase, GP				
pH 3.5, t = 3 hr	1	0.292	11.8	1=2, n.s. (p>0.05)
pH 3.5, t = 1 hr	2	0.303	12.2	
pH 1.5, t = 3 hr	3	0.341	13.7	3=4, n.s. (p>0.05)
pH 1.5, t = 1 hr	4	0.386	15.6	
pH 2.5, t = 2 hr	5	0.372	15.0	
Intestinal Phase, IP				
pH 8.0, t = 3 hr	1	0.095	3.8	1=2, n.s. (p>0.05)
pH 8.0, t = 1 hr	2	0.142	5.7	
pH 6.0, t = 3 hr	3	0.073	2.9	3=4, n.s. (p>0.05)
pH 6.0, t = 1 hr	4	0.058	2.3	
pH 7.0, t = 2 hr	5	0.144	5.8	

n.s. = not significant

4.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณชีวภาพความพร้อมของโลหะหนักในตัวอย่างหอยนางรม

ก) Cd

จากผลการทดลองในข้อ 4.3 ทำให้ทราบว่าปริมาณเฉลี่ยของ Cd ที่มีอยู่ในตัวอย่างหอยนางรมจากทั้ง 5 แหล่งของพื้นที่เก็บตัวอย่าง S1-S5 มีค่าเท่ากับ 0.698 ± 0.114 , 0.550 ± 0.039 , 0.430 ± 0.044 , 0.423 ± 0.059 และ 0.343 ± 0.020 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (น้ำหนักสด) ตามลำดับ ปริมาณนี้ไม่สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเพื่อประเมินความเสี่ยงต่อสุขภาพของผู้บริโภค หอยนางรมดังกล่าวที่มีโลหะหนักชนิดนี้เจือปนอยู่ ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาเพื่อวิเคราะห์ปริมาณชีวภาพความพร้อมของโลหะหนักในตัวอย่างหอยนางรม โดยวิธีการจำลองระบบการย่อยอาหารตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 4.4.1 คือ ใช้น้ำย่อยที่ใช้สำหรับเฟส GP และ IP ที่มีค่าเท่ากับ pH 1.5 และ 7.0 ตามลำดับ และใช้เวลาในการย่อยสำหรับเฟส GP และ IP เฟสละ 2 ชั่วโมง ผลการศึกษาแสดงดังในรูปที่ 4.2 ก) พบว่าปริมาณชีวภาพความพร้อมหรือปริมาณที่ Cd

ถูกดูดซึมได้ (Bioaccessible fraction) ในตัวอย่างหอยนางรมทั้งหมดมีค่าอยู่ในช่วง 0.113-0.376 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (น้ำหนักสด) และในรูปที่ 4.3 ก) แสดงถึงร้อยละของปริมาณชีวภาพความพร้อมของ Cd ในตัวอย่างหอยนางรม พบว่าปริมาณการดูดซึมได้ของ Cd ในเฟสการย่อยในกระเพาะอาหารและเฟสการย่อยในลำไส้เล็ก มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 21.0-33.5 และ 11.9-26.5 ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาปริมาณการดูดซึมได้ของ Cd จากทั้งสองเฟสพบว่ามีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 33.8-59.2 สาเหตุที่ปริมาณชีวภาพความพร้อมในกรณีของแคดเมียมมีความแตกต่างจากค่า Total concentration เช่น ในตัวอย่าง S2/1 กับ S2/3 หรือ ตัวอย่าง S3/1 กับ S3/3 เนื่องจากปริมาณของแคดเมียมในหอยนางรมมีอยู่ในระดับที่น้อยมากและใกล้เคียงกันมาก คือ 0.598 µg/g (S2/1) และ 0.553 µg/g (S2/3) มีค่าแตกต่างกันเพียง 0.045 µg/g เท่านั้น ซึ่งอยู่ในช่วง SD ของผลการวิเคราะห์ปริมาณของโลหะหนักที่พบในหอยนางรมจากแต่ละแหล่ง และในทำนองเดียวกันค่าปริมาณชีวภาพความพร้อมมีค่าเท่ากับ 0.232 µg/g (S2/1) และ 0.274 µg/g (S2/3) คือ มีค่าแตกต่างกันเพียง 0.042 µg/g เท่านั้น นอกจากนี้อาจเนื่องมาจากความไม่เป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างโดยสมบูรณ์ ถึงแม้ได้มีการพยายามเตรียมตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกันมากที่สุดแล้วก็ตาม

ดังนั้นผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ปริมาณของ Cd เพียงส่วนหนึ่งเท่านั้น (Bioaccessible fraction) เมื่อเทียบกับปริมาณ Cd ทั้งหมดที่มีอยู่ในหอยนางรม (Total Cd concentration) ที่สามารถถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ และค่านี้จึงควรนำไปเป็นข้อมูลประกอบการประเมินความเสี่ยงต่อสุขภาพของผู้บริโภคต่อไป รวมทั้งอาจเป็นข้อมูลให้แก่หน่วยงานที่เกี่ยวข้องในการกำหนดมาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน เพื่อป้องกันอันตรายที่อาจเกิดขึ้นแก่ผู้บริโภค และอาจเป็นแนวทางในการป้องกันการกีดกันทางการค้า หากมีการส่งออกหอยนางรมไปยังประเทศต่าง ๆ

ผลงานวิจัยอื่นๆ ที่ผ่านมาซึ่งได้ศึกษาปริมาณชีวภาพความพร้อมของ Cd ในหอยนางรมและสัตว์น้ำชนิดอื่นๆ พบว่า มีรายงานโดย Bragigand *et al.* (2004) ได้ศึกษาปริมาณชีวภาพความพร้อมของ Cd ในตัวอย่างหอยนางรม มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 44-75 ในขณะที่ Metian *et al.* (2009) ได้รายงานค่าร้อยละปริมาณชีวภาพความพร้อมของ Cd ในหอยแมลงภู่ (*Mytilus galloprovincialis*) โดยเปรียบเทียบระหว่างหอยแมลงภู่สดกับหอยแมลงภู่ที่ผ่านการปรุงอาหารโดยใช้ความร้อน พบว่า มีค่าเท่ากับร้อยละ 72 และ 34 ตามลำดับ มีรายงานปริมาณชีวภาพความพร้อมของ Cd ในหอยแมลงภู่โดยนักวิจัยอีกคณะ (Houlbreque *et al.*, 2011) ซึ่งได้เปรียบเทียบระหว่าง หอยแมลงภู่สดกับหอยแมลงภู่ที่ผ่านการปรุงอาหารโดยใช้ความร้อนแล้วเช่นกัน พบว่า มีค่าเท่ากับร้อยละ 79 และ 42 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า ค่าร้อยละชีวภาพความพร้อม

พร้อมของ Cd ที่ได้จากงานวิจัยนี้ (ร้อยละ 33.8-59.2) ซึ่งเป็นการศึกษาในตัวอย่างหอยนางรมที่ไม่ได้ผ่านการปรุงอาหารโดยใช้ความร้อน มีค่าต่ำกว่าค่าที่ได้จากผลงานวิจัยอื่นๆ ไม่มากนัก (เปรียบเทียบข้อมูลจากการทดลองที่เหมือนกัน โดยใช้ตัวอย่างสดที่ไม่ผ่านการปรุงอาหารโดยใช้ความร้อน) ยกเว้นในตัวอย่างปลา Seabass (*L. japonicas*) พบว่าร้อยละปริมาณชีวภาพความพร้อมของ Cd ในปลาชนิดนี้มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 85-93 (He *et al.*, 2010) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากลักษณะของเนื้อปลาที่แตกต่างกับลักษณะของเนื้อหอยคือมีปริมาณน้ำมากกว่า ทำให้เนื้อปลาถูกย่อยโดยน้ำย่อยได้ง่ายกว่า และสารพวกโลหะ เช่น Cd จึงถูกชะออกสู่สารละลาย (น้ำย่อย) ได้มากกว่า ส่งผลให้แนวโน้มปริมาณชีวภาพความพร้อมของ Cd ในตัวอย่างปลามีค่ามากกว่า

ข) Pb

ในทำนองเดียวกันกับ Cd จากผลการทดลองในข้อ 4.3 ทำให้ทราบว่าปริมาณเฉลี่ยของ Pb ที่มีอยู่ในตัวอย่างหอยนางรมจากทั้ง 5 แหล่งของพื้นที่เก็บตัวอย่าง S1-S5 มีค่าเท่ากับ 0.256 ± 0.095 , 0.368 ± 0.066 , 0.300 ± 0.076 , 0.218 ± 0.044 และ 0.233 ± 0.071 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (น้ำหนักสด) ตามลำดับ และได้ทำการศึกษาเพื่อวิเคราะห์ปริมาณชีวภาพความพร้อมของโลหะหนักในตัวอย่างหอยนางรมโดยวิธีการจำลองระบบการย่อยอาหารตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 4.4.1 ผลการศึกษาแสดงดังในรูปที่ 4.2 ข) พบว่าปริมาณชีวภาพความพร้อมหรือปริมาณที่ Pb ถูกดูดซึมได้ (Bioaccessible fraction) ในตัวอย่างหอยนางรมทั้งหมดมีค่าอยู่ในช่วง 0.053-0.147 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (น้ำหนักสด) และในรูปที่ 4.3 ข) แสดงถึงร้อยละของปริมาณชีวภาพความพร้อมของ Pb ในตัวอย่างหอยนางรม พบว่าปริมาณการดูดซึมได้ของ Pb ในเฟสการย่อยในกระเพาะอาหารและเฟสการย่อยในลำไส้เล็ก มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 16.8-28.1 และ 9.4-23.2 ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาปริมาณการดูดซึมได้ของ Pb จากทั้งสองเฟสพบว่ามีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 28.3-51.4 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณชีวภาพความพร้อมของ Pb กับผลงานวิจัยอื่นพบว่าผลที่ได้จากงานวิจัยนี้มีค่าใกล้เคียงกันกับที่มีรายงานโดย Navarro *et al.* (2008) ซึ่งได้ศึกษาปริมาณชีวภาพความพร้อมของ Pb ในหอยแมลงภู่ (*Mytilus galloprovincialis*) ซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยละ 28

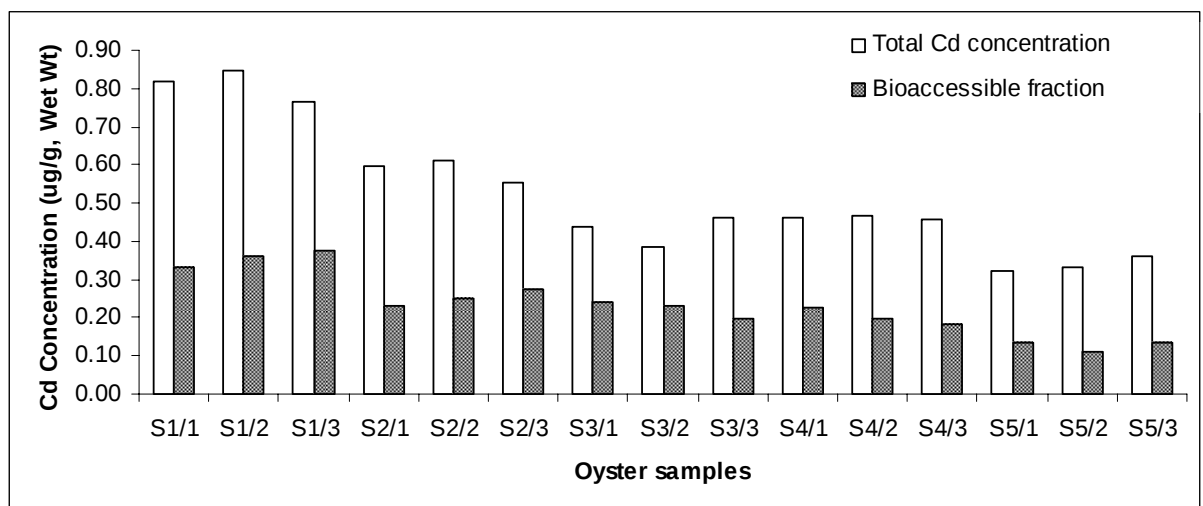
ค) Hg

ปริมาณของ Hg ที่มีอยู่ในตัวอย่างหอยนางรมจากทั้ง 5 แหล่งของพื้นที่เก็บตัวอย่าง S1-S5 มีค่าเท่ากับ 0.110 ± 0.077 , 0.083 ± 0.039 , 0.106 ± 0.051 , 0.049 ± 0.042 และ 0.031 ± 0.015 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (น้ำหนักสด) ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าระดับการปนเปื้อนของ Hg ใน

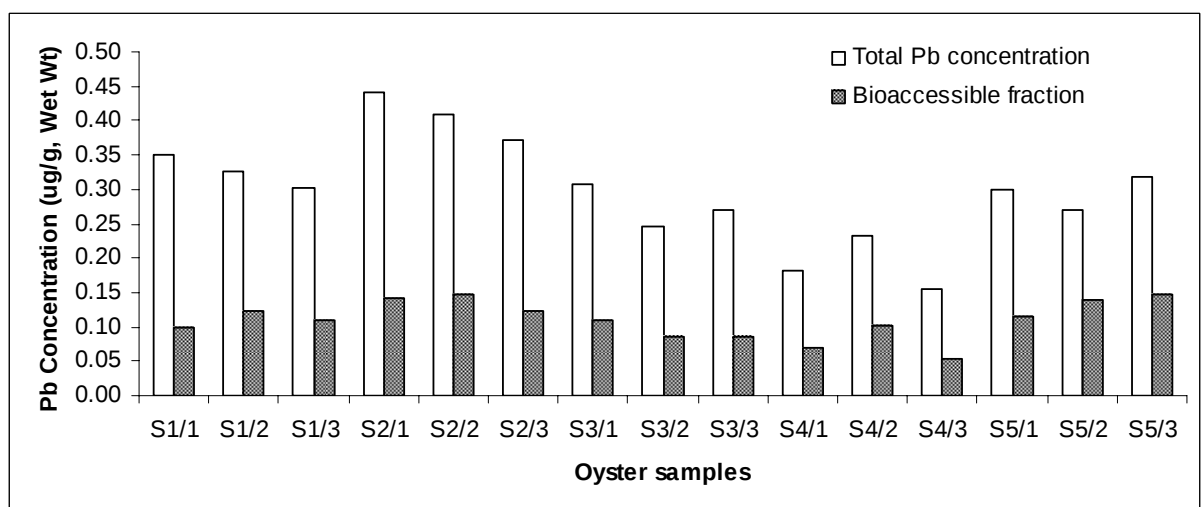
ตัวอย่างหอยนางรมนี้อยู่ในระดับที่ต่ำมาก ดังนั้นเมื่อได้ทำการศึกษาเพื่อวิเคราะห์ปริมาณชีวภาพ ความพร้อมของ Hg ในตัวอย่างหอยนางรมโดยวิธีการจำลองระบบการย่อยอาหารตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 4.4.1 พบว่าระดับของปริมาณการดูดซึมได้มีระดับที่ต่ำกว่าค่า ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจหาปริมาณได้ (LOQ) นั่นคือ ต่ำกว่า 18.9 ไมโครกรัมต่อ กิโลกรัม สำหรับหอยนางรมทุกๆ ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ มีรายงานการศึกษาปริมาณชีวภาพ ความพร้อมของ Hg ในตัวอย่างปลาชนิดต่างๆ ได้แก่ Tuna, Swordfish และ Sardine (Cabanero *et al.*, 2004) พบว่า ปริมาณชีวภาพความพร้อมของ Hg ในตัวอย่างปลาเหล่านี้มีค่าอยู่ในระดับที่ ต่ำมาก นั่นคือ อยู่ในช่วงร้อยละ 9-17

รูปที่ 4.2 ปริมาณชีวภาพความพร้อมของ Cd และ Pb ในตัวอย่างหอยนางรม

ก) Cd

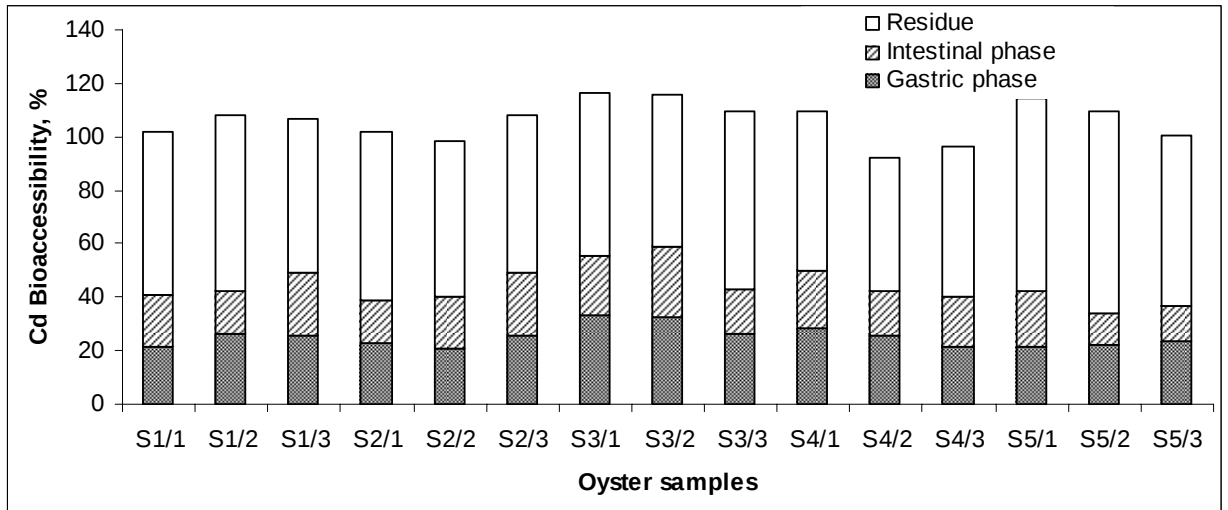


ข) Pb

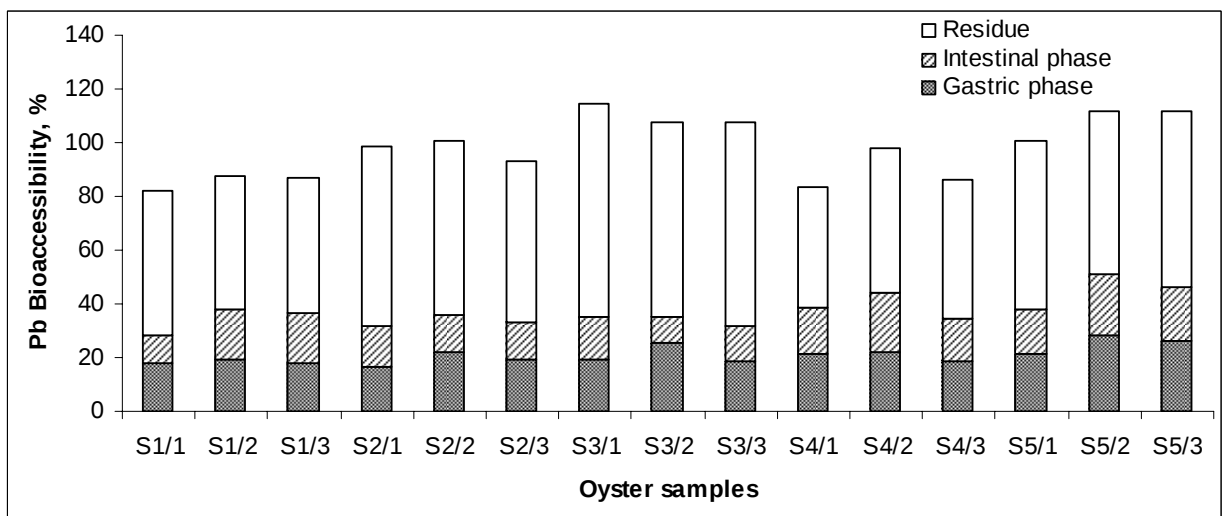


รูปที่ 4.3 ร้อยละของปริมาณชีวภาพความพร้อมของ Cd และ Pb ในตัวอย่างหอยนางรม

ก) Cd



ข) Pb



บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การประเมินชีวภาพความพร้อมของโลหะหนัก 3 ชนิด ได้แก่ Cd, Pb และ Hg ในตัวอย่างหอยนางรมซึ่งได้จากการเก็บตัวอย่างจาก 5 พื้นที่ คือ S1 ถึง S5 ซึ่งเป็นแหล่งเพาะเลี้ยงหอยนางรมในจังหวัดสุราษฎร์ธานี ในการศึกษานี้ครอบคลุมขั้นตอนการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างโดยใช้ระบบการย่อยด้วยไมโครเวฟ (Microwave Digestion System) ซึ่งเป็นขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง เพื่อการวิเคราะห์ความเข้มข้นของโลหะหนักทั้งหมดที่มีอยู่ในตัวอย่าง (Total metal concentration) และหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างโดยใช้ระบบการจำลองการย่อยอาหาร (Physiologically Based Extraction Test, PBET) ซึ่งวิธีการเตรียมตัวอย่างวิธีหลังนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อการวิเคราะห์ปริมาณชีวภาพความพร้อมของโลหะหนัก นั่นคือปริมาณที่โลหะหนักแต่ละชนิดที่จะถูกดูดซึมได้ในร่างกายมนุษย์ (Bioaccessible fraction) หากผู้บริโภคได้รับอาหารที่มีโลหะหนักปนเปื้อน ในขั้นตอนการหาสภาวะที่เหมาะสมใช้การออกแบบการทดลองแบบ Two-Level Factorial Design และ Central Point Replication ผลการศึกษาพบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างโดยใช้ระบบการย่อยด้วยไมโครเวฟคือใช้อัตราส่วนของสารที่ใช้ย่อยระหว่าง conc. HNO_3 : H_2O_2 : H_2O เป็น 8 : 2 : 0 mL ใช้กำลังของคลื่นไมโครเวฟ 1000 วัตต์ และใช้เวลาในการย่อย เท่ากับ 15 นาที และสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างโดยใช้ระบบการจำลองการย่อยอาหารคือ ใช้น้ำย่อยที่ใช้สำหรับเฟสกระเพาะอาหารและเฟสการย่อยในลำไส้เล็กที่มีค่า pH 1.5 และ 7.0 ตามลำดับ และใช้เวลาในการย่อยในทั้งสองเฟสเท่าๆ กัน คือเฟสละ 2 ชั่วโมง

ภายหลังการเตรียมตัวอย่างหอยนางรมโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมดังกล่าว ได้นำตัวอย่างหอยนางรมที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ Cd, Pb และ Hg โดยเทคนิค ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry) พบว่าปริมาณเฉลี่ยของ Cd / Pb / Hg ในตัวอย่างหอยนางรมจากพื้นที่ S1, S2, S3, S4 และ S5 มีค่าเท่ากับ 0.698 / 0.256 / 0.110, 0.550 / 0.368 / 0.083 , 0.430 / 0.300 / 0.106 , 0.423 / 0.218 / 0.049 และ 0.343 / 0.233 / 0.031 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (น้ำหนักสด) ตามลำดับ ซึ่งทุกตัวอย่างจากพื้นที่เก็บตัวอย่างทั้ง 5 แหล่งนี้มีปริมาณ Cd, Pb และ Hg ในระดับที่ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดไว้ นั่นคือ เกณฑ์มาตรฐานของ FDA & EPA Safety Levels in Regulations and Guidance (4.0 และ 1.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักสด สำหรับ Cd และ Pb ตามลำดับ) และ

เกณฑ์มาตรฐานของประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529 (0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักสด สำหรับ Hg) แสดงว่า หอยนางรมจากแหล่งเลี้ยงทั้ง 5 แหล่งนี้ มีระดับการปนเปื้อนของโลหะหนักทั้ง 3 ชนิดนี้อยู่ในระดับที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค และเมื่อพิจารณาระดับการปนเปื้อนของโลหะหนักในหอยนางรมจากแหล่งเลี้ยงต่างๆ พบว่า ระดับการปนเปื้อนของ Cd โดยเฉลี่ยในระดับที่สูงที่สุดพบในหอยนางรมจากแหล่งเลี้ยง S1 รองลงมาคือ S2, S3, S4 และ S5 ตามลำดับ สำหรับระดับการปนเปื้อนของ Pb โดยเฉลี่ยในระดับที่สูงที่สุดพบในหอยนางรมจากแหล่งเลี้ยง S2 รองลงมาคือ S3, S1, S5 และ S4 ตามลำดับ ส่วน Hg พบว่ามีระดับการปนเปื้อนโดยเฉลี่ยในระดับที่ต่ำมาก (ต่ำกว่า 0.110 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) จากตัวอย่างหอยนางรมทั้ง 5 แหล่ง ส่วนการศึกษาการประเมินชีวภาพความพร้อมของโลหะหนักในตัวอย่างหอยนางรม พบว่า ปริมาณการดูดซึมได้ในเฟสการย่อยในกระเพาะอาหาร และเฟสการย่อยในลำไส้เล็ก มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 21.0-33.5 / 6.8-28.1 และ 11.9-26.5 / 9.4-23.2 สำหรับธาตุ Cd / Pb ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาปริมาณการดูดซึมได้ของ Cd / Pb จากทั้งสองเฟสพบว่ามีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 33.8-59.2 / 28.3-51.4 ดังนั้นผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ปริมาณของ Cd และ Pb เพียงส่วนหนึ่งเท่านั้น (Bioaccessible fraction) ที่สามารถถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ เมื่อเทียบกับความเข้มข้นของ Cd / Pb ทั้งหมดที่มีอยู่ในหอยนางรม (Total Cd / Pb concentration) นอกจากนี้ยังพิจารณาได้จากปริมาณของโลหะหนักทั้ง 2 ชนิดนี้ ที่ตรวจพบในส่วน of Residue หรือกากที่เหลือจากการย่อยในเฟสกระเพาะอาหารและเฟสลำไส้เล็ก ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 50.1 – 75.6 และ 44.6 – 78.9 สำหรับธาตุ Cd และ Pb ตามลำดับ จะเห็นได้ชัดเจนว่า ปริมาณของโลหะหนักส่วนใหญ่ยังคงตกค้างอยู่ในกากที่เหลือจากการย่อย ทำให้แนวโน้มความเสี่ยงต่อผู้บริโภคจากอันตรายของการบริโภคหอยนางรมอยู่ในระดับที่ต่ำมาก ในขณะที่ผลการประเมินชีวภาพความพร้อมของ Hg ในตัวอย่างหอยนางรม พบว่าระดับของปริมาณการดูดซึมได้มีระดับที่ต่ำกว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจหาปริมาณได้ (LOQ) นั่นคือ ต่ำกว่า 18.9 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณของ Hg ที่มีอยู่ในหอยนางรมมีค่าอยู่ในระดับที่ต่ำมาก

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการพัฒนาวิธีการ/เครื่องมือในการจำลองระบบการย่อยอาหาร (*In vitro* gastrointestinal digestion) ให้สามารถทำการทดลองได้ในระบบที่ง่าย และรวดเร็วขึ้น
2. ควรหาแนวทางในการเปรียบเทียบผลที่ได้จากวิธี *In vitro* gastrointestinal digestion กับวิธี *In vivo* gastrointestinal digestion เพื่อความเชื่อถือได้มากยิ่งขึ้นของผลการวิเคราะห์
3. ควรนำวิธีการจำลองระบบการย่อยอาหารไปประยุกต์ใช้กับชนิดของสารที่สนใจศึกษาชนิดอื่นๆ รวมทั้งชนิดของตัวอย่างอาหารอื่นๆ เพื่อเป็นประโยชน์ในการประเมินความเสี่ยงต่อสุขภาพ และเพื่อให้ได้ข้อมูลมากยิ่งขึ้นในการตรวจติดตามและเฝ้าระวังอันตรายที่อาจเกิดแก่ผู้บริโภค
4. ควรมีการร่วมมือกับหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ในด้านการดูแลความปลอดภัยแก่ผู้บริโภค เช่น สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) และกรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข ในการกำหนดค่ามาตรฐานสารปนเปื้อนในอาหารเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องมากยิ่งขึ้น และอาจนำไปสู่การลดการกีดกันทางการค้าหรือการส่งออกอาหารทะเลไปยังประเทศอื่นๆ
5. หากมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมเกี่ยวกับเรื่องนี้ ควรมีการศึกษาข้อมูลจากหน่วยงานหรือองค์กรที่มีการใช้ข้อมูลชีวภาพความพร้อม หรือมีการผลักดันให้มีการนำค่าชีวภาพความพร้อมของโลหะไปใช้ประโยชน์ในด้านการประเมินอันตราย หรือความเสี่ยงต่อผู้บริโภค ได้แก่ The Bioaccessibility Research Group of Europe (BARGE), British Geological Survey (BGS), United Kingdom Environmental Agency (UK EA), Bioaccessibility Research Canada (BARC), United States Environmental Protection Agency (US EPA), National Institute of Public Health and the Environment (the Netherlands) เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

- กรมประมง. 2550. **การเลี้ยงหอยนางรม**. ฝ่ายเผยแพร่ ส่วนเผยแพร่การประมง สำนักพัฒนาและถ่ายทอดเทคโนโลยีการประมง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- กรมส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม. กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. 2553.
- อ่าวบ้านดอนกับการสร้างฟาร์มทะเลแบบยั่งยืน** [Online]. เข้าถึงได้จาก <http://infoterra.deqp.go.th/modules.php?name=News&file=article&sid=236> [2553, กุมภาพันธ์ 25]
- กระทรวงสาธารณสุข. 2529. **ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 เรื่องมาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน** [Online]. เข้าถึงได้จาก <http://www.fda.moph.go.th/fda-net/html/product/food/ntfmoph/ntf098.htm> [2553, กุมภาพันธ์ 20]
- จิรวัดณ์ ขวัญแก้ว. 2549. **การปนเปื้อนของปรอทในดินรอบทะเลสงขลา**. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ประทีป สองแก้ว. 2544. **การบำบัดน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนาโดยใช้หอยตะไกรมกรามขาว**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ภาควิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- วิกิพีเดีย. 2553. **ระบบทางเดินอาหารของมนุษย์**. [Online]. เข้าถึงได้จาก <http://th.wikipedia.org/wiki/> [2553, มีนาคม 1]
- สำนักงานประมงจังหวัดสุราษฎร์ธานี. 2553. **ข้อมูลการเพาะเลี้ยงหอยนางรม**. ฝ่ายพัฒนาและส่งเสริมอาชีพการประมง อ.พุนพิน จ.สุราษฎร์ธานี.
- สุนทร คำสุข และประทุมวัลย์ สงคง. 2549. **เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 5 สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ. การปนเปื้อนของโลหะหนักในหอยตะไกรม (*Crassostrea belcheri*) จากอ่าวบ้านดอน จังหวัดสุราษฎร์ธานี** [Online]. เข้าถึงได้จาก http://www.nicaonline.com/articles10/site/view_article.asp?idarticle=3043 [2553, กุมภาพันธ์ 25]
- อัญชลี ฤกษ์ดี. 2551. **การปนเปื้อนของโลหะหนักในหอยนางรมบริเวณแหล่งเพาะเลี้ยงอำเภอกาญจนดิษฐ์ จังหวัดสุราษฎร์ธานี**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาสิ่งแวดล้อมศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี.

- Bendell, L.I. Survey of levels of cadmium in oysters, mussels, clams and scallops from the Pacific Northwest coast of Canada. **Food Additives and Contaminants: Part B**. 2009, 2, 131-139.
- Bermejo, P. *et al.* Iron and zinc in hydrolysed fractions of human milk and infant formulas using an *in vitro* method. **Food Chemistry**. 2002, 77, 361-369.
- Bou, R. *et al.* Validation of mineralisation procedures for the determination of selenium, zinc, iron and copper in chicken meat and feed samples by ICP-AES and ICP-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. 2004, 19, 1361-1369.
- Bragigand, V. *et al.* Estimates of trace metal bioavailability to humans ingesting contaminated oysters. **Food and Chemical Toxicology**. 2004, 42, 1893-1902.
- Brisbin, J.A. and Caruso, J.A. Comparison of extraction procedures for the determination of arsenic and other elements in lobster tissue by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Analyst**. 2002, 127, 921-929.
- Cabrera, C. *et al.* Cadmium contamination levels in seafood determined by electrothermal atomic absorption spectrometry after microwave dissolution. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 1994, 42, 126-128.
- Cabanero, A.I. *et al.* Selenium and mercury bioaccessibility in fish samples: an *in vitro* digestion method. **Analytica Chimica Acta**. 2004, 526, 51-61.
- Cave, M.R. *et al.* Measurement of the bioaccessibility of arsenic in UK soils. R&D Technical Report P5-062/TR02, Environmental Agency, Bristol, 2003.
- Crews, H.M. *et al.* Comparison of trace elements solubility from food items treated separately and in combination. **Z. Lebensm-Unters.-Forsch.**, 1985, 180, 405-410.
- Diamond, G.L. *et al.* Gastrointestinal absorption of metals. **Drug and Chemical Toxicology**. 1997, 20, 345-368.
- Dean, J.R. (2003). **Methods for Environmental Trace Analysis**. Chichester: John Wiley & Sons.
- Dean, J.R. and Ma, R. Approaches to assess the oral bioaccessibility of persistent organic pollutants: A critical review. **Chemosphere**. 2007, 68, 1399-1407.

- Fairbridge, R.W. 1999. **Encyclopedia of Geochemistry, Cadmium**. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp.50-51.
- FDA U.S. Food and Drug Administration. (2001). Fish and Fisheries Products Hazards and Controls Guidance.
<http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/Seafood/FishandFisheriesProductsHazardsandControlsGuide/ucm120108.htm> [2010, February 27]
- Franco, J. *et al.* Heavy metals in molluscs from the Basque Coast (Northern Spain): results from an 11-year monitoring programme. **Marine Pollution Bulletin**. 2002, 44, 973-976.
- He, M. *et al.* Effects of cooking and subcellular distribution on the bioaccessibility of trace elements in two marine fish species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 2010, 58, 3517-3523.
- Houlbreque, F. *et al.* Cooking makes cadmium contained in Chilean mussels less bioaccessible to humans. **Food Chemistry**. 2011, 126, 917-921.
- Intawongse, M. and Dean, J.R. Use of the physiologically-based extraction test to assess the oral bioaccessibility of metals in vegetable plants grown in contaminated soil. **Environmental Pollution**. 2008, 152, 60-72.
- IPCS. (1992). International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 134, Cadmium. World Health Organization, Geneva.
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc134.htm> [2010, February 27]
- Jacobs, A. and Greenman, D.A. Availability of food iron. **Brit. Med. J.** 1969, 1, 673-676.
- Jarenpornnipat, A. *et al.* Sustainable management of shellfish resources in Bandon Bay, Gulf of Thailand. **Journal of Coastal Conservation**. 2003, 9, 135-146.
- Kendall, R. J. *et al.* (2001). 'Ecotoxicology', in Klaassen, C. D. (Ed.) **Toxicology. The Basic Science of Poisons**. New York: McGraw-Hill.
- Kruzynski, G.M. Cadmium in oysters and scallops: the BC experience. **Toxicology Letters**. 2004, 148, 159-169.

- Lopez, F.F. *et al.* Aluminum levels in convenience and fast foods: *in vitro* study of the absorbable fraction. **The Science of the Total Environment**. 2002, 300, 69-79.
- Metian, M. *et al.* Assessment of metal, metalloid, and radionuclide bioaccessibility from mussels to human consumers, using centrifugation and simulated digestion methods coupled with radiotracer techniques. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 2009, 72, 1499-1502.
- Miller, D.D. *et al.* An *in vitro* method for estimation of iron availability from meals. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 1981, 34, 2248-2256.
- Minekus, M. *et al.* A Multicompartmental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small Intestine. **ALTA**. 1995, 23, 197-209.
- Mounicou, S. *et al.* Development of a sequential enzymolysis approach for the evaluation of the bioaccessibility of Cd and Pb from cocoa. **Analyst**. 2002, 127, 1638-1641.
- Navarro, P. *et al.* Evaluation of the physiologically based extraction test as an indicator of metal toxicity in mussel tissue. **Analytica Chimica Acta**. 2008, 622, 126-132.
- Oomen, A.G. *et al.* Comparison of Five *In Vitro* Digestion Models to Study the Bioaccessibility of Soil Contaminants. **Environmental Science and Technology**. 2002, 36, 3326-3334.
- Oomen, A.G. *et al.* Development of an *in vitro* digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. 2003, 44, 281-287.
- Rao, B.S.N. and Prabhavathi, T. An *in vitro* method for predicting the bioavailability of iron from food. **American Journal of Clinical Nutrition**. 1978, 31, 169-175.
- Rodriguez, R.R. *et al.* An *in vitro* gastrointestinal method to estimate bioavailable arsenic in contaminated soils and solid media. **Environmental Science and Technology**. 1999, 33, 642-649.
- Rotard, W. *et al.* Determination of absorption availability of PCDD/PCDF from 'Kieselrot' (Red slag) in the digestive tract - simulation of the digestion of technogenic soil. **UWSF-Z. Umweltchem. Okotox**. 1995, 7, 3-9.

- Ruby, M.V. *et al.* Development of an *in vitro* screening test to evaluate the *in vivo* bioaccessibility of ingested mine-waste lead. **Environmental Science and Technology**. 1993, 27, 2870-2877.
- Ruby, M.V. *et al.* Estimation of lead and arsenic bioavailability using a physiologically based extraction test. **Environmental Science and Technology**. 1996, 30, 422-430.
- Santelli, R.E. *et al.* Multivariate technique for optimization of digestion procedure by focused microwave system for determination of Mn, Zn and Fe in food samples using FAAS. **Talanta**. 2006, 68, 1083-1088.
- Schroder, J.L. *et al.* *In vitro* gastrointestinal method to estimate relative bioavailable cadmium in contaminated soil. **Environmental Science and Technology**. 2003, 37, 1365-1370.
- Soylak, M. *et al.* Optimization of microwave assisted digestion procedure for the determination of zinc, copper and nickel in tea samples employing flame atomic absorption spectrometry. **Journal of Hazardous Materials**. 2007, 149, 264-268.
- USEPA. Method 3052: Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices. 1996.
- Widmeyer, J.R. and Bendell-Young, L.I. Heavy metal levels in suspended sediments, *Crassostrea gigas*, and the risk to humans. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. 2008, 55, 442-450.
- Williams, T.M. *et al.* *In vitro* determination of arsenic bioavailability in contaminated soil and mineral beneficiation waste from Ron Phibun, southern Thailand: A basis for improved human risk assessment. **Environmental Geochemistry and Health**. 1998, 20, 169-177.
- Yang, K.X. and Swami, K. Determination of metals in marine species by microwave digestion and inductively coupled plasma mass spectrometry analysis. **Spectrochimica Acta. Part B**. 2007, 62, 1177-1181.
- Zaroogian, G. and Cheer, S. Accumulation of cadmium by the American oyster, *Crassostrea virginica*. **Nature**. 1976, 261, 408-410.

ภาคผนวก ก.

ตาราง ผ-1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการจำลองการย่อยด้วยระบบ PBET

ตาราง ผ-2 ปริมาณ (ในหน่วย $\mu\text{g/g}$ Wet Wt) และร้อยละชีวภาพความพร้อมของแคดเมียมและตะกั่วในตัวอย่างหอยนางรม

ตาราง ผ-1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการจำลองการย่อยด้วยระบบ PBET

(ก) Gastric Phase

Experiment	Cd concentration, µg/g DW										
	Gastric Phase (A)			Intestinal Phase (B)			Residue (C)			Total (A+B+C)	
	Mean	SD	% Bioacc.	Mean	SD	% Bioacc.	Mean	SD	% total	Mean	SD
1	0.292	0.108	11.8	0.191	0.045	7.7	2.132	0.070	86.0	2.614	0.135
2	0.303	0.027	12.2	0.119	0.047	4.8	1.950	0.048	78.6	2.372	0.091
3	0.341	0.023	13.7	0.059	0.025	2.4	1.969	0.043	79.4	2.369	0.092
4	0.386	0.028	15.6	0.105	0.074	4.2	2.085	0.062	84.1	2.576	0.027
5	0.372	0.088	15.0	0.159	0.077	6.4	2.097	0.059	84.6	2.627	0.119

หมายเหตุ: ปริมาณของ Cd ที่มีอยู่ในสารอ้างอิง SRM 1566b Oyster Tissue เท่ากับ 2.48 ± 0.08 µg/g

(ข) Intestinal Phase

Experiment	Cd concentration, µg/g DW										
	Gastric Phase (A)			Intestinal Phase (B)			Residue (C)			Total (A+B+C)	
	Mean	SD	% Bioacc.	Mean	SD	% Bioacc.	Mean	SD	% total	Mean	SD
1	0.274	0.060	11.0	0.095	0.051	3.8	2.072	0.079	83.6	2.441	0.140
2	0.256	0.054	10.3	0.142	0.095	5.7	2.212	0.112	89.2	2.610	0.111
3	0.378	0.047	15.2	0.073	0.042	2.9	2.291	0.026	92.4	2.741	0.045
4	0.307	0.035	12.4	0.058	0.018	2.3	2.270	0.065	91.5	2.635	0.088
5	0.317	0.061	12.8	0.144	0.042	5.8	2.219	0.134	89.5	2.680	0.105

หมายเหตุ: ปริมาณของ Cd ที่มีอยู่ในสารอ้างอิง SRM 1566b Oyster Tissue เท่ากับ 2.48 ± 0.08 µg/g

ตาราง ผ-2 ปริมาณ (ในหน่วย $\mu\text{g/g}$ Wet Wt) และร้อยละชีวภาพความพร้อมของแคดเมียมและตะกั่วในตัวอย่างหอยนางรม

(ก) Cadmium

Oyster Samples	Gastric Phase (A)		Intestinal Phase (B)		Residue (C)		Total Conc. (A+B+C)	Total Conc. (Microwave Digestion)
	Cd, $\mu\text{g/g}$	Bioacc. (%)	Cd, $\mu\text{g/g}$	Bioacc. (%)	Cd, $\mu\text{g/g}$	Total Conc.		
S1/1	0.177	21.6	0.157	19.3	0.500	61.3	0.834	0.816
S1/2	0.224	26.4	0.138	16.2	0.558	65.6	0.919	0.849
S1/3	0.199	26.0	0.177	23.1	0.443	57.8	0.819	0.766
S2/1	0.138	23.2	0.094	15.7	0.378	63.2	0.611	0.598
S2/2	0.128	21.0	0.119	19.5	0.354	57.9	0.602	0.612
S2/3	0.143	25.9	0.130	23.5	0.324	58.5	0.597	0.553
S3/1	0.146	33.5	0.097	22.2	0.266	60.9	0.508	0.436
S3/2	0.127	32.7	0.103	26.5	0.219	56.5	0.448	0.387
S3/3	0.121	26.2	0.078	16.8	0.307	66.6	0.506	0.462
S4/1	0.131	28.4	0.098	21.2	0.277	60.1	0.506	0.461
S4/2	0.120	25.8	0.077	16.6	0.233	50.1	0.430	0.465
S4/3	0.096	21.2	0.086	18.8	0.257	56.5	0.439	0.455
S5/1	0.070	21.6	0.066	20.4	0.234	72.1	0.371	0.325
S5/2	0.073	21.9	0.040	11.9	0.253	75.6	0.365	0.334
S5/3	0.084	23.4	0.049	13.6	0.228	63.7	0.361	0.359

(A) Lead

Oyster Samples	Gastric Phase (A)		Intestinal Phase (B)		Residue (C)		Total Conc. (A+B+C)	Total Conc. (Microwave Digestion)
	Pb, µg/g	Bioacc. (%)	Pb, µg/g	Bioacc. (%)	Pb, µg/g	Total Conc.		
S1/1	0.062	17.8	0.037	10.5	0.189	54.1	0.288	0.350
S1/2	0.064	19.7	0.060	18.2	0.161	49.4	0.285	0.326
S1/3	0.055	18.2	0.055	18.1	0.152	50.5	0.262	0.302
S2/1	0.074	16.8	0.066	15.1	0.294	66.9	0.435	0.440
S2/2	0.091	22.3	0.055	13.5	0.265	64.7	0.411	0.409
S2/3	0.072	19.3	0.050	13.6	0.223	60.0	0.346	0.372
S3/1	0.060	19.5	0.049	16.0	0.242	78.9	0.350	0.306
S3/2	0.063	25.7	0.023	9.4	0.178	72.6	0.264	0.245
S3/3	0.051	18.8	0.034	12.7	0.204	75.9	0.289	0.269
S4/1	0.039	21.7	0.031	17.2	0.081	44.6	0.152	0.181
S4/2	0.052	22.3	0.051	21.9	0.124	53.6	0.226	0.231
S4/3	0.028	18.4	0.025	16.1	0.080	51.5	0.133	0.155
S5/1	0.065	21.6	0.049	16.5	0.186	62.4	0.300	0.298
S5/2	0.076	28.1	0.063	23.2	0.164	60.6	0.303	0.270
S5/3	0.083	26.2	0.064	20.2	0.207	65.3	0.354	0.317

ภาคผนวก ข

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ และกิจกรรมที่ดำเนินการมา และ
ผลที่ได้รับตลอดโครงการ

กิจกรรม (ตามข้อเสนอโครงการ)	ผลที่คาดว่าจะได้รับ (ตามข้อเสนอโครงการ)	ผลการดำเนินงาน
1.1 ศึกษา parameter ในขั้นตอนการ ย่อยตัวอย่างด้วยระบบไมโครเวฟ เช่น อุณหภูมิ เวลา ปริมาตรกรดที่ใช้ย่อย	ได้เงื่อนไขในการย่อยตัวอย่างด้วย ระบบไมโครเวฟ	สอดคล้องตามผลที่คาดว่าจะ ได้รับ
1.2 ศึกษา parameter ในขั้นตอนการ ย่อยตัวอย่างด้วยระบบ PBET เช่น pH ของน้ำย่อยในแต่ละเฟส เวลาที่ใช้ย่อย สัดส่วนของอาหารต่อปริมาณน้ำย่อยที่ ใช้ย่อย	ได้เงื่อนไขในการย่อยตัวอย่างด้วย ระบบ PBET	สอดคล้องตามผลที่คาดว่าจะ ได้รับ
2.1 วางแผนการเก็บตัวอย่าง	มีแผนในการเก็บตัวอย่าง	สอดคล้องตามผลที่คาดว่าจะ ได้รับ
2.2 เก็บตัวอย่าง	มีการเก็บตัวอย่างตามแผน	สอดคล้องตามผลที่คาดว่าจะ ได้รับ
2.3 วิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักใน ตัวอย่าง (โดยการย่อยด้วยระบบ ไมโครเวฟ)	ได้ทราบปริมาณโลหะหนักใน ตัวอย่างหอยนางรมที่ผ่านการย่อย ด้วยระบบไมโครเวฟ	สอดคล้องตามผลที่คาดว่าจะ ได้รับ
2.4 วิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักใน ตัวอย่าง (โดยการย่อยด้วยระบบ PBET)	ได้ทราบปริมาณโลหะหนักใน ตัวอย่างหอยนางรมที่ผ่านการย่อย ด้วยระบบ PBET	สอดคล้องตามผลที่คาดว่าจะ ได้รับ
2.5 ประเมินชีวภาพความพร้อมของ โลหะหนักในตัวอย่าง	ได้ทราบปริมาณชีวภาพความพร้อม ของโลหะหนักในตัวอย่างหอย นางรม	สอดคล้องตามผลที่คาดว่าจะ ได้รับ
2.6 วิเคราะห์ข้อมูลและเขียนรายงาน การวิจัย	มีข้อมูลจากการวิจัยและจัดทำ รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์	สอดคล้องตามผลที่คาดว่าจะ ได้รับ

ภาคผนวก ค.
บทความวิชาการที่รอการตีพิมพ์

Estimation of Bioaccessibility of Heavy Metals in Oysters using Physiologically Based Extraction Test

Marisa Intawongse

Chemistry Programme, Faculty of Science and Technology, Suratthani Rajabhat University, Surat
Thani, Thailand, 84100.

(corresponding author, Tel.: +66 83 273 5301; Fax.: +66 77 355 664; email address:
marisa131@yahoo.com)

Abstract

A physiologically based extraction test (PBET) was applied to estimate the oral bioaccessibility of Cd, Pb and Hg from oyster tissues. The PBET measures the fraction of a metal which is solubilized from the sample under the simulated gastric and intestinal conditions. Both gastric and intestinal extracted solutions and microwave digested residue were analyzed by ICP-OES. The bioaccessibilities (relative to respective total metal concentrations) of Cd and Pb in the oyster samples were 33.8-59.2% and 28.3-51.4%, respectively. The bioaccessibility of Hg was non-detectable (less than 0.019 mg/kg wet wt) due to the relatively low levels of Hg in the oyster samples (less than 0.110 mg/kg wet wt).

Keyword Bioaccessibility, *In vitro* gastrointestinal digestion, Oysters, Cadmium, Lead, Mercury, ICP-OES

1. Introduction

Oyster farming is the primary aquaculture process in Surat Thani, southern Thailand with a production of approximately 13,000 tonnes/year. The oyster farming is located on the estuary of Bandon Bay, the east coast of Surat Thani Province. Wastewater discharges of industrial manufacturers and chemicals leaching/runoff from agricultural uses into the estuary are the possible sources of metal contamination in

oyster tissues. Heavy metals such as cadmium, lead and mercury have been considered as a threat to human health, even at low concentrations since long term exposure may result in bioaccumulation of toxic levels. Food safety to consumer is a major concern since it is usually the most important source of toxic element intake. Many countries and international organizations have established maximum permitted standards (based on total concentrations) for the toxic elements in dietary products, including seafood.

It is well known that only a fraction of a total concentration of a contaminant that is released from a food matrix when ingested (bioaccessibility) and is important for exposure estimation and risk assessment (Bragigand et al., 2004; Versantvoort et al., 2005; Intawongse and Dean, 2008; Xing, et al., 2008). In this context, bioaccessibility has been defined as the fraction of a compound that is released from its matrix in the gastrointestinal tract, and thus becomes available for intestinal absorption i.e. enters the blood stream (Oomen et al., 2002). *In vitro* gastrointestinal extraction procedure or a so called physiologically based extraction test (PBET) can be used for estimating the bioaccessibility of a contaminant in food. Several approaches have been developed to simulate in a simplified manner the digestion processes in (mouth), stomach and small intestine (Miller et al., 1981; Crews et al., 1983; Ruby et al., 1993; Hack and Selenka, 1996). In comparison with *in vivo* method, *in vitro* studies have the advantage of being simple, rapid and low in cost and may provide insights not achievable in whole animal studies. The aim of this study was to provide a realistic estimate of the oral bioaccessibility of Cd, Pb and Hg in oysters by applying a PBET that simulates human gastrointestinal process to oyster samples.

2. Experimental

2.1 Sampling area and sample pretreatment

The oyster samples were collected in five different locations along Bandon Bay on the east coast of Surat Thani Province, southern Thailand in January 2010 (Fig.1). Thirty live oysters (*Crassostrea belcheri*) per location were collected and taken to the

laboratory in a cool box. The tissues of the oysters were separated from the shell, oven dried at 60°C for 72 h, ground and homogenized and stored in a desiccator until analysis.

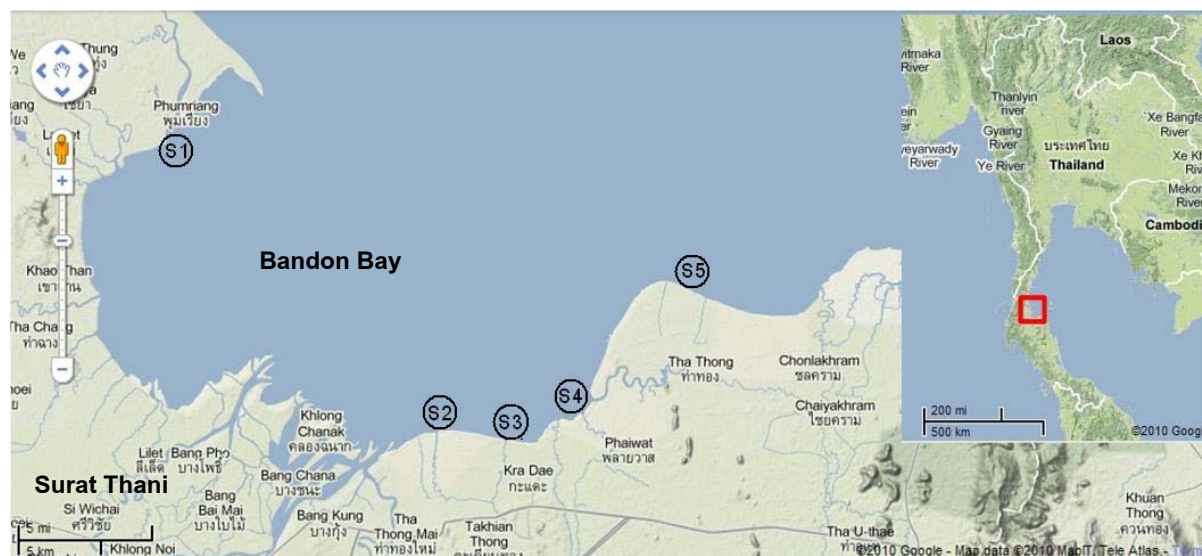


Fig.1 Sampling area map

2.2 Chemicals

All reagents used were of analytical grade and ultrapure water (18.2 MΩ cm) was from a Milli-Q™ Millipore Water Purification System (Millipore SA, Molsheim, France). Nitric acid, hydrochloric acid, hydrogen peroxide, acetic acid, sodium bicarbonate were provided by Merck, Germany. Sodium borohydride, Malicacid disodium salt, bile salt, pancreatin were supplied by Sigma (Germany), while pepsin by Fluka (USA) and lactic acid by BDH (England). Trisodiumcitrate was purchased from Prolabo, VWR International, Belgium. Argon gas (99.999%) was supplied by Praxair, Thailand. All glass and plastic ware was soaked in a 10% nitric acid bath and rinsed with ultrapure water.

Multi-element standard solutions for Cd and Pb, and a single element standard for Hg were purchased from AccuStandard, Inc., USA. The certified reference material SRM1566b (oyster tissue) was supplied by National Institute of Standards & Technology, Gaithersburg, USA.

2.3 Instrumentation

All ICP-OES measurements were carried out with an ICP-OES JY238 Ultratrace – Ultima2 equipped with a Concomitant Metals Analyzer (CMA) (Jobin Yvon Horibaz, Longjumeau, France). The CMA uses NaBH_4 to reduce mercury to the elemental state (cold vapor) for improving analytical sensitivity. Standard plasma conditions as well as wavelengths emission lines are summarized in Table 1. A controlled temperature shaking water bath (Memmert GmbH + Co.KG, Germany) was employed for the PBET experiment. A Multiwave microwave digestion system (Anton Paar GmbH, Graz, Austria) with TFM vessels was used for acid digestion.

Table 1 Instrumental operating ICP-OES conditions

RF Power (Watt)	1000
Plasma gas flow (Lmin^{-1})	12
Auxiliary gas flow (Lmin^{-1})	0.2
Nebulizer model	Meinhard Nebulizer Model: TR-50-C1
Nebulizer gas flow (psi)	45.0
Sample flow (mLmin^{-1})	1.0
Drain flow (mLmin^{-1})	4.0
6 M HCl flow (mLmin^{-1})	0.6
0.5% w/v NaBH_4 in 0.5 M NaOH flow (mLmin^{-1})	1.2
Rinse delay (s)	30
Number of replicates	3
Wavelengths (nm)	
Cd	228.802
Pb	220.353
Hg	194.163

2.4 Microwave digestion procedure

An accurately weighed oyster samples (0.5 g) was placed in a microwave vessel with 8 mL of 69% nitric acid: 2 mL of 30% H₂O₂ mixture. The digestion program was as shown in Table 2. After cooling, the extracts were filtered through a Whatman No.41 filter paper into a 25 mL volumetric flask, then made up to the mark with ultrapure water and analyzed by ICP-OES. A blank was performed in every digestion batch.

Table 2 A microwave heating programme

Step	Power (Watt)	Time (min)
1	250	2
2	0	2
3	250	2
4	1000	15
Cooling	0	5

2.5 Physiologically based extraction test procedure

The PBET method was based on Ruby *et al.* and Cave *et al.* In the first stage, 0.3 g (accurately weighed) of oyster samples was placed into a 50 mL Sarstedt tube and treated with 30 mL of gastric solution (1.25 g pepsin, 0.50 g sodium malate, 0.50 g sodium citrate, 420 µL lactic acid and 500 µL acetic acid made up to 1 L with ultrapure water, adjusted to pH 1.5 with conc. HCl). The mixture was then shaken at 100 rpm in a thermostatic bath maintained at 37 °C. After 2 h, the solution was centrifuged at 3000 rpm for 10 min and a 5 mL aliquot was removed and filtered through 0.45 µL filter disk for analysis. 5.0 mL of the original gastric solution was then backflushed through the filter into the sample tube to retain the original solid: solution ratio. The second stage, 52.5 mg bile salts and 15 mg pancreatin were added into the sample tube and the mixture was adjusted to pH 7.0 with saturated NaHCO₃. The sample was then shaken at 100 rpm in a thermostatic bath maintained at 37 °C for a further 2 h when a second 5.0 mL aliquot was removed and filtered. The bioaccessible metal contents of oyster

extracts were determined by ICP-OES. The resultant sample residue was further extracted by microwave digestion. All the aliquots were stored at 4°C and analyzed within 24 h by ICP-OES. Gastric and intestinal blank were performed in every batch.

2.6 ICP-OES analysis

Samples of the oyster extracts were analyzed by ICP-OES using an external calibration technique. A matrix match standard solution was used to circumvent potential matrix effects. The quality of the ICP-OES measurement data was evaluated by analyzing the certified reference materials (SRM 1566b oyster tissue). The CRMs were run in between every 10 sample measurements to check the sensitivity of the instruments.

2.7 Calculation of bioaccessibility

The bioaccessibility measurements are normally reported as relative bioaccessibility expressed as a percentage and calculated per digestion according to the following equation (Oomen et al., 2002);

$$\text{Bioaccessibility (\%)} = \frac{\text{Metal mobilized from oyster sample during digestion (\mu g)} \times 100}{\text{Metal present in oyster sample before digestion (\mu g)}}$$

3. Results and discussion

3.1 Analytical performance

Accuracy of the method was assessed by using the certified reference material (SRM 1566b oyster tissue). The obtained results and the percentage recovery analyzed for the heavy metals are shown in Table 3 (A-B). All percentage recovery results showed good agreement between measured and certified concentrations with values ranging from 89.4-103.8, 85.3-98.9, and 82.1-111.6 for Cd, Pb and Hg, respectively. Good repeatability of the method expressed as percentage relative standard deviation (%RSD) has been also assessed.

Table 3 Total concentrations ($\mu\text{g/g}$) in a certified reference material (SRM1566b oyster tissue)

A) Cd and Pb

Measurement	Cd		Pb	
	Certified value = 2.48 ± 0.08		Certified value = 0.308 ± 0.009	
	Measured value,	Recovery, %	Measured value,	Recovery, %
1	2.425	97.8	0.301	97.7
2	2.216	89.4	0.266	86.2
3	2.298	92.7	0.263	85.3
4	2.508	101.1	0.280	90.9
5	2.574	103.8	0.295	95.9
6	2.521	101.6	0.305	98.9
7	2.478	99.9	0.274	89.0
Mean	2.431	98.0	0.283	92.0
SD	0.129	5.2	0.017	5.5
% RSD	5.3	5.3	6.0	6.0

B) Hg

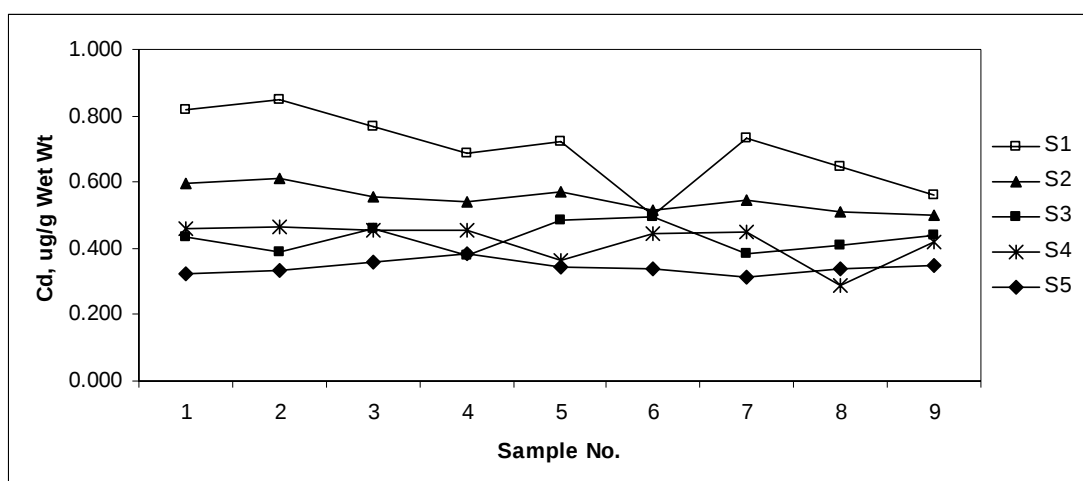
Measurement	Hg ($\mu\text{g/g}$, Dry Wt.)			
	$C_{\text{spiked}} = 0.050 \mu\text{g/g}$			
	$C_{\text{spiked sample}}$	$C_{\text{unspiked sample}}$	C_{found}	Recovery, %
1	0.361	0.314	0.047	93.8
2	0.319	0.263	0.056	111.6
3	0.321	0.277	0.044	87.4
4	0.311	0.268	0.043	86.1
5	0.356	0.315	0.041	82.1
6	0.304	0.262	0.042	84.8
7	0.364	0.316	0.048	96.2
Mean			0.046	91.7
SD			0.005	10.1
% RSD			11.0	11.0

3.2 Total metal concentration

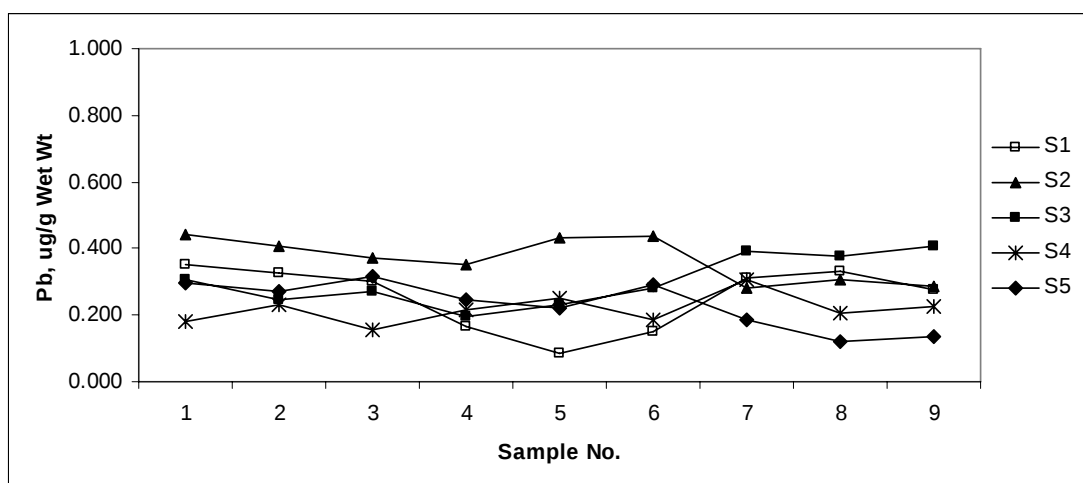
To determine total metal concentrations, all oyster samples were microwave digested with concentrated HNO_3 and 30% H_2O_2 and analyzed for Cd, Pb and Hg by ICP-OES. Fig.2 A-C shows the total metal concentrations ($\mu\text{g/g}$ wet wt.) in oyster samples collected from 5 sampling locations (S1-S5). Table 4 shows the mean total metal concentration in the samples compared to the standard limit set by FDA & EPA (for Cd and Pb) and Ministry of Health Thailand (for Hg). The results indicated that mean Cd / Pb / Hg levels in the oyster samples collected from S1, S2, S3, S4 and S5 location were 0.698 ± 0.114 / 0.256 ± 0.095 / 0.110 ± 0.077 , 0.550 ± 0.039 / 0.368 ± 0.066 / 0.083 ± 0.039 , 0.430 ± 0.044 / 0.300 ± 0.076 / 0.106 ± 0.051 , 0.423 ± 0.059 / 0.218 ± 0.044 / 0.049 ± 0.042 and 0.343 ± 0.020 / 0.233 ± 0.071 / 0.031 ± 0.015 $\mu\text{g/g}$ wet wt., respectively. It clearly observed that the metal concentrations in all oyster samples were well below the standard limits and vary little between sampling sites.

Fig. 2 Total metal concentrations in oyster samples collected from 5 sampling locations (S1-S5)

(A) Cadmium



(B) Lead



(C) Mercury

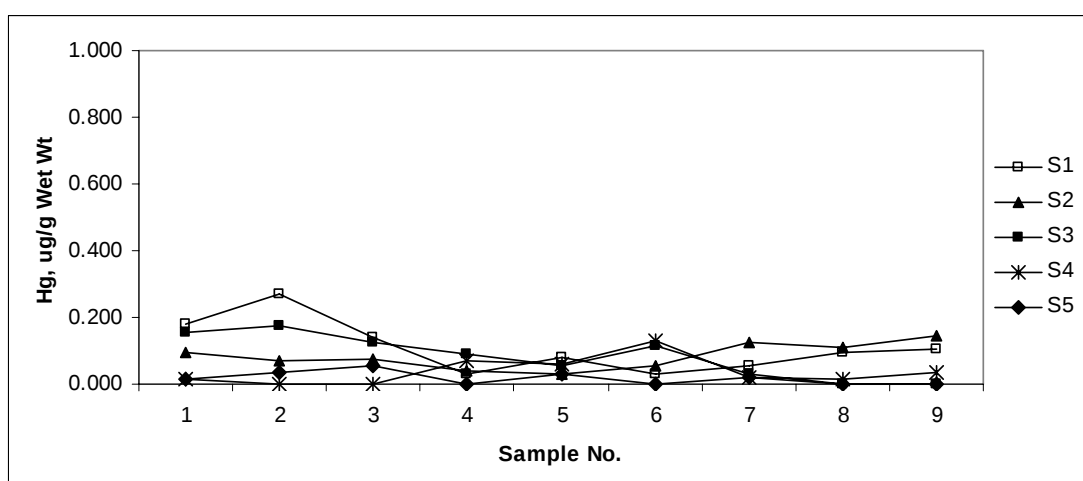


Table 4 Total metal concentration in oyster samples compared to the standard limit

Sampling location	Mean $\pm$ SD ($\mu\text{g/g}$, Wet Wt.), n=9		
	Cd	Pb	Hg
S1	0.698 $\pm$ 0.114	0.256 $\pm$ 0.095	0.110 $\pm$ 0.077
S2	0.550 $\pm$ 0.039	0.368 $\pm$ 0.066	0.083 $\pm$ 0.039
S3	0.430 $\pm$ 0.044	0.300 $\pm$ 0.076	0.106 $\pm$ 0.051
S4	0.423 $\pm$ 0.059	0.218 $\pm$ 0.044	0.049 $\pm$ 0.042
S5	0.343 $\pm$ 0.020	0.233 $\pm$ 0.071	0.031 $\pm$ 0.015
Standard limit	4.0 ^a	1.7 ^a	0.5 ^b

^a Standard limit set by FDA & EPA Safety Levels in Regulations and Guidance

^b Standard limit set by Ministry of Health Thailand Issue 98 (B.C. 2529)

3.3 Bioaccessibility of Cd, Pb and Hg from oyster samples

A) Cadmium

From the results obtained in section 3.2, the total Cd concentrations were in a range of 0.343 to 0.698 µg/g wet wt. for the oyster samples collected from 5 sampling locations. The data potentially overestimate health risks to humans since it is recognized that only a fraction of a metal ingested with food entering the systemic circulation. Therefore, the oral bioaccessibility of metals from the oysters were studied using an *in vitro* gastrointestinal digestion. The samples were treated with gastric and intestinal juices in the PBET experiment, the gastric and intestinal fractions were collected and analyzed by ICP-OES. Bioaccessible concentrations together with total Cd concentrations in the oysters were shown in Fig. 3 A. The bioaccessible fractions were in the range of 0.113 to 0.376 µg/g wet wt. These values expressed as percentage bioaccessibility of the metals in oyster samples were presented in Fig. 4 A. The Cd bioaccessibility was moderate i.e. 21-34% and 12-27% of the total Cd measured in the gastric phase and the intestinal phase, respectively. The bioaccessibility of Cd were 34-59% when the solubility in both phase were considered.

B) Lead

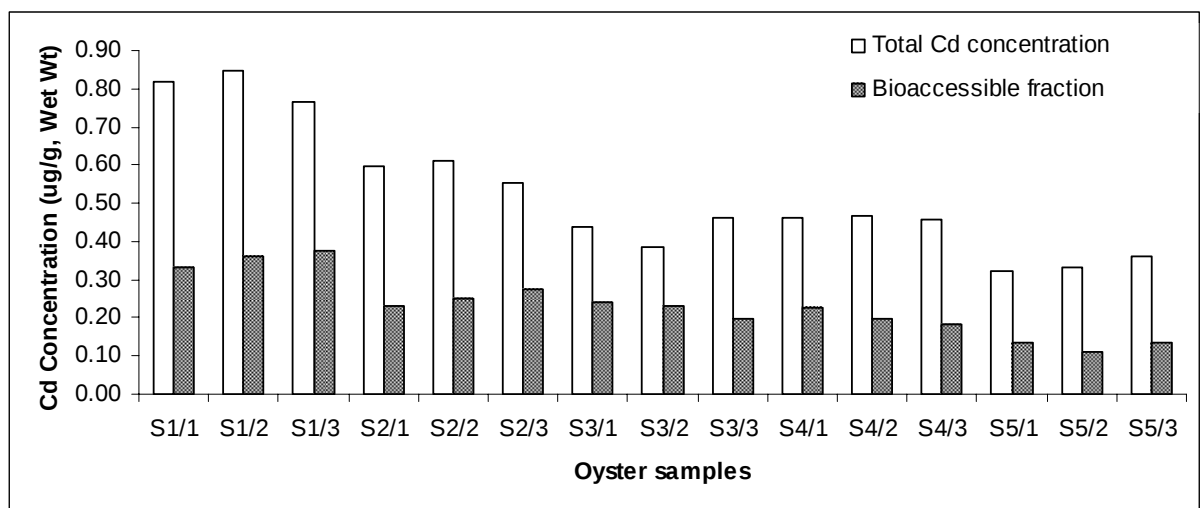
From the results obtained in section 3.2, the total Pb concentrations were in a range of 0.218 to 0.368 µg/g wet wt. for the oyster samples collected from 5 sampling locations. Fig. 3 B shows the bioaccessible and total Pb concentrations in oyster samples. The bioaccessible amount was in the range of 0.053 to 0.147 µg/g wet wt. The bioaccessibility of Pb in the samples was presented in Fig. 4 B indicating that it was slightly lower than Cd. In the gastric phase, 17-28% of the total Pb was extracted from the samples while 9-23% was dissolved in the intestinal phase. The bioaccessibility of Pb in were 28-51% when the values in both the gastric and intestinal phase were comprised.

C) Mercury

The total Hg concentrations were in a range of 0.031 to 0.110 $\mu\text{g/g}$ wet wt. for the oyster samples collected from 5 sampling locations. The contamination levels of Hg in the samples were relatively low. As expected, the bioaccessible amount of Hg was smaller than the LOQ of the method ($<18.9 \mu\text{g/kg}$) for every samples.

Fig. 3 Bioaccessible and total metal concentrations in oyster samples

(A) Cadmium



(B) Lead

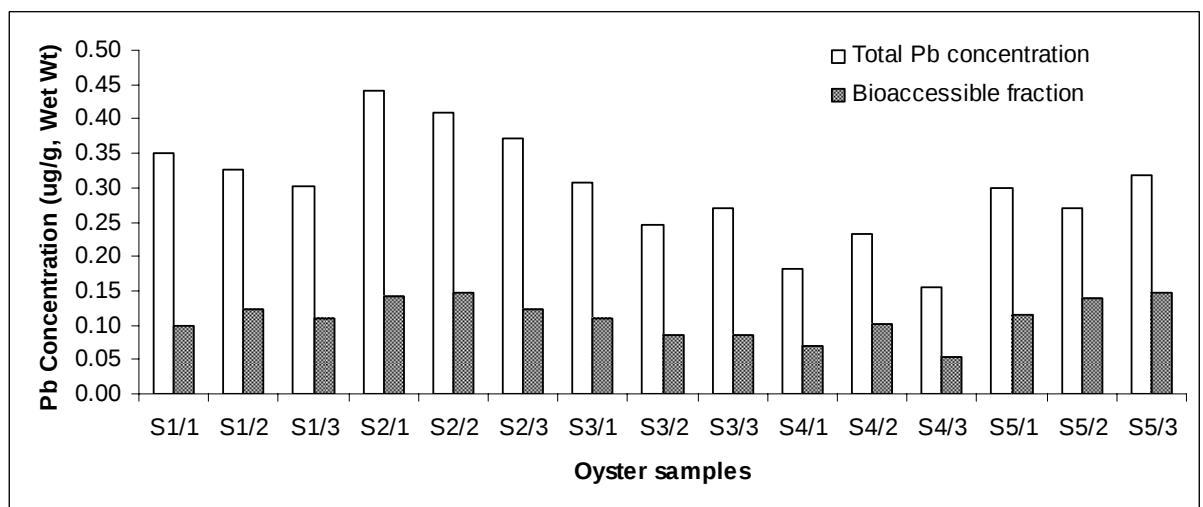
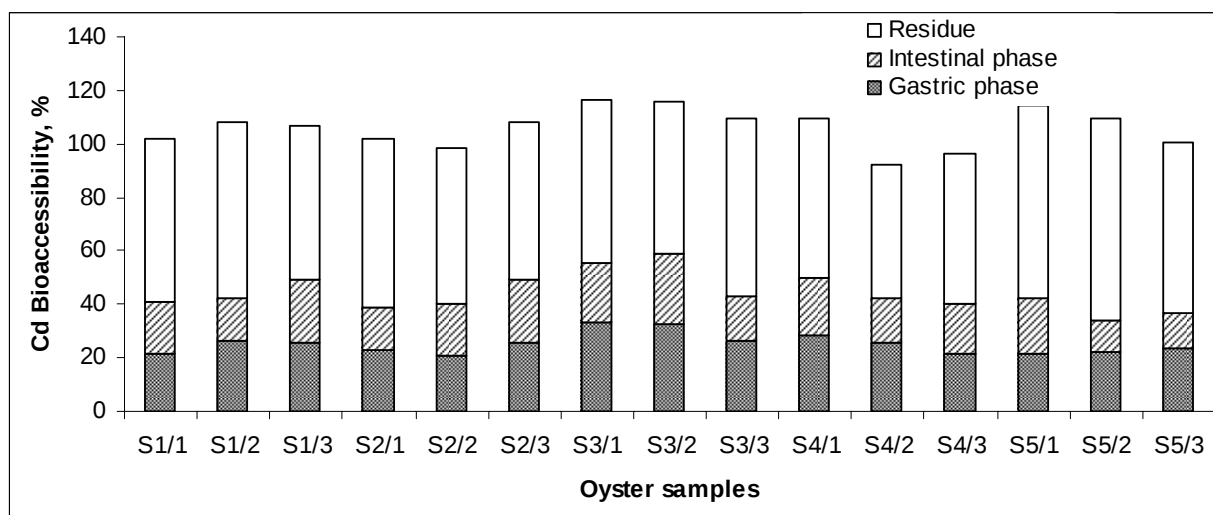
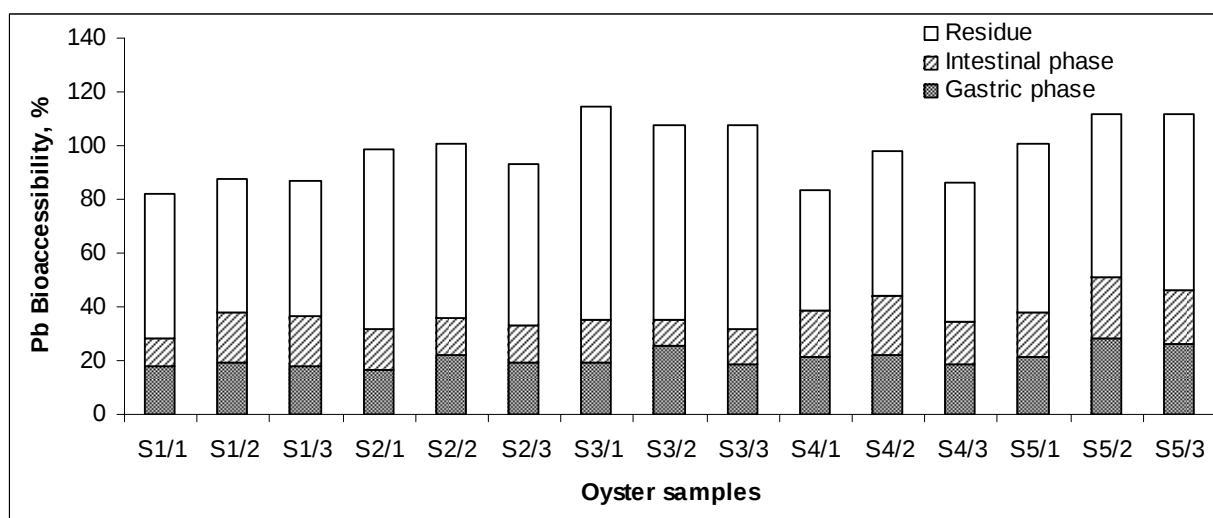


Fig. 4 Percentage bioaccessibility of the metals in oyster samples

(A) Cadmium



(B) Lead



4. Conclusions

The *in vitro* gastrointestinal extraction procedure was applied to estimate the bioaccessibility fraction of Cd, Pb and Hg from oyster tissues. The PBET measures the fraction of a metal which is solubilized from the sample under the simulated gastric and intestinal conditions. The simulated parameters include stomach and small intestinal pH and chemistry, soil-to-solution ratio, stomach mixing and digestion temperature. Both

gastric and intestinal extracted solutions and microwave digested residue were analyzed by ICP-OES. The bioaccessibilities (relative to respective total metal concentrations) of Cd and Pb in the oyster samples were 33.8-59.2% and 28.3-51.4%, respectively. The bioaccessibility of Hg was non-detectable (less than 0.019 mg/kg wet wt) due to the relatively low levels of Hg in the oyster samples (less than 0.110 mg/kg wet wt).

The results of the present study suggest that the PBET could be used to estimate toxicity of the heavy metals in oyster samples. The approach is relatively simple and economical, requiring only a day and only a small fraction of the cost of an *in vivo* study. In addition, the PBET can be used to produce assessments of potential health risks of heavy metals in foods that are more realistic than other approaches based on total metal content. However, further research into the development of the PBET to be a standard protocol is needed and the validation of the approach would be of benefit.

Acknowledgement

Thailand Research Fund (TRF) is acknowledged for financial support and the author wish to thank the Science Center of Faculty of Sciences and Technology, Suratthani Rajabhat University for the use of laboratory facilities.

5. References

1. Bragigand et al. 2004. Estimates of trace metal bioavailability to humans ingesting contaminated oysters. **Food and Chemical Toxicology**. 42, 1893-1902.
2. Versantvoort et al. 2005. Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. **Food and Chemical Toxicology**. 43, 31-40.
3. Intawongse, M. and Dean, J.R. 2008. Use of the physiologically-based extraction test to assess the oral bioaccessibility of metals in vegetable plants grown in contaminated soil. **Environmental Pollution**. 152, 60-72.
4. Xing, G.H. et al. 2008. Bioaccessibility of polychlorinated biphenyls in different foods using an in vitro digestion method. **Environmental Pollution**. 156, 1218-1226.

5. Oomen, A. G. et al. 2002. Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants, **Environmental Science and Technology**. 36, 3326-3334.
6. Miller, D. D. et al. 1981. An in vitro method for estimation of iron availability from meals, **The American Journal of Clinical Nutrition**. 34, 2248-2256.
7. Crews, H. M. et al. 1983. Preliminary enzymolysis studies on trace element extractability from food. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 34, 997-1004.
8. Ruby, M. V. et al. 1993. Development of an in vitro screening test to evaluate the in vivo bioaccessibility of ingested mine-waste lead. **Environmental Science and Technology**. 27, 2870-2877.
9. Hack, A. and Selenka, F., 1996. Mobilization of PAH and PCB from contaminated soil using a digestive tract model. **Toxicology Letters**. 88, 199-210.
10. Cave, M. R. et al. 2003. Measurement of the bioaccessibility of aArsenic in UK Soils. Bristol: British Geological Survey, Environmental Agency. (R&D Technical Report P5-062/TR02).
11. Ruby, M. V. et al. 1996. Estimation of lead and arsenic bioavailability using a physiologically based extraction test. **Environmental Science and Technology**. 30, 422-430.