

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

สาหร่ายขนนก (*Caulerpa racemosa* var. *corynephora*) หรือในแถบภาคใต้จะเรียกอีกชื่อว่า “สาหร่ายสาย” เป็นสาหร่ายทะเลในกลุ่มสาหร่ายสีเขียว พบได้ตามธรรมชาติในชายฝั่งอันดามันทางภาคใต้ของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดกระบี่ พังงา ตรัง และสตูล มักพบขึ้นอยู่บนก้อนหินและซากปะการังในเขตน้ำขึ้นน้ำลง บนพื้นกรวดปนทราย หรือตามพื้นโคลนในคลองป่าชายเลน สาหร่ายนอกจากมีความสำคัญต่อระบบนิเวศแล้ว ยังมีความสำคัญในด้านเศรษฐกิจ สาหร่ายขนนกสามารถนำไปใช้บริโภคเป็นอาหาร ซึ่งสามารถบริโภคได้ในสภาพสดเหมือนผักทั่วไป และสามารถนำไปประกอบอาหารหรือแปรรูป เช่น ลวกจิ้มน้ำพริก ยำสาหร่าย แกงจืดสาหร่าย ข้าวเกรียบสาหร่าย น้ำสาหร่าย ลูกกัสาหร่าย นอกจากนี้ยังมีการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์สปา ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง สาหร่ายขนนกมีคุณค่าทางโภชนาการสูงคล้ายกับสาหร่ายทะเลอื่นๆ คือ มีเส้นใยสูง มีไขมันต่ำ มีวิตามินและแร่ธาตุต่างๆ สูง เช่น ไอโอดีน แคลเซียม แมกนีเซียม โพแทสเซียม เหล็ก ทองแดง และ สังกะสี เป็นต้น ที่ผ่านมามีผลผลิตสาหร่ายขนนกต้องอาศัยการเก็บเกี่ยวจากแหล่งธรรมชาติ ทำให้ได้ผลผลิตไม่แน่นอน และจะมีผลผลิตมากเฉพาะในฤดูแล้ง แหล่งที่พบมากคือในตำบลคลองยาง อำเภอเกาะลันตา จังหวัดกระบี่ ต่อมาจึงมีการส่งเสริมให้มีการเพาะเลี้ยงในเชิงพาณิชย์โดยการเพาะเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ จะทำให้เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงสามารถมีสาหร่ายขนนกเก็บเกี่ยวเพื่อจำหน่ายได้ตลอดทั้งปี ซึ่งได้มีการจัดตั้งศูนย์วิจัยเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนนกขึ้นที่ตำบลไสไทย อำเภอมือ จังหวัดกระบี่ โดยคณะนักวิจัยจากมหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต โดยการให้ทุนสนับสนุนของคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ทำให้สาหร่ายขนนกมีแนวโน้มที่จะเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดใหม่ของภาคใต้

สังกะสี เหล็ก แมงกานีส และทองแดง เป็นแร่ธาตุปริมาณน้อย (Trace elements) ที่พบได้ในสาหร่ายขนนก ซึ่งเป็นพืชที่สนใจในงานวิจัยนี้ เป็นที่ทราบกันดีว่าแร่ธาตุเหล่านี้เป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อร่างกาย (Micronutrients) แต่แร่ธาตุเหล่านี้ที่มีอยู่ในอาหารอาจไม่อยู่ในรูปฟอร์มที่ร่างกายสามารถดูดซึมได้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องศึกษาทั้งในด้านของปริมาณแร่ธาตุเหล่านี้ที่มีอยู่ในอาหาร (Total determination) และในด้านของปริมาณที่สารอาหารเหล่านี้จะสามารถถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ (Oral bioaccessibility) ซึ่งเป็นปริมาณที่ร่างกายสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้จริง วิธีการที่สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณการดูดซึมได้ คือ *In vitro* gastrointestinal extraction วิธีการนี้ทำได้โดยการจำลองกระบวนการที่เกิดขึ้นจริงในระบบการย่อยอาหาร เริ่มตั้งแต่ในปาก กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก หลังจากนั้นจึงนำเอาของเหลวที่ได้จากการย่อยไปวิเคราะห์หาปริมาณสารที่สนใจศึกษาโดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ทางเคมีที่เหมาะสม

แร่ธาตุที่ผู้วิจัยสนใจศึกษา ได้แก่ สังกะสี เหล็ก แมงกานีส และทองแดง เป็นแร่ธาตุที่มีในสาหร่ายขนนก แต่ยังไม่เคยมีรายงานวิจัยเกี่ยวกับข้อมูลของปริมาณแร่ธาตุดังกล่าวในสาหร่ายขนนกชนิดนี้ จึงทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาเพื่อวิเคราะห์ปริมาณแร่ธาตุเหล่านี้ นอกจากนี้ยังมุ่งเน้นศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับปริมาณการดูดซึมได้ของแร่ธาตุเหล่านี้ในร่างกายคนเมื่อบริโภคสาหร่ายขนนกเพื่อที่จะได้ข้อมูลที่เป็นแนวทางในการประเมินคุณค่าทางโภชนาการของอาหารชนิดนี้ และจะได้มีการเผยแพร่ข้อมูลด้านโภชนาการที่สำคัญของสาหร่ายขนนกซึ่งมีแนวโน้มที่จะเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดใหม่ของภาคใต้ นอกจากนี้ยังสามารถนำเทคนิคในการวิเคราะห์ไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างอาหารประเภทอื่นๆ และข้อมูลที่จะได้จากการวิจัยครั้งนี้ อาจถูกนำไปใช้ประโยชน์เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานให้แก่กลุ่มนักวิจัยเชื่อมโยงในต่างประเทศเพื่อนำไปสู่การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์นี้ให้เป็นวิธีการมาตรฐานต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณแร่ธาตุปริมาณน้อย (Trace elements) ที่มีในสาหร่ายขนนก ได้แก่ สังกะสี เหล็ก แมงกานีส และทองแดง
- 2) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณการดูดซึมได้ของแร่ธาตุปริมาณน้อย (Trace elements) ที่มีในสาหร่ายขนนก ได้แก่ สังกะสี เหล็ก แมงกานีส และทองแดง

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

- 1) ใช้ตัวอย่างสาหร่ายขนนกทั้งที่ได้จากแหล่งธรรมชาติ และ/หรือ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในพื้นที่ จังหวัดกระบี่
- 2) ธาตุที่วิเคราะห์ ได้แก่ สังกะสี, เหล็ก, แมงกานีส และทองแดง
- 3) ในการวิเคราะห์ปริมาณของแร่ธาตุปริมาณน้อยต่างๆ เตรียมตัวอย่างโดยวิธี Microwave digestion และในการประเมินการดูดซึมได้ เตรียมตัวอย่างโดยวิธี *In vitro* gastrointestinal extraction
- 4) เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณของธาตุต่างๆ คือ Flame-Atomic Absorption Spectrometer (FAAS) หรือ Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer (ICP-OES)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีในระดับชาติหรือนานาชาติ
- 2) ให้ความรู้แก่ผู้บริโภคในเรื่อง แร่ธาตุที่สำคัญที่มีในสาหร่ายขนนก

3) ได้ข้อมูลเพื่อเป็นแนวทางในการประเมินคุณค่าทางโภชนาการของสาหร่ายชนกในด้านแร่ธาตุที่จำเป็นต่อร่างกาย ได้แก่ สังกะสี เหล็ก แมงกานีส และทองแดง

หน่วยงานที่น่าผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1) หน่วยงานภายในประเทศ ได้แก่

- สำนักโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข
- ศูนย์ส่งเสริมการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในเชิงพาณิชย์
- ผู้บริโภคและชุมชนในท้องถิ่น

2) หน่วยงานในต่างประเทศ มีหลายหน่วยงานที่มีการใช้ข้อมูลเกี่ยวกับ Bioaccessibility หรือมีการผลักดันให้มีการนำข้อมูลนี้ไปใช้ประโยชน์ในด้านการประเมินคุณค่าทางโภชนาการ หรือการประเมินความเสี่ยงต่อผู้บริโภคในกรณีที่มีสารที่เป็นพิษปนเปื้อนในอาหาร 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

บทที่ 2

การตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สาหร่ายขนนก

สาหร่ายขนนก (*Caulerpa racemosa* var. *corynephora*) เป็นสาหร่ายทะเลในกลุ่มสาหร่ายสีเขียว มีลักษณะทลัสส์สีเขียวอ่อนเป็นท่อนติดต่อกันตลอด ประกอบด้วยส่วนที่คืบคลานไปตามพื้นที่ยึดเกาะ และมีส่วนที่ดั่งขึ้น โดยมีแกนกลางและแตกแขนงออกคล้ายขนนก ตรงปลายพองออกเป็นกระเปาะ (รูปที่ 2.1) ในแถบภาคใต้จะเรียกอีกชื่อว่า “สาหร่ายสาย” พบได้ตามธรรมชาติในชายฝั่งอันดามันทางภาคใต้ของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดตรัง สตูล กระบี่ และพังงา มักพบขึ้นอยู่บนก้อนหินและซากปะการังในเขตน้ำขึ้นน้ำลง บนพื้นกรวดปนทราย หรือตามพื้นโคลนในคลองป่าชายเลน พบในบริเวณน้ำทะเลค่อนข้างใส น้ำสะอาดและคลื่นลมไม่รุนแรงนัก มักพบที่ความลึกประมาณ 2-5 เมตร สาหร่ายชนิดนี้มีการเจริญเติบโตหนาแน่นในบริเวณที่มีปริมาณสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน (แอมโมเนีย ไนไตรท์ ไนเตรท) และธาตุอาหารอนินทรีย์อื่นๆ สูง และขึ้นอยู่ได้ในช่วงความเค็มค่อนข้างแคบ โดยสามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงความเค็ม 30–40 ppt (parts per thousand) โดยทั่วไปแหล่งน้ำจืด จะมีปริมาณเกลือน้อยกว่าร้อยละ 0.1 หรือน้อยกว่า 1 ppt ส่วนแหล่งน้ำเค็มจะมีเกลือโดยเฉลี่ยประมาณร้อยละ 3.5 หรือ 35 ppt (กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง, 2553)



รูปที่ 2.1 ลักษณะทั่วไปของสาหร่ายขนนก (*Caulerpa racemosa* var. *corynephora*)

สาหร่ายนอกจากสร้างอาหารเองโดยการสังเคราะห์แสงแล้วยังดูดซึมเอาแร่ธาตุที่มีประโยชน์มาจากทะเลด้วย ดังนั้นสาหร่ายจึงมีความสำคัญต่อทั้งระบบนิเวศน์และในด้านเศรษฐกิจ เป็นแหล่งอาหาร เป็นที่อยู่อาศัยและแหล่งอนุบาลสัตว์น้ำในทะเล สาหร่ายขนนกสามารถนำไปใช้บริโภคเป็น

อาหาร ซึ่งสามารถบริโภคได้ในสภาพสดเหมือนผักทั่วไป และสามารถนำไปประกอบอาหารหรือแปรรูป สาหร่ายขนนกมีคุณค่าทางโภชนาการสูงคล้ายกับสาหร่ายทะเลอื่นๆ คือ มีเส้นใยสูง มีไขมันต่ำ มีวิตามินและแร่ธาตุต่างๆ สูง เช่น วิตามินเอ วิตามินบี วิตามินซี กรดโฟลิก ไอโอดีน แคลเซียม แมกนีเซียม โพแทสเซียม เหล็ก ทองแดง และ สังกะสี เป็นต้น แมกนีเซียมช่วยให้ระบบประสาทและกล้ามเนื้อทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ แคลเซียมบำรุงกระดูก โพแทสเซียมควบคุมการทำงานของเซลล์และสมดุลของน้ำในร่างกาย ธาตุเหล็กและทองแดงช่วยในการสร้างเม็ดเลือด สังกะสีช่วยเสริมภูมิคุ้มกัน และยังพบว่าสาหร่ายขนนกมีสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยป้องกันมะเร็ง มีกรดอะมิโนหลายชนิดที่พืชบกไม่มีซึ่งมีฤทธิ์ช่วยในการรักษาโรคลำไส้อักเสบ รักษาโรคตับอักเสบเพราะช่วยในการสมานแผล เป็นอาหารที่เหมาะสมกับผู้ป่วยความดันโลหิตสูง เบาหวาน และหัวใจ นอกจากนี้สาหร่ายยังสามารถนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ ใช้ในการกำจัดน้ำเสียเพราะจัดเป็นตัวดูดซับทางชีวภาพที่ช่วยในการดูดซับสารพิษต่างๆ ใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและยา (กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง, 2553) ที่ผ่านมามีผลผลิตสาหร่ายขนนกต้องอาศัยการเก็บเกี่ยวจากแหล่งธรรมชาติ ทำให้ได้ผลผลิตไม่แน่นอน และจะมีผลผลิตมากเฉพาะในฤดูแล้งในเดือนมีนาคมถึงพฤษภาคม และจะลดลงเมื่อเข้าหน้าฝนในเดือนมิถุนายนถึงตุลาคม ต่อมาจึงมีการส่งเสริมให้มีการเพาะเลี้ยงในเชิงพาณิชย์โดยการเพาะเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ จะทำให้เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงสามารถมีสาหร่ายขนนกเก็บเกี่ยวเพื่อจำหน่ายได้ตลอดทั้งปี ทำให้การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนนกมีแนวโน้มที่จะเป็นอาชีพทางเลือกของชุมชนใน จังหวัดกระบี่ (มณฑนา, 2554)

2.2 แร่ธาตุในสาหร่าย

มนุษย์ได้นำสาหร่ายมาบริโภคเป็นอาหารตั้งแต่โบราณ ส่วนใหญ่จะพบในทวีปเอเชีย โดยเฉพาะในประเทศจีนและญี่ปุ่น ในปัจจุบันเป็นที่นิยมบริโภคกันมากขึ้นและมีการบริโภคกันแพร่หลายในหลายๆ ประเทศ ทั้งในอเมริกาและยุโรป รวมทั้งประเทศไทย สาหร่ายมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรต โปรตีน วิตามิน และแร่ธาตุหลายชนิด ในสาหร่ายมีองค์ประกอบที่เป็นแร่ธาตุอยู่ร้อยละ 8-40 (Ruperez, 2002) โดยน้ำหนักแห้ง มีรายงานวิจัยโดย Kumar และคณะ (2011) เกี่ยวกับองค์ประกอบสารอาหารและแร่ธาตุที่พบ (ดังแสดงในตารางที่ 2.1) ในสาหร่ายสีเขียวสกุล *Caulerpa* 3 สปีชีส์ ได้แก่ *C. racemosa*, *C. scalpelliformis* และ *C. veravelensis* ที่เก็บตัวอย่างจากชายฝั่งทะเล (Veraval Coast) ประเทศอินเดีย โดยได้ประเมินองค์ประกอบทางโภชนาการและแนวโน้มในการใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสาหร่าย 3 ชนิดนี้พบว่าปริมาณคาร์โบไฮเดรต และไขมัน อยู่ในช่วงร้อยละ 37.23-48.95 และ 2.64-3.06 น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ มีปริมาณแร่ธาตุเรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ โซเดียม (Na) > โพแทสเซียม (K) > แคลเซียม (Ca) > แมกนีเซียม (Mg) โดยมีปริมาณ Na, K, Ca และ Mg อยู่ร้อยละ 9-13, 4.8-

5.1, 3.2-4.8, และ 1.3-1.6 น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และมีแร่ธาตุปริมาณน้อย Fe, Cu, Zn, และ Mn เท่ากับ 15-30, 0.4-0.8, 3.3-6.8 และ 2.0-4.9 mg/100g น้ำหนักแห้ง ข้อมูลจากผลการวิจัยนี้ยืนยันได้ว่าสาหร่ายทั้ง 3 ชนิดนี้มีประโยชน์ทั้งในด้านคุณค่าทางโภชนาการและมีสมบัติเป็นสารแอนติออกซิแดนต์ (Antioxidant)

สาหร่ายแต่ละชนิดจะมีปริมาณแร่ธาตุอยู่มากเพียงใดนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ชนิดพันธุ์ของสาหร่าย ฤดูกาล แหล่งที่พบและสภาพแวดล้อมของบริเวณที่มีสาหร่ายอยู่ เช่น อุณหภูมิของน้ำ pH และความเค็มของน้ำ เป็นต้น แร่ธาตุที่ผู้วิจัยสนใจศึกษา ได้แก่ สังกะสี เหล็ก แมงกานีส และทองแดง เป็นแร่ธาตุที่มีในสาหร่าย แต่ยังไม่เคยมีรายงานวิจัยเกี่ยวกับข้อมูลของปริมาณแร่ธาตุดังกล่าวในสาหร่ายชนิดใดชนิดหนึ่ง มีเพียงการรายงานปริมาณแร่ธาตุปริมาณน้อย (Trace element) เหล่านี้ในสาหร่ายชนิดต่างๆ เช่น ในสาหร่ายสีน้ำตาล (*Fucus vesiculosus*) พบว่า มีปริมาณเหล็ก สังกะสี แมงกานีส และทองแดง เท่ากับ 4.20, 3.71, 5.50 และ <0.5 mg/100g น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และในสาหร่ายสีแดง (*Porphyra tenera*, Nori) พบว่า มีปริมาณเหล็ก สังกะสี แมงกานีส และทองแดง เท่ากับ 10.3, 2.21, 2.72 และ <0.5 mg/100g น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (Ruperez, 2002) การที่สาหร่ายมีแร่ธาตุชนิดต่างๆ อยู่ในปริมาณที่สูงเนื่องจากผนังเซลล์ (Polysaccharides และโปรตีน) ของสาหร่ายมีหมู่ที่เป็นประจุลบ (คาร์บอกซิล, ซัลเฟต และฟอสเฟต) ซึ่งทำให้สามารถยึดจับกับแร่ธาตุต่างๆ ได้ดี (Davis, 2003) ในปี ค.ศ. 2010 มีรายงานโดย Larrea-Marin และคณะ เกี่ยวกับปริมาณของแร่ธาตุปริมาณน้อยในสาหร่าย 2 ชนิด คือ *Porphyra* (สาหร่ายสีแดง) และ *Laminaria* (สาหร่ายสีน้ำตาล) พบว่าในสาหร่ายชนิดแรกมีปริมาณเหล็ก สังกะสี แมงกานีส และทองแดง เท่ากับ 200.5, 78.6, 30.5 และ 21.8 mg/kg น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ในขณะที่ในสาหร่ายชนิดที่ 2 มีปริมาณเหล็ก สังกะสี แมงกานีส และทองแดง เท่ากับ 145.0, 31.9, 14.1 และ 14.5 mg/kg น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และมีรายงานวิจัยโดย Ródenas de la Rocha และคณะ (2009) ที่ศึกษาเกี่ยวกับปริมาณของแร่ธาตุในสาหร่าย 2 ชนิดนี้เช่นกันคือ *Porphyra* และ *Laminaria* ซึ่งได้เก็บตัวอย่างสาหร่ายจากแหล่งต่างๆ กัน ได้แก่ บริเวณชายฝั่งประเทศสเปน (Spanish northwest coast) ชายฝั่งประเทศฝรั่งเศส (France northwest coast) และสาหร่ายอบแห้งจากประเทศเกาหลี และประเทศญี่ปุ่น ผลการวิจัยพบว่าในสาหร่าย *Porphyra* มีปริมาณธาตุต่างๆ จากมากไปน้อยดังนี้ As > Cd > V > Ni > Cr > Pb > Se > Mo > Co > Sb สำหรับสาหร่าย *Laminaria* ปริมาณธาตุต่างๆ จากมากไปน้อยดังนี้ As > V > Cd > Ni > Cr > Pb > Se > Co > Mo > Sb ปริมาณแร่ธาตุเหล่านี้ที่ตรวจพบแสดงดังในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของสารอาหาร รงควัตถุ (Pigment) และแร่ธาตุที่พบในสาหร่ายสีเขียวสกุล *Caulerpa* 3 สปีชีส์

องค์ประกอบ	<i>C. racemosa</i>	<i>C. scalpelliformis</i>	<i>C. veravelensis</i>
สารอาหาร (%DW)			
ความชื้น (%)	87.88 ± 7.71	81.77 ± 6.11	91.53 ± 8.80
เถ้า (Ash)	33.70 ± 2.73	40.77 ± 2.15	24.20 ± 2.20
โปรตีน	7.77 ± 0.59	10.50 ± 0.91	12.88 ± 1.17
คาร์โบไฮเดรต	37.23 ± 3.05	38.84 ± 3.45	48.95 ± 2.06
ไขมัน	2.80 ± 0.19	3.06 ± 0.39	2.64 ± 0.20
คาร์บอน	21.75 ± 0.93	27.43 ± 1.08	38.03 ± 1.84
ไนโตรเจน	1.24 ± 0.09	1.68 ± 0.15	2.06 ± 0.19
พลังงาน (kJ g ⁻¹ DW)	8.70 ± 0.56	9.31 ± 0.53	10.91 ± 1.74
รงควัตถุ (μg g⁻¹ FW)			
Chl a	79.28 ± 3.36	113.81 ± 5.23	91.04 ± 2.97
Chl b	65.11 ± 3.40	75.22 ± 2.77	44.39 ± 3.70
แคโรทีนอยด์	12.77 ± 1.55	10.27 ± 1.77	24.96 ± 2.53
Macro-element (% DW)			
Na	12.89 ± 0.81	8.63 ± 0.45	10.64 ± 0.29
K	5.06 ± 0.22	4.79 ± 0.24	5.03 ± 0.32
Ca	4.16 ± 0.35	3.21 ± 0.34	4.76 ± 0.87
Mg	1.33 ± 0.25	1.43 ± 0.15	1.61 ± 0.15
Micro-element (mg100g⁻¹ DW)			
Fe	14.79 ± 1.44	16.28 ± 2.11	29.71 ± 3.33
Cu	0.41 ± 0.07	0.77 ± 0.05	0.62 ± 0.04
Zn	5.42 ± 0.22	3.27 ± 0.38	6.82 ± 0.58
Mn	2.00 ± 0.19	3.33 ± 0.36	4.91 ± 0.48
Ni	0.20 ± 0.04	0.37 ± 0.05	0.33 ± 0.03
As	0.21 ± 0.07	0.25 ± 0.09	0.61 ± 0.04
Mo	0.13 ± 0.02	0.11 ± 0.01	0.15 ± 0.02
Se	0.27 ± 0.04	0.15 ± 0.03	0.13 ± 0.02

ที่มา: Kumar et al., 2011

ตารางที่ 2.2 ปริมาณแร่ธาตุที่พบในสาหร่าย *Porphyra* และ *Laminaria* ที่มีแหล่งที่มาจากประเทศในเอเชียและยุโรป

แร่ธาตุ	Genus	ฝรั่งเศส	สเปน	เกาหลี	ญี่ปุ่น
Co (ng g ⁻¹ DW)	<i>Porphyra</i>	256 ± 31	207 ± 15	142 ± 23	112 ± 15
	<i>Laminaria</i>	72.8 ± 8.7	99.8 ± 8.8	253 ± 14	287 ± 8
Mo (ng g ⁻¹ DW)	<i>Porphyra</i>	1030 ± 40	408 ± 13	174 ± 48	140 ± 17
	<i>Laminaria</i>	48.4 ± 4.4	72.8 ± 3.9	183 ± 8	106 ± 10
Pb (ng g ⁻¹ DW)	<i>Porphyra</i>	312 ± 22	493 ± 14	397 ± 32	848 ± 53
	<i>Laminaria</i>	249 ± 21	385 ± 14	1488 ± 131	1042 ± 51
Sb (ng g ⁻¹ DW)	<i>Porphyra</i>	23.0 ± 5.7	17.0 ± 5.4	11.0 ± 4.4	71.00 ± 6.52
	<i>Laminaria</i>	29.0 ± 2.6	29.2 ± 4.1	40.8 ± 7.5	27.20 ± 2.77
Se (ng g ⁻¹ DW)	<i>Porphyra</i>	502 ± 22	536 ± 22	375 ± 24	438 ± 32
	<i>Laminaria</i>	575 ± 24	231 ± 13	201 ± 8	328 ± 9
As (μg g ⁻¹ DW)	<i>Porphyra</i>	4.25 ± 0.13	8.77 ± 1.36	6.28 ± 0.19	9.70 ± 1.20
	<i>Laminaria</i>	53.1 ± 2.9	30.1 ± 7.0	40.02 ± 3.82	50.7 ± 3.8
Cd (μg g ⁻¹ DW)	<i>Porphyra</i>	2.88 ± 0.13	0.46 ± 0.06	3.07 ± 0.07	3.18 ± 0.08
	<i>Laminaria</i>	0.46 ± 0.08	0.35 ± 0.10	0.31 ± 0.07	2.95 ± 0.19
Cr (μg g ⁻¹ DW)	<i>Porphyra</i>	0.81 ± 0.10	1.19 ± 0.13	0.95 ± 0.12	1.04 ± 0.11
	<i>Laminaria</i>	0.98 ± 0.06	0.65 ± 0.04	1.09 ± 0.06	0.73 ± 0.04
Ni (μg g ⁻¹ DW)	<i>Porphyra</i>	1.22 ± 0.20	2.76 ± 0.16	0.27 ± 0.07	0.23 ± 0.04
	<i>Laminaria</i>	0.65 ± 0.04	1.01 ± 0.074	1.14 ± 0.04	1.00 ± 0.07
V (μg g ⁻¹ DW)	<i>Porphyra</i>	5.06 ± 0.13	3.05 ± 0.16	0.66 ± 0.11	0.70 ± 0.08
	<i>Laminaria</i>	0.76 ± 0.03	0.67 ± 0.02	3.2 ± 0.16	0.60 ± 0.07

ที่มา: Ródenas de la Rocha et al., 2009

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาปริมาณแร่ธาตุที่พบในสาหร่าย *Porphyra vietnamensis* ที่เก็บตัวอย่างจากพื้นที่ชายฝั่งทางตะวันตกตอนกลาง ประเทศอินเดีย (Rao, 2007) ได้วิเคราะห์ปริมาณแร่ธาตุทั้งหมด 17 ชนิด โดยเทคนิค ICP-OES ได้ผลดังนี้คือ Na, 24.5–65.6; K, 1.76–3.19; Ca, 1.40–6.12; Mg, 4.0–5.90 (mg/g น้ำหนักแห้ง); Pb, 0.01–0.15; Cr, 0.13–0.22; Co, 0.06–0.20; Fe,

33.0–298; Zn, 0.93–3.27; Mn, 4.22–10.00; Hg, 0.01–0.04; Cu, 0.54–1.05; As, 1.24–1.83; Ni, 0.02–0.25; Cd, 0.14–0.55; Mo, 0.02–0.03 และ B, 0.02–0.07 mg/100 g น้ำหนักแห้ง

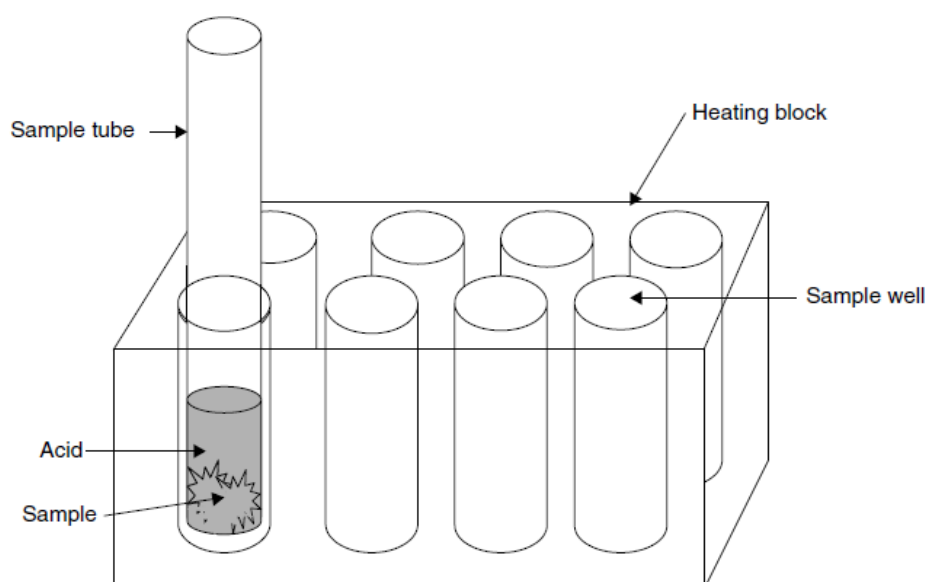
Besada และคณะ (2009) ได้ศึกษาปริมาณของโลหะหนักในสาหร่าย 11 ชนิดที่มีจำหน่ายในประเทศสเปน ได้แก่ *Gelidium* spp., *Eisenia bicyclis*, *Himanthalia elongata*, *Hizikia fusiforme*, *Laminaria* spp., *Ulva rigida*, *Chondrus crispus*, *Porphyra umbilicales* และ *Undaria pinnatifida* พบว่าสาหร่ายชนิด *Hizikia fusiforme* มีปริมาณของสารหนู (As) สูงที่สุดซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 103-147 mg/kg น้ำหนักแห้ง และพบว่ามีปริมาณของ Cd อยู่ในช่วง 0.025-4.82 mg/kg น้ำหนักแห้ง ซึ่งส่วนใหญ่มีค่าเกินเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดโดยประเทศฝรั่งเศส สำหรับปริมาณของ Pb, Hg, Cu และ Zn มีค่าอยู่ในช่วง <0.008-1.28, 0.001-0.057, 0.410-14.1 และ 1.30-73.8 mg/kg น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และมีการศึกษาปริมาณแร่ธาตุในสาหร่ายขนาดใหญ่ (Macroalgae) 4 ชนิด ได้แก่ *Ulva lactuca*, *Chondracanthus squarrulosus*, *Sargassum sinicola* และ *Gracilariopsis lemaneiformis* ซึ่งเก็บตัวอย่างจากชายฝั่งตะวันตกของอ่าวแคลิฟอร์เนีย พบว่ามีปริมาณแร่ธาตุต่างๆ อยู่ในช่วงต่อไปนี้ Co, 84-111; Cu, 34-51; Fe, 3,300-18,000; Mn, 147-320; Ni, 73-112; Pb, 78-145 และ Zn, 101-190 nmol g⁻¹ น้ำหนักแห้ง (Huerta-Diaz, 2007) และในปี ค.ศ. 2011 มีรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสาหร่าย *Ulva lactuca* ที่เก็บตัวอย่างจากชายฝั่งประเทศตูนิเซีย พบว่ามีองค์ประกอบที่เป็นเส้นใย (54.0%) แร่ธาตุ (19.6%) โปรตีน (8.5%) และไขมัน (7.9%) ในส่วนที่เป็นแร่ธาตุ พบว่าในสาหร่ายชนิดนี้มีปริมาณแร่ธาตุต่างๆ เท่ากับ 3891 (Mg), 2720 (Ca), 630 (K), 552 (Na) และ 93 (P) mg 100g⁻¹ น้ำหนักแห้ง และพบว่ามีปริมาณโลหะหนักต่างๆ เท่ากับ 43 (Fe), 6.8 (Zn), 1.3 (Mn), 1.26 (Pb), 0.8 (Cu) และ 0.12 (Cd) mg 100g⁻¹ น้ำหนักแห้ง (Yaich, 2011)

2.3 การเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก

ในการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักในตัวอย่างต่างๆ ทางสิ่งแวดล้อมนั้นจำเป็นจะต้องมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง (Sample preparation) ก่อนเพื่อให้แมทริกซ์ (Matrix) ของสารตัวอย่างเกิดการสลายตัว (Decomposition) ให้ได้โลหะหนักมาอยู่ในสารละลาย แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ต่างๆ เช่น Atomic Absorption Spectrometry (AAS), Atomic Emission Spectrometry (AES), Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS) เป็นต้น ยกเว้นกรณีที่วิเคราะห์โดยอาศัยเทคนิคอื่นๆ ที่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่เป็นของแข็งได้โดยตรง เช่น เทคนิค X-ray Fluorescence Spectroscopy

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 เพราะทำให้เกิดการสูญหายไปของธาตุเหล่านี้ในระหว่างการเตรียมตัวอย่าง และการทำให้เถ้าจากการเผาละลายด้วยตัวทำละลายนั้นค่อนข้างยุ่งยาก ส่วนวิธี Fusion เหมาะสำหรับสารตัวอย่างที่มีซิลิกาและออกไซด์เป็นองค์ประกอบ แต่มีข้อด้อยคือสารตัวอย่างมีโอกาสปนเปื้อนสูง จากการเติมสารเคมีบางชนิดลงไปให้มากเกินไปเพื่อให้สารตัวอย่างหลอมละลายได้ดียิ่งขึ้นขณะให้ความร้อน ตัวอย่างสารเคมีที่ใช้เติมลงไป เช่น Sodium carbonate, Lithium tetraborate และ Potassium pyrosulfate (Dean, 2003)

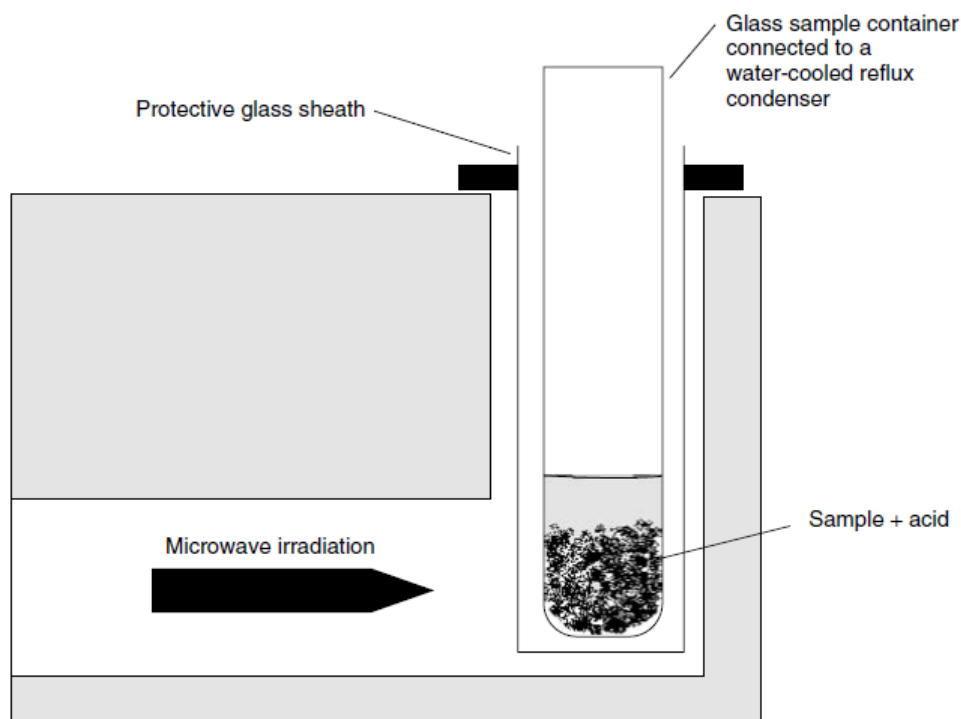
การย่อยด้วยกรด (Acid Digestion) เป็นการย่อยโดยใช้กรดและความร้อนในการทำให้แมทริกซ์ของตัวอย่างสลายตัว การเลือกใช้กรดชนิดใดหรือส่วนผสมระหว่างกรดชนิดใดนั้นขึ้นอยู่กับลักษณะของแมทริกซ์ของสารตัวอย่างที่ต้องการสลายตัว เช่น ถ้าต้องการย่อยตัวอย่างที่มีซิลิกาเป็นองค์ประกอบต้องใช้กรดไฮโดรฟลูออริก (HF) ส่วนกรดไนตริกสามารถใช้ย่อยตัวอย่างชีวสาร (Biological samples) ได้ดี การย่อยด้วยกรดมี 2 แบบ คือ การย่อยแบบดั้งเดิมโดยใช้แผ่นความร้อน (Hotplate หรือ Heating block) และการใช้เตาไมโครเวฟ รูปที่ 2.2 แสดงไดอะแกรมของระบบการย่อยตัวอย่างด้วยกรดแบบดั้งเดิมโดยใช้ Heating block ที่มีภาชนะบรรจุตัวอย่าง (Vessel) หลายอันทำให้สามารถย่อยได้ครั้งละหลายตัวอย่างพร้อมกัน



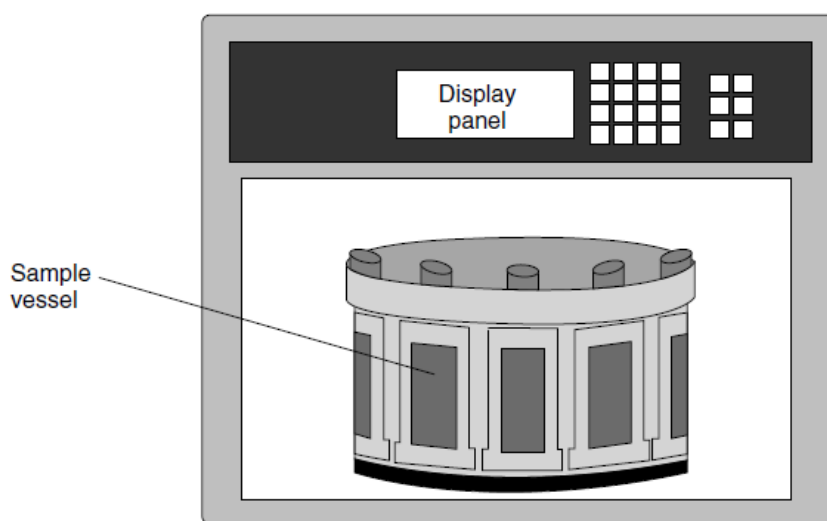
รูปที่ 2.2 ไดอะแกรมของระบบการย่อยตัวอย่างด้วยกรดโดยใช้ Heating block

ที่มา: Dean, 2003

มีการนำเตาไมโครเวฟมาใช้ในการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณโลหะเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1975 (Abu-Samra, 1975) และด้วยความก้าวหน้าทางด้านเทคโนโลยีในปัจจุบัน ทำให้บริษัทผู้ผลิตเครื่องมือหลายบริษัทได้พัฒนาเตาไมโครเวฟเพื่อใช้สำหรับการเตรียมตัวอย่างโดยเฉพาะ เช่น บริษัท CEM Corporation และบริษัท Anton Paar เป็นต้น ระบบการให้ความร้อนของเตาไมโครเวฟแบ่งเป็น 2 แบบ คือ แบบระบบเปิด (Open-focused system) และแบบระบบปิด (Closed-vessel system) คลื่นไมโครเวฟเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความถี่สูง ที่มีความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 1 มิลลิเมตร ถึง 1 เมตร เตาไมโครเวฟส่วนใหญ่จะใช้ค่าความยาวคลื่นประมาณ 12.2 เซนติเมตร (หรือความถี่ 2.45 GHz) คลื่นไมโครเวฟประกอบด้วย 2 องค์ประกอบคือ สนามแม่เหล็กและสนามไฟฟ้าที่อยู่ในระนาบตั้งฉากกัน อุปกรณ์ที่สำคัญของเตาไมโครเวฟ คือ แมกนีตรอน (Magnetron) ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนพลังงานไฟฟ้าเป็นคลื่นไมโครเวฟ ไมโครเวฟจะเคลื่อนที่ผ่านท่อนำคลื่น (Waveguide) ไปยังสารตัวอย่างที่นำมาผ่านกระบวนการย่อยที่อยู่ภายในควิตี้ (Cavity) ทำให้โมเลกุลของสารตัวอย่างดูดกลืนพลังงาน เกิดการสั่นและเกิดการชนโมเลกุลอื่นๆ ต่อไป ทำให้เกิดเป็นพลังงานความร้อนและสามารถย่อยสลายสารตัวอย่างได้ รูปที่ 2.3 แสดงไดอะแกรมของระบบการย่อยตัวอย่างด้วยไมโครเวฟแบบระบบเปิด และรูปที่ 2.4 แสดงไดอะแกรมของระบบการย่อยตัวอย่างด้วยไมโครเวฟแบบระบบปิด



รูปที่ 2.3 ไดอะแกรมของระบบการย่อยตัวอย่างด้วยไมโครเวฟแบบระบบเปิด
ที่มา: Dean, 2003



รูปที่ 2.4 ไดอะแกรมของระบบการย่อยตัวอย่างด้วยไมโครเวฟแบบระบบปิด
ที่มา: Dean, 2003

การย่อยด้วยระบบไมโครเวฟเป็นที่นิยมใช้มากขึ้นเนื่องจากมีความสะดวกและรวดเร็ว ไม่ทำให้เกิดปัญหาการสูญหายไปของธาตุที่ระเหยเป็นไอได้เนื่องจากสามารถกระทำได้ในระบบปิด นอกจากนี้ยังช่วยลดการปนเปื้อนที่อาจเกิดขึ้นในการวิเคราะห์ เนื่องจากการใช้ปริมาณกรดน้อยลง และทำการย่อยในระบบปิด Ródenas de la Rocha และคณะ (2009) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างสำหรับเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณแร่ธาตุหลายชนิดพร้อมกัน (Multi-element analysis) โดยเทคนิค ICP-MS ในการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการย่อยด้วยไมโครเวฟ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมเป็นดังนี้ ใช้สารห้ำ 0.5 g ตัวอย่างสารห้ำที่ใช้จะต้องนำไปกำจัดเกลือออกก่อน โดยนำสารห้ำอบแห้ง 1 g มาล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 นาที แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 55 ± 5 °C นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงบดด้วยเครื่องบดให้ละเอียด (ขนาดอนุภาคไม่เกิน 30 μm) ส่วนผสมของสารเคมีที่ใช้ย่อยตัวอย่างประกอบด้วย HNO_3 (65% w/v) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และ H_2O_2 (30% w/v) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ใช้เวลาในการย่อย 5 นาที และใช้กำลังของคลื่นไมโครเวฟ 200 วัตต์ ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยใช้สารอ้างอิง BCR 279 (Sea lettuce, *Ulva lactuca*) สำหรับ As, Cd, Cr และ Se ใช้สารอ้างอิง NCS ZC78006 (Tea) สำหรับ Co และ Sb และใช้ NIST 1547 (Peach leaves) สำหรับ Ni, Pb, Mo และ V พบว่า มีค่าความถูกต้องของทุกตัวอย่างที่วิเคราะห์อยู่ในช่วง 75-115% และค่าความแม่นยำ

ของการวิเคราะห์มีค่าอยู่ในช่วงไม่เกิน $\pm 15\%$ และเมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างสาหร่าย 2 ชนิด ได้แก่ *Porphyra* และ *Laminaria* ได้ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 2.2

Romarís-Hortas และคณะ (2009) ได้ศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างโดยใช้ระบบการย่อยด้วยไมโครเวฟ ในการศึกษาปริมาณของไอโอดีนและโบรมีนในตัวอย่างสาหร่ายโดยเทคนิค ICP-MS ได้ศึกษาประสิทธิภาพของการสกัด โดยพิจารณาตัวแปรต่างๆ ที่ส่งผลต่อการสกัด ได้แก่ อุณหภูมิที่ใช้ในการย่อย ปริมาตรของสารสกัด (Tetramethylammonium hydroxide, TMAH) ที่ใช้ และเวลาที่ใช้ในการย่อย โดยส่วนใหญ่การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณแร่ธาตุมักใช้การย่อยด้วยกรด แต่สำหรับการวิเคราะห์ไอโอดีนและโบรมีนวิธีการย่อยด้วยกรดไม่เหมาะสม เพราะทำให้เกิดความถูกต้องของการวิเคราะห์ลดลงเนื่องจากการเกิดเป็นสารที่ระเหยได้ในสถานะที่เป็นกรด เช่น Br_2 , I_2 , HI หรือ HBr ดังนั้นจึงมักใช้สถานะที่เป็นด่างในการเตรียมตัวอย่าง ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้ TMAH เป็นสารสกัด และการใช้สาร TMAH เป็นสารสกัดไม่สามารถทำให้เกิดการสลายตัวของตัวอย่างได้โดยสมบูรณ์ (Total decomposition) ดังนั้นจึงเป็นการเตรียมตัวอย่างในสถานะที่เรียกว่า Extraction หรือ Leaching ผลการศึกษาพบว่า สถานะที่เหมาะสมของการย่อยเป็นด่างนี้ ใช้ตัวอย่างสาหร่าย 0.25 g (น้ำหนักแห้ง) เติมน้ำ DI ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติม TMAH ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปย่อยด้วยระบบไมโครเวฟโดยใช้อุณหภูมิ 200 °C และใช้เวลาในการย่อย 10 นาที และ 5 นาที สำหรับ Ramp time และ Hold time ตามลำดับ ในการตรวจสอบผลการวิเคราะห์ซ้ำ (Repeatability) ของวิธีการวิเคราะห์พบว่ามีความแม่นยำเท่ากับ 6% และพบว่าขีดจำกัดในการวิเคราะห์ต่ำสุด (LOD) ของไอโอดีนและโบรมีนในสาหร่ายเท่ากับ 24.6 และ 19.9 ng g⁻¹ ตามลำดับ ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์โดยการวิเคราะห์สารอ้างอิง NIES-09 (*Sargasso*, *Sargassum fulvellum*) พบว่าค่าที่วิเคราะห์ได้สอดคล้องกับค่าที่รับรอง

García-Sartal และคณะ (2011) ได้ศึกษาปริมาณการดูดซึมได้ของสารหนูในตัวอย่างสาหร่าย โดยใช้วิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยไมโครเวฟในการวิเคราะห์หาปริมาณสารหนู สถานะที่ใช้ในการย่อยด้วยระบบไมโครเวฟเป็นด่างนี้ ใช้ตัวอย่างสาหร่าย 0.2 g (น้ำหนักแห้ง) เติมกรด HNO_3 (69% w/v) ปริมาตร 8 มิลลิลิตร และ H_2O_2 (33% w/v) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใช้เวลาในการย่อย 15 นาที และใช้กำลังของคลื่นไมโครเวฟ 1000 วัตต์ นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารหนูโดยเทคนิค ICP-MS และได้ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์โดยการวิเคราะห์สารอ้างอิง BCR-279 (Sea lettuce seaweed) ผลการวิเคราะห์พบว่าปริมาณสารหนูในสาหร่ายมีค่าเท่ากับ 79.1 ± 0.8 , 53.8 ± 2.0 , 43.7 ± 0.1 และ 5.3 ± 0.05 สำหรับสาหร่าย Kombu, Wakame, Nori และ Sea lettuce ตามลำดับ และต่อมาในปี ค.ศ. 2012 Ryan และคณะ ได้ศึกษาการแพร่กระจายของโลหะในสาหร่ายขนาดใหญ่ (Macroalgae) 3 กลุ่ม (4 ชนิด) ได้แก่ *Polysiphonia lanosa* (สาหร่ายสีแดง), *Ascophyllum nodosum* (สาหร่ายสีน้ำตาล), *Fucus vesiculosus* (สาหร่ายสีน้ำตาล)

และ *Ulva* sp. (สาหร่ายสีเขียว) นอกจากนี้ยังได้เก็บตัวอย่างน้ำทะเล และดินตะกอนเพื่อวิเคราะห์ด้วย ตัวอย่างทั้งหมดเก็บจากบริเวณ Fethard on Sea, Co. Wexford ประเทศไอร์แลนด์ ในการเตรียมตัวอย่างสาหร่ายด้วยการย่อยด้วยระบบไมโครเวฟ ใช้สภาวะดังนี้ ใช้ตัวอย่างสาหร่าย 0.3 g (น้ำหนักแห้ง) เติมน้ำ DI ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เติมกรด HNO_3 (69% w/v) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และ H_2O_2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปย่อยด้วยระบบไมโครเวฟโดยการตั้งโปรแกรมอุณหภูมิและเวลาเป็นขั้นตอน คือ 1. อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส (กำลังของคลื่นไมโครเวฟ 600 วัตต์) เวลา 2 นาที 2. อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที 3. อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส (กำลังของคลื่นไมโครเวฟ 1200 วัตต์) เวลา 4 นาที นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณ Pb, Zn, As, Cd, Co, Cr, Cu, Mn และ Ni โดยเทคนิค ICP-OES และได้ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์โดยการวิเคราะห์สารอ้างอิง BCR No. 60 *Lagarosiphon major* และ NIST (Tomato Leaves) ผลการวิเคราะห์พบว่า ปริมาณโลหะทั้งหมด (Total metal) ปริมาณโลหะที่อยู่ในเซลล์สาหร่าย (Intracellular metal) และปริมาณโลหะที่ติดอยู่ที่ผิวด้านนอกของเซลล์สาหร่าย (Surface bound metal) มีความแปรผันตามชนิดของโลหะและชนิดของสาหร่าย และพบว่าปริมาณโลหะส่วนใหญ่อยู่ภายในเซลล์ของสาหร่าย และปริมาณของ Zn มีผลยับยั้งการดูดซึมแร่ธาตุ Mn เข้าสู่เซลล์สาหร่ายชนิด *P. lanosa* และยังพบว่าสาหร่ายชนิดนี้มีความสามารถในการสะสมโลหะภายในเซลล์ (Bioaccumulation ability)

นอกจากนี้ได้มีการนำวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยระบบการย่อยด้วยไมโครเวฟไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างหลากหลายชนิดเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณแร่ธาตุต่างๆ เช่น ดิน ดินตะกอน พืชผัก สมุนไพร อาหาร เนื้อสัตว์ เป็นต้น Bou (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 สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยตัวอย่างเป็นดังนี้ 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 ทำให้โลหะทุกชนิดสลายตัวออกมาอยู่ในตัวทำละลายได้ทั้งหมด และเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการย่อยโดยระบบเปิดโดยใช้ Digestion block พบว่ามีการแปรปรวนของผลการวิเคราะห์น้อยกว่า Yang และ Swami (2007) ได้วิเคราะห์หาปริมาณโลหะ 27 ชนิด ในสัตรว์น้ำจืดจากปลาและปู โดยใช้วิธีการย่อยด้วยไมโครเวฟสำหรับเตรียมตัวอย่างและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CVAAS (สำหรับ Hg) และเทคนิค ICPMS (สำหรับธาตุอื่นๆ ทั้งหมด) ในการวิเคราะห์พบว่าส่วนผสมของสารเคมีที่ใช้ย่อยตัวอย่างที่เหมาะสมประกอบด้วย 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

2.4 การประเมินการดูดซึมได้

การประเมินการดูดซึมได้ (Bioaccessibility) ของแร่ธาตุสารอาหาร/สารเคมีต่างๆ สามารถทำได้โดยการจำลองระบบการย่อยอาหาร (*In vitro* gastrointestinal extraction) เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปทำนายปริมาณการดูดซึมได้ของสารนั้นๆ ที่คนจะได้รับจากการบริโภคอาหารแต่ละชนิด วิธีการนี้ทำได้โดยการจำลองกระบวนการย่อยอาหารต่างๆ เริ่มตั้งแต่การย่อยโดยกรดในกระเพาะอาหารและเอนไซม์ในปาก กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก อวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการย่อยอาหารมีดังนี้

1) ปาก (Mouth) เป็นอวัยวะแรกของระบบย่อยอาหาร ภายในประกอบด้วยฟันทำหน้าที่บดเคี้ยวอาหารให้มีขนาดเล็กลง เพื่อเพิ่มปริมาณพื้นที่ผิวของอาหารให้เหมาะสำหรับการย่อยในกระเพาะต่อไป ลิ้นทำหน้าที่ส่งอาหารให้ฟันบดเคี้ยว และคลุกเคล้าอาหารให้อ่อนตัว ต่อม้ำลาย มีหน้าที่ผลิตเอนไซม์ในน้ำลายคืออะไมเลส (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 (Pancreas) 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 แต่ในการจำลองในห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่จะไม่รวมขั้นตอนการย่อยในปาก ด้วยเหตุผลที่ว่าอาหารอยู่ในช่องปากในระยะเวลาที่น้อยมาก โดยเฉลี่ยประมาณ 10 วินาที ถึง 2 นาที (Dean, 2007) หลังจากนั้นจึงนำของเหลวที่ได้จากการย่อยไปวิเคราะห์หาปริมาณสารที่สนใจศึกษา อีกวิธีหนึ่งที่ได้มีการนำไปใช้หาปริมาณชีวภาพความพร้อม คือการใช้สัตว์ทดลอง (*In vivo* approaches) เมื่อเปรียบเทียบสองวิธีนี้พบว่าการใช้สัตว์ทดลองมีข้อจำกัดบางประการ เช่น การแปลผลข้อมูลอาจทำได้ไม่สมบูรณ์เนื่องจากความแตกต่างทางด้านสรีระระหว่างคนและสัตว์ที่นำมาทดลอง อีกทั้งยังต้องใช้ระยะเวลานาน และมีความยุ่งยากมากกว่าในการทดลอง และมีค่าใช้จ่ายสูงโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อต้องการวิเคราะห์ตัวอย่างเป็นจำนวนมากๆ รวมทั้งการหลีกเลี่ยงไม่ใช้และทารุณสัตว์ในการทดลองในห้องปฏิบัติการ

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการประเมินการดูดซึมได้ของแร่ธาตุต่างๆ ในอาหาร เริ่มต้นในปี ค.ศ. 1969 Jacobs และ Greenman นักวิจัยจาก Welsh National School of Medicine ประเทศเวลส์ ได้ศึกษาชีวปริมาณออกฤทธิ์ (Bioavailability) ของธาตุเหล็กในอาหาร 25 ชนิด เช่น เนื้อสัตว์ เบคอน สเต็ก กะหล่ำปลี ฯลฯ โดยใช้ร้อยละที่เตรียมโดยการผสมเปปซิน (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 และอาหารบางชนิดอาจมีสารที่สามารถยับยั้งกับธาตุเหล็กได้ดีแตกต่างกัน 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 ได้ศึกษาเกี่ยวกับวิธีการหาค่า Bioaccessibility เพื่อประมาณระดับของธาตุเหล็กที่ร่างกายสามารถดูดซึมได้ทางระบบย่อยอาหาร โดยใช้อาหารชนิดต่างๆ เช่น ไข่ เนื้อสัตว์ แยม ข้าว ผักขม นม ชีส น้ำส้ม ซากาแฟ ฯลฯ คณะผู้วิจัยพบว่าวิธีการนี้เป็นวิธีที่สามารถทำได้รวดเร็ว มีค่าใช้จ่ายไม่มากนัก และให้ผลการศึกษาที่ถูกต้อง ต่อมาจึงได้มีความพยายามพัฒนาวิธี *In vitro* gastrointestinal extraction ทั้งในทวีปอเมริกาและยุโรป (Crews et al., 1985; Rotard et al., 1995; Minekus et al., 1995; Ruby et al., 1996; Rodriguez et al., 1999; Oomen et al., 2002) วิธีการนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้กับตัวอย่างต่างๆ 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; Okorie et al., 2011) และมีรายงานการประยุกต์ใช้กับตัวอย่างอาหาร (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)

ในปี ค.ศ. 2011 หน่วยงาน Bioaccessibility Research Group of Europe หรือ BARGE ได้พัฒนาวิธี Unified BARGE Method หรือ UBM (Wragg, 2011) โดยดัดแปลงมาจากวิธี RIVM ซึ่งพัฒนาโดยนักวิจัยจากหน่วยงาน The National Institute for Public Health and the Environment ประเทศเนเธอร์แลนด์ (Oomen et al., 2002) วิธี UBM นี้ประกอบด้วยเฟสการย่อยชิ้นแรกในปาก (Saliva phase) ต่อด้วยเฟสการย่อยในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก และได้มีความร่วมมือกันระหว่าง 5 ประเทศในยุโรป และ 2 ประเทศในอเมริกาเหนือ เพื่อร่วมทดลองในการประเมินความเหมาะสมของวิธี UBM ในการนำข้อมูลจากการทดลองที่ได้ไปใช้เพื่อประเมินความเสี่ยงของการได้รับสารหนู แคดเมียม และตะกั่ว ในตัวอย่างดิน กลุ่มประเทศเหล่านี้ตระหนักถึงอันตรายที่อาจเกิดขึ้นได้กับเด็กในขณะที่เล่นในสนามหญ้าหรือสนามเด็กเล่น เนื่องจากเด็กเล็กมีพฤติกรรมชอบนำสิ่งแปลกปลอมเข้าปาก เมื่อได้ข้อมูลปริมาณการดูดซึมได้ของสารพิษจากการใช้วิธี UBM จึงนำไปใช้เพื่อเปรียบเทียบกับการใช้สัตว์ทดลอง (Swine model) ผลการวิจัยพบว่าวิธี UBM ให้ผลการจำลองการย่อยอาหารที่สอดคล้องกับผลของการใช้สัตว์ทดลอง แต่จำเป็นต้องมีการควบคุม pH ของเฟสการย่อยในกระเพาะอาหารเป็นอย่างดี เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ดีขึ้นในแง่ของการวิเคราะห์ซ้ำ ทั้ง 2 แบบ คือ Repeatability (ความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำๆ ในสภาวะเดียวกันโดยวิธีเดียวกัน ในห้องปฏิบัติการและเครื่องมือชุดเดียวกัน และผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน) และ Reproducibility (ความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำๆ โดยวิธีเดียวกัน ในห้องปฏิบัติการและเครื่องมือคนละชุดกัน และผู้วิเคราะห์ต่างกัน)

มีรายงานโดย García-Sartal และคณะ (2011) ซึ่งศึกษาการประเมินการดูดซึมได้ของสารหนูในสาหร่าย 4 ชนิด ได้แก่ Kombu (*Laminaria ochroleuca*), Wakame (*Undaria pinnatifida*), Nori (*Porphyra umbilicalis*) และ Sea Lettuce (*Ulva rigida*) โดยเก็บตัวอย่างมาจากชายฝั่ง Galician ประเทศสเปน นำตัวอย่างที่ได้มาย่อยโดยวิธีการจำลองการย่อยอาหาร และนำสารละลายตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณสารหนูด้วยเทคนิค ICP-MS และได้มีการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยใช้สารอ้างอิง BCR-279 (Sea lettuce) ผลการวิจัยพบว่า ปริมาณการดูดซึมได้ของสารหนูในตัวอย่างสาหร่ายมีค่าอยู่ในช่วง 14.0-17.0% (สาหร่ายที่ไม่ได้ผ่านขั้นตอนการปรุงอาหาร) และ 7.4-15.3% (สาหร่ายที่ผ่านขั้นตอนการปรุงอาหาร) และในปี ค.ศ. 2010 Domínguez-González และคณะได้ศึกษาการประเมินการดูดซึมได้ในสาหร่ายชนิดต่างๆ ดังนี้ สาหร่ายสีน้ำตาล 4 ชนิด คือสาหร่าย Sea Spaghetti (*Himanthalia elongata*), สาหร่าย Furbelows (*Saccorhiza polyschides*), สาหร่าย Kombu (*Laminaria ochroleuca*) และสาหร่าย Wakame (*Undaria pinnatifida*), สาหร่ายสีแดง 2 ชนิด คือสาหร่าย Dulse (*Palmaria palmata*) และสาหร่าย Nori (*Porphyra umbilicalis*) นอกจากนี้ยังมีสาหร่ายสีเขียว คือ สาหร่าย Sea Lettuce (*Ulva rigida*) สาหร่าย สไปรูลินา (*Spirulina*)

platensis) และสาหร่าย *Gelidium sesquipedale* สาหร่ายทั้งหมดนี้ได้มาจากชายฝั่งทางตะวันตกเฉียงเหนือของประเทศสเปน และได้ประเมินการดูดซึมได้ (Bioaccessibility) ของโลหะ 4 ชนิดคือ Cr, Co, Mn และ V โดยวิธี *In vitro* digestion ซึ่งใช้ Dialysis membrane ในการจำลองระบบการย่อยในลำไส้เล็ก และวิเคราะห์ปริมาณของโลหะโดยเทคนิค Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS) ผลการศึกษาพบว่าค่าปริมาณการดูดซึมได้ อยู่ในช่วงตั้งแต่ 0 ถึง 100% และสำหรับตัวอย่างทุกชนิดพบว่า แมงกานีสมีปริมาณการดูดซึมได้ สูงสุด อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยระบุว่ายังไม่เคยมีการรายงานมาก่อนเกี่ยวกับการศึกษาปริมาณการดูดซึมได้ของโลหะทั้ง 4 ชนิดนี้ จึงทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบผลการศึกษาได้ มีเพียงการรายงานเกี่ยวกับปริมาณของโลหะเหล่านี้ในตัวอย่างสาหร่ายชนิดต่างๆ นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังได้ทำการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation) ของวิธีการนี้โดยการวิเคราะห์สารอ้างอิงของสาหร่าย NIES-09 (*Sargasso* seaweed)

ในปี ค.ศ. 2007 Koch และคณะ ได้ศึกษาปริมาณการดูดซึมได้และรูปฟอร์มทางเคมี (Species) ของสารหนูในหอยแครง (*Mya arenaria*) และสาหร่าย (*Fucus* sp.) โดยเก็บตัวอย่างมาจากชายฝั่ง Seal Harbour ประเทศแคนาดา ซึ่งเป็นแหล่งที่มีการปนเปื้อนของสารหนู ในการวิเคราะห์ปริมาณสารหนูอาศัยเทคนิค ICP-MS และใช้เทคนิค HPLC-ICP-MS และ HPLC-HG-AAS สำหรับการวิเคราะห์หารูปฟอร์มทางเคมี (Speciation analysis) และในการจำลองระบบการย่อยอาหารมีสภาวะดังนี้ ค่า pH ของเฟสการย่อยในกระเพาะอาหาร เท่ากับ 1.5 โดยมี Glycine ซึ่งเป็นกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบของน้ำย่อย ใช้เวลาย่อยนาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงเติม Pancreatin น้ำดี และปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 7.0 ใช้เวลาย่อยในเฟสลำไส้เล็กนาน 4 ชั่วโมง ผลการวิจัยนี้พบว่า ปริมาณสารหนูในหอยแครงมีค่าอยู่ในช่วง 218-228 mg/kg น้ำหนักสด และมีปริมาณการดูดซึมได้ในช่วง 34-46% และสปีชีส์ของสารหนูส่วนใหญ่อยู่ในรูปฟอร์มของสารอนินทรีย์ สำหรับตัวอย่างสาหร่ายพบว่ามีสารหนูอยู่ในช่วง 27-43 mg/kg น้ำหนักสด และมีปริมาณการดูดซึมได้ในช่วง 63-81% และสปีชีส์ของสารหนูส่วนใหญ่อยู่ในรูปฟอร์มของสารอนินทรีย์ และคณะผู้วิจัยยังรายงานว่ายางฝั่งบริเวณที่เก็บตัวอย่างหอยแครงและสาหร่ายนี้ได้ถูกปิดห้ามไม่ให้ประชาชนเข้าไปเพื่อนำเอาสัตว์น้ำจากบริเวณนี้มาเพื่อการบริโภค นอกจากนี้มีรายงานโดย Romarís-Hortas และคณะ (2011) เกี่ยวกับการศึกษาปริมาณการดูดซึมได้ของ ไอโอดีนและโบรมีนในสาหร่ายสีแดง 2 ชนิดคือ Dulce และ Nori สาหร่ายสีน้ำตาล 3 ชนิด คือ Kombu, Wakame และ Sea Spaghetti สาหร่ายสีเขียว 1 ชนิด คือ Sea Lettuce และสาหร่ายขนาดเล็ก คือ *Spirulina platensis* วิเคราะห์หาปริมาณไอโอดีนและโบรมีนด้วยเทคนิค ICP-MS โดยใช้เทลลูเรียมและยิบเทอเรียมเป็นสารอ้างอิงภายใน (Internal standard) ผลการวิเคราะห์ปริมาณการดูดซึมได้โดยวิธีการจำลองระบบการย่อยอาหาร พบว่า ปริมาณการดูดซึมได้ของ

โบรมีนมีค่าสูงสุดเท่ากับ 36% และ 47% ในสาหร่ายสีแดง Dulse และ Nori ตามลำดับ สำหรับปริมาณการดูดซึมได้ของไอโอดีนมีค่าสูงสุดเท่ากับ 17% ในสาหร่ายสีน้ำตาล (Kombu)

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. เครื่องไมโครเวฟ รุ่น Multiwave	Anton Paar GmbH, Graz, Austria
3. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ Memmert	Memmert GmbH & Co.KG, Germany
4. Milli-Q TM Millipore Water Purification System	Millipore SA, Molsheim, France
5. pH Meter (SevenEasy)	Metler-Toledo AG, Switzerland
6. เครื่องบดตัวอย่าง (A11 basic analytical mill)	IKA - Wekke GmbH & Co.KG, Germany
7. Polycarbonate tubes with PP screw closure	Nalgene, Belgium
8. Syringe filter nylon 0.45 µm, 25 mm	Filtrex Filtration, Singapore
9. HDPE Screw top bottle	Nalgene, Belgium
10. เครื่อง End-over-end rotator	
11. เครื่อง Magnetic stirrer	

ข) สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
1. ICP Multi element standard solution	AccuStandard, Inc., USA
2. Ar gas 99.999% (UHP)	Praxair, Thailand
3. Trace elements and arsenic compounds in seaweed (NMIJ CRM 7405-a)	National Metrology Institute of Japan, Japan
4. Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4)	Merck, Germany
5. Sodium chloride (NaCl)	Merck, Germany
6. Potassium thiocyanate (KSCN)	Fluka, China
7. Sodium sulfate (Na_2SO_4)	Merck, Germany
8. Potassium chloride (KCl)	Merck, Germany
9. Calcium chloride ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Germany
10. Ammonium chloride (NH_4Cl)	Merck, Germany
11. Sodium bicarbonate (NaHCO_3)	Merck, Germany
12. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	Merck, Germany
13. Magnesium chloride ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Germany
14. Sodium hydroxide (NaOH)	Merck, Germany
15. Hydrochloric acid 37% w/w	Merck, Germany
16. Nitric acid 67% w/w	Merck, Germany
17. Hydrogen peroxide 30% w/w	Merck, Germany
18. Urea	Merck, Germany
19. Anhydrous D+Glucose	Merck, Germany
20. D-Glucuronic acid	Sigma, Switzerland
21. D-glucosaminehydrochloride	Merck, Germany
22. Pepsin (Porcine)	Fluka, USA
23. Bovine serum albumen	Merck, Germany
24. Mucin (Porcine)	Sigma, USA
25. Uric acid	Sigma, Hungary
26. Pancreatin (Porcine)	Sigma, USA
27. α - amylase (Bacillus)	Sigma, USA
28. Lipase (Porcine)	Sigma, USA
29. Bile (Bovine)	Fluka, New Zealand

3.2 การเก็บและเตรียมตัวอย่าง

3.2.1 การเก็บตัวอย่างและเตรียมตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างสาหร่ายขนนกจากตลาดในอำเภอตลอดแนวชายฝั่งทะเลอันดามันของจังหวัดกระบี่ 5 อำเภอ ได้แก่ อำเภออ่าวลึก (ตลาดอ่าวลึก, S1) อำเภอเมือง (ตลาดชุมชนตำบลเขาคราม, S2) อำเภอเหนือคลอง (ตลาดบ้านบางฝ้าง, S3 ; และตลาดรุ่งโรจน์, S4) อำเภอคลองท่อม (ตลาดคลองท่อมใต้, S5) และอำเภอเกาะลันตา (ชุมชนบ้านหัวหิน, S6) เก็บตัวอย่างโดยวิธีการสุ่ม โดยใช้สาหร่ายจำนวน 3 ตัวอย่าง ต่อ 1 จุดเก็บตัวอย่าง ได้ดำเนินการเก็บตัวอย่างในฤดูร้อน (เดือนเมษายน พ.ศ. 2555) เนื่องจากในธรรมชาติจะพบสาหร่ายขนนกได้เฉพาะในฤดูร้อน ส่วนในฤดูฝนจะพบสาหร่ายชนิดนี้น้อยมาก ตัวอย่างสาหร่ายที่ได้จะต้องห่อไว้ด้วยใบตองและบรรจุใส่ในกล่องโฟมนำมายังห้องปฏิบัติการ หลังจากนั้นจึงล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนเพื่อกำจัดเศษดิน/เศษใบไม้ที่อาจติดปนอยู่ (ต้องระมัดระวังในขั้นตอนนี้ เนื่องจากเซลล์สาหร่ายจะแตกออกทำให้เกิดการสูญเสียน้ำหนักของสาหร่ายไปส่วนหนึ่ง จึงไม่ควรใช้เวลาล้างนานเกินไป) หลังจากนั้นจึงนำไปใส่ภาชนะเพื่ออบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (มีความชื้นเริ่มต้นโดยเฉลี่ยร้อยละ 97.8) หลังจากอบแห้งแล้วจึงนำไปบดด้วยเครื่องบดจนละเอียด บรรจุใส่ถุงซิปล็อกไปเก็บไว้ในแชลลอคเกอร์สำหรับการวิเคราะห์ต่อไป

3.2.2 การเตรียมตัวอย่างโดยวิธีการย่อยด้วยไมโครเวฟ

ระบบไมโครเวฟที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างประกอบด้วยแหล่งให้กำเนิดคลื่นไมโครเวฟ (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 ในการเตรียมตัวอย่างโดยวิธีการย่อยด้วยไมโครเวฟใช้วิธีมาตรฐาน EPA 3052 (USEPA, 1996) โดยมีวิธีการดังนี้

ชั่งสาร (สาหร่ายขนนก/สารอ้างอิง NMIJ CRM 7405-a) ปริมาณ 0.5 กรัม (ต่อการย่อย 1 ซ้ำ) ใส่ในภาชนะบรรจุตัวอย่าง (Vessel) เติมน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เติมน้ำ H_2O_2 (30%) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และ HNO_3 (67%) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร แล้วจึงปิดฝาภาชนะให้สนิทนำไปย่อยด้วยระบบไมโครเวฟ โดยใช้โปรแกรมการให้ความร้อนตามที่ระบุในตารางที่ 3.2 เมื่อย่อยเสร็จแล้วนำสารตัวอย่างไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 40 ใส่ในขวดวัดปริมาตรและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ได้ 25 มิลลิลิตร หลังจากนั้นจึงนำสารละลายตัวอย่างที่ได้นี้ไปวิเคราะห์หาปริมาณ Cu, Fe, Mn และ Zn โดยใช้เทคนิค ICP-OES ตามวิธีการในข้อ 3.4

ตารางที่ 3.2 โปรแกรมการให้ความร้อนของระบบการย่อยไมโครเวฟ

ขั้นตอน	Power (Watt)	เวลา (นาทื)
1	250	2
2	0	2
3	250	2
4	1000	10
Cooling	0	5

3.3 การวิเคราะห์ปริมาณการดูดซึมได้ (Bioaccessibility) ของแร่ธาตุในตัวอย่างสาหร่าย

วิธีการศึกษาปริมาณการดูดซึมได้ของแร่ธาตุในตัวอย่างสาหร่าย อาศัยการจำลองระบบการย่อยอาหารตามวิธี Unified BARGE Method หรือ UBM โดยการย่อยอาหารใน 3 ขั้นตอน ได้แก่ ปาก (ใช้เวลา 5 นาที) กระเพาะอาหาร (ใช้เวลา 1 ชั่วโมง) และในส่วนของลำไส้เล็ก (ใช้เวลา 4 ชั่วโมง) โดยใช้น้ำย่อยสังเคราะห์ 4 ชนิด ได้แก่

น้ำลาย (S - Saliva)

น้ำย่อยในกระเพาะอาหาร (G - Gastric fluid)

น้ำย่อยในลำไส้เล็ก (D - Duodenal fluid)

น้ำดี (B - Bile)

3.3.1 การเตรียมน้ำย่อยสังเคราะห์

น้ำย่อยแต่ละชนิดประกอบด้วยสารละลายอนินทรีย์ (Inorganic solution, I) สารละลายอินทรีย์ (Organic solution, O) และเอนไซม์ และต้องเตรียมน้ำย่อย 1 วันก่อนทำการจำลองการย่อย ตารางที่ 3.3 แสดงน้ำหนัก (ในหน่วยมิลลิกรัม) หรือปริมาตร (ในหน่วยมิลลิลิตรหรือไมโครลิตร) ของสารเคมีที่ต้องใช้สำหรับการเตรียมน้ำย่อยอนินทรีย์ สารละลายอินทรีย์ และเอนไซม์ โดยมีวิธีการเตรียมน้ำย่อยชนิดต่างๆ ดังนี้

น้ำลาย (S - Saliva)

1) เตรียมสารละลาย I โดยการเติมสารเคมีชนิดต่างๆ ตามปริมาณที่ระบุไว้ในตารางที่ 3.3 ใส่ลงไปในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร

2) เตรียมสารละลาย O ในทำนองเดียวกับวิธีการในข้อ 1)

3) ผสมสารละลาย I สารละลาย O เข้าด้วยกันในขวด HDPE ขนาด 1 ลิตร แล้วเติมเอนไซม์ชนิดต่างๆ ตามปริมาณที่ระบุไว้ในตารางที่ 3.3 ลงไป

4) นำน้ำย่อยที่เตรียมได้ในข้อ 3) ไปผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Magnetic stirrer เป็นเวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมง

5) ตรวจสอบค่า pH ของสารละลายและปรับ pH ให้มีค่า 6.5 ± 0.5 (ตามที่ระบุไว้ในตารางที่ 3.3) โดยใช้สารละลาย 1M NaOH หรือ 37% HCl เก็บน้ำย่อยที่เตรียมได้ที่อุณหภูมิห้อง

สำหรับน้ำย่อยอีก 3 ชนิด ได้แก่ น้ำย่อยในกระเพาะอาหาร น้ำย่อยในลำไส้เล็ก น้ำดี เตรียมได้ในทำนองเดียวกันกับวิธีการข้างต้น โดยต้องเติมสารเคมีและเอนไซม์ชนิดต่างๆ และปรับค่า pH ของสารละลายตามที่ระบุไว้ในตารางที่ 3.3

การควบคุม pH ของน้ำย่อย

pH เป็นปัจจัยที่สำคัญในการจำลองระบบการย่อยอาหาร เนื่องจากเป็นปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณของสารที่จะสามารถถูกย่อยออกมาสู่สารละลายได้ ดังนั้น ค่า pH ของน้ำย่อยที่ใช้ในการย่อยในกระเพาะอาหาร (Gastric phase) และน้ำย่อยที่ใช้ในการย่อยในกระเพาะอาหาร-ลำไส้เล็ก (Gastro-intestinal phase) จะต้องมีความอยู่ในช่วง 1.20 ± 0.05 และ 6.30 ± 0.5 ตามลำดับ จึงต้องมีการสอบเทียบเครื่องวัด pH ทุกครั้งที่ใช้ และต้องมีวิธีการตรวจวัดค่า pH ของน้ำย่อยดังนี้

ก) น้ำย่อยสำหรับการย่อยในกระเพาะอาหาร (Gastric blank)

เติมน้ำย่อย S ปริมาตร 9.0 มิลลิลิตร และเติมน้ำย่อย G ปริมาตร 13.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดใส่ตัวอย่าง (หลอดเปล่า) เขย่าให้เข้ากัน วัดค่า pH หากไม่อยู่ในช่วง 1.20 ± 0.05 ให้ปรับ pH ของน้ำย่อย G หรือน้ำย่อย S โดยใช้สารละลาย 1M NaOH หรือ 37% HCl จนกระทั่งได้ค่า pH ของน้ำย่อยในกระเพาะ (Gastric blank) อยู่ในช่วง 1.20 ± 0.05

ข) น้ำย่อยสำหรับการย่อยในกระเพาะอาหาร-ลำไส้เล็ก (Gastro-intestinal blank)

เติมน้ำย่อย S ปริมาตร 9.0 มิลลิลิตร, น้ำย่อย G ปริมาตร 13.5 มิลลิลิตร, น้ำย่อย D ปริมาตร 27.0 มิลลิลิตร และน้ำย่อย B ปริมาตร 9.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดใส่ตัวอย่าง (หลอดเปล่า) เขย่าให้เข้ากัน วัดค่า pH หากไม่อยู่ในช่วง 6.30 ± 0.5 ให้ปรับ pH ของน้ำย่อย D หรือน้ำย่อย B โดยใช้สารละลาย 1M NaOH หรือ 37% HCl จนกระทั่งได้ค่า pH ของน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร-ลำไส้เล็ก (Gastro-intestinal blank) อยู่ในช่วง 6.30 ± 0.5

ตารางที่ 3.3 น้ำหนัก (มิลลิกรัม) และปริมาตรของสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมน้ำย่อยแต่ละชนิด

	Reagents	Saliva (S)	Gastric (G)	Duodenal (D)	Bile (B)	Volume (mL)
Inorganic (I)	KCl	448	412	282	188	250
	NaH ₂ PO ₄	444	133	-	-	
	KSCN	100	-	-	-	
	Na ₂ SO ₄	285	-	-	-	
	NaCl	149	1376	3506	2630	
	CaCl ₂	-	200	-	-	
	NH ₄ Cl	-	153	-	-	
	NaHCO ₃	-	-	2803.5	2893	
	KH ₂ PO ₄	-	-	40	-	
	MgCl ₂	-	-	25	-	
	NaOH (1M)	0.9 mL	-	-	-	
	HCl (37%)	-	4.15 mL	90 µL	90 µL	
Organic (O)	Urea	100	42.5	50	125	250
	Glucose	-	325	-	-	
	Glucuronic	-	10	-	-	
	Glucosamine	-	165	-	-	
Enzymes	α - amylase	72.5	-	-	-	250+250 = 500
	Mucin	25	1500	-	-	
	Uric acid	7.5	-	-	-	
	Bovine serum	-	500	500	900	
	Pepsin	-	500	-	-	
	CaCl ₂	-	-	100	111	
	Pancreatin	-	-	1500	-	
	Lipase	-	-	250	-	
	Bile	-	-	-	3000	
pH	I + O	6.5 ± 0.5	1.1 ± 0.1	7.4 ± 0.2	8.0 ± 0.2	

ที่มา: Wragg et al., 2009

3.3.2 การเตรียมตัวอย่าง

วิธีการที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณการดูดซึมได้ คือ วิธี Unified BARGE Method (UBM) ซึ่งพัฒนาขึ้นมาโดยหน่วยงาน Bioaccessibility Research Group of Europe หรือ BARGE (Wragg et al., 2011) โดยดัดแปลงมาจากวิธี RIVM ซึ่งพัฒนาโดยนักวิจัยจากหน่วยงาน The National Institute for Public Health and the Environment ประเทศเนเธอร์แลนด์ (Oomen et al., 2002) วิธีการนี้อาจนำไปประยุกต์ใช้วิเคราะห์ปริมาณการดูดซึมได้ในตัวอย่างชนิดต่างๆ ได้แก่ ดิน ดินตะกอน ชีวเสี้ยน ฟันละออง อาหาร และ พืชผัก เป็นต้น ผู้วิจัยได้นำวิธีนี้มาใช้เพื่อประเมินการดูดซึมได้ของโลหะหนักในตัวอย่างสาหร่ายขนนก โดยการจำลองระบบการย่อยอาหารซึ่งประกอบด้วย 2 ขั้นตอนหลัก คือการจำลองระบบการย่อยในเฟสกระเพาะอาหาร และระบบการย่อยในเฟสกระเพาะอาหาร-ลำไส้เล็ก ตามขั้นตอนที่แสดงในรูปที่ 3.1 ซึ่งมีวิธีการทดลองดังนี้

- 1) ชั่งตัวอย่างสาหร่าย (0.5 g) ใส่ในหลอดใส่ตัวอย่าง (Polycarbonate tube) จำนวน 2 หลอด โดยเขียนกำกับว่า "Gst" สำหรับตัวอย่างที่ใช้ในเฟสการย่อยในกระเพาะอาหาร และ "Int" สำหรับตัวอย่างที่ใช้ในเฟสการย่อยในกระเพาะอาหาร-ลำไส้เล็ก (ทุกๆ ตัวอย่างจะต้องทำการย่อยทั้ง 2 เฟส ดังนั้นจะมีจำนวน 2 หลอดต่อ 1 ตัวอย่าง)
- 2) เติมน้ำย่อย S ปริมาตร 9.0 mL โดยใช้ปิเปต แล้วเขย่าให้เข้ากันประมาณ 10 วินาที
- 3) เติมน้ำย่อย G ปริมาตร 13.5 mL โดยใช้ปิเปต แล้วเขย่าให้เข้ากันประมาณ 10 วินาที
- 4) วัดค่า pH หากไม่อยู่ในช่วง 1.20 ± 0.05 ให้ปรับ pH ของสารละลายโดยใช้สารละลาย 1M NaOH หรือ 37% HCl จนกระทั่งได้ค่า pH ของสารละลายอยู่ในช่วง 1.20 ± 0.05
- 5) นำหลอดตัวอย่างไปใส่ในเครื่อง End-over-end rotator แล้วนำไปย่อยในเครื่อง Shaking Water Bath ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 6) นำหลอดตัวอย่างออกจากเครื่อง End-over-end rotator/Shaking Water Bath แล้ววัดค่า pH ให้อยู่ในช่วง 1.20 ถึง 1.50 [หากไม่อยู่ในช่วงนี้ ต้องเริ่มทำการทดลองตั้งแต่ข้อ 1) ใหม่ จนกระทั่งได้ค่า pH อยู่ในช่วงที่กำหนดนี้]
- 7) นำสารละลายตัวอย่างในหลอดที่เขียนกำกับว่า "Gst" ไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเซ็นตริฟิวจ์ ที่ 4,500 g เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงปิเปตสารละลายตัวอย่างส่วนที่ใสปริมาตร 5 mL ใส่ในหลอดเก็บตัวอย่าง หลังจากนั้นจึงเติม 67% M HNO₃ ปริมาตร 0.5 mL และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C (เป็นตัวอย่างที่ย่อยได้จากน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร: Gastric Phase) เพื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ICP-OES ต่อไป

สำหรับตัวอย่างที่อยู่ในหลอดที่เขียนกำกับว่า "Gst" ให้ทำการทดลองตั้งแต่ขั้นที่ 8) ต่อไปดังนี้

8) เติมน้ำย่อย D ปริมาตร 27.0 mL และน้ำย่อย B ปริมาตร 9.0 mL ใส่ลงในหลอดใส่ตัวอย่างโดยใช้ปิเปต แล้วเขย่าให้เข้ากันประมาณ 10 วินาที

9) วัดค่า pH หากไม่อยู่ในช่วง 6.30 ± 0.5 ให้ปรับ pH ของสารละลายโดยใช้สารละลาย 1M NaOH หรือ 37% HCl จนกระทั่งได้ค่า pH ของสารละลายอยู่ในช่วง 6.30 ± 0.5

10) นำหลอดตัวอย่างไปใส่ในเครื่อง End-over-end rotator แล้วนำไปย่อยในเครื่อง Shaking Water Bath ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

11) นำหลอดตัวอย่างออกจากเครื่อง End-over-end rotator/Shaking Water Bath แล้ววัดค่า pH พร้อมทั้งบันทึกค่า pH ของสารละลายไว้

12) นำสารละลายในหลอดตัวอย่างไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเซ็นตริฟิวจ์ ที่ 4,500 g เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงปิเปตสารละลายตัวอย่างส่วนที่ใส่ปริมาตร 5 mL ใส่ในหลอดเก็บตัวอย่าง หลังจากนั้นจึงเติม 67% M HNO_3 ปริมาตร 1.0 mL และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C (เป็นตัวอย่างที่ย่อยได้จากน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร-ลำไส้เล็ก: Gastro-intestinal Phase) เพื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ICP-OES ต่อไป

13) นำกากที่เหลือจากการย่อย (เฉพาะหลอดที่เขียนกำกับว่า "Int") ไปย่อยโดยวิธีการย่อยด้วยไมโครเวฟ ตามวิธีการในข้อ 3.2.2 หลังจากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักโดยเทคนิค ICP-OES ตามวิธีการในข้อ 3.4

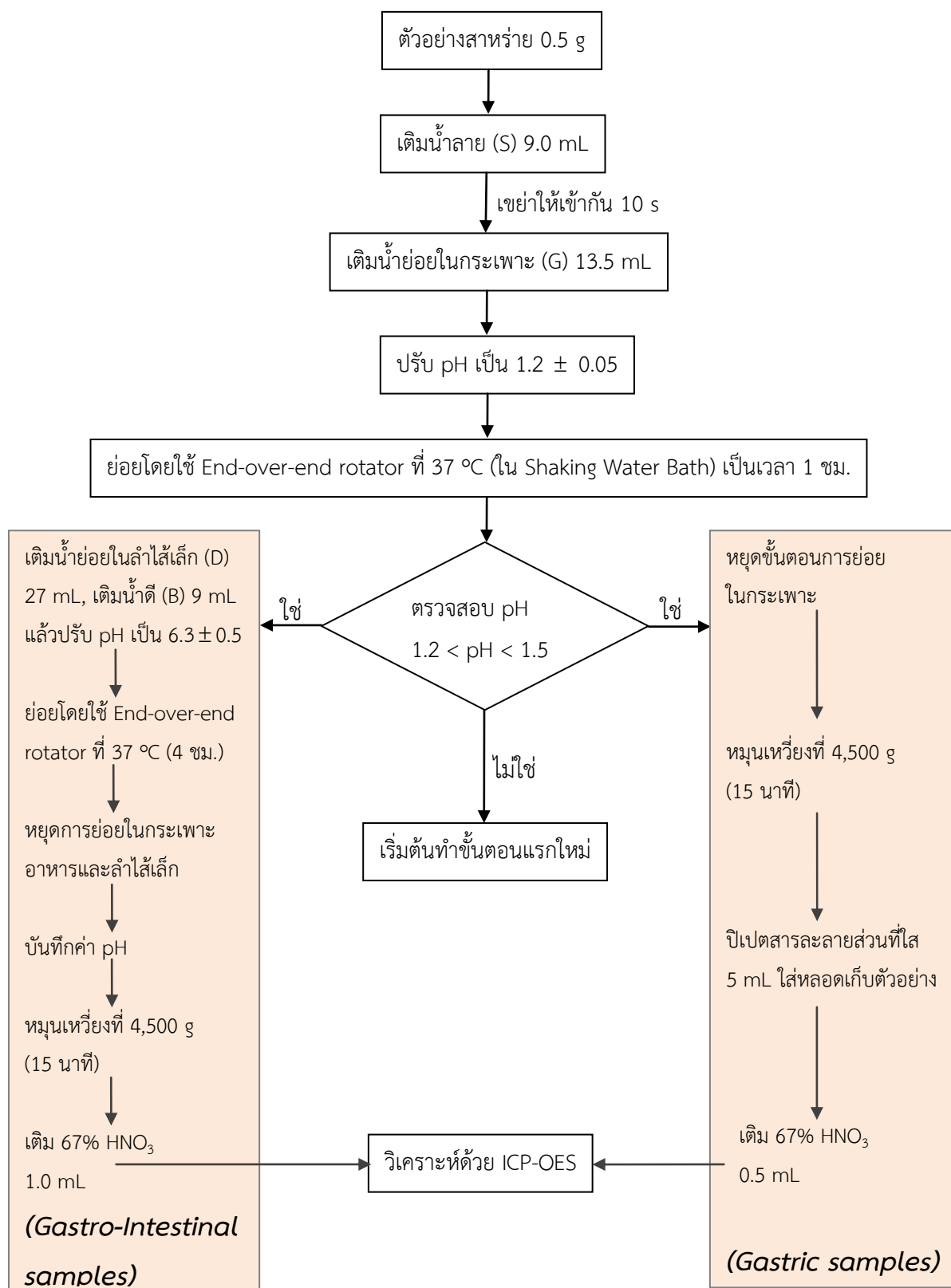
หมายเหตุ: หลอดตัวอย่าง (Polycarbonate tube) ที่ทำการทดลองเสร็จแล้ว นำไปทำความสะอาดโดยการล้างด้วยน้ำประปา หลังจากนั้นจึงล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน จำนวน 3 ครั้ง แล้วจึงเติม 2% HNO_3 ลงไปจนเต็มขวด แช่ไว้จนกระทั่งใช้วิเคราะห์ในครั้งต่อไป

3.3.3 การคำนวณปริมาณการดูดซึมได้

ค่าร้อยละของปริมาณการดูดซึมได้ (% Bioaccessibility) ของโลหะหนักในตัวอย่างสามารถคำนวณได้จากสมการข้างล่างนี้ (Oomen et al., 2002)

$$\% \text{ Bioaccessibility} = \frac{\text{Concentration of bioaccessible metal (mg.kg}^{-1}\text{)}}{\text{Concentration of total metal in sample (mg.kg}^{-1}\text{)}} \times 100$$

โดยที่ปริมาณของโลหะทั้งหมดในตัวอย่าง (Total metal in sample) หาได้จากการวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างที่ได้จากการย่อยด้วยกรดโดยระบบไมโครเวฟ



รูปที่ 3.1 แผนผังขั้นตอนการจำลองระบบการย่อยอาหารในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก

ที่มา: Wragg et al., 2009

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

ตัวอย่างสำหรับยวชนกและสารอ้างอิง (NMIJ CRM 7405-a) ที่ได้จากการย่อยในข้อ 3.2.2 และ 3.3.2 ถูกนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ Cu, Fe, Mn และ Zn ด้วยเครื่อง ICP-OES โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ตามที่ระบุไว้ในตารางที่ 3.4 ใช้วิธี External calibration ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ โดยที่สารละลายมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ต้องเตรียมให้มีลักษณะของแมทริกซ์ (Matrix) ใกล้เคียงกับแมทริกซ์ของสารละลายตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์มากที่สุด และในการวิเคราะห์ทุกครั้งจะต้องมีการวิเคราะห์แบลงค์ (Blank analyses) 2 ชนิด คือ Calibration blank เพื่อนำไปใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) และ Method blank เพื่อนำไปใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์ โดยการนำค่าสัญญาณของแบลงค์ไปหักออกจากค่าสัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง

ตารางที่ 3.4 พารามิเตอร์ของเครื่อง ICP-OES ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนัก

พารามิเตอร์ (หน่วย)	ค่าที่ใช้
RF Power (W)	1200
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
Rinse delay (s)	30
Number of replicates	3
Wavelengths (nm)	
Cu	324.754
Fe	259.940
Mn	257.610
Zn	213.856

3.5 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)

3.5.1 การหาความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีการวิเคราะห์

การหาความแม่นยำทำได้โดยการวิเคราะห์สารอ้างอิง (NMIJ CRM 7405-a) ซ้ำ 7 ครั้ง ซึ่งเตรียมตัวอย่างโดยการย่อยด้วยระบบไมโครเวฟตามวิธีการในข้อ 3.2.2 และนำตัวอย่างที่ย่อยได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณ Cu, Fe, Mn และ Zn ด้วยเครื่อง ICP-OES ตามสมภาวะที่ใช้ในวิธีการทดลองในข้อ 3.4 แล้วเปรียบเทียบค่าที่วิเคราะห์ได้กับค่าที่รับรอง (Certified Value) เพื่อตรวจสอบความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์

การหาความเที่ยงทำได้โดยการวิเคราะห์สารอ้างอิง (NMIJ CRM 7405-a) ซ้ำ 7 ครั้ง แล้วคำนวณค่า % RSD เพื่อตรวจสอบความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำๆ ในสภาวะเดียวกัน (Repeatability)

3.5.2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (LOD) และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจหาปริมาณได้ (LOQ)

นำ Method blank ที่เตรียมได้จากการทดลองในข้อ 3.2.2 ไปทำการวิเคราะห์ซ้ำ 7 ครั้งตามวิธีการวิเคราะห์ในข้อ 3.4 แล้วคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของสัญญาณการวิเคราะห์ (Peak Intensity) ของ Cu, Fe, Mn และ Zn 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 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

- สถิติพรรณนา (Descriptive statistics) ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
- สถิติทดสอบ T-test (Independent sample T-test)
- สถิติสหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (Pearson correlation)
- สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) หรือ การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียวของ ครัสคอลล-วอลลิส (Kruskal-Wallis one-way ANOVA of ranks) ในกรณีที่ข้อมูลไม่เป็นไปตามข้อตกลงเบื้องต้นของ ANOVA (มีค่าความแปรปรวนของทุกกลุ่มเท่ากัน, Homogeneity of variance) และทดสอบผลต่างของค่าเฉลี่ยรายคู่โดย Tukey's HSD (Honestly significant difference test)

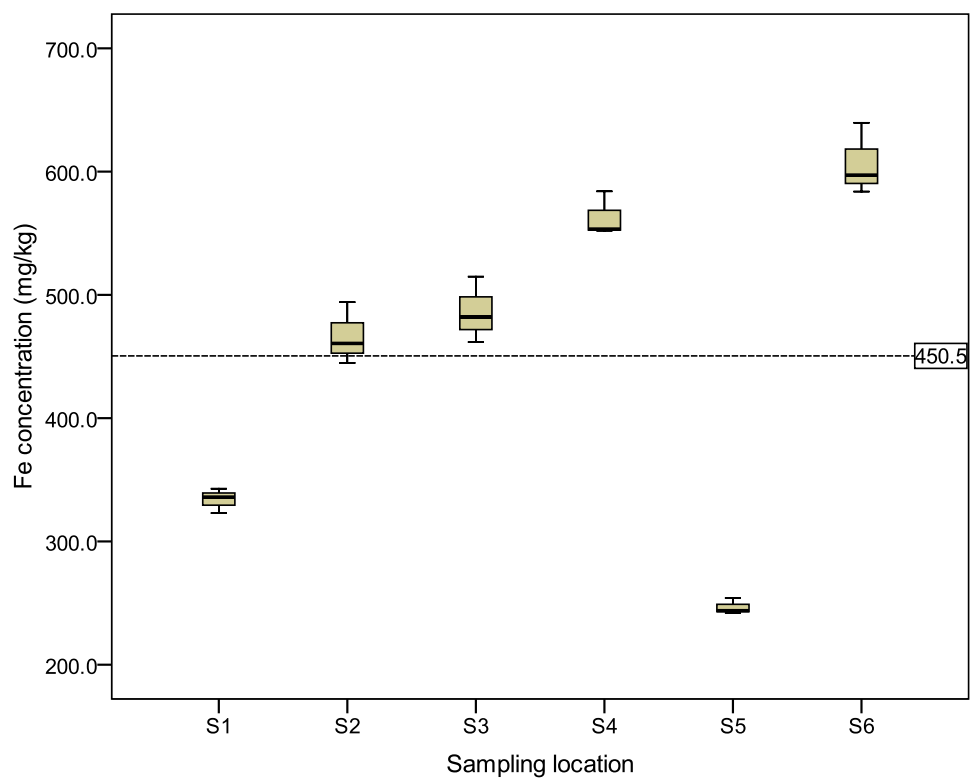
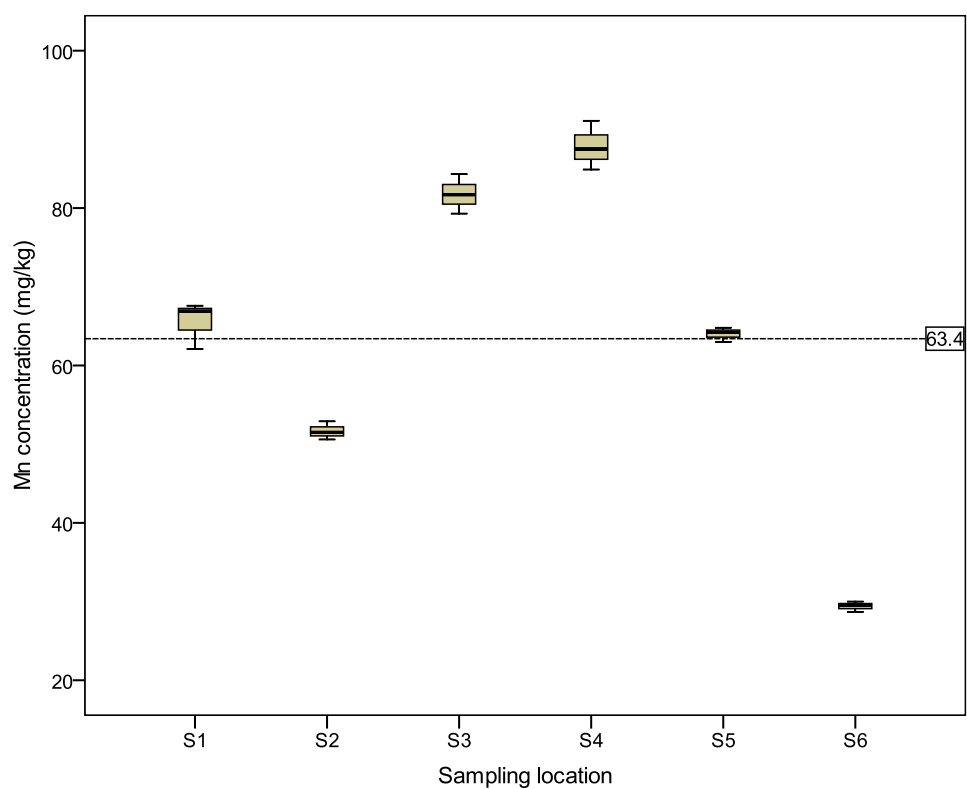
บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

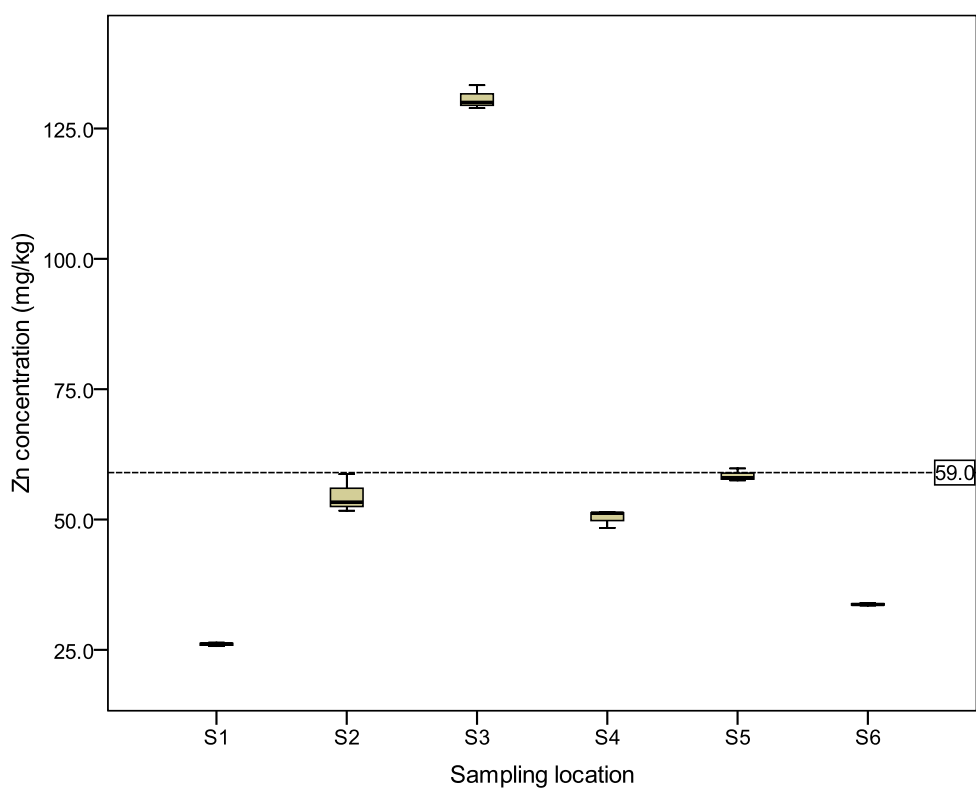
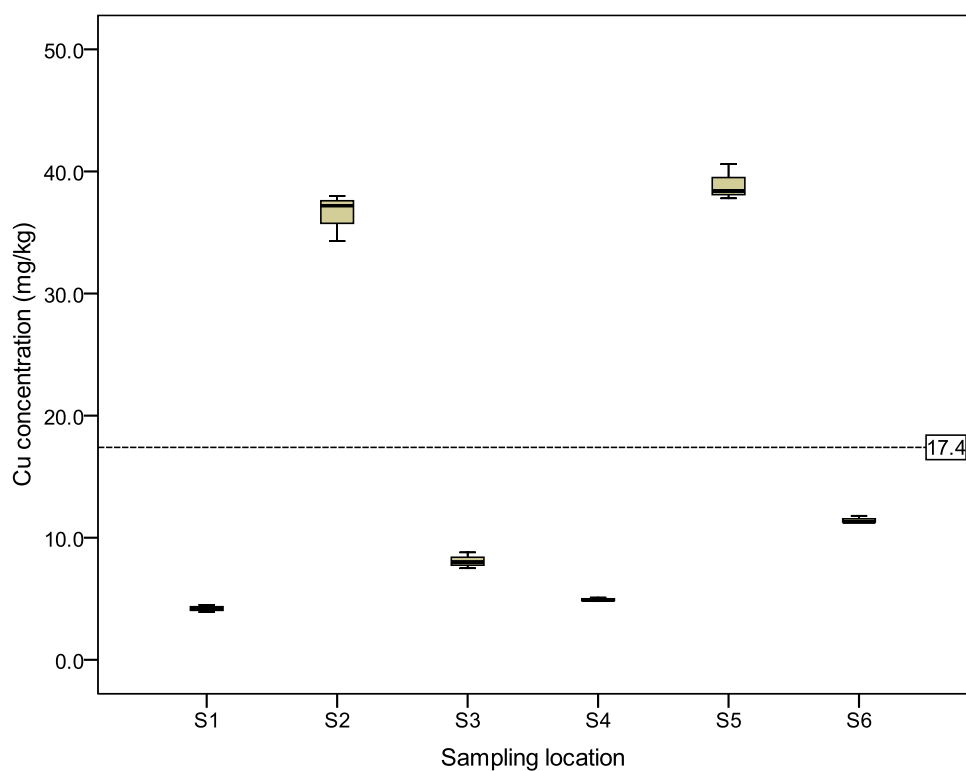
4.1 การวิเคราะห์ปริมาณแร่ธาตุในสาหร่ายขนนกโดยเทคนิค ICP-OES

เมื่อนำสารละลายตัวอย่างของสาหร่ายขนนกที่เตรียมได้โดยการย่อยด้วยระบบไมโครเวฟ อัตราส่วนของสารละลายผสมที่ใช้ย่อยระหว่าง conc. HNO_3 : H_2O เป็น 9 : 4.5 mL ใช้กำลังของคลื่นไมโครเวฟ 1000 วัตต์ และใช้เวลาในการย่อย 15 นาที หลังจากนั้นจึงนำตัวอย่างที่ย่อยได้ไปวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณของแมงกานีส เหล็ก ทองแดง และสังกะสี ด้วยเทคนิค ICP-OES กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณธาตุทั้ง 4 ชนิด เป็นความสัมพันธ์เชิงเส้น มีค่า R^2 มากกว่า 0.9997 ดังแสดงไว้ในภาคผนวก ก.

ปริมาณของแร่ธาตุทั้ง 4 ชนิดที่ได้ทำการศึกษาในตัวอย่างสาหร่ายขนนกที่เก็บมาจากตลาดจำนวน 6 แห่ง ในอำเภอตลอดแนวชายฝั่งทะเลอันดามันของจังหวัดกระบี่ 5 อำเภอ ได้แก่ ตลาดอ่าวลึกอำเภออ่าวลึก (S1) ตลาดเขาคราม อำเภอเมือง (S2) ตลาดบ้านบางฝ้าง อำเภอเหนือคลอง (S3) ตลาดรุ่งโรจน์ อำเภอเหนือคลอง (S4) ตลาดคลองท่อมใต้ อำเภอคลองท่อม (S5) และบ้านหัวหินอำเภอเกาะลันตา (S6) เรียงลำดับตามปริมาณที่พบในสาหร่ายจากน้อยไปมากได้ดังนี้ คือ $\text{Cu} < \text{Zn} < \text{Mn} < \text{Fe}$ โดยมีปริมาณเฉลี่ยของ Cu, Zn, Mn และ Fe เท่ากับ 17.4, 59.0, 63.4 และ 450.5 mg/kg น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.1 ปริมาณของเหล็กซึ่งมีค่าสูงที่สุดอยู่ในช่วง 246.7-606.8 mg/kg น้ำหนักแห้ง ปริมาณสังกะสีอยู่ในช่วง 26.1-130.7 mg/kg น้ำหนักแห้ง สำหรับปริมาณของแมงกานีสมีค่าอยู่ในช่วง 29.4-87.9 mg/kg น้ำหนักแห้ง และมีปริมาณของทองแดงอยู่ในช่วง 4.2-38.9 mg/kg น้ำหนักแห้ง ดังแสดงในตารางที่ 4.1



รูปที่ 4.1 ปริมาณของแมงกานีส เหล็ก ทองแดง และสังกะสีในสาหร่ายขนนกที่เก็บจากแหล่งเก็บตัวอย่างแหล่ง S1 ถึง S6 (ในหน่วย mg/kg Dry weight)



รูปที่ 4.1 ปริมาณของแมงกานีส เหล็ก ทองแดง และสังกะสีในสาหร่ายขนนกที่เก็บจากแหล่งเก็บตัวอย่างแหล่ง S1 ถึง S6 (ในหน่วย mg/kg Dry weight) (ต่อ)

แร่ธาตุที่ศึกษาทั้ง 4 ชนิดนี้เป็นแร่ธาตุที่จำเป็นต่อสิ่งมีชีวิต เรียกว่า ธาตุอาหารจำเป็น (Essential trace elements) แม้ร่างกายต้องการในปริมาณน้อยแต่หากขาดธาตุอาหารจำเป็น สิ่งมีชีวิตจะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ และไม่สามารถทดแทนด้วยสารอื่น เช่น สังกะสีเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ในร่างกายเกือบ 100 ชนิด มีบทบาทสำคัญต่อระบบการทำงานต่างๆ ของร่างกายที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต การสร้างโปรตีน การมองเห็น การสร้างภูมิคุ้มกันโรค เป็นต้น หากร่างกายได้รับแร่ธาตุจำเป็นมากเกินไป จะทำให้สะสมอยู่ในร่างกายทำให้เกิดความผิดปกติของอวัยวะ เช่น ม้าม ตับ เกณฑ์มาตรฐานสากลที่ควบคุมระดับปริมาณสารปนเปื้อนในอาหารจะครอบคลุมเฉพาะธาตุที่เป็นพิษต่อร่างกายเท่านั้น เช่น แคดเมียม ตะกั่วปรอท เป็นต้น สำหรับธาตุอาหารจำเป็นมีเพียงปริมาณที่แนะนำให้บริโภคต่อวัน (Recommended dietary allowance, RDA) และปริมาณสูงสุดที่บริโภคได้ (Upper levels of tolerable intake, UL) หน่วยงานสภาที่รับผิดชอบด้านโภชนาการ (Council for Responsible Nutrition, CRN) ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้กำหนดค่าปริมาณสูงสุดที่บริโภคได้สำหรับแร่ธาตุทั้ง 4 ชนิด คือ แมงกานีส เหล็ก ทองแดง และ สังกะสี เท่ากับ 11, 45, 10 และ 40 มิลลิกรัมต่อวัน ตามลำดับ (Dickinson, 2002) ตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณของแมงกานีส เหล็ก ทองแดง และสังกะสีในสาหร่ายขนนกที่วิเคราะห์โดยเทคนิค ICP-OES ในหน่วยมิลลิกรัมต่อน้ำหนักสาหร่ายสด 1 กิโลกรัม โดยแปลงหน่วยจากมิลลิกรัมต่อน้ำหนักสาหร่ายแห้ง 1 กิโลกรัม (จากตารางที่ 4.1) เพื่อให้สะดวกในการเปรียบเทียบกับข้อมูล RDA และ UL ที่แสดงไว้ในตารางเดียวกันนี้ พบว่าแร่ธาตุที่มีอยู่ในสาหร่ายสด 1 กิโลกรัมมีปริมาณใกล้เคียงและน้อยกว่ากับปริมาณที่แนะนำให้บริโภคต่อวัน เช่น Mn จากแหล่ง S3 มีปริมาณ 1.800 mg/kg น้ำหนักสด และ S4 มีปริมาณ 1.933 mg/kg น้ำหนักสด ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณที่แนะนำให้บริโภคต่อวัน (กำหนดไว้เท่ากับ 1.8-2.3 mg ต่อวัน) Fe จากแหล่ง S3 มีปริมาณ 10.695 mg/kg น้ำหนักสดและ S6 มีปริมาณ 13.350 mg/kg น้ำหนักสด ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณที่แนะนำให้บริโภคต่อวัน (กำหนดไว้เท่ากับ 8-18 mg ต่อวัน) Cu จากแหล่ง S2 มีปริมาณ 0.803 mg/kg น้ำหนักสดและ S5 มีปริมาณ 0.856 mg/kg น้ำหนักสด ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณที่แนะนำให้บริโภคต่อวัน (กำหนดไว้เท่ากับ 0.900 mg ต่อวัน) ในขณะที่ปริมาณของ Zn ในสาหร่ายสด 1 กิโลกรัมจากทุกแหล่ง (S1 ถึง S6) มีปริมาณน้อยกว่าปริมาณที่แนะนำให้บริโภคต่อวัน (กำหนดไว้เท่ากับ 8-11 mg ต่อวัน) สำหรับในประเทศไทย ได้มีการกำหนดเกณฑ์มาตรฐานในประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 (พ.ศ. 2529) เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน สำหรับ Cu และ Zn กำหนดไว้ให้มีค่าไม่เกิน 20 และ 100 mg ต่อน้ำหนักอาหาร 1 กิโลกรัม ตามลำดับ จากผลที่ได้ในตารางที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างสาหร่ายทั้งหมดจากแหล่งเก็บตัวอย่างทั้ง 6 แหล่ง มีปริมาณของ Cu และ Zn ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานนี้มาก ไม่มีแนวโน้มที่จะก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคอันเนื่องมาจากปริมาณของแร่ธาตุ 4 ชนิดนี้

ตารางที่ 4.1 ปริมาณของแมงกานีส เหล็ก ทองแดง และสังกะสีในสาหร่ายขนนกที่วิเคราะหโดยเทคนิค ICP-OES (ในหน่วย mg/kg Dry weight)

แหล่งตัวอย่าง	Mean $\pm$ SD (mg/kg Dry weight), n=3			
	Mn	Fe	Cu	Zn
S1	65.5 $\pm$ 3.0	333.9 $\pm$ 10.0	4.2 $\pm$ 0.3	26.1 $\pm$ 0.4
S2	51.7 $\pm$ 1.2	466.5 $\pm$ 25.2	36.5 $\pm$ 1.9	54.6 $\pm$ 3.7
S3	81.8 $\pm$ 2.5	486.2 $\pm$ 26.8	8.1 $\pm$ 0.7	130.7 $\pm$ 2.3
S4	87.9 $\pm$ 3.1	563.1 $\pm$ 18.1	4.9 $\pm$ 0.1	50.3 $\pm$ 1.6
S5	64.0 $\pm$ 0.9	246.7 $\pm$ 6.4	38.9 $\pm$ 1.5	58.4 $\pm$ 1.2
S6	29.4 $\pm$ 0.7	606.8 $\pm$ 29.2	11.5 $\pm$ 0.3	33.7 $\pm$ 0.3

ตารางที่ 4.2 ปริมาณของแมงกานีส เหล็ก ทองแดง และสังกะสีในสาหร่ายขนนกที่วิเคราะหโดยเทคนิค ICP-OES (ในหน่วย mg/kg Wet weight)

แหล่งตัวอย่าง	Mean $\pm$ SD (mg/kg Wet weight), n=3			
	Mn	Fe	Cu	Zn
S1	1.442 $\pm$ 0.066	7.345 $\pm$ 0.220	0.092 $\pm$ 0.006	0.574 $\pm$ 0.008
S2	1.137 $\pm$ 0.026	10.263 $\pm$ 0.554	0.803 $\pm$ 0.043	1.201 $\pm$ 0.080
S3	1.800 $\pm$ 0.055	10.695 $\pm$ 0.589	0.178 $\pm$ 0.015	2.876 $\pm$ 0.051
S4	1.933 $\pm$ 0.069	12.388 $\pm$ 0.399	0.109 $\pm$ 0.003	1.107 $\pm$ 0.036
S5	1.408 $\pm$ 0.020	5.428 $\pm$ 0.141	0.856 $\pm$ 0.033	1.286 $\pm$ 0.026
S6	0.646 $\pm$ 0.014	13.350 $\pm$ 0.641	0.252 $\pm$ 0.006	0.742 $\pm$ 0.006
ปริมาณที่แนะนำ ให้บริโภค (mg ต่อวัน)	2.3 (ผู้ชาย) 1.8 (ผู้หญิง)	8 (ผู้ชาย) 18 (ผู้หญิง)	0.900	11 (ผู้ชาย) 8 (ผู้หญิง)
ปริมาณสูงสุดที่ บริโภคได้ (mg ต่อวัน)	11	45	10	40
เกณฑ์มาตรฐาน [#] (mg/kg น้ำหนักสด)	NA	NA	20	100

[#] เกณฑ์มาตรฐานของประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 (พ.ศ. 2529)

NA, Not applicable (ไม่มีข้อมูล)

เมื่อทำการทดสอบทางสถิติเพื่อพิจารณาแหล่งของสาหร่าย (แหล่ง S1 ถึง S6) ที่อาจมีผลต่อปริมาณแร่ธาตุที่ศึกษาโดยใช้สถิติความแปรปรวนทางเดียว (One way-ANOVA) พบว่าแหล่งของสาหร่ายต่างกันซึ่งมีสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน มีผลทำให้ปริมาณของแร่ธาตุทั้ง 4 ชนิดในสาหร่ายแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และสถิติทดสอบผลต่างของค่าเฉลี่ยรายคู่ (Tukey's HSD) พบว่า ปริมาณของแร่ธาตุที่ศึกษา (Mn, Fe, Cu และ Zn) ที่มีอยู่ในสาหร่ายที่เก็บมาจากแต่ละแหล่งเป็นดังนี้

แมงกานีส (Mn)

แหล่ง S6 มีปริมาณของแมงกานีสต่ำสุด (29.4 mg/kg) ในขณะที่แหล่ง S4 มีปริมาณสูงสุด (87.9 mg/kg) และมีค่าแตกต่างจากแหล่ง S2 และ S3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ยกเว้นจากแหล่ง S1 และ S5 ที่มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยจัดกลุ่มที่แตกต่างกันได้ 5 กลุ่ม ดังนี้คือ S6, S2, (S5, S1), S3 และ S4 ดังแสดงในรูปที่ 4.2

เหล็ก (Fe)

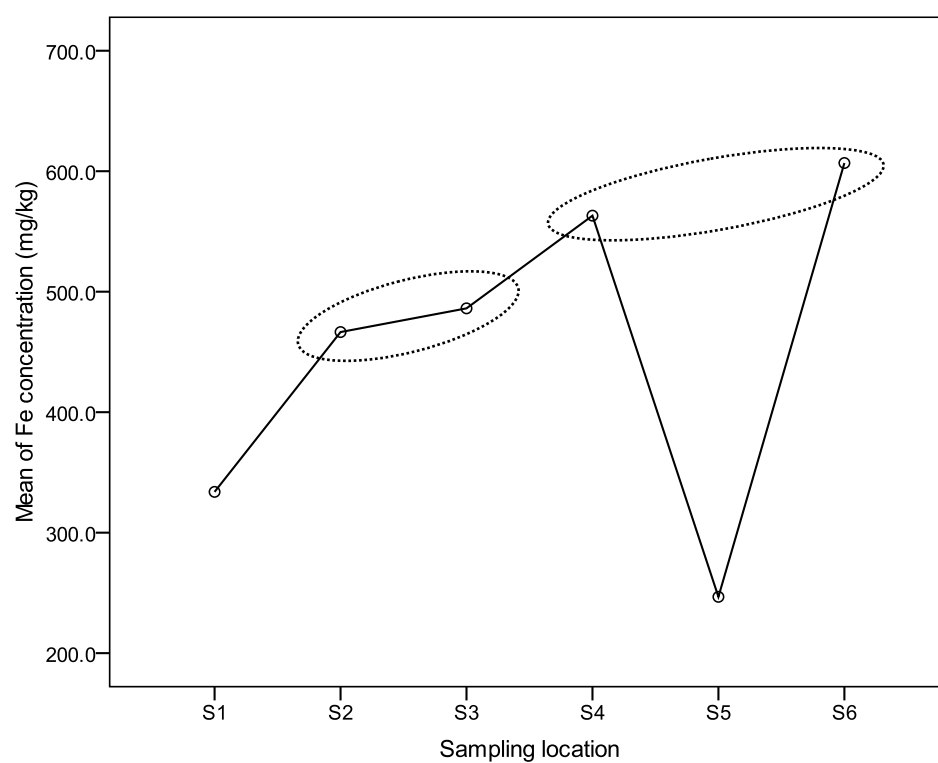
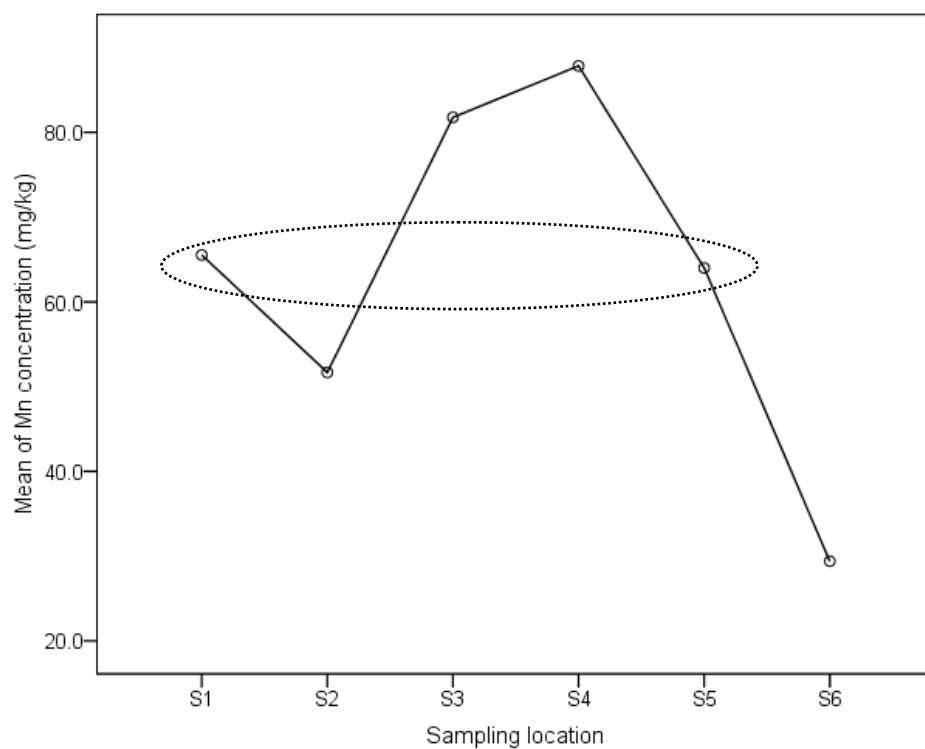
แหล่ง S5 มีปริมาณของเหล็กต่ำสุด (246.7 mg/kg) ในขณะที่แหล่ง S6 มีปริมาณสูงสุด (606.8 mg/kg) แหล่ง S1 และ S5 มีปริมาณเหล็กแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สำหรับแหล่ง S2 และ S3 ปริมาณของเหล็กไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) เช่นเดียวกับแหล่ง S4 และ S6 โดยจัดกลุ่มที่แตกต่างกันได้ 4 กลุ่ม ดังนี้คือ S5, S1, (S2, S3) และ (S4, S6) ดังแสดงในรูปที่ 4.2

ทองแดง (Cu)

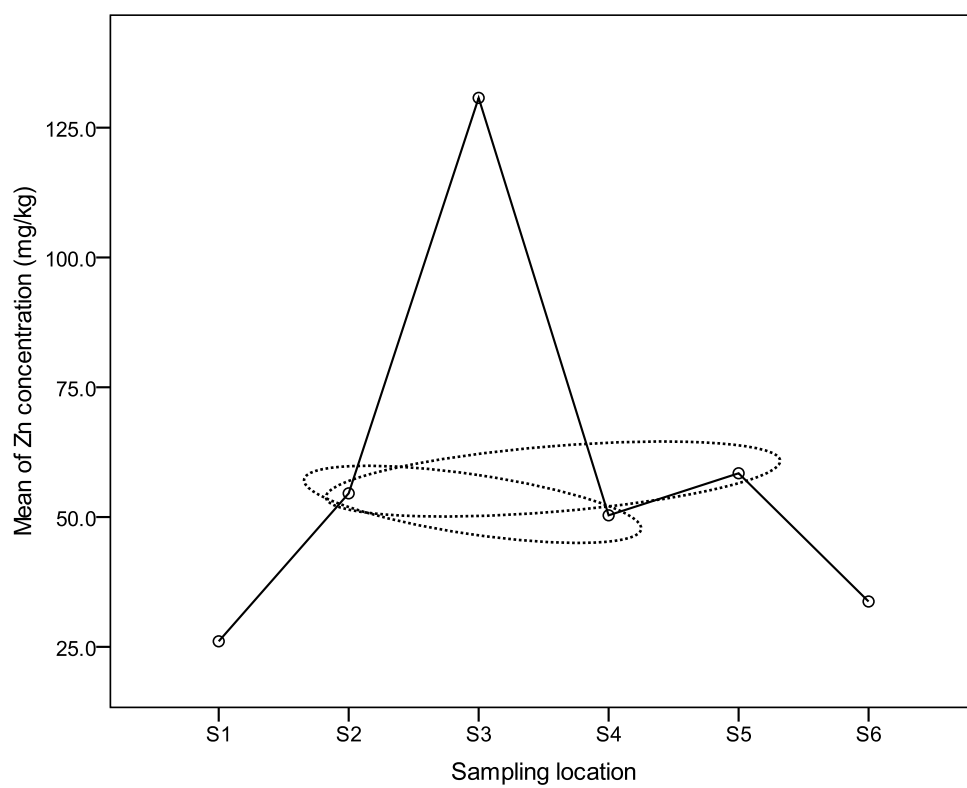
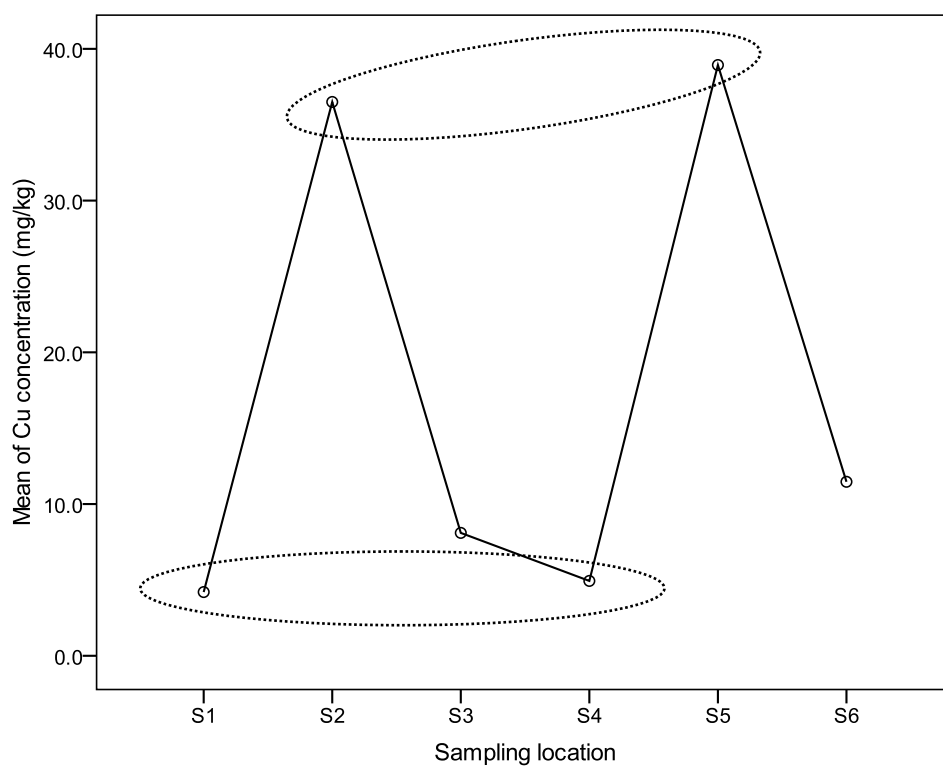
แหล่ง S1 มีปริมาณทองแดงต่ำสุด (4.2 mg/kg) ในขณะที่แหล่ง S5 มีปริมาณสูงสุด (38.9 mg/kg) แหล่ง S3 และ S6 มีปริมาณทองแดงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สำหรับแหล่ง S1 และ S4 มีปริมาณของทองแดงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) เช่นเดียวกับแหล่ง S2 และ S5 โดยจัดกลุ่มที่แตกต่างกันได้ 4 กลุ่ม ดังนี้คือ (S1, S4), S3, S6 และ (S2, S5) ดังแสดงในรูปที่ 4.2

สังกะสี (Zn)

แหล่ง S1 มีปริมาณสังกะสีต่ำสุด (26.1 mg/kg) ในขณะที่แหล่ง S3 มีปริมาณสูงสุด (130.7 mg/kg) แหล่ง S1, S3 และ S6 มีปริมาณสังกะสีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สำหรับแหล่ง S2 และ S4 มีปริมาณของทองแดงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) เช่นเดียวกับแหล่ง S2 และ S5 โดยจัดกลุ่มที่แตกต่างกันได้ 5 กลุ่ม ดังนี้คือ S1, S6, (S4, S2), (S2, S5) และ S3 ดังแสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 ปริมาณเฉลี่ยของแมงกานีส เหล็ก ทองแดง และสังกะสีในสาหร่ายขนนกที่เก็บจากแหล่งเก็บตัวอย่างแหล่ง S1 ถึง S6 (ในหน่วย mg/kg Dry weight)



รูปที่ 4.2 ปริมาณเฉลี่ยของแมงกานีส เหล็ก ทองแดง และสังกะสีในสาหร่ายขนนกที่เก็บจากแหล่งเก็บตัวอย่างแหล่ง S1 ถึง S6 (ในหน่วย mg/kg Dry weight) (ต่อ)

4.2 การวิเคราะห์ปริมาณการดูดซึมได้ของแร่ธาตุในสาหร่ายขนนก

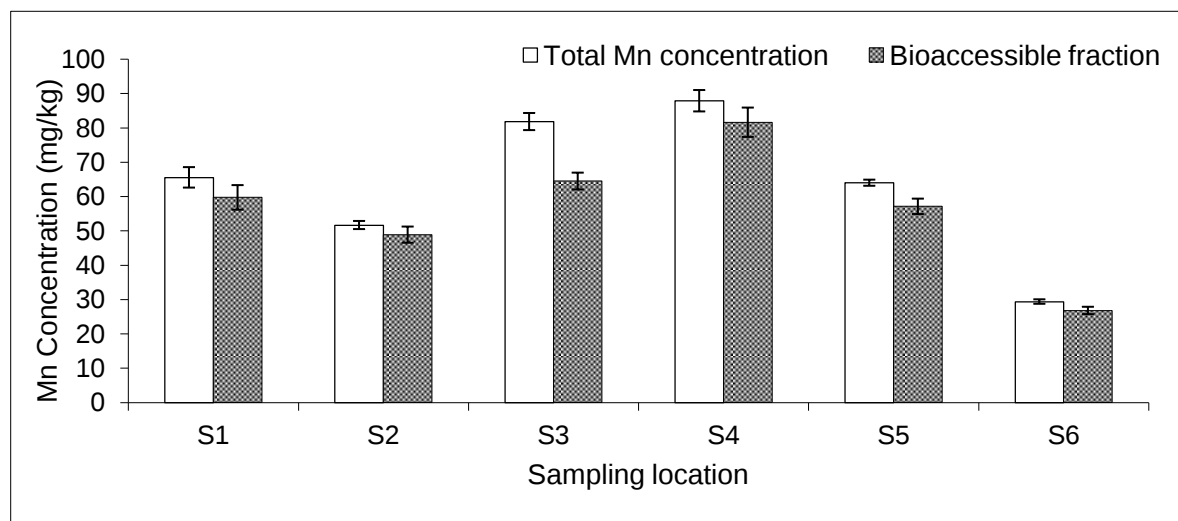
จากผลการวิจัยในข้อ 4.1 ทำให้ทราบปริมาณของแร่ธาตุปริมาณน้อย (Trace elements) ที่มีในสาหร่ายขนนก ได้แก่ แมงกานีส เหล็ก ทองแดง และสังกะสี จากทั้ง 6 แหล่งเก็บตัวอย่าง S1 ถึง S6 ซึ่งมีค่าเฉลี่ยจากทุกแหล่งเท่ากับ 63.4 ± 20.0 , 450.5 ± 129.8 , 17.4 ± 15.1 และ 59.0 ± 35.1 mg/kg น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เนื่องจากปริมาณที่มีอยู่ในสาหร่ายนี้ไม่ใช่ปริมาณทั้งหมดที่จะถูกดูดซึมหรือนำไปใช้ประโยชน์ได้เมื่อผ่านการย่อยอาหารหลังจากการบริโภคสาหร่าย มีเพียงปริมาณส่วนหนึ่ง (Fraction) เท่านั้นที่ร่างกายสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ดังนั้นจึงได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณการดูดซึมได้ของแร่ธาตุทั้ง 4 ชนิดนี้ โดยวิธีการจำลองการย่อยอาหารดังรายละเอียดของวิธีการวิจัยในข้อ 3.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณการดูดซึมได้ของแร่ธาตุทั้ง 4 ชนิดในสาหร่ายขนนก เป็นดังนี้

ก) แมงกานีส (Mn)

ปริมาณเฉลี่ยของ Mn ที่มีอยู่ในสาหร่ายขนนกจากแหล่ง S1 ถึง S6 เท่ากับ 65.5, 51.7, 81.8, 87.9, 64.0 และ 29.4 mg/kg น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์ปริมาณการดูดซึมได้พบว่าปริมาณการดูดซึมได้จากแหล่ง S1 ถึง S6 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 59.7, 48.9, 64.5, 81.6, 57.1 และ 26.8 mg/kg น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.3 จะเห็นได้ว่าปริมาณการดูดซึมได้ของ Mn มีค่าสูงเมื่อเทียบกับปริมาณที่มีอยู่ในตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละของปริมาณการดูดซึมได้ เท่ากับ 88.8, 90.2, 81.6, 90.5, 86.8 และ 91.0 ตามลำดับ ปริมาณการดูดซึมได้นี้คำนวณจากปริมาณของแร่ธาตุที่ได้จาก 2 เฟสรวมกัน ได้แก่ เฟสการย่อยในกระเพาะอาหาร และเฟสการย่อยในลำไส้เล็ก รูปที่ 4.5 แสดงปริมาณการดูดซึมได้ (Bioaccessibility, %) ในแต่ละเฟส สำหรับ Mn ปริมาณการดูดซึมได้ในเฟสการย่อยในกระเพาะอาหาร และเฟสการย่อยในลำไส้เล็ก มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 46.1-55.3 และ 34.8-44.8 ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาปริมาณการดูดซึมได้ของ Mn จากทั้งสองเฟสพบว่ามีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 81.6-91.0

เมื่อเปรียบเทียบกับผลงานวิจัยอื่นๆ พบว่า Laird และ Chan (2013) ได้ศึกษาปริมาณการดูดซึมได้ของ Mn ในสาหร่าย (Laver seaweed) พบว่ามีค่าร้อยละ 86 ± 8.4 ซึ่งมีค่าสอดคล้องกับผลการศึกษาในงานวิจัยนี้ ในขณะที่ Moreda-Piñeiro และคณะ (2012) ได้รายงานค่าร้อยละปริมาณการดูดซึมได้ของ Mn ในสาหร่าย 7 ชนิด ได้แก่ Dulce, Nori, Kombu, Wakame, Sea spaghetti, Sea lettuce และ Canned seaweed พบว่ามีค่าร้อยละ 91.8 ± 7.1 , 70.1 ± 5.2 , 62.3 ± 5.1 , 100.0 ± 8.1 , 77.4 ± 7.1 , 71.1 ± 5.6 และ 18.2 ± 0.9 ตามลำดับ จะเห็นว่าปริมาณการดูดซึมได้ของสาหร่าย 6 ใน 7 ชนิดที่ศึกษามีค่าปริมาณการดูดซึมได้ในช่วงร้อยละ 62.3-100.0 ซึ่งมีค่าสูงสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ มีเพียงสาหร่ายชนิดเดียวคือ สาหร่ายกระป๋องที่มีค่าปริมาณการดูดซึมได้ต่ำกว่ามาก คณะผู้วิจัยได้อธิบายว่าองค์ประกอบที่เป็นเส้นใยในสาหร่ายที่มีมากถึงร้อยละ 90 เป็นเส้นใย

ที่ละลายน้ำได้ จึงช่วยทำให้เพิ่มปริมาณการดูดซึมได้ของแร่ธาตุในสาหร่าย และก่อนหน้านี้ในปี ค.ศ. 2010 Domínguez-González และคณะได้ศึกษาปริมาณการดูดซึมได้ของแร่ธาตุในสาหร่าย 9 ชนิด ผลการศึกษาพบว่า สาหร่าย 6 ชนิด มีปริมาณการดูดซึมได้ของ Mn ค่อนข้างสูง มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 62.3-100.0 มีสาหร่าย 3 ชนิดซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการแปรรูปแล้วที่มีค่าปริมาณการดูดซึมได้ต่ำมาก (ร้อยละ 12.0-18.2)



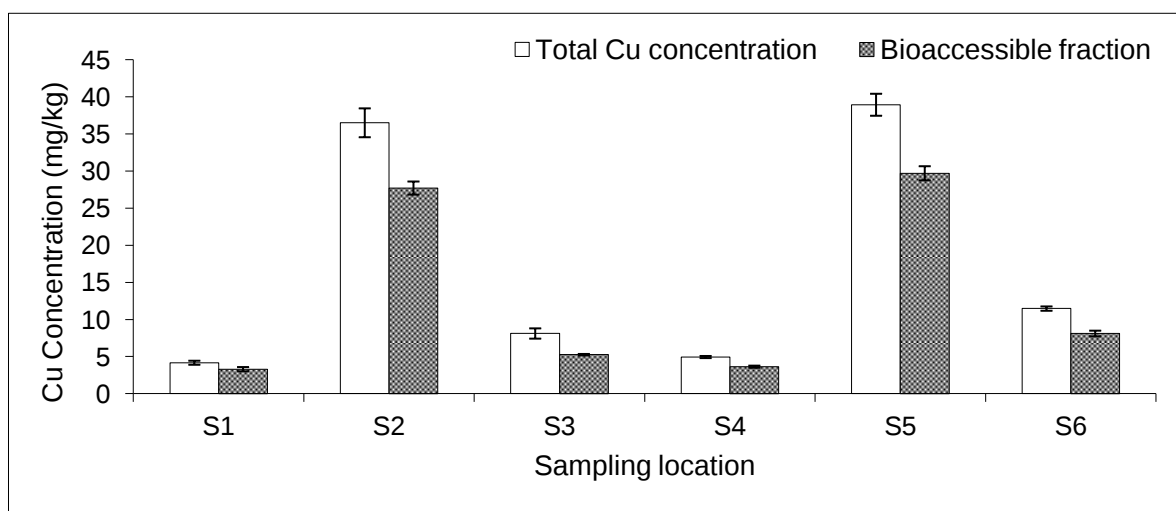
รูปที่ 4.3 ปริมาณแมงกานีสที่มีในสาหร่าย (Total Mn concentration) เทียบกับปริมาณการดูดซึมได้ (Bioaccessible fraction)

ข) ทองแดง (Cu)

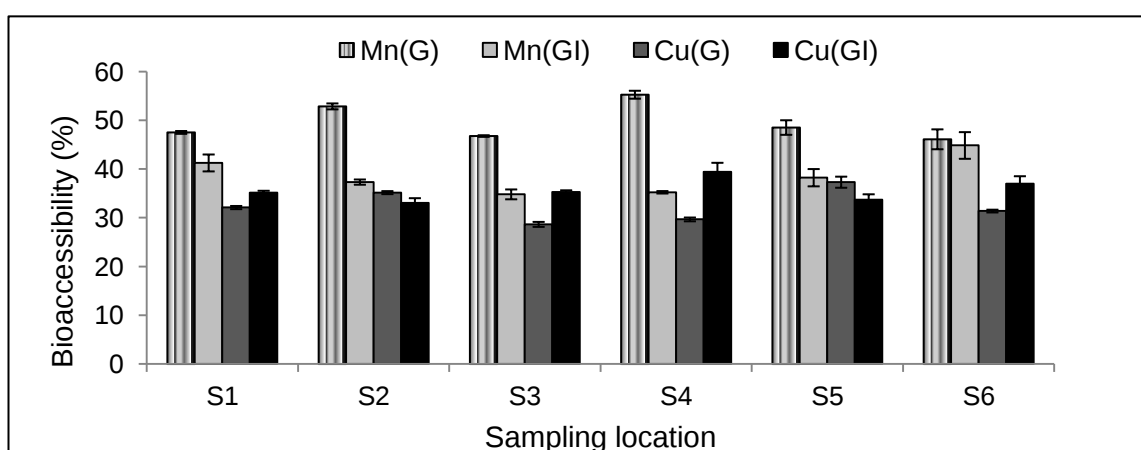
จากการวิเคราะห์ปริมาณของ Cu ที่มีอยู่ในสาหร่ายขนนกจากแหล่งเก็บตัวอย่าง S1 ถึง S6 พบว่ามีค่าเท่ากับ 4.2, 36.5, 8.1, 4.9, 38.9 และ 11.5 mg/kg น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับธาตุชนิดอื่นๆ ที่ศึกษา และมีปริมาณการดูดซึมได้ของ Cu เท่ากับ 3.3, 27.7, 5.3, 3.6, 29.7 และ 8.1 mg/kg น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.4 คิดเป็นร้อยละของปริมาณการดูดซึมได้ เท่ากับ 67.3, 68.2, 63.9, 69.1, 71.0 และ 68.4 ตามลำดับ รูปที่ 4.5 แสดงปริมาณการดูดซึมได้ (Bioaccessibility, %) ในแต่ละเฟสของการจำลองการย่อยอาหารสำหรับ Cu ปริมาณการดูดซึมได้ในเฟสการย่อยในกระเพาะอาหาร และเฟสการย่อยในลำไส้เล็ก มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 28.7-37.3 และ 33.0-39.4 ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาปริมาณการดูดซึมได้ของ Cu จากทั้งสองเฟสพบว่ามีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 63.9-71.0

เมื่อเปรียบเทียบกับผลงานวิจัยอื่นๆ พบว่า มีรายงานโดย Laird และ Chan (2013) เกี่ยวกับปริมาณการดูดซึมได้ของ Cu ในสาหร่าย (Laver seaweed) มีค่าร้อยละ 59 ± 10.1 ซึ่งมีค่าใกล้เคียง

กับผลของการศึกษาในงานวิจัยนี้ นอกจากนี้ Moreda-Piñeiro และคณะ (2012) ได้รายงานค่าร้อยละปริมาณการดูดซึมได้ของ Cu ในสาหร่าย 7 ชนิด ได้แก่ Dulse, Nori, Kombu, Wakame, Sea spaghetti, Sea lettuce และ Canned seaweed พบว่ามีค่าร้อยละ 23.7±1.1, 59.5±0.9, 66.5±1.6, 75.8±2.5, 62.5±5.1, 67.2±6.1 และ 26.8±1.5 ตามลำดับ จะเห็นว่าปริมาณการดูดซึมได้ส่วนใหญ่อยู่ในช่วงร้อยละ 59.5-75.8 ซึ่งมีค่าค่อนข้างสูงสอดคล้องกับงานวิจัยนี้



รูปที่ 4.4 ปริมาณทองแดงที่มีในสาหร่าย (Total Cu concentration) เทียบกับปริมาณการดูดซึมได้ (Bioaccessible fraction)

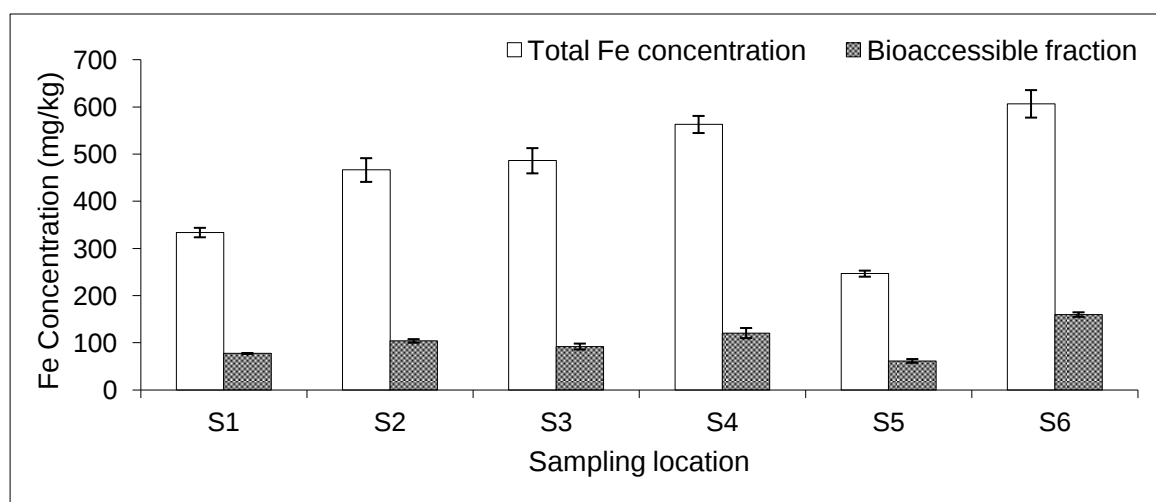


รูปที่ 4.5 ปริมาณการดูดซึมได้ (Bioaccessibility, %) ของ Mn และ Cu ในเฟสการย่อยในกระเพาะอาหาร (G) และในเฟสการย่อยในลำไส้เล็ก (GI)

ค) เหล็ก (Fe)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณของ Fe ในสาหร่ายขนนกจากแหล่งเก็บตัวอย่าง S1 ถึง S6 พบว่ามีค่าเท่ากับ 333.9, 466.5, 486.2, 563.1, 246.7 และ 606.8 mg/kg น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เป็นธาตุที่พบว่ามีปริมาณมากที่สุดในสาหร่ายขนนกเมื่อเปรียบเทียบกับธาตุชนิดอื่นๆ ที่ศึกษา และมีปริมาณการดูดซึมได้ของ Fe เท่ากับ 77.4, 104.1, 92.2, 120.7, 61.7 และ 160.0 mg/kg น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.6 คิดเป็นร้อยละของปริมาณการดูดซึมได้ เท่ากับ 22.8, 22.6, 19.2, 20.8, 24.3 และ 25.6 ตามลำดับ รูปที่ 4.8 แสดงปริมาณการดูดซึมได้ (Bioaccessibility, %) ในแต่ละเฟสของการจำลองการย่อยอาหาร สำหรับ Fe ปริมาณการดูดซึมได้ในเฟสการย่อยในกระเพาะอาหาร และเฟสการย่อยในลำไส้เล็ก มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 10.5-14.9 และ 7.9-11.2 ตามลำดับ และปริมาณการดูดซึมได้ของ Fe จากทั้งสองเฟสมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 19.2-25.6

การศึกษาปริมาณการดูดซึมได้ของ Fe ในสาหร่ายที่ผ่านมา Moreda-Piñeiro และคณะ (2012) ได้รายงานค่าร้อยละปริมาณการดูดซึมได้ของ Fe ในสาหร่าย 7 ชนิด ได้แก่ Dulse, Nori, Kombu, Wakame, Sea spaghetti, Sea lettuce และ Canned seaweed พบว่ามีค่าร้อยละ 26.9 ± 1.6 , 18.9 ± 1.1 , 92.4 ± 7.1 , 15.8 ± 0.9 , 17.9 ± 0.8 , 10.6 ± 0.8 และ 27.8 ± 1.1 ตามลำดับ จะเห็นว่าปริมาณการดูดซึมได้ส่วนใหญ่มีค่าต่ำกว่าร้อยละ 27.8 ซึ่งมีค่าค่อนข้างต่ำสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ ดังแสดงในรูปที่ 4.6 ยกเว้นสาหร่ายเพียงชนิดเดียวคือ Kombu ที่มีค่าปริมาณการดูดซึมได้สูง

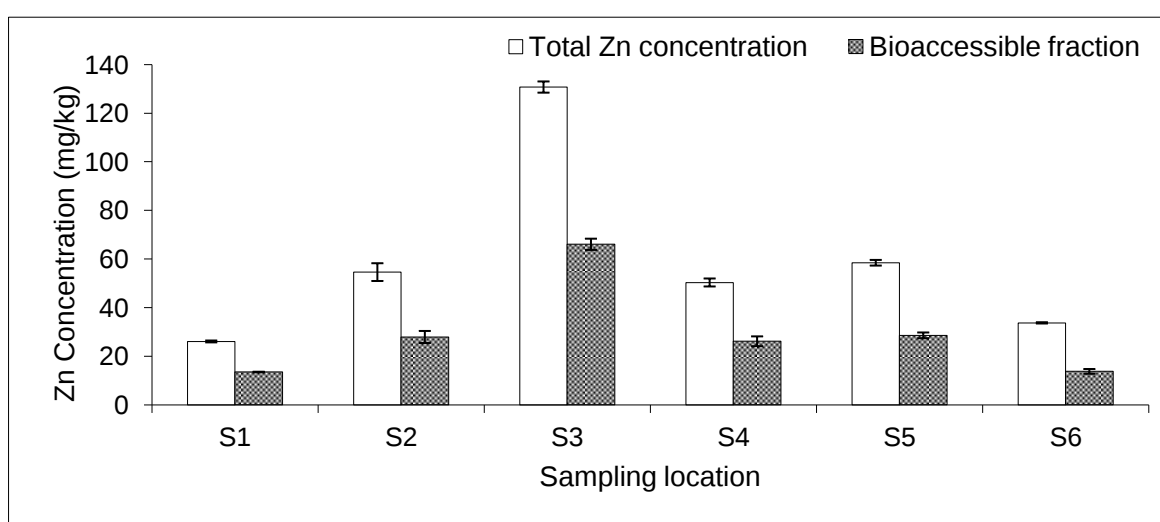


รูปที่ 4.6 ปริมาณเหล็กที่มีในสาหร่าย (Total Fe concentration) เทียบกับปริมาณการดูดซึมได้ (Bioaccessible fraction)

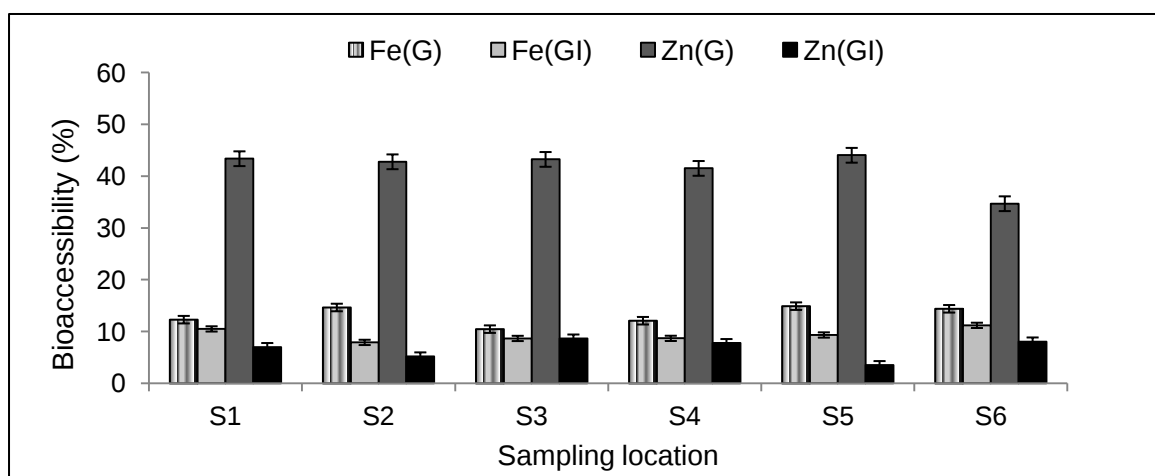
ง) สังกะสี (Zn)

ปริมาณเฉลี่ยของ Zn ที่มีอยู่ในสาหร่ายขนนกจากแหล่ง S1 ถึง S6 เท่ากับ 26.1, 54.6, 130.7, 50.3, 58.4 และ 33.7 mg/kg น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์ปริมาณการดูดซึมได้พบว่ามีปริมาณการดูดซึมได้โดยเฉลี่ยเท่ากับ 13.5, 27.9, 66.0, 26.1, 28.6 และ 13.8 mg/kg น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.7 จะเห็นได้ว่าปริมาณการดูดซึมได้ของ Zn มีค่าประมาณครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับปริมาณที่มีอยู่ในตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละของปริมาณการดูดซึมได้ เท่ากับ 50.4, 48.0, 51.9, 49.3, 47.6 และ 42.8 ตามลำดับ รูปที่ 4.8 แสดงปริมาณการดูดซึมได้ของ Zn ในแต่ละเฟส ปริมาณการดูดซึมได้ในเฟสการย่อยในกระเพาะอาหาร และเฟสการย่อยในลำไส้เล็ก มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 34.7-44.0 และ 3.5-8.6 ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาปริมาณการดูดซึมได้ของ Zn จากทั้งสองเฟสพบว่ามีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 42.8-51.9

Moreda-Piñeiro และคณะ (2012) ได้รายงานค่าร้อยละปริมาณการดูดซึมได้ของ Zn ในสาหร่าย 7 ชนิด ได้แก่ Dulce, Nori, Kombu, Wakame, Sea spaghetti, Sea lettuce และ Canned seaweed พบว่ามีค่าร้อยละ 15.8 ± 0.7 , 59.1 ± 0.9 , 49.9 ± 1.2 , 37.8 ± 2.6 , 64.5 ± 3.7 , 41.8 ± 3.1 และ 25.5 ± 1.9 ตามลำดับ จะเห็นว่าปริมาณการดูดซึมได้ส่วนใหญ่มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 37.8-64.5 ซึ่งมีค่าปานกลางสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ ยกเว้นสาหร่าย 2 ชนิดที่มีค่าปริมาณการดูดซึมได้ค่อนข้างต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณการดูดซึมได้ในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กของสังกะสี ดังแสดงในรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.7 ปริมาณสังกะสีที่มีในสาหร่าย (Total (concentration) เทียบกับปริมาณการดูดซึมได้ (Bioaccessible fraction)



รูปที่ 4.8 ปริมาณการดูดซึมได้ (Bioaccessibility, %) ของ Fe และ Zn ในเฟสการย่อยใน กระเพาะอาหาร (G) และในเฟสการย่อยในลำไส้เล็ก (GI)

จากผลการศึกษาการประเมินการดูดซึมได้นี้ สามารถเรียงลำดับจากน้อยไปมากของร้อยละปริมาณการดูดซึมได้ของทั้ง 4 ธาตุที่ศึกษา คือ $Fe < Zn < Cu < Mn$ ในขณะที่ปริมาณของแร่ธาตุที่มีอยู่ในสาหร่ายมีปริมาณเรียงลำดับจากน้อยไปมาก คือ $Cu < Zn < Mn < Fe$ จะเห็นได้ว่า Fe ซึ่งมีปริมาณมากที่สุดในสาหร่ายแต่มีปริมาณการดูดซึมได้ต่ำสุด สำหรับ Cu มีปริมาณน้อยที่สุดในสาหร่ายแต่มีปริมาณการดูดซึมได้ค่อนข้างสูง

การวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (Correlation analysis)

การวิเคราะห์สหสัมพันธ์เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตั้งแต่ 2 ตัวขึ้นไป ในการพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรว่ามีมากน้อยเพียงใดนั้น จะใช้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) ในการศึกษาปริมาณแร่ธาตุในตัวอย่างสาหร่ายนี้ ได้วิเคราะห์ปริมาณแร่ธาตุ 2 วิธี เพื่อศึกษาปริมาณแร่ธาตุใน 2 ลักษณะ คือ 1) ปริมาณแร่ธาตุที่มีในสาหร่าย (Total concentration) และ 2) ปริมาณการดูดซึมได้ (Bioaccessibility) จึงได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ 2 ลักษณะนี้ของแร่ธาตุทั้ง 4 ชนิด (ตารางที่ 4.3) สามารถสรุปผลการวิเคราะห์ที่มีนัยสำคัญทางสถิติได้ดังนี้

- ตัวแปรที่มีความสัมพันธ์กันในเชิงบวก ได้แก่ ปริมาณของ Zn และ Mn ที่มีในสาหร่าย ($r=0.493$) ปริมาณ Cu ที่ดูดซึมได้และปริมาณ Cu ที่มีในสาหร่าย ($r=0.478$) ปริมาณ Zn ที่ดูดซึมได้และปริมาณ Mn ที่มีในสาหร่าย ($r=0.772$) ปริมาณ Zn ที่ดูดซึมได้และปริมาณ Zn ที่มีในสาหร่าย ($r=0.492$) ปริมาณ Fe ที่ดูดซึมได้และปริมาณ Mn ที่ดูดซึมได้ ($r=0.539$) ปริมาณ Cu ที่ดูดซึมได้และปริมาณ Mn ที่ดูดซึมได้ ($r=0.561$) ปริมาณ Zn ที่ดูดซึมได้และปริมาณ Fe ที่ดูดซึมได้

($r=0.633$)

- ตัวแปรที่มีความสัมพันธ์กันในเชิงลบ ได้แก่ ปริมาณ Mn ที่ดูดซึมได้และปริมาณ Zn ที่มีในสาหร่าย ($r=-0.846$) ปริมาณ Fe ที่ดูดซึมได้และปริมาณ Mn ที่มีในสาหร่าย ($r=-0.813$) ปริมาณ Fe ที่ดูดซึมได้และปริมาณ Zn ที่มีในสาหร่าย ($r=-0.701$) ปริมาณ Cu ที่ดูดซึมได้และปริมาณ Zn ที่มีในสาหร่าย ($r=-0.599$) ปริมาณ Zn ที่ดูดซึมได้และปริมาณ Mn ที่ดูดซึมได้ ($r=-0.500$) ปริมาณ Zn ที่ดูดซึมได้และปริมาณ Fe ที่ดูดซึมได้ ($r=-0.664$)

ตารางที่ 4.3 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน (r) สำหรับปริมาณแร่ธาตุที่มีในสาหร่าย (Total concentration) และปริมาณการดูดซึมได้ (Bioaccessibility)

	Total concentration (mg/kg)				Bioaccessibility (%)			
	Mn	Fe	Cu	Zn	Mn	Fe	Cu	Zn
Total concentration (mg/kg)								
Mn	1.000	-0.159	-0.300	0.493 [*]	-0.447	-0.813 ^{**}	-0.229	0.772 ^{**}
Fe	-	1.000	-0.467	0.061	0.291	-0.135	-0.293	-0.290
Cu	-	-	1.000	-0.023	0.049	0.352	0.478 [*]	-0.226
Zn	-	-	-	1.000	-0.846 ^{**}	-0.701 ^{**}	-0.599 ^{**}	0.492 [*]
Bioaccessibility (%)								
Mn	-	-	-	-	1.000	0.539 [*]	0.561 [*]	-0.500 [*]
Fe	-	-	-	-	-	1.000	0.633 ^{**}	-0.664 ^{**}
Cu	-	-	-	-	-	-	1.000	-0.263
Zn	-	-	-	-	-	-	-	1.000

^{*} $P < 0.05$

^{**} $P < 0.01$

4.3 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

4.3.1 ความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีการวิเคราะห์

การวิเคราะห์สารอ้างอิง (สำหรับ NMIJ CRM 7405-a) เป็นการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ โดยการนำสารอ้างอิงไปย่อยด้วยวิธีการย่อยด้วยไมโครเวฟ หลังจากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ Mn, Fe, Cu และ Zn โดยเทคนิค ICP-OES โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำ 7 ครั้ง วิเคราะห์ค่าที่ได้เทียบกับค่าที่รับรอง (Certified value) โดยคำนวณให้อยู่ในค่าร้อยละการกลับคืน (% Recovery) ดังแสดงในตารางที่ 4.5 ค่าร้อยละการกลับคืนเฉลี่ยของ Mn, Fe, Cu และ Zn มีค่าเท่ากับ 103.5, 104.1, 92.4 และ 96.4 ตามลำดับ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 3.2, 3.3, 3.3 และ 1.6 ตามลำดับ ดังนั้น วิธีการเตรียมตัวอย่างและวิธีการวิเคราะห์โดยเทคนิค ICP-OES นี้ให้ผลการวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือได้เนื่องจากมีความถูกต้องและแม่นยำ

4.3.2 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (LOD) และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจหาปริมาณได้ (LOQ)

เมื่อนำสารละลาย Method blank ที่ได้จากวิธีการย่อยด้วยไมโครเวฟไปวิเคราะห์ซ้ำ 7 ครั้ง โดยเทคนิค ICP-OES เพื่อหาสัญญาณการวิเคราะห์ที่ได้ แล้วนำค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณการวิเคราะห์ (Peak Intensity) ของ Mn, Fe, Cu และ Zn ไปคำนวณหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (LOD) และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจหาปริมาณได้ (LOQ) ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (LOD) และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจหาปริมาณได้ (LOQ)

ธาตุที่วิเคราะห์	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)
Mn	4.3	14.4
Fe	13.5	45.0
Cu	1.5	4.9
Zn	6.0	20.0

ตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์สารอ้างอิง (สำหรับ NMIJ CRM 7405-a) โดยเทคนิค ICP-OES

ครั้งที่วิเคราะห์	Mn		Fe		Cu		Zn	
	ค่าที่วิเคราะห์ได้ (mg/kg)	ร้อยละการ กลับคืน	ค่าที่วิเคราะห์ได้ (mg/kg)	ร้อยละการ กลับคืน	ค่าที่วิเคราะห์ได้ (mg/kg)	ร้อยละการ กลับคืน	ค่าที่วิเคราะห์ได้ (mg/kg)	ร้อยละการ กลับคืน
1	13.840	98.2	311.448	100.1	1.377	88.9	12.757	95.2
2	14.781	104.8	335.783	108.0	1.411	91.0	13.125	97.9
3	15.082	107.0	335.309	107.8	1.454	93.8	12.781	95.4
4	14.620	103.7	317.961	102.2	1.500	96.8	13.253	98.9
5	14.037	99.6	309.775	99.6	1.373	88.6	12.709	94.8
6	14.878	105.5	328.995	105.8	1.453	93.8	12.868	96.0
7	14.883	105.6	326.974	105.1	1.462	94.3	12.938	96.5
ค่าเฉลี่ย	14.589	103.5	323.749	104.1	1.433	92.4	12.919	96.4
SD	0.468	3.3	10.774	3.5	0.047	3.0	0.203	1.5
%RSD	3.2	3.2	3.3	3.3	3.3	3.3	1.6	1.6
Certified value	14.1 ± 0.7 mg/kg		311 ± 11 mg/kg		1.55 ± 0.07 mg/kg		13.4 ± 0.5 mg/kg	

4.3.3 การศึกษาสมดุลมวลสาร

ในการประเมินความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ของการศึกษาปริมาณการดูดซึมได้นั้น ได้อาศัยวิธีสมดุลมวลสาร (Mass-balance approach) ซึ่งทำได้โดยการนำสารอ้างอิง (สำหรับ NMIJ CRM 7405-a) มาย่อยโดยระบบการจำลองการย่อยอาหารใน 3 ขั้นตอน ได้แก่ ในปาก ในกระเพาะอาหาร และในลำไส้เล็ก หลังจากนั้นจึงนำของเหลวที่ได้จากการย่อย ได้แก่ ของเหลวที่ได้จากการย่อยในกระเพาะอาหาร ของเหลวที่ได้จากการย่อยในลำไส้เล็ก (ตามวิธีการในข้อ 3.3.2) และกากที่เหลือจากการย่อย (ซึ่งได้ผ่านการย่อยด้วยระบบไมโครเวฟ) ไปวิเคราะห์หาปริมาณ Mn, Fe, Cu และ Zn ด้วยเทคนิค ICP-OES โดยการอาศัยวิธีสมดุลมวลสารจะทำให้ได้ว่า ปริมาณของแร่ธาตุที่มีอยู่ในสารหยาบก่อนการย่อย (ได้จากการย่อยด้วยระบบไมโครเวฟ) จะมีค่าเท่ากับปริมาณของแร่ธาตุที่ได้จากการย่อยด้วยระบบการจำลองการย่อยอาหารรวมกับกากที่เหลือจากการย่อย และผลจากการใช้สถิติทดสอบที (T-test) พบว่าปริมาณของแร่ธาตุที่มีอยู่ในสารหยาบก่อนการย่อย มีค่าไม่แตกต่างกันกับปริมาณของแร่ธาตุที่ได้จากการย่อยด้วยระบบการจำลองการย่อยอาหารรวมกับกากที่เหลือจากการย่อย ($P > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบผลการทดลองจากวิธีการจำลองการย่อยอาหารและวิธีการย่อยด้วยไมโครเวฟ

Element	No. of replicate	Gastric Phase (A)		GasIntestinal Phase (B)		Residue (C)		Total conc. (A+B+C)	Total conc. (Microwave digestion)	P-value
		Conc., mg/kg	Bioacc. (%)	Conc., mg/kg	Bioacc. (%)	Conc., mg/kg	Total conc. (%)			
Mn	1	8.2	52.9	5.2	33.2	2.2	14.0	15.6	14.0	0.055
	2	8.3	52.4	4.8	30.0	2.8	17.6	15.8	14.9	
	3	8.6	56.5	4.7	30.7	2.0	12.9	15.2	14.9	
	Mean±SD	8.4 ± 0.2	53.9 ± 2.2	4.9 ± 0.3	31.3 ± 1.7	2.3 ± 0.4	14.8 ± 2.5	15.5 ± 0.3	14.6 ± 0.5	
Fe	1	37.5	12.5	25.1	8.3	238.8	79.2	301.4	309.8	0.678
	2	35.3	11.0	18.4	5.8	265.7	83.2	319.4	329.0	
	3	38.5	11.6	23.0	7.0	269.3	81.4	330.9	327.0	
	Mean±SD	37.1 ± 1.7	11.7 ± 0.7	22.2 ± 3.4	7.0 ± 1.3	257.9±16.7	81.3 ± 2.0	317.2±14.9	321.9±10.6	
Cu	1	0.6	32.4	0.6	31.5	0.6	36.1	1.7	1.4	0.089
	2	0.5	30.1	0.3	18.1	0.8	51.8	1.5	1.5	
	3	0.6	38.7	0.3	16.2	0.8	45.1	1.7	1.5	
	Mean±SD	0.6 ± 0.1	33.7 ± 4.4	0.4 ± 0.2	22.0 ± 8.3	0.7 ± 0.1	44.3 ± 7.9	1.6 ± 0.1	1.4 ± 0.05	
Zn	1	4.2	37.1	1.0	8.8	6.1	54.1	11.2	12.7	0.267
	2	6.1	45.8	1.1	8.3	6.1	45.9	13.3	12.9	
	3	5.2	45.2	0.7	6.0	5.6	48.8	11.4	12.9	
	Mean±SD	5.1 ± 1.0	42.7 ± 4.9	0.9 ± 0.2	7.7 ± 1.5	5.9 ± 0.3	49.6 ± 4.1	12.0 ± 1.2	12.8 ± 0.1	

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้วัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณแร่ธาตุปริมาณน้อย (Trace elements) ที่มีในสาหร่ายขนนก (*Caulerpa racemosa* var. *corynephora*) ได้แก่ Mn, Fe, Cu และ Zn และเพื่อวิเคราะห์ปริมาณการดูดซึมได้ของแร่ธาตุทั้ง 4 ชนิดนี้ เก็บตัวอย่างสาหร่ายโดยวิธีการสุ่มจากตลาดในอำเภอตลอดแนวชายฝั่งทะเลอันดามัน จังหวัดกระบี่ 5 อำเภอ ได้แก่ อำเภออ่าวลึก (ตลาดอ่าวลึก, S1) อำเภอเมือง (ตลาดชุมชนตำบลเขาคราม, S2) อำเภอเหนือคลอง (ตลาดบ้านบางฝ้าง, S3 และตลาดรุ่งโรจน์, S4) อำเภอคลองท่อม (ตลาดคลองท่อมใต้, S5) และอำเภอเกาะลันตา (ชุมชนบ้านหัวหิน, S6) ใช้สาหร่ายจำนวน 3 ตัวอย่าง ต่อ 1 จุดเก็บตัวอย่าง ดำเนินการเก็บตัวอย่างในฤดูร้อน (เดือนเมษายน พ.ศ. 2555) เตรียมตัวอย่างสาหร่ายโดยวิธีการย่อยด้วยกรดโดยใช้ระบบไมโครเวฟตามวิธีมาตรฐาน EPA 3052 โดยใช้สาหร่ายปริมาณ 0.5 กรัม เติมน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เติมน้ำ H_2O_2 (30%) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และ HNO_3 (67%) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร โดยใช้โปรแกรมการให้ความร้อน หลังจากนั้นจึงนำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณ Mn, Fe, Cu และ Zn โดยเทคนิค ICP-OES ผลการศึกษาพบว่า ปริมาณที่พบในสาหร่ายเรียงลำดับจากน้อยไปมากได้ดังนี้ คือ $Cu < Zn < Mn < Fe$ โดยมีปริมาณเฉลี่ยเท่ากับ 17.4 ± 15.1 , 59.0 ± 35.1 , 63.4 ± 20.0 และ 450.5 ± 129.8 mg/kg น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับผลที่ได้กับปริมาณที่แนะนำให้บริโภคต่อวัน (Recommended dietary allowance, RDA) และปริมาณสูงสุดที่บริโภคได้ (Upper levels of tolerable intake, UL) พบว่าแร่ธาตุที่มีอยู่ในสาหร่ายสด 1 กิโลกรัมมีปริมาณใกล้เคียงและน้อยกว่าปริมาณที่แนะนำให้บริโภคต่อวัน สำหรับในประเทศไทย ได้มีการกำหนดเกณฑ์มาตรฐานในประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 (พ.ศ. 2529) เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน สำหรับ Cu และ Zn กำหนดไว้ให้มีค่าไม่เกิน 20 และ 100 mg ต่อน้ำหนักอาหาร 1 กิโลกรัม (น้ำหนักสด) ตามลำดับ จากผลที่ได้พบว่าตัวอย่างสาหร่ายทั้งหมดจากแหล่งเก็บตัวอย่างทั้ง 6 แหล่ง มีปริมาณของ Cu และ Zn ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานนี้มาก ไม่มีแนวโน้มที่จะก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคอันเนื่องมาจากปริมาณของแร่ธาตุ 4 ชนิดนี้

การศึกษาปริมาณการดูดซึมได้ของแร่ธาตุในตัวอย่างสาหร่าย อาศัยการจำลองระบบการย่อยอาหารตามวิธี Unified BARGE Method หรือ UBM โดยการย่อยอาหารใน 3 ขั้นตอน ได้แก่ ปาก (ใช้เวลา 5 นาที) กระเพาะอาหาร (ใช้เวลา 1 ชั่วโมง) และในส่วนของลำไส้เล็ก (ใช้เวลา 4 ชั่วโมง) โดยใช้ น้ำย่อยสังเคราะห์ 4 ชนิด ได้แก่ น้ำลาย น้ำย่อยในกระเพาะอาหาร น้ำย่อยในลำไส้เล็ก และน้ำดี การควบคุม pH และอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญในการจำลองระบบการย่อยอาหาร เนื่องจาก

เป็นปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณของสารที่จะสามารถถูกย่อยออกมาสู่สารละลายได้ ค่า pH ของน้ำย่อยที่ใช้ในการย่อยในกระเพาะอาหาร (Gastric phase) และน้ำย่อยที่ใช้ในการย่อยในลำไส้เล็ก (Gastro-intestinal phase) จะต้องมีความอยู่ในช่วง 1.20 ± 0.05 และ 6.30 ± 0.5 ตามลำดับ และใช้อุณหภูมิ 37°C ในการย่อยเนื่องจากเป็นอุณหภูมิของร่างกายที่เหมาะสมต่อสภาวะการทำงานของเอนไซม์ นำของเหลวที่ได้จากการย่อยไปวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักโดยเทคนิค ICP-OES ปริมาณการดูดซึมได้สามารถคำนวณจากปริมาณของแร่ธาตุที่ได้จาก 2 เฟสรวมกัน ได้แก่ เฟสการย่อยในกระเพาะอาหาร และเฟสการย่อยในลำไส้เล็ก สำหรับ Mn ปริมาณการดูดซึมได้ในเฟสการย่อยในกระเพาะอาหาร และเฟสการย่อยในลำไส้เล็ก มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 46.1-55.3 และ 34.8-44.8 ตามลำดับ และปริมาณการดูดซึมได้ของ Mn จากทั้งสองเฟสมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 81.6-91.0 ซึ่งมีค่าสูงที่สุดรองลงมาก็คือ Cu ปริมาณการดูดซึมได้ในเฟสการย่อยในกระเพาะอาหาร และเฟสการย่อยในลำไส้เล็ก มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 28.7-37.3 และ 33.0-39.4 ตามลำดับ และปริมาณการดูดซึมได้รวมของ Cu มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 63.9-71.0 สำหรับ Zn มีปริมาณการดูดซึมได้อยู่ในช่วงร้อยละ 34.7-44.0 และ 3.5-8.6 ในเฟสการย่อยในกระเพาะอาหาร และเฟสการย่อยในลำไส้เล็ก ตามลำดับ และมีปริมาณการดูดซึมได้รวมอยู่ในช่วงร้อยละ 42.8-51.9 ในขณะที่ปริมาณการดูดซึมได้ของ Fe มีค่าต่ำสุด มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 10.5-14.9 และ 7.9-11.2 ในเฟสการย่อยในกระเพาะอาหาร และเฟสการย่อยในลำไส้เล็ก ตามลำดับ และปริมาณการดูดซึมได้รวมมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 19.2-25.6 สามารถเรียงลำดับจากน้อยไปมากของร้อยละปริมาณการดูดซึมได้ของทั้ง 4 ธาตุที่ศึกษา คือ $\text{Fe} < \text{Zn} < \text{Cu} < \text{Mn}$ ในขณะที่ปริมาณของแร่ธาตุที่มีอยู่ในสาหร่ายมีปริมาณเรียงลำดับจากน้อยไปมาก คือ $\text{Cu} < \text{Zn} < \text{Mn} < \text{Fe}$ จะเห็นได้ว่า Fe ซึ่งมีปริมาณมากที่สุดในสาหร่ายแต่มีปริมาณการดูดซึมได้ต่ำสุด สำหรับ Cu มีปริมาณน้อยที่สุดในสาหร่ายแต่มีปริมาณการดูดซึมได้ค่อนข้างสูง

ในงานวิจัยนี้ได้ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณโลหะทั้งหมด (Total metal concentration) โดยการวิเคราะห์สารอ้างอิง (สาหร่าย NMIJ CRM 7405-a) พบว่าค่าร้อยละการกลับคืนเฉลี่ยของ Mn, Fe, Cu และ Zn มีค่าเท่ากับ 103.5, 104.1, 92.4 และ 96.4 ตามลำดับ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 3.2, 3.3, 3.3 และ 1.6 ตามลำดับ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (LOD) สำหรับ Mn, Fe, Cu และ Zn มีค่าเท่ากับ 4.3, 13.5, 1.5 และ 6.0 ng/g ตามลำดับ และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจหาปริมาณได้ (LOQ) มีค่าเท่ากับ 14.4, 45.0, 4.9 และ 20.0 ng/g ตามลำดับ ในการประเมินความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณการดูดซึมได้อาศัยวิธีสมดุลมวลสาร (Mass-balance approach) พบว่าปริมาณของแร่ธาตุที่มีอยู่ในสาหร่ายก่อนการย่อย มีค่าไม่แตกต่างกันกับปริมาณของแร่ธาตุที่ได้จากการย่อยด้วยระบบการจำลองการย่อยอาหารรวมกับกากที่เหลือจากการย่อย ($P > 0.05$)

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรขยายพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างให้ครอบคลุมจังหวัดอื่นๆ ตลอดแนวชายฝั่งอันดามันที่เป็นแหล่งของสาหร่ายขนนก เพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น
2. ควรศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของแร่ธาตุที่มีอยู่ในน้ำทะเล ดินตะกอน และสาหร่าย เพื่อคาดการณ์แนวโน้มของปริมาณแร่ธาตุแต่ละชนิดที่พบในสาหร่าย
3. ควรมีการศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ที่มีต่อปริมาณการดูดซึมได้ของแร่ธาตุแต่ละชนิด เช่น องค์ประกอบที่มีในสาหร่าย ได้แก่ เส้นใย คาร์โบไฮเดรต โปรตีน เป็นต้น
4. ควรมีการพัฒนาวิธีการ/เครื่องมือในการจำลองระบบการย่อยอาหาร (*In vitro* gastrointestinal digestion) ให้สามารถทำการทดลองได้ในระบบที่ง่าย และรวดเร็วขึ้น
5. ควรหาแนวทางในการเปรียบเทียบผลที่ได้จากวิธี *In vitro* gastrointestinal digestion กับวิธี *In vivo* gastrointestinal digestion เพื่อความเชื่อถือได้มากยิ่งขึ้นของผลการวิเคราะห์

เอกสารอ้างอิง

- กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง. 2553. **สาหร่ายสาย พืชมหัศจรรย์ สารพันประโยชน์**. กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. กรุงเทพฯ. 36 หน้า.
- มณฑนา นวลเจริญ และรพีพรรณ เลหาบรรจง. 2554. **สาหร่ายขนนกและการเพาะเลี้ยง สำหรับการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน**. เชียงใหม่: บริษัท เชียงใหม่ดอคคิวเมนท์ ดีไซน์. 32 หน้า.
- วิกิพีเดีย. 2553. **ระบบทางเดินอาหารของมนุษย์**. [Online]. เข้าถึงได้จาก [http://th.wikipedia.org/wiki/\[2553, มีนาคม 1\]](http://th.wikipedia.org/wiki/[2553, มีนาคม 1])
- Abu-Samra, A., Morris, J. S. and Koityohann, S. R. (1975). Wet ashing of some biological samples in a microwave oven. *Analytical Chemistry*, 47, 1475-1477.
- Bermejo, P. et al. (2002). Iron and zinc in hydrolysed fractions of human milk and infant formulas using an *in vitro* method. *Food Chemistry*, 77, 361-369.
- Besada, V., et al. (2009). Heavy metals in edible seaweeds commercialised for human consumption. *Journal of Marine Systems*, 75, 305-313.
- Bou, R. et al. (2004). 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*, 19, 1361-1369.
- Cabanero, A.I. et al. (2004). Selenium and mercury bioaccessibility in fish samples: an *in vitro* digestion method. *Analytica Chimica Acta*, 526, 51-61.
- Crews, H.M. et al. (1985). Comparison of trace elements solubility from food items treated separately and in combination. *Z. Lebensm-Unters.-Forsch.*, 180, 405-410.
- Davis, T.A., Volesky, B. and Mucci, A. (2003). A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Research*, 37, 4311-4330.
- Dean, J.R. (2003). *Methods for Environmental Trace Analysis*. Chichester: John Wiley & Sons.
- Dean, J.R. and Ma, R. (2007). Approaches to assess the oral bioaccessibility of persistent organic pollutants: A critical review. *Chemosphere*, 68, 1399-1407.
- Dickinson, A. (2002). *The benefits of nutritional supplements*. Council for Responsible Nutrition (CRN).

- Domínguez-González, R. et al. (2010). Evaluation of an *in vitro* method to estimate trace elements bioavailability in edible seaweeds. *Talanta*, 82, 1668-1673.
- García-Sartal, C. et al. (2011). Use of an *in vitro* digestion method to evaluate the bioaccessibility of arsenic in edible seaweed by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Microchemical Journal*, 98, 91-96.
- Huerta-Díaz, M.A. et al. (2007). Iron, manganese and trace metal concentrations in seaweeds from the central west coast of the Gulf of California. *Applied Geochemistry*, 22, 1380-1392.
- 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.
- Jacobs, A. and Greenman, D.A. (1969). Availability of food iron. *British Medical Journal*, 1, 673-676.
- Koch, I. et al. (2007). Arsenic bioaccessibility and speciation in clams and seaweed from a contaminated marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 54, 586-594.
- Kumar, M. et al. (2011). Assessment of nutrient composition and antioxidant potential of *Caulerpaceae* seaweeds. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 270-278.
- Laird, B.D. and Chan H.M. (2013). Bioaccessibility of metals in fish, shellfish, wild game, and seaweed harvested in British Columbia, Canada. *Food and Chemical Toxicology*, 58, 381-387.
- Lopez, F.F. et al. (2002). Aluminum levels in convenience and fast foods: *in vitro* study of the absorbable fraction. *The Science of the Total Environment*, 300, 69-79.
- 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.
- Minekus, M. et al. (1995). A Multicompartmental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small Intestine. *ALTA*, 23, 197-209.

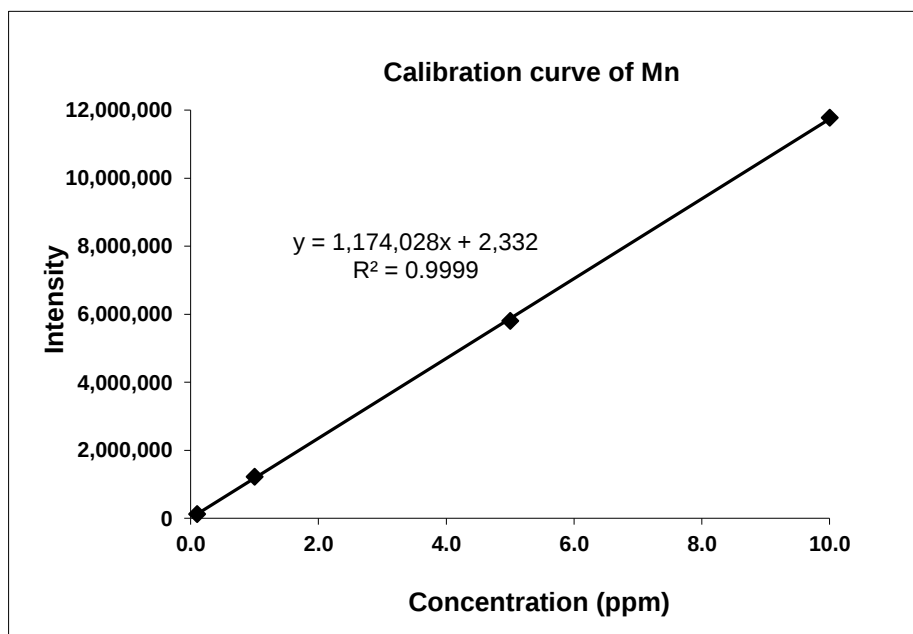
- Moreda-Piñeiro, J. et al. (2012). Trace metals in marine foodstuff: Bioavailability estimation and effect of major food constituents. *Food Chemistry*, 134, 339-345.
- Mounicou, S. et al. (2002). Development of a sequential enzymolysis approach for the evaluation of the bioaccessibility of Cd and Pb from cocoa. *Analyst*, 127, 1638-1641.
- Navarro, P. et al. (2008). Evaluation of the physiologically based extraction test as an indicator of metal toxicity in mussel tissue. *Analytica Chimica Acta*, 622, 126-132.
- Okorie, A., Entwistle, J. and Dean, J.R. (2011). The application of *in vitro* gastrointestinal extraction to assess oral bioaccessibility of potentially toxic elements from an urban recreational site. *Applied Geochemistry*, 26, 789-796.
- 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.
- Oomen, A.G. et al. (2003). Development of an *in vitro* digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 44, 281-287.
- Rao, B.S.N. and Prabhavathi, T. (1978). An *in vitro* method for predicting the bioavailability of iron from food. *American Journal of Clinical Nutrition*, 31, 169-175.
- Rao, P.V.S, Mantri, V.A. and Ganesan, K. (2007). Mineral composition of edible seaweed *Porphyra vietnamensis*. *Food Chemistry*, 102, 215-218.
- Ródenas de la Rocha, S. et al. (2009). Trace elements determination in edible seaweeds by an optimized and validated ICP-MS method. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 330-336.
- Rodriguez, R.R. et al. (1999). An *in vitro* gastrointestinal method to estimate bioavailable arsenic in contaminated soils and solid media. *Environmental Science and Technology*, 33, 642-649.

- Romarís-Hortas, V. et al. (2009). Microwave assisted extraction of iodine and bromine from edible seaweed for inductively coupled plasma-mass spectrometry determination, *Talanta*, 79, 947-952.
- Romarís-Hortas, V. et al. (2011). Bioavailability study using an in-vitro method of iodine and bromine in edible seaweed. *Food Chemistry*, 124, 1747-1752.
- Rotard, W. et al. (1995). 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*, 7, 3-9.
- 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.
- 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.
- Ruperez, P. (2002). Mineral content of edible marine seaweeds. *Food Chemistry*, 79, 23-26.
- Ryan, S., McLoughlin, P. and O'Donovan, O. (2012). A comprehensive study of metal distribution in three main classes of seaweed. *Environmental Pollution*, 167, 171-177.
- Schroder, J.L. et al. (2003). *In vitro* gastrointestinal method to estimate relative bioavailable cadmium in contaminated soil. *Environmental Science and Technology*, 37, 1365-1370.
- USEPA. *Method 3052: Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices*. 1996.
- Williams, T.M. et al. (1998). *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*, 20, 169-177.
- Wragg, J. et al. (2009). *Inter-laboratory Trial of a Unified Bioaccessibility Procedure*. British Geological Survey, OR/07/027.

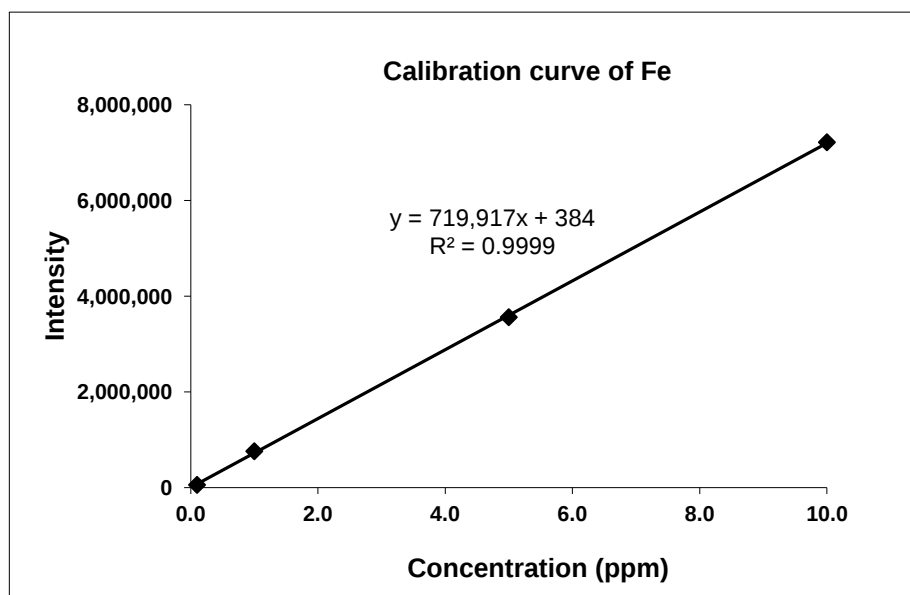
- Wragg, J. et al. (2011). An inter-laboratory trial of the unified BARGE bioaccessibility method for arsenic, cadmium and lead in soil. *Science of the Total Environment*, 409, 4016-4030.
- Yaich, H. et al. (2011). Chemical composition and functional properties of *Ulva lactuca* seaweed collected in Tunisia. *Food Chemistry*, 128, 895-901.
- Yang, K.X. and Swami, K. (2007). Determination of metals in marine species by microwave digestion and inductively coupled plasma mass spectrometry analysis. *Spectrochimica Acta. Part B.*, 62, 1177-1181.

ภาคผนวก ก.

กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

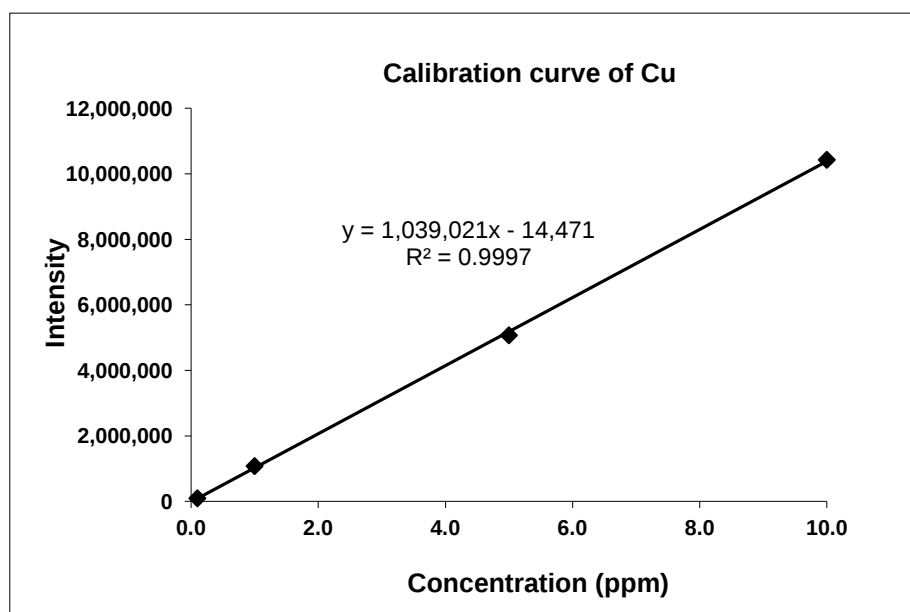


(ก)

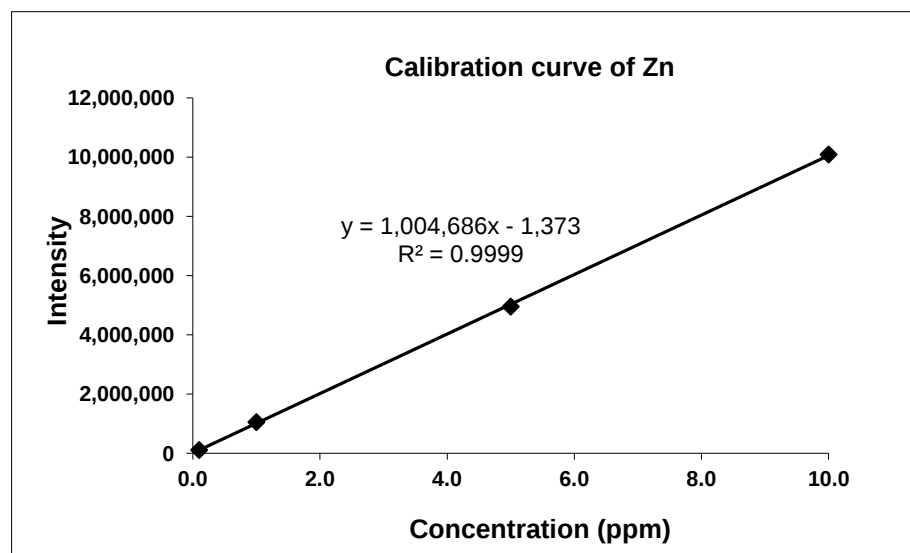


(ข)

รูปที่ ผ-1 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณของ (ก) แมงกานีส (ข) เหล็ก
(ค) ทองแดง และ (ง) สังกะสี



(ค)



(ง)

รูปที่ ผ-1 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณของ (ก) แมงกานีส (ข) เหล็ก
(ค) ทองแดง และ (ง) สังกะสี (ต่อ)

ภาคผนวก ข.

ผลการวิเคราะห์ปริมาณแร่ธาตุและปริมาณการดูดซึมได้ในสาหร่ายขนนก

ตาราง ผ-1 ปริมาณของแร่ธาตุ (ในหน่วย mg/kg น้ำหนักแห้ง) ในสาหร่ายขนนกที่วิเคราะห์โดยเทคนิค ICP-OES

แหล่งตัวอย่าง	ครั้งที่วิเคราะห์	ปริมาณแร่ธาตุ (mg/kg น้ำหนักแห้ง)			
		Mn	Fe	Cu	Zn
S1	1	66.9	342.8	4.5	26.1
	2	67.6	335.8	4.2	26.4
	3	62.1	323.0	3.9	25.7
	Mean±SD	65.5 ± 3.0	333.9 ± 10.0	4.2 ± 0.3	26.1 ± 0.4
S2	1	50.6	444.8	34.3	51.7
	2	52.9	494.1	37.2	58.7
	3	51.5	460.6	38.0	53.3
	Mean±SD	51.7 ± 1.2	466.5 ± 25.2	36.5 ± 1.9	54.6 ± 3.7
S3	1	81.7	482.0	7.5	133.3
	2	79.3	461.7	8.0	130.0
	3	84.3	514.8	8.8	128.9
	Mean±SD	81.8 ± 2.5	486.2 ± 26.8	8.1 ± 0.7	130.7 ± 2.3
S4	1	91.1	584.0	5.1	51.4
	2	87.5	553.2	4.8	51.2
	3	84.9	552.1	4.9	48.4
	Mean±SD	87.9 ± 3.1	563.1 ± 18.1	4.9 ± 0.1	50.3 ± 1.6
S5	1	64.8	254.1	38.4	59.8
	2	63.0	242.2	37.8	57.5
	3	64.2	243.9	40.6	58.0
	Mean±SD	64.0 ± 0.9	246.7 ± 6.4	38.9 ± 1.5	58.4 ± 1.2
S6	1	28.7	583.8	11.3	33.7
	2	29.5	597.0	11.3	33.5
	3	30.0	639.6	11.8	34.0
	Mean±SD	29.4 ± 0.7	606.8 ± 29.2	11.5 ± 0.3	33.7 ± 0.3
Mean±SD (S1-S6)		63.4 ± 20.0	450.5 ± 129.8	17.4 ± 15.1	59.0 ± 35.1

ตาราง ผ-2 ปริมาณ (mg/g น้ำหนักแห้ง) และปริมาณการดูดซึมได้ (ร้อยละ) ของแร่ธาตุในสาหร่ายขนนก
(ก) แมงกานีส

Sampling location	No. of replicate	Gastric Phase (A)		GasIntestinal Phase (B)		Residue (C)		Bioacc. fraction (A+B)		Total conc. (A+B+C)	Total conc. (Microwave digestion)
		Mn, mg/kg	Bioacc. (%)	Mn, mg/kg	Bioacc. (%)	Mn, mg/kg	Total conc. (%)				
								mg/kg	%		
S1	1	33.4	47.6	29.5	42.0	7.3	10.4	62.8	89.6	70.1	66.9
	2	32.0	47.8	28.5	42.5	6.5	9.7	60.5	90.3	67.0	67.6
	3	30.5	47.2	25.3	39.3	8.7	13.5	55.8	86.5	64.5	62.1
	Mean±SD	31.9±1.5	47.5±0.3	27.8±2.2	41.3±1.7	7.5±1.1	11.2±2.0	59.7±3.6	88.8±2.0	67.2±2.8	65.5±3.0
S2	1	27.6	52.6	19.7	37.6	5.1	9.8	47.3	90.2	52.5	50.6
	2	30.3	53.6	21.3	37.7	4.9	8.8	51.6	91.2	56.5	52.9
	3	28.0	52.4	19.6	36.7	5.8	10.9	47.7	89.1	53.5	51.5
	Mean±SD	28.6±1.4	52.9±0.6	20.2±0.9	37.3±0.5	5.3±0.5	9.8±1.1	48.9±2.4	90.2±1.1	54.2±2.1	51.7±1.2
S3	1	38.0	47.0	29.1	36.0	13.8	17.1	67.0	82.9	80.8	81.7
	2	35.7	46.6	26.4	34.5	14.5	18.9	62.1	81.1	76.6	79.3
	3	37.2	46.7	27.1	34.0	15.3	19.2	64.3	80.8	79.6	84.3
	Mean±SD	37.0±1.1	46.8±0.2	27.5±1.4	34.8±1.0	14.5±0.8	18.4±1.2	64.5±2.4	81.6±1.2	79.0±2.2	81.8±2.5

(ก) แมงกานีส (ต่อ)

Sampling location	No. of replicate	Gastric Phase (A)		GasIntestinal Phase (B)		Residue (C)		Bioacc. fraction		Total conc. (A+B+C)	Total conc. (Microwave digestion)
		Mn, mg/kg	Bioacc. (%)	Mn, mg/kg	Bioacc. (%)	Mn, mg/kg	Total conc. (%)	(A+B)			
								mg/kg	%		
S4	1	53.3	56.2	33.2	35.0	8.4	8.8	86.5	91.2	94.9	91.1
	2	48.3	54.9	31.0	35.3	8.6	9.8	79.2	90.2	87.8	87.5
	3	47.9	54.7	31.1	35.5	8.7	9.9	79.0	90.1	87.7	84.9
	Mean±SD	49.8±3.0	55.3±0.8	31.8±1.2	35.2±0.3	8.5±0.1	9.5±0.6	81.6±4.3	90.5±0.6	90.1±4.1	87.9±3.1
S5	1	32.1	49.1	24.6	37.5	8.8	13.4	56.7	86.6	65.4	64.8
	2	29.6	46.8	25.5	40.3	8.2	12.9	55.1	87.1	63.3	63.0
	3	34.2	49.7	25.4	36.9	9.2	13.4	59.5	86.6	68.8	64.2
	Mean±SD	32.0±2.3	48.5±1.5	25.1±0.5	38.2±1.8	8.7±0.5	13.2±0.3	57.1±2.2	86.8±0.3	65.8±2.8	64.0±0.9
S6	1	14.3	45.7	13.6	43.6	3.3	10.7	27.9	89.3	31.3	28.7
	2	12.8	44.3	13.8	48.0	2.2	7.7	26.6	92.3	28.8	29.5
	3	13.7	48.3	12.1	42.9	2.5	8.7	25.8	91.3	28.3	30.0
	Mean±SD	13.6±0.8	46.1±2.0	13.2±0.9	44.8±2.7	2.7±0.6	9.0±1.5	26.8±1.1	91.0±1.5	29.5±1.6	29.4±0.7

(ข) เหล็ก

Sampling location	No. of replicate	Gastric Phase (A)		GasIntestinal Phase (B)		Residue (C)		Bioacc. fraction		Total conc. (A+B+C)	Total conc. (Microwave digestion)
		Fe, mg/kg	Bioacc. (%)	Fe, mg/kg	Bioacc. (%)	Fe, mg/kg	Total conc. (%)	(A+B)			
								mg/kg	%		
S1	1	40.5	11.6	36.0	10.4	271.3	78.0	76.5	22.0	347.8	342.8
	2	41.4	12.2	36.7	10.8	262.4	77.1	78.0	22.9	340.5	335.8
	3	43.3	13.1	34.4	10.5	251.9	76.4	77.7	23.6	329.6	323.0
	Mean±SD	41.7±1.4	12.3±0.8	35.7±1.1	10.5±0.2	261.9±9.7	77.2±0.8	77.4±0.8	22.8±0.8	339.3±9.2	333.9±10.0
S2	1	66.4	15.1	34.2	7.8	339.2	77.1	100.6	22.9	439.8	444.8
	2	68.8	14.1	39.3	8.1	380.2	77.9	108.1	22.1	488.3	494.1
	3	67.4	14.8	36.1	7.9	352.0	77.3	103.5	22.7	455.5	460.6
	Mean±SD	67.5±1.2	14.7±0.5	36.6±2.6	7.9±0.1	357.1±21.0	77.4±0.4	104.1±3.8	22.6±0.4	461.2±24.7	466.5±25.2
S3	1	50.3	10.7	40.1	8.6	377.8	80.7	90.4	19.3	468.2	482.0
	2	48.4	10.7	38.5	8.5	365.4	80.8	86.9	19.2	452.3	461.7
	3	52.2	10.0	46.9	9.0	423.4	81.0	99.1	19.0	522.5	514.8
	Mean±SD	50.3±1.9	10.5±0.4	41.8±4.5	8.7±0.3	388.9±30.5	80.8±0.2	92.2±6.3	19.2±0.2	481.0±36.8	486.2±26.8

(ข) เหล็ก (ต่อ)

Sampling location	No. of replicate	Gastric Phase (A)		GasIntestinal Phase (B)		Residue (C)		Bioacc. fraction		Total conc. (A+B+C)	Total conc. (Microwave digestion)
		Fe, mg/kg	Bioacc. (%)	Fe, mg/kg	Bioacc. (%)	Fe, mg/kg	Total conc. (%)	(A+B)			
								mg/kg	%		
S4	1	80.3	13.2	52.7	8.7	473.4	78.1	133.0	21.9	606.4	584.0
	2	66.1	11.6	50.1	8.8	451.2	79.5	116.2	20.5	567.3	553.2
	3	64.6	11.4	48.4	8.6	451.8	80.0	113.0	20.0	564.8	552.1
	Mean±SD	70.3±8.7	12.1±1.0	50.4±2.2	8.7±0.1	458.8±12.7	79.2±1.0	120.7±10.8	20.8±1.0	579.5±23.3	563.1±18.1
S5	1	40.3	15.4	25.9	9.9	195.3	74.7	66.2	25.3	261.5	254.1
	2	36.4	14.6	22.4	9.0	190.3	76.4	58.8	23.6	249.1	242.2
	3	37.0	14.7	23.0	9.1	191.1	76.1	60.0	23.9	251.1	243.9
	Mean±SD	37.9±2.1	14.9±0.4	23.8±1.9	9.4±0.5	192.2±2.7	75.7±0.9	61.7±4.0	24.3±0.9	253.9±6.7	246.7±6.4
S6	1	87.2	14.4	67.8	11.2	448.3	74.3	154.9	25.7	603.3	583.8
	2	90.0	14.6	70.5	11.5	455.0	73.9	160.5	26.1	615.5	597.0
	3	92.8	14.2	71.7	10.9	490.8	74.9	164.5	25.1	655.3	639.6
	Mean±SD	90.0±2.8	14.4±0.2	70.0±2.0	11.2±0.3	464.7±22.9	74.4±0.5	160.0±4.8	25.6±0.5	624.7±27.2	606.8±29.2

(ค) ทองแดง

Sampling location	No. of replicate	Gastric Phase (A)		GasIntestinal Phase (B)		Residue (C)		Bioacc. fraction		Total conc. (A+B+C)	Total conc. (Microwave digestion)
		Cu, mg/kg	Bioacc. (%)	Cu, mg/kg	Bioacc. (%)	Cu, mg/kg	Total conc. (%)	(A+B)			
								mg/kg	%		
S1	1	1.7	32.5	1.9	35.2	1.7	32.3	3.6	67.7	5.3	4.5
	2	1.6	31.8	1.7	35.5	1.6	32.7	3.3	67.3	4.9	4.2
	3	1.4	32.0	1.6	34.8	1.5	33.2	3.0	66.8	4.5	3.9
	Mean±SD	1.6±0.1	32.1±0.3	1.7±0.1	35.2±0.4	1.6±0.1	32.7±0.5	3.3±0.3	67.3±0.5	4.9±0.4	4.2±0.3
S2	1	13.6	35.3	13.1	34.0	11.8	30.7	26.7	69.3	38.6	34.3
	2	14.7	35.4	13.7	33.1	13.1	31.6	28.5	68.4	41.6	37.2
	3	14.5	34.8	13.4	32.0	13.9	33.2	27.9	66.8	41.8	38.0
	Mean±SD	14.3±0.6	35.2±0.3	13.4±0.3	33.0±1.0	12.9±1.0	31.8±1.3	27.7±0.9	68.2±1.3	40.6±1.8	36.5±1.9
S3	1	2.3	29.0	2.8	35.6	2.8	35.4	5.1	64.6	8.0	7.5
	2	2.4	28.9	2.9	35.3	3.0	35.8	5.3	64.2	8.3	8.0
	3	2.4	28.1	2.9	34.9	3.1	37.1	5.3	62.9	8.5	8.8
	Mean±SD	2.4±0.04	28.7±0.5	2.9±0.1	35.3±0.4	3.0±0.2	36.1±0.9	5.3±0.1	63.9±0.9	8.2±0.3	8.1±0.7

(ค) ทองแดง (ต่อ)

Sampling location	No. of replicate	Gastric Phase (A)		GasIntestinal Phase (B)		Residue (C)		Bioacc. fraction		Total conc. (A+B+C)	Total conc. (Microwave digestion)
		Cu, mg/kg	Bioacc. (%)	Cu, mg/kg	Bioacc. (%)	Cu, mg/kg	Total conc. (%)	(A+B)			
								mg/kg	%		
S4	1	1.6	29.3	2.2	41.5	1.6	29.2	3.8	70.8	5.3	5.1
	2	1.6	30.1	2.0	38.0	1.7	32.0	3.7	68.0	5.4	4.8
	3	1.5	29.7	2.0	38.7	1.6	31.6	3.5	68.4	5.1	4.9
	Mean±SD	1.6±0.1	29.7±0.4	2.1±0.1	39.4±1.9	1.6±0.1	30.9±1.5	3.6±0.1	69.1±1.5	5.3±0.2	4.0±0.1
S5	1	15.4	37.6	14.0	34.1	11.6	28.3	29.4	71.7	41.0	38.4
	2	15.6	38.3	13.3	32.5	12.0	29.2	28.9	70.8	40.9	37.8
	3	15.7	36.0	15.1	34.6	12.8	29.3	30.8	70.7	43.5	40.6
	Mean±SD	15.6±0.1	37.3±1.1	14.1±0.9	33.7±1.1	12.1±0.6	29.0±0.6	29.7±1.0	71.0±0.6	41.8±1.5	38.9±1.5
S6	1	3.8	31.6	4.7	38.6	3.6	29.8	8.5	70.2	12.1	11.3
	2	3.6	31.5	4.2	36.8	3.6	31.7	7.8	68.3	11.4	11.3
	3	3.7	31.1	4.3	35.6	4.0	33.3	8.0	66.7	12.1	11.8
	Mean±SD	3.7±0.1	31.4±0.3	4.4±0.3	37.0±1.5	3.7±0.2	31.6±1.8	8.1±0.4	68.4±1.8	11.9±0.4	11.5±0.3

(จ) สังกะสี

Sampling location	No. of replicate	Gastric Phase (A)		GasIntestinal Phase (B)		Residue (C)		Bioacc. fraction		Total conc. (A+B+C)	Total conc. (Microwave digestion)
		Zn, mg/kg	Bioacc. (%)	Zn, mg/kg	Bioacc. (%)	Zn, mg/kg	Total conc. (%)	(A+B)			
								mg/kg	%		
S1	1	11.5	42.4	2.0	7.4	13.6	50.1	13.5	49.9	27.1	26.1
	2	11.7	43.9	1.9	6.9	13.1	49.1	13.6	50.9	26.7	26.4
	3	11.6	43.8	1.8	6.6	13.1	49.6	13.4	50.4	26.5	25.7
	Mean±SD	11.6±0.1	43.4±0.8	1.9±0.1	7.0±0.4	13.3±0.3	49.6±0.5	13.5±0.1	50.4±0.5	26.8±0.3	26.1±0.4
S2	1	24.2	43.4	3.2	5.8	28.3	50.8	27.4	49.2	55.7	51.7
	2	26.6	42.7	3.9	6.3	31.8	50.9	30.6	49.1	62.3	58.7
	3	23.7	42.3	2.0	3.5	30.5	54.3	25.7	45.7	56.2	53.3
	Mean±SD	24.9±1.6	42.8±0.6	3.0±1.0	5.2±1.5	30.2±1.7	52.0±1.9	27.9±2.5	48.0±1.9	58.1±3.7	54.6±3.7
S3	1	55.4	43.9	12.1	9.6	58.7	46.5	67.5	53.5	126.2	133.3
	2	53.6	42.8	9.7	7.8	61.9	49.4	63.4	50.6	125.2	130.0
	3	56.1	43.0	11.2	8.6	63.0	48.4	67.2	51.6	130.3	128.9
	Mean±SD	55.0±1.2	43.3±0.6	11.0±1.2	8.6±0.9	61.2±2.2	48.1±1.5	66.0±2.3	51.9±1.5	127.2±2.7	130.7±2.3

(จ) สังกะสี (ต่อ)

Sampling location	No. of replicate	Gastric Phase (A)		GasIntestinal Phase (B)		Residue (C)		Bioacc. fraction		Total conc. (A+B+C)	Total conc. (Microwave digestion)
		Zn, mg/kg	Bioacc. (%)	Zn, mg/kg	Bioacc. (%)	Zn, mg/kg	Total conc. (%)	(A+B)			
								mg/kg	%		
S4	1	21.7	40.4	6.5	12.1	25.5	47.5	28.1	52.5	53.6	51.4
	2	22.3	40.8	3.9	7.1	28.5	52.1	26.2	47.9	54.6	51.2
	3	22.0	43.4	2.1	4.1	26.6	52.5	24.1	47.5	50.7	48.4
	Mean±SD	22.0±0.3	41.5±1.6	4.1±2.2	7.8±4.0	26.9±1.5	50.7±2.8	26.1±2.0	49.3±2.8	53.0±2.0	50.3±1.6
S5	1	27.4	44.6	2.6	4.2	31.4	51.2	29.9	48.8	61.3	59.8
	2	26.3	43.2	1.7	2.9	32.8	53.9	28.0	46.1	60.9	57.5
	3	25.7	44.3	2.0	3.5	30.3	52.2	27.8	47.8	58.1	58.0
	Mean±SD	26.5±0.8	44.0±0.8	2.1±0.4	3.5±0.7	31.5±1.3	52.4±1.4	28.6±1.2	47.6±1.4	60.1±1.8	58.4±1.2
S6	1	12.5	37.8	2.4	7.1	18.3	55.1	14.9	44.9	33.1	33.7
	2	10.1	32.5	3.3	10.5	17.6	56.9	13.3	43.1	31.0	33.5
	3	10.9	33.8	2.1	6.6	19.3	59.6	13.0	40.4	32.3	34.0
	Mean±SD	11.2±1.2	34.7±2.7	2.6±0.6	8.1±2.2	18.4±0.8	57.2±2.3	13.8±1.0	42.8±2.3	32.1±1.1	33.7±0.3