

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบคอปเปอร์ในอาหารสัตว์ด้วยเครื่อง ICP-OES

สุนีย์ คณาพิพัฒน์ จารุพันธ์ อัจจุตมานัส พงษ์พิพัฒน์ สุวพัฒน์
ประภาพร วรรณาเขียว สุกัญญา พวงเสียง พรชนิตว์ พรหมคุณ

บทคัดย่อ

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบคอปเปอร์ในอาหารสัตว์ด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer (ICP-OES) โดยขั้นตอนการเตรียมสารละลายตัวอย่างได้ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน AOAC 935.13 (2019) และนำสารละลายตัวอย่างมาตรวจวัดหาปริมาณคอปเปอร์ด้วยเครื่อง ICP-OES ผลการศึกษาพบว่าสารละลายมาตรฐานคอปเปอร์ที่ระดับความเข้มข้น 0-10 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงได้ค่า regression correlation (R^2) เท่ากับ 1.0000 ทำการทดสอบ Spike Sample ในตัวอย่างอาหารไก่ อาหารเป็ด และอาหารสุกร ที่ระดับความเข้มข้น 10, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำการประเมินความแม่นยำ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การกลับคืนได้อยู่ในช่วง 94.19-103.32 ประเมินความเที่ยงภายในสภาวะคงที่ (repeatability) พบว่า $\%RSD_r$ มีค่าน้อยกว่า $\%PRSD_r$ และประเมินความเที่ยงจากการทดสอบซ้ำต่างวัน (within laboratory reproducibility) พบว่า $\%RSD_R$ มีค่าน้อยกว่า $\%PRSD_R$

คำสำคัญ : คอปเปอร์ การทดสอบความใช้ได้ อาหารสัตว์ ICP-OES

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Method Validation of Copper Analytical in Feed by ICP-OES

Sunee Kanapipat Charunan Ajjutamanus Phongpipat Suwapat
Prapaphon Wunnakhieo Sukanya Puangsiang Phonchanit Prommakun

Abstract

Method validation of copper analytical in Feed by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer (ICP-OES). Sample preparation was modified from AOAC 935.13 (2019), the aliquots of sample solution were analyzed for copper with ICP-OES. The study showed that the regression correlation (R^2) of copper standard solution at level 0-10 mg/L was 1.0000. The determination of copper using spiked sample in chicken feed, duck feed and swine feed at concentration level 10, 50 and 100 mg/kg represented that accuracy by percent recovery was 94.19-103.32. Precision by repeatability showed $\%RSD_r$ less than $\%PRSD_r$ and precision by within laboratory reproducibility showed $\%RSD_R$ less than $\%PRSD_R$.

Key word : copper, method validation, feed, ICP-OES

Bureau of Quality Control of Livestock Products.

การทดสอบหาปริมาณการใช้ได้ของวิธีทดสอบคอปเปอร์ในอาหารสัตว์ด้วยเครื่อง ICP-OES

สุนีย์ คณาพิพัฒน์ จารุพันธ์ อัจจุตมานัส พงษ์พิพัฒน์ สุวพัฒน์
ประภาพร วรรณเขียว สุกัญญา พวงเสียง พรชนิตร์ พรหมคุณ

บทนำ

ทองแดง (copper, Cu) เป็นธาตุโลหะทรานซิชันธาตุหนึ่ง มีเลขเชิงอะตอม 29 น้ำหนักเชิงอะตอม 63.546 สัญลักษณ์ธาตุคือ Cu (Meija *et al.*, 2016) ต่อมาเรียกทองแดงด้วยคำละตินว่า cuprum ทองแดงเป็นองค์ประกอบของแร่ที่มีสีน้ำเงินหรือเขียว เช่น อะซูไรต์ (azurite) มาลาไคต์ (malachite) หรือ เทอร์คอยซ์ (turquoise) เป็นต้น ทองแดงมีคุณสมบัติคล้ายเหล็ก ในแง่ทำปฏิกิริยาได้สารเชิงซ้อน ซึ่งมีเสถียรภาพมาก และปรับเปลี่ยนสถานะออกซิเดชัน ($\text{Cu}^+ \leftrightarrow \text{Cu}^{2+}$) ง่าย โดยการถ่ายโอนอิเล็กตรอนคิวปริกไอออน (Cu^{2+}) อาจถูกรีดิวซ์กลายเป็นคิวปรัสไอออน (Cu^+) ได้ แต่ออกซิเดชันกลับไม่เสถียรในสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 10^{-7} โมลาร์ ในกรณีนี้ทองแดงจึงมีความคล้ายคลึงกับเหล็กในด้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน (ยงยุทธ, 2558)

ทองแดงเป็นธาตุที่ร่างกายสัตว์ต้องการในปริมาณเล็กน้อย (trace element) แต่มีความจำเป็นเนื่องจากเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์และโปรตีนหลายชนิด เช่น Ceruloplasmin, Cytochrome c oxidase, Diamine oxidase, Dopamine- β -monooxygenase, Hephaestin, Ferroxidase II, Lysyl oxidases, Monoamine oxidase, Peptidylglycine- α -amidating monooxygenase, Superoxide dismutases, Thiol oxidase และ Tyrosinase เป็นต้น โดย Ceruloplasmin มีความจำเป็นต่อการสร้างฮีโมโกลบินเช่นเดียวกับเหล็ก แม้ว่าทองแดงจะไม่ได้เป็นส่วนประกอบของฮีโมโกลบินก็ตาม (Suttle, 2010) โดยทำหน้าที่เปลี่ยนธาตุเหล็กจากสภาพเฟอร์รัส (Fe^{2+}) เป็นเฟอร์ริก (Fe^{3+}) ซึ่งเป็นสภาพที่ใช้ในการสร้างเม็ดเลือดแดง การขาดธาตุทองแดงจึงมีผลต่อการสร้างเม็ดเลือดแดงของสัตว์ด้วย นอกจากนี้ทองแดงยังเป็นประกอบหลักใน haemocyanin ของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (invertebrate) เช่น กุ้ง หอย ปู มีหน้าที่เป็นตัวพาออกซิเจนไปยังเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของร่างกายเช่นเดียวกับเม็ดเลือดแดงในสัตว์มีกระดูกสันหลังทั่วไป (อุทัย, 2559) โดยปกติแล้วร่างกายสัตว์จะดูดซึมได้ 30-40% ของปริมาณทองแดงที่ได้รับผ่านการกินทั้งหมด แต่ถ้าได้รับ Zn, Cd, Mo, ซัลเฟต (Sulfate; SO_4) และไฟเตตมาก จะทำให้ Cu ดูดซึมได้น้อยลง (วรรณพร, 2560)

การขาดธาตุทองแดงทำให้การสร้างเม็ดเลือดแดงลดลง ระบบประสาทผิดปกติ การพัฒนากระดูกผิดปกติ เส้นเลือดแดงแตก สีขนของสัตว์ผิดปกติ ท้องร่วง ลำไส้ทำงานผิดปกติ (วรรณพร, 2560; อุทัย, 2559; Suttle, 2010) การเกิดพิษขึ้นอยู่กับปริมาณ ช่องทางที่ได้รับ และสภาพร่างกายของสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งปัจจัยที่ส่งผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของทองแดง เช่น ภาวะต่าง ๆ ที่ทำให้ทองแดงถูกดูดซึมหรือสะสมมากขึ้น มีอิทธิพลต่อความเป็นพิษ สำหรับระยะเวลาหลังได้รับสารพิษจนกระทั่งสัตว์แสดงอาการป่วยออกมานั้น (onset) ขึ้นกับความเข้มข้นของทองแดงที่ได้รับเข้าสู่ร่างกาย พิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรัง พบได้บ่อยที่สุดในแกะ สุนัขบางพันธุ์มีความไวต่อพิษของ

ทองแดงมากกว่าพันธุ์อื่น ๆ เช่น สุนัขพันธุ์เบดลิงตันเทอเรียร์ (Bedlington terriers) ไวต่อพิษของทองแดงที่สุด นอกจากนี้มีรายงานพบพิษเรื้อรังในสุนัขพันธุ์ลาบราดอร์รีทรีฟเวอร์ (Labrador retrievers), เวสต์ไฮแลนด์ไวต์เทอเรียร์ (West highland white terriers), สกาย์เทอเรียร์ (Skye terriers), เคสฮอนด์ (Keeshonds), อเมริกันคอร์กเกอร์สแปเนียล (American cocker Spaniels) และโดเบอร์แมนพินเชอร์ (Doberman pinschers) การเกิดพิษเฉียบพลัน อาจเกิดจากสัตว์ได้รับสารประกอบเกลือทองแดงที่ละลายน้ำได้ซึ่งผสมอยู่ในยาถ่ายพยาธิ หรือในแร่ธาตุเสริมมากเกินไปขนาดสัตว์จะมีการกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบอย่างรุนแรง ปวดท้อง ท้องเสีย เบื่ออาหาร ขาดน้ำ และช็อก หากผ่านไป 3 วันแล้วสัตว์ยังไม่ตาย อาจพบมีอาการเม็ดเลือดแดงแตก และเฮโมโกลบินูเรียตามมา ส่วนการเกิดพิษเรื้อรัง พบได้บ่อยในแกะที่กินทองแดงมากเกินไปเป็นระยะเวลาานาน แต่สัตว์จะไม่มีอาการ ใด ๆ จนกว่าทองแดงที่ถูกเก็บไว้ในตับจะถูกปล่อยออกในปริมาณมาก ระดับของทองแดงในเลือดที่สูงขึ้นอย่างกะทันหัน ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Lipid peroxidation) และเม็ดเลือดแดงแตก สัญญาณเตือนล่วงหน้าของภาวะวิกฤตจากเม็ดเลือดแดงแตก (hemolytic crisis) โดยก่อนเกิดภาวะวิกฤตเม็ดเลือดแดงแตกราว 1 สัปดาห์ อาจพบค่าเอนไซม์ตับ เช่น แอสปาเทอะมิโนทรานสเฟอเรส (aspartate aminotransferase; AST) และอะลานีน อะมิโนทรานสเฟอเรส (alanine aminotransferase; ALT) สูงผิดปกติ ในระหว่างที่เกิดภาวะวิกฤตเม็ดเลือดแดงแตก พบมีภาวะเมทเฮโมโกลบินูเรีย เฮโมโกลบินูเรีย (hemoglobinemia) ค่าปริมาตรเซลล์อัดแน่น (packed cell volume) และระดับกลูตาไทโอนในเลือดต่ำผิดปกติ (เนาวรัตน์, 2559)

คณะกรรมการยุโรป (European Commission, 2018) ประกาศกฎระเบียบของสหภาพยุโรป 2018/1039 กำหนดปริมาณทองแดงในอาหารสัตว์สำหรับสัตว์ชนิดต่าง ๆ ไว้ดังนี้ ลูกหมูที่ยังไม่หย่านมถึงลูกหมูที่หย่านมแล้ว 4 สัปดาห์ ไม่เกิน 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ลูกหมูที่หย่านมแล้ว 5 ถึง 8 สัปดาห์ ไม่เกิน 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โคเนื้อและโคนม ไม่เกิน 30 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โคเนื้อและโคนมที่เริ่มเคี้ยวเอื้อง ไม่เกิน 15 มิลลิกรัม/กิโลกรัม แพะ ไม่เกิน 35 มิลลิกรัม/กิโลกรัม แกะ ไม่เกิน 15 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สัตว์เคี้ยวเอื้องชนิดอื่น ไม่เกิน 30 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สัตว์ปีกและสัตว์ชนิดอื่น ๆ ไม่เกิน 25 มิลลิกรัม/กิโลกรัม นอกจากนี้ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ ปริมาณการใช้ และเงื่อนไขในการห้ามผลิต นำเข้า หรือขายอาหารสัตว์ พ.ศ. 2559 ได้กำหนดปริมาณทองแดงสูงสุดที่กำหนดให้มีในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับสัตว์ประเภทต่าง ๆ ดังนี้ ไก่และเป็ด ไม่เกิน 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สุกรมีไม่เกิน 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และโคมีไม่เกิน 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (ราชกิจจานุเบกษา, 2559)

ห้องปฏิบัติการงานเคมี กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ได้ทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบคอปเปอร์ในอาหารสัตว์ ด้วยเครื่อง ICP-OES เพื่อให้ผลการทดสอบ มีความน่าเชื่อถือ เกิดความเชื่อมั่นในวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้น เป็นไปตามมาตรฐานสากล

1. วัตถุประสงค์

- 1.1 เพื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบคอปเปอร์ในอาหารสัตว์ด้วยเครื่อง ICP-OES
- 1.2 เพื่อให้เกิดความมั่นใจว่าวิธีทดสอบคอปเปอร์ในอาหารสัตว์ด้วยเครื่อง ICP-OES เป็นวิธีทดสอบที่เหมาะสมกับวัตถุประสงค์การใช้งานและผลการทดสอบมีความน่าเชื่อถือ เป็นที่ยอมรับความสามารถตามมาตรฐาน ISO/IEC17025

2. ขอบข่าย

ดำเนินการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบคอปเปอร์ในอาหารสัตว์ด้วยเครื่อง ICP-OES ดังนี้

- 2.1 หาสถานะของเครื่อง ICP-OES ที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นวิธีทดสอบ
- 2.2 ทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (Linearity)
- 2.3. ความแม่นยำ (Accuracy)
- 2.4. ความเที่ยง (Precision)
 - 2.4.1 Repeatability
 - 2.4.2 Within laboratory reproducibility

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 3.1 ได้วิธีทดสอบคอปเปอร์ในอาหารสัตว์ด้วยเครื่อง ICP-OES ที่ผ่านการทดสอบความใช้ของวิธีทดสอบแล้ว เพื่อให้เป็นไปตามระบบ ISO/IEC 17025
- 3.2 เพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นและยอมรับในวิธีทดสอบคอปเปอร์ในอาหารสัตว์

4. วิธีดำเนินการ

- 4.1 ใช้ตัวอย่างอาหารสัตว์ ที่บดผ่าน sieve ขนาด 1 มิลลิเมตร
- 4.2 สารเคมี
 - 4.2.1 กรดไนตริก (Nitric acid, HNO_3) AR grade ความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 68%
 - 4.2.2 สารละลายกรดไนตริก 2% (v/v)
 - 4.2.3 กรดเปอร์คลอริก (Perchloric acid, HClO_4) AR grade ความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 69%
 - 4.2.4 น้ำขจัดไอออน ความต้านทานไม่น้อยกว่า $18 \text{ M}\Omega/\text{cm}^{-1}$
- 4.3 สารละลายมาตรฐาน
 - 4.3.1 Stock copper standard solution ความเข้มข้น 1000 mg/L
 - 4.3.2 การเตรียม Intermediate copper standard solution ความเข้มข้น 100 mg/L
ปิเปต Stock copper standard solution ความเข้มข้น 1000 mg/L ปริมาตร 5 mL ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 50 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยกรดไนตริก 2%
 - 4.3.3 การเตรียม Working copper standard solution ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 10 mg/L
 - 4.3.3.1 Working copper standard solution ความเข้มข้น 1 mg/L
ปิเปต Intermediate copper standard solution ความเข้มข้น 100 mg/L ปริมาตร 0.5 mL ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 50 mL และปรับปริมาตรด้วยกรดไนตริก ความเข้มข้น 2%
 - 4.3.3.2 Working copper standard solution ความเข้มข้น 2 mg/L

ปิเปต Intermediate copper standard solution เข้มข้น 100 mg/L ปริมาตร 1 mL ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 50 mL และปรับปริมาตรด้วยกรดไนตริก ความเข้มข้น 2%

4.3.3.3 Working copper standard solution ความเข้มข้น 4 mg/L

ปิเปต Intermediate copper standard solution เข้มข้น 100 mg/L ปริมาตร 2 mL ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 50 mL และปรับปริมาตรด้วยกรดไนตริก ความเข้มข้น 2%

4.3.3.4 Working copper standard solution ความเข้มข้น 8 mg/L

ปิเปต Intermediate copper standard solution ความเข้มข้น 100 mg/L ปริมาตร 4 mL ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 50 mL และปรับปริมาตรด้วยกรดไนตริก ความเข้มข้น 2%

4.3.3.5 Working copper standard solution ความเข้มข้น 10 mg/L

ปิเปต Intermediate copper standard solution ความเข้มข้น 100 mg/L ปริมาตร 5 mL ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 50 mL และปรับปริมาตรด้วยกรดไนตริก ความเข้มข้น 2%

4.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ

4.4.1 เครื่องวิเคราะห์แร่ธาตุ (Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectrometer; ICP-OES) ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น Optima 2100DV

4.4.2 เครื่องชั่งไฟฟ้า ชั่งได้ละเอียด 0.0001 g

4.4.3 เครื่องดูดจ่ายสารละลาย (Dispenser) ขนาด 10 mL และ 50 mL

4.4.4 แท่นความร้อน (Hot plate)

4.4.5 Beaker ขนาด 100 mL

4.4.6 Volumetric flask class A ขนาด 50 ,100 และ 250 mL

4.4.7 Volumetric pipette Class A ขนาด 0.5, 1, 2, 4 และ 5 mL

4.4.8 Dropper

4.4.9 หลอดใส่ตัวอย่าง (Tube) ขนาด 50 mL พร้อมฝาปิด

4.4.10 กระจกทรงเบอร์ 4

4.5 ขั้นตอนการปฏิบัติงาน

4.5.1 วิธีทดสอบคอปเปอร์ในอาหารสัตว์ด้วยเครื่อง ICP-OES

4.5.1.1 ชั่งตัวอย่าง 1.0000 g ใส่ลงใน Beaker ขนาด 100 mL

4.5.1.2 เติมกรดไนตริกเข้มข้น ปริมาตร 20 mL นำไปย่อยบนแท่นความร้อนจนหมดควันสีแดง ยกออกจากแท่นความร้อนแล้วทิ้งไว้ให้เย็น

4.5.1.3 เติมกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น ปริมาตร 10 mL นำไปย่อยบนแท่นความร้อนจนเกิดควันสีขาว ยกออกจากแท่นความร้อนแล้วทิ้งไว้ให้เย็น

4.5.1.4 ถ่ายใส่ Volumetric flask ขนาด 250 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำจัดไอออน ผสมให้เข้ากัน แล้วกรองผ่านกระจกทรงเบอร์ 4

4.5.1.5 ทดสอบหาปริมาณคอปเปอร์ในสารละลายตัวอย่างด้วยเทคนิค Inductively Coupled Plasma–Optical Emission Spectrometry; ICP–OES โดยตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 327.393 นาโนเมตร

4.5.2 หาสถานะที่เหมาะสมของเครื่อง ICP-OES ที่จะใช้เป็นวิธีทดสอบ

4.5.3 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบคอปเปอร์ในอาหารสัตว์ด้วยเครื่อง ICP-OES

4.5.3.1 ทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (Linearity)

4.5.3.1.1 เตรียมสารมาตรฐานคอปเปอร์ 5 ระดับความเข้มข้น คือ 1, 2, 4, 8 และ 10 mg/L

4.5.3.1.2 ตรวจวัดสารละลายมาตรฐานคอปเปอร์ ด้วยเครื่อง ICP-OES ที่ความยาวคลื่น 327.393 นาโนเมตร

4.5.3.1.3 สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานคอปเปอร์

4.5.4. การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision)

4.5.4.1 เตรียม Spiked sample โดยชั่งตัวอย่างอาหารไก่ที่ใช้เป็น Sample blank 1.0000 กรัม เติมสารละลายมาตรฐานคอปเปอร์ 3 ระดับ ระดับความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

4.5.4.1.1 ที่ระดับ 10 mg/kg ปิเปตสารละลายมาตรฐานคอปเปอร์ความเข้มข้น 100 mg/L ปริมาตร 1 ml ลงใน Sample blank

4.5.4.1.2 ที่ระดับ 50 mg/kg ปิเปตสารละลายมาตรฐานคอปเปอร์ความเข้มข้น 100 mg/L ปริมาตร 5 ml ลงใน Sample blank

4.5.4.1.3 ที่ระดับ 100 mg/kg ปิเปตสารละลายมาตรฐานคอปเปอร์ความเข้มข้น 100 mg/L ปริมาตร 10 ml ลงใน Sample blank

4.5.4.2 ทดสอบ Sample blank 10 ซ้ำ และทดสอบ Spiked sample ระดับความเข้มข้นละ 10 ซ้ำตาม วิธีทดสอบคอปเปอร์ในอาหารสัตว์ (ข้อ 4.5.1.1-4.5.1.5)

4.5.4.3 คำนวณค่าคอปเปอร์เฉลี่ย (\bar{X})

4.5.4.4 ประเมินค่าความแม่นยำ (Accuracy) โดยใช้ค่า %Recovery ของค่าคอปเปอร์เฉลี่ยเปรียบเทียบกับ Spiked sample

4.5.4.5 ประเมินความเที่ยง (Precision)

4.5.4.5.1 Repeatability มีเกณฑ์ยอมรับคือ %RSD_r ที่คำนวณจากผลทดสอบต้องมีค่าน้อยกว่า %PRSD_r ที่คำนวณจาก Horwitz's equation

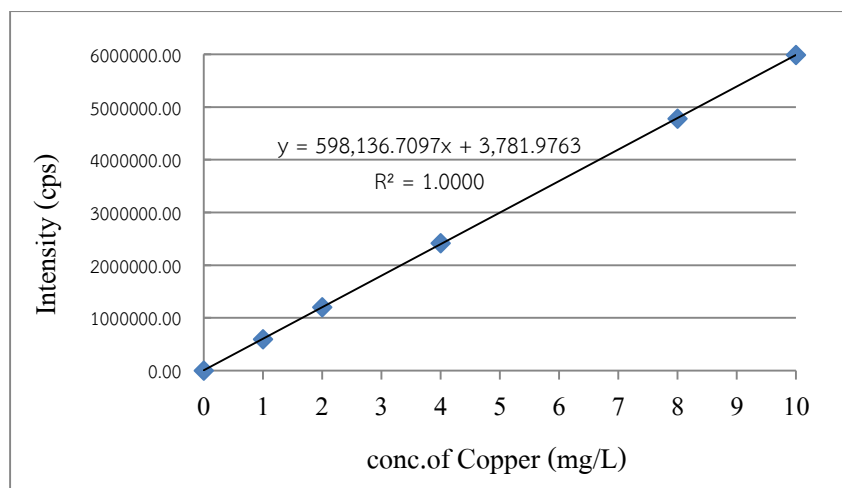
4.5.1.5.2 Within laboratory reproducibility ทำการทดสอบ ตามข้อ 4.5.4.1-4.5.4.2 โดยทำการทดสอบซ้ำต่างวัน (ห่างกัน 7 วัน) และประเมินค่าความเที่ยง %RSD_R ที่คำนวณจากผลทดสอบต้องมีค่าน้อยกว่า %PRSD_R ที่คำนวณจาก Horwitz's equation

5. ผลการทดลอง

5.1 สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง ICP-OES ที่ใช้ทดสอบคอปเปอร์ในอาหารสัตว์
ตารางที่ 1 สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง ICP-OES ในการทดสอบคอปเปอร์ในอาหารสัตว์

Measure Mode	Axial
RF Power (W)	1300
Plasma Gas Flow (L/min)	15
Auxiliary Gas Flow (L/min)	0.2
Nebulizer Gas Flow (L/min)	0.80
View Dist (mm)	15
Pump Flow Rate (mL/min)	1.50
Flush Time (sec)	20
Delay Time (sec)	20
Replicate	3

5.2 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (Linearity) โดยใช้สารมาตรฐานคอปเปอร์
ที่ระดับความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 10 mg/L



ภาพที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของสารละลายมาตรฐานคอปเปอร์ที่ความเข้มข้นต่างๆ
กับค่า Intensity

ผลการทดสอบ Linearity ของสารละลายมาตรฐานคอปเปอร์พบว่า regression
correlation (R^2) เท่ากับ 1.0000 โดยเกณฑ์การยอมรับ >0.995

5.3 ผลการทดสอบ Spiked sample ในตัวอย่างอาหารไก่ อาหารเป็ดและอาหารสุกร
ที่ระดับความเข้มข้น 10, 50 และ 100 mg/kg ระดับความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ทำการประเมินความแม่นยำ

(Accuracy) ประเมินความเที่ยงแบบ Repeatability จากนั้นทำการทดสอบซ้ำต่างวัน (7 วัน) ประเมินความเที่ยงแบบ Within laboratory reproducibility ให้ผลการศึกษาดังตารางที่ 2-4

ตารางที่ 2 ผลการประเมิน %Recovery ในตัวอย่าง Spike sample (อาหารไก่ อาหารเป็ด และอาหารสุกร) ที่ระดับความเข้มข้น 10, 50 และ 100 mg/kg ระดับความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

	อาหารไก่(mg/kg)			อาหารเป็ด(mg/kg)			อาหารสุกร(mg/kg)		
	10	50	100	10	50	100	10	50	100
ค่าเฉลี่ย (mg/kg)	10.08	47.09	95.13	9.72	48.74	96.43	9.78	51.66	102.37
%Recovery	100.79	94.19	95.13	97.15	97.49	96.43	97.83	103.32	102.37
เกณฑ์การยอมรับ (ช่วงของ %Recovery)	80-110	80-110	90-107	80-110	80-110	90-107	80-110	80-110	90-107

ตารางที่ 3 ผลการประเมินความเที่ยงแบบ Repeatability ในตัวอย่าง Spike sample (อาหารไก่ อาหารเป็ด และอาหารสุกร) ที่ระดับความเข้มข้น 10, 50 และ 100 mg/kg ระดับความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

	อาหารไก่(mg/kg)			อาหารเป็ด(mg/kg)			อาหารสุกร(mg/kg)		
	10	50	100	10	50	100	10	50	100
Mean (mg/kg)	10.08	47.09	95.13	9.72	48.74	96.43	9.78	51.66	102.37
SD (mg/kg)	0.24	1.16	4.01	0.44	1.34	3.27	0.37	1.57	1.12
RSD _r (%)	2.35	2.46	4.22	4.52	2.75	3.40	3.76	3.04	1.09
PRSD _r (%)	7.47	5.86	5.28	7.47	5.86	5.28	7.47	5.86	5.28

ตารางที่ 4 ผลการประเมินความเที่ยงแบบ Within laboratory reproducibility ในตัวอย่าง Spike sample (อาหารไก่ อาหารเป็ด และอาหารสุกร) ที่ระดับความเข้มข้น 10, 50 และ 100 mg/kg ระดับความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

	อาหารไก่(mg/kg)			อาหารเป็ด(mg/kg)			อาหารสุกร(mg/kg)		
	10	50	100	10	50	100	10	50	100
Mean (mg/kg)	10.32	48.99	96.71	9.87	49.09	98.48	10.19	51.29	104.26
SD (mg/kg)	0.31	2.13	3.36	0.54	1.78	4.03	0.55	2.23	2.51
RSD _R (%)	2.98	4.34	3.48	5.46	3.62	4.09	5.40	4.36	2.41
PRSD _R (%)	11.31	8.88	8.00	11.31	8.88	8.00	11.31	8.88	8.00

จากตารางที่ 2 ผลการทดสอบ Spiked sample ในตัวอย่างอาหารไก่ อาหารเป็ดและอาหารสุกร ที่ 3 ระดับความเข้มข้นคือ 10, 50 และ 100 mg/kg ระดับความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ผลการทดสอบได้ค่าคอปเปอร์เฉลี่ยแล้วนำมาคำนวณหาค่า %Recovery พบว่าทุกตัวอย่างทดสอบ และทุกระดับความเข้มข้น อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ แสดงว่าผลการประเมินความแม่นยำ (Accuracy) อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

จากตารางที่ 3 เป็นผลการทดสอบ Spiked sample ในตัวอย่างอาหารไก่ อาหารเป็ดและอาหารสุกร โดยทดสอบซ้ำภายใต้สภาวะคงที่ (Repeatability) พบว่าผลการคำนวณ %RSD_r มีค่าน้อยกว่า %PRSD_r ที่คำนวณจาก Horwitz's equation ในทุกตัวอย่างทดสอบและทุกระดับความเข้มข้น แสดงว่าผลการประเมินความเที่ยงแบบ Repeatability อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

จากตารางที่ 4 เป็นผลการทดสอบ Spiked sample ในตัวอย่างอาหารไก่ อาหารเป็ดและอาหารสุกร เป็นการทดสอบตัวอย่างเดียวกันแต่ทำการทดสอบใหม่ห่างกัน 7 วัน นำผลทดสอบทั้งสองครั้งมาประเมินความเที่ยงแบบ Within laboratory reproducibility พบว่าผลการคำนวณ %RSD_R มีค่าน้อยกว่า %PRSD_R ที่คำนวณจาก Horwitz's equation ในทุกตัวอย่างทดสอบและทุกระดับความเข้มข้น แสดงว่าผลการประเมินความเที่ยงแบบ Within laboratory reproducibility อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

6. สรุปผลการทดลอง

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบคอปเปอร์ในอาหารสัตว์ ทำให้สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง ICP-OES ที่จะใช้เป็นวิธีทดสอบและจากการทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (Linearity) โดยใช้สารละลายมาตรฐานคอปเปอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 10 mg/L พบว่า Regression correlation (R^2) เท่ากับ 1.0000 แสดงว่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ ($R^2 > 0.995$) จากการใช้ตัวอย่างอาหารไก่ อาหารเป็ดและอาหารสุกรเป็น Spike sample ที่มี การเติมสารละลายมาตรฐานคอปเปอร์ที่ระดับความเข้มข้น 10, 50 และ 100 mg/kg ระดับความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ทดสอบและคำนวณหาปริมาณคอปเปอร์เฉลี่ย ทำการประเมินความแม่นยำ (Accuracy) โดยคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ค่าการกลับคืนได้ (%Recovery) พบว่าอยู่ในช่วง 94.19-103.32 แสดงว่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (AOAC, 80-110% และ 90-107%) และนำผลการทดสอบมาประเมินความเที่ยงแบบ Repeatability พบว่า %RSD_r มีค่าน้อยกว่า %PRSD_r ในทุกตัวอย่างทดสอบและทุกระดับความเข้มข้น แสดงการทดสอบคอปเปอร์ในอาหารสัตว์ ในสภาวะคงที่ที่อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ จากนั้นมีการทดสอบ Spike sample ชนิดเดียวกัน และเติมสารละลายมาตรฐานคอปเปอร์ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน ระดับความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ทำการทดสอบห่างกัน 7 วัน นำผลทดสอบมาประเมินความเที่ยงแบบ Within laboratory reproducibility พบว่า %RSD_R มีค่าน้อยกว่า %PRSD_R ในทุกตัวอย่างทดสอบและทุกระดับความเข้มข้น แสดงว่าผลการประเมินความเที่ยงแบบ Within laboratory reproducibility อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

สรุปได้ว่าจากการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบคอปเปอร์ในอาหารสัตว์ มีความแม่นยำและความเที่ยงเหมาะสมจะใช้เป็นวิธีทดสอบต่อไป

7. ข้อเสนอแนะ

8. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สพ.ญ.ดร.พัชรี ทองคำคุณ ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่ให้โอกาสและสนับสนุนการศึกษาทดลอง

9. เอกสารอ้างอิง

- European Commission. 2018. COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) 2018/1039 of 23 July 2018 concerning the authorisation of Copper(II) diacetate monohydrate, Copper(II) carbonate dihydroxy monohydrate, Copper(II) chloride dihydrate, Copper(II) oxide, Copper(II) sulphate pentahydrate, Copper(II) chelate of amino acids hydrate, Copper(II) chelate of protein hydrolysates, Copper(II) chelate of glycine hydrate (solid) and Copper(II) chelate of glycine hydrate (liquid) as feed additives for all animal species and amending Regulations (EC) No 1334/2003, (EC) No 479/2006 and (EU) No 349/2010 and Implementing Regulations (EU) No 269/2012, (EU) No 1230/2014 and (EU) 2016/2261. **Official Journal of the European Union**. L186: 3-24.
- Meija, J., T. B. Coplen, M. Berglund, W. A. Brand, P. D. Bievre, M. Groning, N. E. Holden, J. Irrgeher, R. D. Loss, T. Walczyk and T. Prohaska. 2016. Atomic weights of the elements 2013 (IUPAC Technical Report). **Pure Appl. Chem**, 88(3): 265–291.
- Suttle, N. F. 2010. **Mineral Nutrition of Livestock**. 4th edition. Centre for Agriculture and Biosciences International, England.
- เนาวรัตน์ สุธัฒนาภพงษ์. 2559. **พิษวิทยาทางการสัตวแพทย์**. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- ยงยุทธ โอสถสภ. 2558. **ธาตุอาหารพืช**. พิมพ์ครั้งที่ 4. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ราชกิจจานุเบกษา. 2559. เล่มที่ 113 ตอนพิเศษ 306 ง, หน้า 18 - 26.
- วรรณพร ทะพิงค์แก. 2560. **อาหารและการให้อาหารสัตว์ (Feeds and Feeding)**. ศูนย์บริหารงานวิจัยมหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.
- อุทัย คันโธ. 2559. **อาหารสุกรและสัตว์ปีกเชิงประยุกต์**. ยู เค ที, ฉะเชิงเทรา.