

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบแมงกานีสในอาหารสัตว์ด้วยเครื่อง ICP-OES

สุนีย์ คณาพิพัฒน์ พงษ์พัฒน์ สุวัฒน์ รัชชานนท์ รักชีพ

ประภาพร วรรณเขียว สุกัญญา พวงเสียง พรชนิตว์ พรหมคุณ

บทคัดย่อ

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบแมงกานีสในอาหารสัตว์ด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer (ICP-OES) โดยขั้นตอนการเตรียมสารละลายตัวอย่างได้ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน AOAC 935.13 (2019) และนำสารละลายตัวอย่างมาตรวจวัดหาปริมาณแมงกานีสด้วยเครื่อง ICP-OES ผลการศึกษาพบว่าสารละลายมาตรฐานแมงกานีสที่ระดับความเข้มข้น 0-10 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงได้ค่า regression correlation (R^2) เท่ากับ 1.00 ทำการทดสอบ spiked sample ในตัวอย่างอาหารไก่ อาหารเป็ด อาหารสุกรและอาหารโค ที่ระดับความเข้มข้น 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำการประเมินความแม่นยำ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การกลับคืนได้เฉลี่ยอยู่ในช่วง 94.57 - 102.64 ประเมินความเที่ยงภายในได้สภาวะคงที่ (repeatability) พบว่า $\%RSD_r$ มีค่าน้อยกว่า $\%PRSD_r$ และประเมินความเที่ยงจากการทดสอบซ้ำต่างวัน (within laboratory reproducibility) พบว่า $\%RSD_R$ มีค่าน้อยกว่า $\%PRSD_R$

คำสำคัญ: แมงกานีส การทดสอบความใช้ได้ของวิธี อาหารสัตว์ ICP-OES

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Method Validation of Manganese Analytical in Feed by ICP-OES

Sunee Kanapipat Phongpipat Suwapat Ratchanon Rakcheep

Prapaphon Wunnakhieo Sukanya Puangsiang Phonchanit Prommakun

Abstract

Method validation of manganese 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 manganese with ICP-OES. The study showed that the regression correlation (R^2) of manganese standard solution at level 0 - 10 mg/L was 1.00. The determination of manganese using spiked sample in chicken feed, duck feed, swine feed and bovine feed at concentration level 50, 100 and 200 mg/kg represented that accuracy by percent mean recovery was 94.57 - 102.64. Precision by repeatability showed %RSD_r less than %PRSD_r and precision by within laboratory reproducibility showed %RSD_R less than %PRSD_R.

Keyword: Manganese, method validation, feed, ICP-OES

Feed Quality Control Laboratory Division, Bureau of Quality Control of Livestock Products.
Department of Livestock Development

บทนำ

แมงกานีส (Manganese; Mn) มีเลขเชิงอะตอม 25 น้ำหนักเชิงอะตอม 54.938043 ± 0.000002 สัญลักษณ์ธาตุคือ Mn (Prohaska *et al.*, 2022) แมงกานีสเป็นแร่ธาตุที่ต้องการในปริมาณค่อนข้างน้อย (trace minerals) แต่ก็มีความสำคัญต่อร่างกายเป็นอย่างมาก โดยเป็นองค์ประกอบสำคัญในการพัฒนาและเจริญเติบโตของกระดูกและกระดูกอ่อน รวมทั้งเป็นปัจจัยร่วมของเอนไซม์ในกระบวนการเผาผลาญคาร์โบไฮเดรตและไขมัน การขาดแมงกานีสทำให้สัตว์มีอาการผิดปกติในการพัฒนากระดูก ทำให้มีอาการขาอ่อน ข้อขาบวมโต และยังเกิดอาการกระดูกพรุน และอาการบิดของกระดูกในสัตว์ปีก นอกจากนี้การขาดแมงกานีสทำให้การเป็นสัดของสัตว์ช้าลง อัตราการผสมติดต่ำ รวมทั้งอัตราการรอดของลูกสัตว์ต่ำลง (อุทัย, 2559) แหล่งของแมงกานีสมีมากในรำ โดยส่วนใหญ่จะเพียงพออยู่แล้วในพืชอาหารสัตว์ แต่มักเสริมในรูปของแมงกานีสซัลเฟต (Manganese sulfate; MnSO_4) หรือแมงกานีสออกไซด์ (Manganese oxide; MnO) อย่างไรก็ตามถ้าร่างกายได้รับแมงกานีสมากเกินไป จะไปขัดขวางการดูดซึมธาตุเหล็ก ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้เกิดโรคโลหิตจางได้ (วรรณพร, 2560)

คณะกรรมการยุโรป (European Commission, 2017) ประกาศกฎระเบียบของสหภาพยุโรป 2017/1490 กำหนดปริมาณแมงกานีสในอาหารสัตว์สำหรับสัตว์ชนิดต่าง ๆ ไว้ไม่เกิน 150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม นอกจากนี้ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ ปริมาณการใช้ และเงื่อนไขในการห้ามผลิต นำเข้า หรือขายอาหารสัตว์ พ.ศ. 2559 ได้กำหนดปริมาณแมงกานีสสูงสุดที่กำหนดให้มีในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับสัตว์ประเภทต่าง ๆ ดังนี้ ไก่และเป็ด ไม่เกิน 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โคไม่เกิน 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และสุกรไม่เกิน 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ราชกิจจานุเบกษา, 2559)

ห้องปฏิบัติการงานเคมี กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ได้พัฒนาวิธีการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบแมงกานีสในอาหารสัตว์ด้วยเครื่อง ICP-OES ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 257.610 นาโนเมตร อ้างอิงวิธีทดสอบ AOAC 935.13 (AOAC, 2019) และ EN 15510 (CEN, 2017) ซึ่งเป็นเทคนิคที่อาศัยความร้อนจากพลาสมาที่มีอุณหภูมิสูงประมาณ 6,000-10,000 เคลวิน เหนี่ยวนำให้ตัวอย่างเกิดเป็นอะตอมอิสระเปลี่ยนจากสถานะพื้นเป็นสถานะถูกกระตุ้น อะตอมจะปลดปล่อยพลังงานในรูปแสงที่มีความยาวคลื่นเฉพาะตัวตามชนิดของธาตุ และมีความเข้มแสง (intensity) เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณธาตุในสารละลายตัวอย่าง (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2562) โดยใช้แนวทางการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบตาม Magnusson and Örnemark (2014) เพื่อให้ผลการทดสอบมีความน่าเชื่อถือ เกิดความเชื่อมั่นในวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้น เป็นไปตามมาตรฐานสากล

1. วัตถุประสงค์

- 1.1 เพื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบแมงกานีสในอาหารสัตว์ด้วยเครื่อง ICP-OES
- 1.2 เพื่อให้เกิดความมั่นใจว่าวิธีทดสอบแมงกานีสในอาหารสัตว์ด้วยเครื่อง ICP-OES เป็นวิธีทดสอบที่เหมาะสมกับวัตถุประสงค์การใช้งานและผลการทดสอบมีความน่าเชื่อถือ เป็นที่ยอมรับความสามารถตามมาตรฐาน ISO/IEC17025

2. ขอบข่าย

- ดำเนินการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบแมงกานีสในอาหารสัตว์ด้วยเครื่อง 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 ได้วิธีทดสอบแมงกานีสในอาหารสัตว์ด้วยเครื่อง ICP-OES ที่ผ่านการทดสอบความใช้ของวิธีทดสอบแล้ว เพื่อให้เป็นไปตามระบบ ISO/IEC 17025
- 3.2 เพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นและยอมรับในวิธีทดสอบแมงกานีสในอาหารสัตว์

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 น้ำจัดไอออน ความต้านทานไม่น้อยกว่า 18 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$
- 4.3 สารละลายมาตรฐาน
 - 4.3.1 stock manganese standard solution ความเข้มข้น 1,000 mg/L
 - 4.3.2 การเตรียม intermediate manganese standard solution ความเข้มข้น 100 mg/L
ปิเปต stock manganese standard solution ความเข้มข้น 1000 mg/L ปริมาตร 5 mL ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 50 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยกรดไนตริก 2%
 - 4.3.3 การเตรียม working manganese standard solution ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 10 mg/L

4.3.3.1 Working manganese standard solution ความเข้มข้น 1 mg/L

ปิเปต intermediate manganese standard solution ความเข้มข้น 100 mg/L ปริมาตร 0.5 mL ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 50 mL และปรับปริมาตรด้วยกรดไนตริกความเข้มข้น 2%

4.3.3.2 Working manganese standard solution ความเข้มข้น 2 mg/L

ปิเปต intermediate manganese standard solution ความเข้มข้น 100 mg/L ปริมาตร 1 mL ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 50 mL และปรับปริมาตรด้วยกรดไนตริกความเข้มข้น 2%

4.3.3.3 Working manganese standard solution ความเข้มข้น 4 mg/L

ปิเปต intermediate manganese standard solution ความเข้มข้น 100 mg/L ปริมาตร 2 mL ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 50 mL และปรับปริมาตรด้วยกรดไนตริกความเข้มข้น 2%

4.3.3.4 Working manganese standard solution ความเข้มข้น 8 mg/L

ปิเปต intermediate manganese standard solution ความเข้มข้น 100 mg/L ปริมาตร 4 mL ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 50 mL และปรับปริมาตรด้วยกรดไนตริกความเข้มข้น 2%

4.3.3.5 Working manganese standard solution ความเข้มข้น 10 mg/L

ปิเปต intermediate manganese standard solution ความเข้มข้น 100 mg/L ปริมาตร 5 mL ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 50 mL และปรับปริมาตรด้วยกรดไนตริกความเข้มข้น 2%

4.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ

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

4.4.2 เครื่องชั่งไฟฟ้า ชั่งได้ละเอียด 0.0001 g

4.4.3 ตัวดูดจ่ายสารละลาย (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, 3, 5 และ 10 mL

4.4.8 Dropper

4.4.9 หลอดใส่ตัวอย่าง (tube) ขนาด 50 mL พร้อมฝาปิด

4.4.10 กระดาษกรองเบอร์ 4

4.5 ขั้นตอนการปฏิบัติงาน

4.5.1 วิธีทดสอบแมงกานีสในอาหารสัตว์ด้วยเครื่อง 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 เติมกรดเปอร์คลอริกเข้มข้นปริมาตร 10 mL นำไปย่อยบนแท่นความร้อนจนเกิดควันสีขาว ยกออกจากแท่นความร้อนแล้วทิ้งไว้ให้เย็น

4.5.1.4 ถ่ายใส่ volumetric flask ขนาด 250 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำขจัดไอออนผสมให้เข้ากัน แล้วกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4

4.5.1.5 ทดสอบหาปริมาณแมงกานีสในสารละลายตัวอย่างด้วยเทคนิค Inductively Coupled Plasma–Optical Emission Spectrometry; ICP–OES โดยตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 257.610 นาโนเมตร

4.5.2 หาสถานะที่เหมาะสมของเครื่อง ICP-OES ที่จะใช้เป็นวิธีทดสอบ

4.5.3 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบแมงกานีสในอาหารสัตว์ด้วยเครื่อง ICP-OES

4.5.3.1 ทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (linearity)

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

4.5.3.1.2 ตรวจวัดสารละลายมาตรฐานแมงกานีสด้วยเครื่อง ICP-OES ที่ความยาวคลื่น 257.610 นาโนเมตร

4.5.3.1.3 สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานแมงกานีส

4.5.4. การทดสอบความแม่นยำ (accuracy)

4.5.4.1 เตรียม spiked sample (อาหารไก่ อาหารเป็ด อาหารสุกรและอาหารโค) โดยชั่ง sample blank 1.0000 กรัม เติมสารละลายมาตรฐานแมงกานีส 3 ระดับ ระดับความเข้มข้นละ 10 ชั่ว

4.5.4.1.1 ที่ระดับ 50 mg/kg ปีเปตสารละลายมาตรฐานแมงกานีสความเข้มข้น 100 mg/L ปริมาตร 0.5 ml ลงใน sample blank

4.5.4.1.2 ที่ระดับ 100 mg/kg ปีเปตสารละลายมาตรฐานแมงกานีสความเข้มข้น 100 mg/L ปริมาตร 1 ml ลงใน sample blank

4.5.4.1.3 ที่ระดับ 200 mg/kg ปีเปตสารละลายมาตรฐานแมงกานีสความเข้มข้น 100 mg/L ปริมาตร 2 ml ลงใน sample blank

4.5.4.2 ทดสอบ sample blank ชนิดตัวอย่างละ 10 ซ้ำ และทดสอบ spiked sample แต่ละชนิดตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นละ 10 ซ้ำตาม วิธีทดสอบ แอมกานีสในอาหารสัตว์ (ข้อ 4.5.1.1 - 4.5.1.5)

4.5.4.3 คำนวณค่าแอมกานีสเฉลี่ย ($\bar{X}$)

4.5.4.4 ประเมินค่าความแม่นยำ (accuracy) โดยใช้ค่า %recovery ของค่าแอมกานีสเฉลี่ยเปรียบเทียบกับค่า spiked sample ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

4.5.4.5 ทดสอบตัวอย่าง CRM ชนิดตัวอย่าง phosphate rock โดยทดสอบจำนวน 10 ซ้ำ ตามวิธีทดสอบแอมกานีสในอาหารสัตว์ (ข้อ 4.5.1.1 - 4.5.1.5)

4.5.4.6 ประเมินความแม่นยำ (accuracy) โดยการประเมิน trueness และประเมินค่า %Recovery

4.5.5 ประเมินความเที่ยง (precision)

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

4.5.4.5.2 Within laboratory reproducibility ทำการทดสอบ ตามข้อ 4.5.4.1 - 4.5.4.2 โดยทำการทดสอบซ้ำต่างวัน (ห่างกัน 7 วัน) และประเมินค่าความเที่ยง แบบ within laboratory reproducibility มีเกณฑ์ยอมรับคือ %RSD_R ที่คำนวณจาก ผลทดสอบต้องมีค่าน้อยกว่า %PRSD_R ที่คำนวณจาก Horwitz's equation

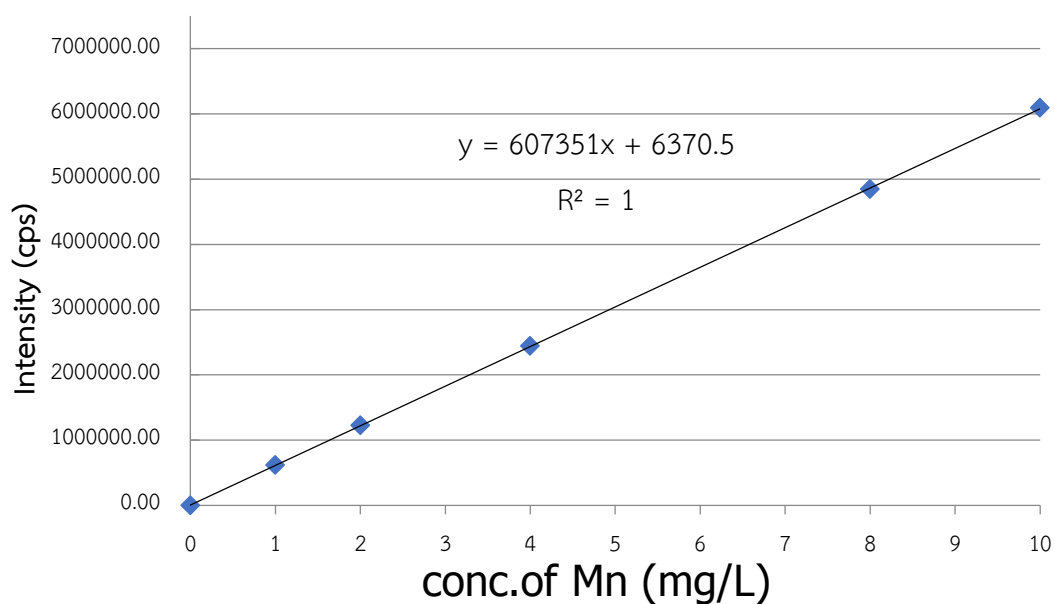
5. ผลการทดลอง

5.1 สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง ICP-OES ที่ใช้ทดสอบแมงกานีสในอาหารสัตว์

ตารางที่ 1 สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง ICP-OES ในการทดสอบแมงกานีสในอาหารสัตว์

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) โดยใช้สารละลายมาตรฐานแมงกานีสที่ระดับความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 10 mg/L



ภาพที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของสารละลายมาตรฐานแมงกานีสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับค่า intensity

ผลการทดสอบ linearity ของสารละลายมาตรฐานแมงกานีสพบว่า regression correlation (R^2) เท่ากับ 1.00 โดยเกณฑ์การยอมรับ >0.995

5.3 ผลการทดสอบ spiked sample ในตัวอย่างอาหารไก่ อาหารเป็ด อาหารสุกร และอาหารโค ที่ระดับความเข้มข้น 50, 100 และ 200 mg/kg ระดับความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ทำการประเมินความแม่นยำ (accuracy) และทดสอบ CRM ชนิดตัวอย่าง phosphate rock จำนวน 10 ซ้ำ ประเมินค่า trueness และ %recovery ประเมินความเที่ยงแบบ repeatability จากนั้นทำการทดสอบซ้ำต่างวัน (7 วัน) ประเมินความเที่ยงแบบ within laboratory reproducibility ให้ผลการศึกษาตามตารางที่ 2 – 8

ตารางที่ 2 ผลการประเมิน % mean recovery ในตัวอย่าง spike sample (อาหารไก่ อาหารเป็ด) ที่ระดับความเข้มข้น 50, 100 และ 200 mg/kg ระดับความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

	อาหารไก่ (mg/kg)			อาหารเป็ด (mg/kg)		
	50	100	200	50	100	200
ค่าเฉลี่ย (mg/kg)	47.90	94.88	192.0	47.28	96.15	190.1
% mean recovery	95.79	94.88	96.00	94.57	96.15	95.03
เกณฑ์การยอมรับ (ช่วงของ % mean recovery)	80-110	90-107	90-107	80-110	90-107	90-107

ตารางที่ 3 ผลการประเมิน % mean recovery ในตัวอย่าง spike sample (อาหารสุกร อาหารโค) ที่ระดับความเข้มข้น 50, 100 และ 200 mg/kg ระดับความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

	อาหารสุกร (mg/kg)			อาหารโค (mg/kg)		
	50	100	200	50	100	200
ค่าเฉลี่ย (mg/kg)	51.32	98.96	197.2	49.33	97.87	193.1
% mean recovery	102.64	98.96	98.62	98.66	97.87	96.53
เกณฑ์การยอมรับ (ช่วงของ % mean recovery)	80-110	90-107	90-107	80-110	90-107	90-107

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบ CRM ชนิดตัวอย่าง phosphate rock จำนวน 10 ซ้ำ และประเมิน trueness และ %Recovery

ซ้ำที่	ผลการทดสอบแมกนีเซียม (mg/kg)
1	88.06
2	89.79
3	88.66
4	90.54
5	88.81
6	90.46
7	90.58
8	90.05
9	89.29
10	89.48
ค่าเฉลี่ย ($\bar{x}$)	89.57
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S)	0.87
จำนวนซ้ำ (n=10)	10
True value or Certified value (μ)	89.80
t	0.84
t _c	2.26
t < t _c	ผ่าน
%Recovery (เกณฑ์การยอมรับ 80 - 110)	99.74

หาค่า t_c จากตาราง โดย df=n-1 และ p=0.05 เปรียบเทียบค่า t จากการคำนวณ (ไม่คิดเครื่องหมาย)

กับค่า t_c จากตาราง หากพบว่า t < t_c แสดงว่าวิธีทดสอบมี trueness

ตารางที่ 5 ผลการประเมินความเที่ยงแบบ repeatability ในตัวอย่าง spike sample (อาหารไก่ อาหารเป็ด) ที่ระดับความเข้มข้น 50, 100 และ 200 mg/kg ระดับความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

	อาหารไก่ (mg/kg)			อาหารเป็ด (mg/kg)		
	50	100	200	50	100	200
Mean (mg/kg)	47.90	98.88	192.0	47.28	96.15	190.06
SD (mg/kg)	0.47	1.93	2.59	2.29	2.82	3.29
RSD _r (%)	0.98	2.04	1.35	4.85	2.93	1.73
PRSD _r (%)	5.86	5.28	4.76	5.86	5.28	4.76

หมายเหตุ PRSD_r (%) = $0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)}$ เมื่อ C = Concentration ratio

ตารางที่ 6 ผลการประเมินความเที่ยงแบบ repeatability ในตัวอย่าง spike sample (อาหารสุกร อาหารโค) ที่ระดับความเข้มข้น 50, 100 และ 200 mg/kg ระดับความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

	อาหารสุกร (mg/kg)			อาหารโค (mg/kg)		
	50	100	200	50	100	200
Mean (mg/kg)	51.32	98.96	197.2	49.33	97.87	193.1
SD (mg/kg)	1.50	3.45	6.93	2.22	4.05	5.23
RSD _r (%)	2.92	3.49	3.51	4.51	4.13	2.71
PRSD _r (%)	5.86	5.28	4.76	5.86	5.28	4.76

หมายเหตุ PRSD_r (%) = $0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)}$ เมื่อ C = Concentration ratio

ตารางที่ 7 ผลการประเมินความเที่ยงแบบ within laboratory reproducibility ในตัวอย่าง spike sample (อาหารไก่ อาหารเป็ด) ที่ระดับความเข้มข้น 50, 100 และ 200 mg/kg ระดับความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ (ทดสอบ 3 ครั้ง ห่างกัน 7 วัน)

	อาหารไก่ (mg/kg)			อาหารเป็ด (mg/kg)		
	50	100	200	50	100	200
Mean (mg/kg)	48.10	96.30	193.3	49.20	97.30	195.7
SD (mg/kg)	1.85	2.18	5.50	1.34	2.80	4.05
RSD _R (%)	3.84	2.26	2.84	2.72	2.87	2.07
PRSD _R (%)	8.88	8.00	7.21	8.88	8.00	7.21

หมายเหตุ PRSD_R (%) = $2^{(1-0.5 \log C)}$ เมื่อ C = Concentration ratio

ตารางที่ 8 ผลการประเมินความเที่ยงแบบ within laboratory reproducibility ในตัวอย่าง spike sample (อาหารสุกร อาหารโค) ที่ระดับความเข้มข้น 50, 100 และ 200 mg/kg ระดับความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ (ทดสอบ 3 ครั้ง ห่างกัน 7 วัน)

	อาหารสุกร (mg/kg)			อาหารโค (mg/kg)		
	50	100	200	50	100	200
Mean (mg/kg)	48.6	97.70	193.2	48.10	97.40	195.9
SD (mg/kg)	1.53	2.34	4.90	1.33	1.68	4.99
RSD _R (%)	3.15	2.40	2.53	2.77	1.72	2.55
PRSD _R (%)	8.88	8.00	7.21	8.88	8.00	7.21

หมายเหตุ PRSD_R (%) = $2^{(1-0.5 \log C)}$ เมื่อ C = Concentration ratio

จากตารางที่ 2 และตารางที่ 3 ผลการทดสอบ spiked sample ในตัวอย่างอาหารไก่ อาหารเป็ด อาหารสุกรและอาหารโค ที่ 3 ระดับความเข้มข้นคือ 50, 100 และ 200 mg/kg ระดับความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ผลการทดสอบได้ค่าแมงกานีสเฉลี่ยแล้วนำมาคำนวณหาค่า %recovery พบว่าทุกตัวอย่างทดสอบ และทุกระดับความเข้มข้น อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ แสดงว่าผลการประเมินความแม่นยำ (accuracy) อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

จากตารางที่ 4 ผลทดสอบ CRM ชนิดตัวอย่าง phosphate rock จำนวน 10 ซ้ำ ประเมินค่า trueness และ %recovery พบว่าผลทดสอบ อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ แสดงว่าผลการประเมินความแม่นยำ (accuracy) อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

จากตารางที่ 5 และตารางที่ 6 เป็นผลการทดสอบ spiked sample ในตัวอย่างอาหารไก่ อาหารเป็ด อาหารสุกรและอาหารโค โดยทดสอบซ้ำภายใต้สภาวะคงที่ (repeatability) พบว่าผลการคำนวณ %RSD_r มีค่าน้อยกว่า %PRSD_r ที่คำนวณจาก Horwitz's equation ในทุกตัวอย่างทดสอบ และทุกระดับความเข้มข้น แสดงว่าผลการประเมินความเที่ยงแบบ repeatability อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

จากตารางที่ 7 และตารางที่ 8 เป็นผลการทดสอบ spiked sample ในตัวอย่างอาหารไก่ อาหารเป็ด อาหารสุกร และอาหารโค เป็นการทดสอบตัวอย่างเดียวกันแต่ทำการทดสอบใหม่ 3 ครั้ง ห่างกัน 7 วัน นำผลทดสอบทั้งสามครั้งมาประเมินความเที่ยงแบบ within laboratory reproducibility พบว่าผลการคำนวณ %RSD_R มีค่าน้อยกว่า %PRSD_R ที่คำนวณจาก Horwitz's

equation ในทุกตัวอย่างทดสอบและทุกระดับความเข้มข้น แสดงว่าผลการประเมินความเที่ยงแบบ within laboratory reproducibility อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

6. สรุปผลการทดลอง

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบแมงกานีสในอาหารสัตว์ ทำให้สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง ICP-OES ที่จะใช้เป็นวิธีทดสอบและจากการทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (linearity) โดยใช้สารละลายมาตรฐานแมงกานีสที่ระดับความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 10 mg/L พบว่า regression correlation (R^2) เท่ากับ 1.00 แสดงว่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ ($R^2 > 0.995$) จากการใช้ตัวอย่างอาหารไก่ อาหารเป็ด อาหารสุกร และอาหารสุกร เป็น spike sample ที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานแมงกานีสที่ระดับความเข้มข้น 50, 100 และ 200 mg/kg ระดับความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ทดสอบและคำนวณหาปริมาณแมงกานีสเฉลี่ย ทำการประเมินความแม่นยำ (accuracy) โดยคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ค่าการกลับคืนได้ (%recovery) พบว่าอยู่ในช่วง 94.57 – 102.64 แสดงว่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (AOAC, 90-107%) และนำผลการทดสอบมาประเมินความเที่ยงแบบ Repeatability พบว่า %RSD_r มีค่าน้อยกว่า %PRSD_r ในทุกตัวอย่างทดสอบและทุกระดับความเข้มข้น แสดงการทดสอบแมงกานีสในอาหารสัตว์ ในสภาวะคงที่ที่อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ จากนั้นมีการทดสอบ spike sample ชนิดเดียวกัน และเติมสารละลายมาตรฐานแมงกานีสที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน ระดับความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ทำการทดสอบห่างกัน 7 วัน นำผลทดสอบมาประเมินความเที่ยงแบบ within laboratory reproducibility พบว่า %RSD_R มีค่าน้อยกว่า %PRSD_R ในทุกตัวอย่างทดสอบและทุกระดับความเข้มข้น แสดงว่าผลการประเมินความเที่ยงแบบ within laboratory reproducibility อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

สรุปได้ว่าจากการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบแมงกานีสในอาหารสัตว์ มีความแม่นยำและความเที่ยงเหมาะสมจะใช้เป็นวิธีทดสอบต่อไป

7. ข้อเสนอแนะ

-

8. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ น.สพ.เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่ให้โอกาสและสนับสนุนการศึกษาทดลอง

9. เอกสารอ้างอิง

AOAC. 2019. AOAC Official Method 935.13 Calcium in Animal Feed. Ch.4. AOAC Official Methods of Analysis. 21th ed. AOAC International. Gaithersburg. MD.

CEN. 2017. EN 15510 Animal feeding stuffs. Methods of sampling and analysis. Determination of calcium, sodium, phosphorus, magnesium, potassium,

iron, Manganese, copper, manganese, cobalt, molybdenum and lead by ICP-AES. European Committee for Standardization, Brussels.

European Commission. 2016. COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) 2016/1095 of 6 July 2016 concerning the authorisation of Manganese acetate dihydrate, Manganese chloride anhydrous, Manganese oxide, Manganese sulphate heptahydrate, Manganese sulphate monohydrate, Manganese chelate of amino acids hydrate, Manganese chelate of protein hydrolysates, Manganese chelate of glycine hydrate (solid) and Manganese chelate of glycine hydrate (liquid) as feed additives for all animal species and amending Regulations (EC) No 1334/2003, (EC) No 479/2006, (EU) No 335/2010 and Implementing Regulations (EU) No 991/2012 and (EU) No 636/2013. **Official Journal of the European Union**. L182: 7-27.

Magnusson, B. and U. Örnemark. 2014. **Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**. 2nd ed. Available from <http://www.eurachem.org>.

Prohaska, T., J. Irrgeher, J. Benefield, J.K. Böhlke, L.A. Chesson, T.B. Coplen, T. Ding, P.J.H. Dunn, M. Gröning, N.E. Holden, H.A.J. Meijer, H. Moossen, A. Possolo, Y. Takahashi, J. Vogl, T. Walczyk, J. Wang, M.E. Wieser, S. Yoneda, X. Zhu and J. Meija. 2022. Standard atomic weights of the elements 2021 (IUPAC Technical Report). **Pure Appl. Chem**, 94(5): 573–600.

ราชกิจจานุเบกษา. 2559. เล่มที่ 113 ตอนพิเศษ 306 ง, หน้า 18 - 26.

วรรณพร ทะพิงค์แก. 2560. **อาหารและการให้อาหารสัตว์ (Feeds and Feeding)**. ศูนย์บริหารงานวิจัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2562. **วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหารเล่ม 7**. บริษัท เอ็นซี คอนเซ็ปต์ จำกัด, กรุงเทพฯ.

อุทัย คั่นโธ. 2559. **อาหารสุกรและสัตว์ปีกเชิงประยุกต์**. ยู เค ที, ฉะเชิงเทรา.