

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบซีลีเนียมในอาหารสัตว์ด้วยเครื่อง ICP-OES

นายรัชชานนท์ รักชีพ

นางสาวสุนีย์ คณาพิพัฒน์

นายพงษ์พัฒน์ สุวัฒน์

นางสาวกนกวรรณ มงคล

นางสาวประภาพร วรรณเขียว

นางสาวสุกัญญา พวงเสียง

นางสาวพรชนิตว์ พรหมคุณ

บทคัดย่อ

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบซีลีเนียมในอาหารสัตว์ด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer (ICP-OES) โดยขั้นตอนการเตรียมสารละลายตัวอย่างได้ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน AOAC 935.13 (2023) และนำสารละลายตัวอย่างมาตรฐานซีลีเนียมด้วยเครื่อง ICP-OES ผลการศึกษาพบว่าสารละลายมาตรฐานซีลีเนียมที่ระดับความเข้มข้น 0.01 – 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 1.0000 ทำการทดสอบ spiked sample ในตัวอย่างอาหารไก่ อาหารสุกร อาหารโค และอาหารจิ้งหรีด ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำการประเมินความแม่นยำ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ค่าการกลับคืนได้เฉลี่ยอยู่ในช่วง 90.29 – 101.16 ประเมินความเที่ยงภายในได้สภาวะคงที่ (repeatability) พบว่า $\%RSD_r$ มีค่าน้อยกว่า $\%PRSD_r$ และประเมินความเที่ยงจากการทดสอบซ้ำต่างวัน (within-laboratory reproducibility) พบว่า $\%RSD_R$ มีค่าน้อยกว่า $\%PRSD_R$

คำสำคัญ: ซีลีเนียม การทดสอบความใช้ได้ของวิธี อาหารสัตว์ ICP-OES

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Method Validation of Selenium Analytical in Feed by ICP-OES

Ratchanon Rakcheep

Sunee Kanapipat

Phongpipat Suwapat

Kanokwan Mongkol

Prapaphon Wunnakhieo

Sukanya Puangsiang

Phonchanit Prommakun

Abstract

Method validation of selenium analytical in feed by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer (ICP-OES). Sample preparation was modified from AOAC 935.13 (2023), the aliquots of sample solution were analyzed for selenium with ICP-OES. The study showed that Coefficient of Correlation (r) of selenium standard solution at level 0.01 – 1.00 mg/L was 1.0000. The determination of selenium using spiked sample in chicken feed, swine feed, bovine feed and cricket feed at concentration level 0.5, 1.0, 2.0 and 5.0 mg/kg represented that accuracy by percent mean recovery was 90.29 – 101.16. Precision by repeatability showed $\%RSD_r$ less than $\%PRSD_r$ and precision by within-laboratory reproducibility showed $\%RSD_R$ less than $\%PRSD_R$.

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

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

บทนำ

ซีลีเนียม (selenium) มีเลขเชิงอะตอม 34 น้ำหนักเชิงอะตอม 78.971 ± 0.002 สัญลักษณ์ธาตุคือ Se (Prohaska et al., 2022) ซีลีเนียมมีสถานะออกซิเดชันตามธรรมชาติ 4 สถานะ ได้แก่ -2 , 0 , $+4$, และ $+6$ โดยซีลีเนียมสถานะออกซิเดชัน -2 จะอยู่ในรูปของซีลีไนด์ (selenide) เช่น โซเดียมซีลีไนด์ (Na_2Se) ไฮโดรเจนซีลีไนด์ (H_2Se) หรือ ไดเมทิลซีลีไนด์ ($(\text{CH}_3)_2\text{Se}$) ในสัตว์ที่ได้รับซีลีเนียมในปริมาณสูงมีกลิ่น dimethyl selenide ซึ่งคล้ายกระเทียม ซีลีเนียมสถานะออกซิเดชัน 0 เป็นธาตุซีลีเนียม (Se) จุดเดือดที่ 684°C มีความเสถียรสูงมาก ไม่ละลายน้ำ และพืชไม่สามารถนำไปใช้ มีสีแดง สีสน้ำตาลเข้ม หรือสีเทาเงิน ซีลีเนียมสถานะออกซิเดชัน $+4$ ในสถานะนี้จะอยู่ในรูปของซีลีไนต์ (selenite) ในสารประกอบต่าง ๆ เช่น โซเดียมซีลีไนต์ (Na_2SeO_3) ซีลีเนียมไดออกไซด์ (SeO_2) และกรดซีลีเนียส (H_2SeO_3) ซีลีเนียมรูปแบบนี้สามารถถูกออกซิไดซ์อย่างช้า ๆ เป็นสถานะ $+6$ ในสารละลายที่เป็นด่างและมีออกซิเจน หรือสามารถถูกรีดิวซ์เป็นซีลีเนียมธาตุได้ง่ายด้วยกรดแอสคอร์บิกหรือซัลเฟอร์ไดออกไซด์ กรดซีลีเนียสซึ่งเป็นกรดไดเบสิกที่อ่อน สามารถเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างซีลีเนียมไดออกไซด์กับน้ำ และบางครั้งก็ทำหน้าที่เป็นตัวออกซิไดซ์แทนที่จะเป็นตัวรีดิวซ์ ซีลีเนียมสถานะออกซิเดชัน $+6$ สารประกอบซีลีเนียมในสถานะนี้ เช่น โซเดียมซีลีเนต (Na_2SeO_4) ซีลีเนียมไตรออกไซด์ (SeO_3) หรือกรดซีลีนิค (H_2SeO_4) ซีลีเนียมในสารประกอบเหล่านี้ มีความเสถียร ละลายน้ำได้ และพืชสามารถนำไปใช้ได้อย่างดีในสภาพที่เป็นด่าง ด้วยเหตุนี้ ซีลีเนียมในสถานะ $+6$ จึงเป็นรูปแบบของธาตุที่มีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมมากที่สุด (National Research Council, 2005) ซีลีเนียมเป็นแร่ธาตุรอง (trace minerals) ที่ร่างกายสัตว์ต้องการปริมาณน้อยซึ่งต้องได้รับจากอาหารในปริมาณที่เหมาะสมเพื่อสุขภาพและการเจริญเติบโตของสัตว์ ซีลีเนียมในสัตว์ส่วนใหญ่ทำงานอยู่ในรูปซีลีโนโปรตีน (selenoprotein; SeP) ตามตัวอย่างในตารางที่ 1 ซีลีโนโปรตีนมีบทบาทสำคัญในกระบวนการรีดอกซ์ (redox) ของเซลล์ โดยทำงานร่วมกับวิตามินอีในการป้องกันเซลล์จากสารออกซิไดซ์ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และกลุ่มของสารออร์แกนิกเปอร์ออกไซด์ (organic peroxide) ซึ่งสามารถทำให้โปรตีนที่จำเป็นของเซลล์เสื่อมสภาพส่งผลให้เกิดการเสื่อมสภาพและการตายของเนื้อเยื่อ (อุทัย, 2559; วรพร, 2560; Suttle, 2021)

ตารางที่ 1 Selenoproteins that have been purified and/or cloned, their location and possible functions.

Selenoprotein	Principal location	Function
Cytosolic glutathione peroxidases (GPX)	Tissue cytosol, red blood cells	Storage, antioxidant
Phospholipid hyperoxide GPX	Intracellular membranes, particularly testes	Intracellular antioxidant
Plasma GPX	Plasma, kidney, lung	Extracellular antioxidant
Gastrointestinal GPX	Gut mucosa, kidney	Mucosal antioxidant
Epididymal GPX	Epididymis	Weak antioxidant
Selenophosphate synthetase 2	Ubiquitous	selenocysteine biosynthesis
Iodothyronine 5'-deiodinase type I	Liver, kidney, muscle	Conversion of T4 to T3

ตารางที่ 1 (ต่อ) Selenoproteins that have been purified and/or cloned, their location and possible functions.

Selenoprotein	Principal location	Function
Iodothyronine 5'-deiodinase type II	Brown adipose tissue	Conversion of T4 to T3
Iodothyronine 5'-deiodinase type III	Placenta	Conversion of T4 to rT3
Thioredoxin reductases 1, 2, and 3	Kidney, brain	Redox cycling
Selenoprotein H	Nerve tissue	Neuroprotection
Selenoprotein N	Muscle	Cell proliferation
Selenoprotein P	Plasma	Transport, metal detoxifier
Selenoprotein R	Liver, kidney	Methionine sulfoxide reductase
Selenoprotein W	Muscle	Antioxidant, calcium-binding
Mitochondrial capsular selenoprotein	Sperm mitochondrial capsule	Store for Gastrointestinal GPX

ที่มา: Suttle (2021)

การขาดธาตุซีลีเนียมก่อให้เกิดอาการกล้ามเนื้อเสื่อม (muscular dystrophy) ในแกะ สุกร สัตว์ปีก และลูกวัว อาการบวมน้ำ (exudative diathesis) ตับตาย (liver necrosis) และภาวะสมองนุ่ม (encephalomalacia) ของสัตว์ปีก (อุทัย, 2559) และซีลีเนียมเองก็เป็นแร่ธาตุที่ต้องระมัดระวังเรื่องความเป็นพิษ คือ ถ้าในดินมีซีลีเนียมมากก็จะทำให้พืชอาหารสัตว์ดูดซึมซีลีเนียมมากด้วย เมื่อสัตว์กินเข้าไปจะทำให้เกิดการเป็นพิษขึ้นมาได้ ทำให้เป็นโรคอัลคาไลด์ (alkali disease) มีสภาวะที่เลือดมีความเป็นด่างมากเกินไป ทำให้ขนร่วง ตาลืมไม่ขึ้นเดินโซเซเป็นวงกลม (blind stagger) ไม่ยอมกินอาหาร เป็นอัมพาต และตายในที่สุด (วรรณพร, 2560)

ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ ปริมาณการใช้ และเงื่อนไขในการห้ามผลิต นำเข้า หรือขายอาหารสัตว์ พ.ศ. 2559 ได้กำหนดวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ในปริมาณที่เหมาะสมให้อาหารสัตว์มีคุณภาพปลอดภัยต่อสัตว์ และประชาชนผู้บริโภคเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ โดยกำหนดปริมาณซีลีเนียมสูงสุดที่กำหนดให้มีในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับสัตว์ประเภทต่าง ๆ ดังนี้ ไก่ เป็ด สุกร และโค ไม่เกิน 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ราชกิจจานุเบกษา, 2559) และสหภาพยุโรปได้กำหนดปริมาณซีลีเนียมรวม (total selenium) ในอาหารสัตว์ที่มีโภชนาการครบถ้วนไม่เกิน 0.5 mg/kg ตามกฎระเบียบของคณะกรรมการอาหารยุโรป (European Union. 2014, 2019)

1. วัตถุประสงค์

1.1 เพื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบซีลีเนียมในอาหารสัตว์ด้วยเครื่อง ICP-OES

1.2 เพื่อให้เกิดความมั่นใจว่าวิธีทดสอบซีลีเนียมในอาหารสัตว์ด้วยเครื่อง ICP-OES เป็นวิธีทดสอบที่เหมาะสมกับวัตถุประสงค์การใช้งานและผลการทดสอบมีความน่าเชื่อถือ เป็นที่ยอมรับความสามารถตามมาตรฐาน ISO/IEC17025

2. ขอบข่าย

ดำเนินการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบซีลีเนียมในอาหารสัตว์ด้วยเครื่อง ICP-OES ดังนี้

2.1 หาสถานะของเครื่อง ICP-OES ที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นวิธีทดสอบ

2.2 ทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (linearity)

2.3 หาค่า limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ)

2.4 การยืนยัน LOD และ LOQ ของการทดสอบ

2.5 ทดสอบ matrix effect

2.6 ความแม่นยำ (accuracy)

2.7 ความเที่ยง (precision)

2.7.1 Repeatability

2.7.2 Within laboratory reproducibility

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

3.1 ได้วิธีทดสอบซีลีเนียมในอาหารสัตว์ด้วยเครื่อง ICP-OES ที่ผ่านการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบแล้ว เพื่อให้เป็นไปตามระบบ ISO/IEC 17025

3.2 เพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นและยอมรับในวิธีทดสอบซีลีเนียมในอาหารสัตว์

4. เครื่องมือและวัสดุวิทยาศาสตร์

4.1 เครื่องมือ

4.1.1 เครื่องวิเคราะห์แร่ธาตุ (Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometer; ICP-OES) ยี่ห้อ PerkinElmer รุ่น Avio 550 Max

4.1.2 เครื่องบดอาหารสัตว์ โดยตัวอย่างต้องบดผ่าน sieve ขนาด 1 มิลลิเมตร

4.1.3 เครื่องชั่งไฟฟ้า ชั่งได้ละเอียด 0.0001 g

4.1.4 เครื่องดูดจ่ายสารละลาย (dispenser) ขนาด 10 mL และ 50 mL

4.1.5 แท่นความร้อน (hot plate)

4.1.6 Micropipette ขนาด 10 - 100 μ L และ 100 - 1000 μ L

4.1.7 Volumetric flask class A ขนาด 50, 100, 1000 และ 2000 mL

4.1.8 Volumetric pipette class A ขนาด 1, 5 และ 10 mL

4.1.9 Beaker

4.1.10 กระบอกตวง

4.1.11 Dropper

4.1.12 แท่งแก้วคนสาร

4.1.13 หลอดใส่ตัวอย่าง (tube) ขนาด 50 mL พร้อมฝาปิด

4.1.14 กระดาษกรองเบอร์ 5

4.2 สารเคมี (Reagents)

4.2.1 กรดไนตริก (Nitric acid, HNO_3) AR grade ความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 68%

4.2.2 สารละลายกรดไนตริก 1% (v/v)

เติมน้ำขจัดไอออนประมาณ 500 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 1000 mL ค่อยๆ เติมกรดไนตริก (4.2.1) ปริมาตร 10 mL เขย่าให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำขจัดไอออน แล้วเขย่าให้เข้ากันอีกครั้ง

4.2.3 สารละลายกรดไนตริก 2% (v/v)

เติมน้ำขจัดไอออนประมาณ 800 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 2000 mL ค่อยๆ เติมกรดไนตริก (4.2.1) ปริมาตร 40 mL เขย่าให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำขจัดไอออน แล้วเขย่าให้เข้ากันอีกครั้ง

4.2.4 กรดเพอร์คลอริก (Perchloric acid, HClO_4) AR grade ความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 70%

4.2.5 น้ำขจัดไอออน ความต้านทานไม่น้อยกว่า 18 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$

4.3 สารมาตรฐาน (Standard)

4.3.1 Stock selenium standard solution ความเข้มข้น 1000 mg/L เก็บที่อุณหภูมิ 2 - 8 °C

4.3.2. การเตรียม intermediate selenium standard solution ความเข้มข้น 10 mg/L

ปิเปต stock selenium standard solution ความเข้มข้น 1000 mg/L ปริมาตร 1 mL ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 100 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายไนตริก 1% สารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้ให้ถ่ายเทใส่หลอดใส่ตัวอย่าง เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 °C มีอายุการใช้งาน 30 วัน

4.3.3 การเตรียม working selenium standard solution ความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.10, 0.50 และ 1.00 mg/L กับที่อุณหภูมิ 2-8 °C มีอายุการใช้งาน 30 วัน

4.3.3.1 Working selenium standard solution ความเข้มข้น 1.00 mg/L

ปิเปต intermediate selenium standard solution เข้มข้น 10 mg/L ปริมาตร 10 mL ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 100 mL และปรับปริมาตรด้วยสารละลายกรดไนตริก 1% (v/v)

4.3.3.2 Working selenium standard solution ความเข้มข้น 0.50 mg/L

ปิเปต intermediate selenium standard solution เข้มข้น 10 mg/L ปริมาตร 5 mL ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 100 mL และปรับปริมาตรด้วยสารละลายกรดไนตริก 1% (v/v)

4.3.3.3 Working selenium standard solution ความเข้มข้น 0.10 mg/L

ปิเปต intermediate selenium standard solution ความเข้มข้น 10 mg/L ปริมาตร 1 mL ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 100 mL และปรับปริมาตรด้วยสารละลายกรดไนตริก 1% (v/v)

4.3.3.4 Working selenium standard solution ความเข้มข้น 0.05 mg/L

ปิเปต working selenium standard solution ความเข้มข้น 1.00 mg/L ปริมาตร 5 mL ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 100 mL และปรับปริมาตรด้วยสารละลายกรดไนตริก 1% (v/v)

4.3.3.5 Working selenium standard solution ความเข้มข้น 0.01 mg/L

ปิเปต working selenium standard solution ความเข้มข้น 1.00 mg/L ปริมาตร 1 mL ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 100 mL และปรับปริมาตรด้วยสารละลายกรดไนตริก 1% (v/v)

5. วิธีดำเนินการ

5.1 ชั่งตัวอย่าง 1.0000 ± 0.0002 g ใส่ลงใน beaker ขนาด 100 mL

5.2 เติมกรดไนตริกเข้มข้น ปริมาตร 20 mL นำไปย่อยบนแท่นความร้อนจนหมดควันสีแดง ยกออกจากแท่นความร้อนแล้วทิ้งไว้ให้เย็น

5.3 เติมกรดเปอร์คลอริกเข้มข้นปริมาตร 10 mL นำไปย่อยบนแท่นความร้อนจนเกิดควันสีขาว ยกออกจากแท่นความร้อนแล้วทิ้งไว้ให้เย็น

5.4 ถ่ายใส่ volumetric flask ขนาด 250 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำขจัดไอออน ผสมให้เข้ากัน แล้วกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4

5.5 ทดสอบหาปริมาณซีลีเนียมในสารละลายตัวอย่างด้วยเทคนิค Inductively Coupled Plasma–Optical Emission Spectrometry (ICP–OES) โดยตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 238.204 นาโนเมตร

5.6 หาสถานะที่เหมาะสมของเครื่อง ICP-OES ที่จะใช้เป็นวิธีทดสอบ

5.7 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบซีลีเนียมในอาหารสัตว์ด้วยเครื่อง ICP-OES

5.7.1 ทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (linearity)

5.7.1.1 เตรียมสารมาตรฐานซีลีเนียม 5 ระดับความเข้มข้น คือ 0.01, 0.05, 0.10, 0.50 และ 1.00 mg/L

5.7.1.2 ตรวจวัดสารละลายมาตรฐานซีลีเนียมด้วยเครื่อง ICP-OES ที่ความยาวคลื่น 238.204 นาโนเมตร

5.7.1.3 สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานซีลีเนียม

5.7.2 การทดสอบความแม่นยำ (accuracy)

5.7.2.1 เตรียม spiked sample โดยชั่งอาหารไก่ อาหารสุกร อาหารโค และอาหารจิ้งหรีด 1.0000 ± 0.0002 กรัม เติมสารละลายมาตรฐานซีลีเนียม 4 ระดับ คือ ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 mg/kg ระดับความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

5.7.2.1.1 ที่ระดับ 0.5 mg/kg ปีเปตสารละลายมาตรฐานซีลีเนียมความเข้มข้น 0.5 mg/L ปริมาตร 1 ml ลงใน sample blank

5.7.2.1.2 ที่ระดับ 1.0 mg/kg ปีเปตสารละลายมาตรฐานซีลีเนียมความเข้มข้น 1 mg/L ปริมาตร 1 ml ลงใน sample blank

5.7.2.1.3 ที่ระดับ 2.0 mg/kg ปีเปตสารละลายมาตรฐานซีลีเนียมความเข้มข้น 1 mg/L ปริมาตร 2 ml ลงใน sample blank

5.7.2.1.4 ที่ระดับ 5.0 mg/kg ปีเปตสารละลายมาตรฐานซีลีเนียมความเข้มข้น 1 mg/L ปริมาตร 5 ml ลงใน sample blank

5.7.2.3 ทดสอบ sample blank ชนิดตัวอย่างละ 10 ซ้ำ และทดสอบ spiked sample แต่ละชนิดตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

5.7.2.4 คำนวณค่าซีลีเนียมเฉลี่ย ($\bar{x}$)

5.7.2.5 ประเมินค่าความแม่นยำ (accuracy) โดยใช้ค่า %recovery ของค่าซีลีเนียมเฉลี่ยเปรียบเทียบกับค่า spiked sample ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ โดยทุกระดับความเข้มข้นต้องอยู่ในเกณฑ์การยอมรับของ AOAC (2023)

5.7.2.6 ทดสอบตัวอย่าง Certified Reference Materials (CRM) DORM-5 ชนิดตัวอย่าง fish protein โดยทดสอบจำนวน 10 ซ้ำ เพื่อแสดงว่าวิธีทดสอบมี

trueness ใช้สมการ $t_{cal} = \frac{|\bar{x} - \mu| \sqrt{n}}{s}$ มีเกณฑ์ยอมรับคือ ค่า t_{cal} จากการคำนวณ (ไม่คิดเครื่องหมาย) เปรียบเทียบกับค่า t_{cirt} จากตาราง ที่ $df = n-1$ และ $p = 0.05$ โดย t_{cal} ต้องน้อยกว่า t_{cirt} และค่า %Mean recovery ต้องอยู่ในเกณฑ์การยอมรับของ AOAC (2023)

5.7.3 ประเมินความเที่ยง (precision)

5.7.3.1 Repeatability มีเกณฑ์ยอมรับคือ คำนวณค่า %RSD_r ของแต่ละความเข้มข้นในชุดนั้น ๆ ผลทดสอบต้องมีค่าน้อยกว่า %PRSD_r (AOAC, 2023)

5.7.3.2 Within-laboratory reproducibility โดยทำการทดสอบซ้ำต่างวัน ห่างกัน 7 วัน และ 14 วัน และประเมินค่าความเที่ยง แบบ within-laboratory reproducibility มีเกณฑ์ยอมรับคือ คำนวณค่า %RSD_R ของแต่ละชุดความเข้มข้นนั้น ต้องมีค่าน้อยกว่า %PRSD_R (AOAC, 2023)

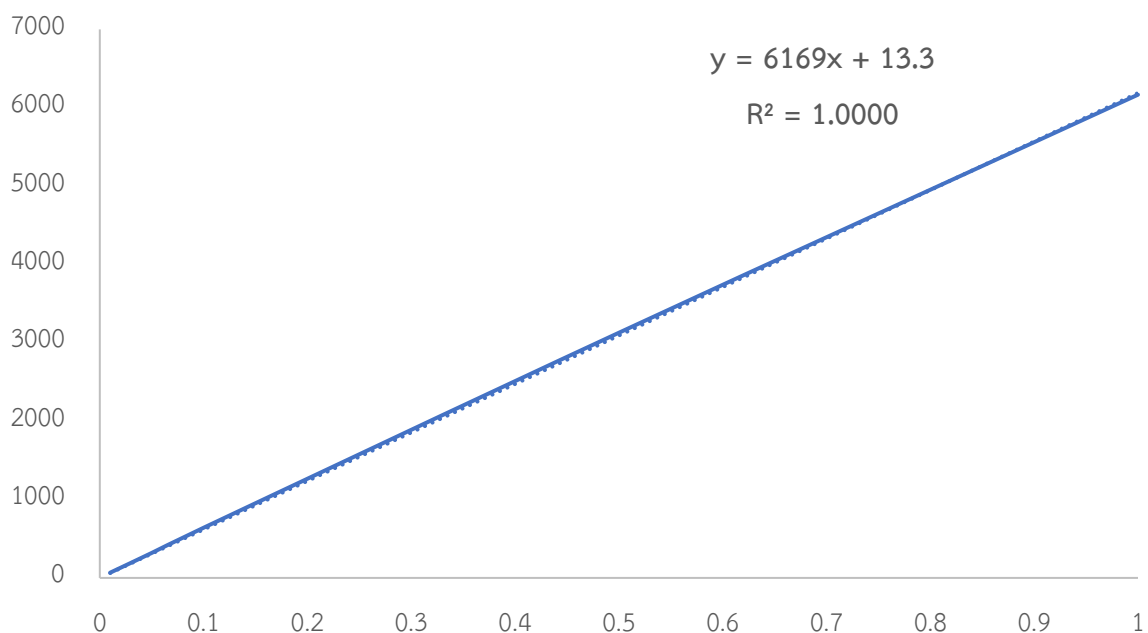
6. ผลการทดลอง

6.1 ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง ICP-OES ในการทดสอบซีลีเนียมในอาหารสัตว์ โดยตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 238.204 โดยมีสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง ดังนี้

ตารางที่ 2 สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง ICP-OES ในการทดสอบซีลีเนียมในอาหารสัตว์

Parameters	Conditions
RF Power	1500 watts
Flow gas:	
Plasma Gas Flow	10 L/min
Auxiliary Gas Flow	0.2 L/min
Nebulizer Gas Flow	0.5 L/min
Plasma view	Axial
Speed pump	1 mL/min

6.2 ได้ทดสอบหา linearity โดยใช้สารมาตรฐานซีลีเนียมที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.10, 0.50 และ 1.00 mg/L



ภาพที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง intensity (cps) และค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐานซีลีเนียมที่ความเข้มข้น 0.01 - 1.0 mg/L

6.3 ผลการหาค่า limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ)

ทดสอบ sample blank จำนวน 10 ซ้ำ นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S_0) แล้วคำนวณหาค่า LOD จาก $3S'_0$ และค่า LOQ จาก $10S'_0$ ให้ผลดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงผลการทดสอบหาค่า LOD และ LOQ ของวิธีทดสอบซีลีเนียมในอาหารสัตว์ ตัวอย่างละ 10 ซ้ำ

	Se (mg/kg)			
	Swine feed	Poultry feed	Bovine feed	Cricket feed
mean	0.201	0.206	0.388	0.265
S_0	0.037	0.057	0.052	0.030
S'_0	0.045	0.069	0.064	0.037
LOD	0.14	0.21	0.19	0.11
LOQ	0.45	0.69	0.64	0.37

จะเห็นว่าผลการทดสอบหาปริมาณซีลีเนียมในตัวอย่างอาหารสัตว์ มีค่า limit of detection (LOD) ของเท่ากับ 0.20 mg/kg และ limit of quantification (LOQ) เท่ากับ 0.50 mg/kg

6.4 ผลการยืนยัน LOQ ของการทดสอบซีลีเนียม

ผลการยืนยันค่า LOQ โดยทดสอบ spiked sample ที่มีความเข้มข้นของซีลีเนียมระดับ 0.50 mg/kg จำนวน 10 ซ้ำ แล้วคำนวณหาค่า %Recovery, %Mean Recovery, %RSD_r และ %PRSD_r พบว่าทุกค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบซีลีเนียมในอาหารสัตว์ที่ความเข้มข้นเท่ากับ LOQ (0.50 mg/kg) ตัวอย่างละ 10 ซ้ำ

	Se (mg/kg)			
	Swine feed	Poultry feed	Bovine feed	Cricket feed
mean (mg/kg)	0.501	0.490	0.501	0.488
% Mean recovery	100.14	97.90	100.24	97.60
SD (mg/kg)	0.030	0.020	0.024	0.028
RSD _r (%)	5.96	4.01	4.77	5.65
PRSD _r (%)	16.57	11.72	11.72	11.72

ผลการยืนยัน LOQ ในการทดสอบหาปริมาณซีลีเนียมในตัวอย่างอาหารสัตว์ พบว่ามีค่า %mean recovery อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (80 - 110%) และ %RSD_r น้อยกว่า %PRSD_r แสดงว่า LOQ มีความแม่นยำและความเที่ยง

6.5 ผลการทดสอบความแม่นยำ (accuracy)

6.5.1 ผลการทดสอบความแม่นยำของวิธีทดสอบ โดยทดสอบ spiked sample ที่มีความเข้มข้นของซีลีเนียมทั้งหมด 4 ระดับคือ 0.05, 1.00, 2.00 และ 5.00 mg/kg ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ แล้วคำนวณค่า % mean recovery พบว่าความเข้มข้นทั้งหมดมีเกณฑ์การยอมรับ %mean recovery อยู่ในช่วง 80 - 110% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับของ AOAC (2023c) แสดงว่าวิธีทดสอบนี้มีความแม่นยำเป็นที่ยอมรับได้ ดังแสดงในตารางที่ 5 - 6

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบซีลีเนียมจำนวน 10 ซ้ำ ในตัวอย่าง spiked sample ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในตัวอย่างอาหารสุกร และตัวอย่างอาหารไก่

	Selenium in Swine feed (mg/kg)				Selenium in Poultry feed (mg/kg)			
	0.50	1.00	2.00	5.00	0.50	1.00	2.00	5.00
mean (mg/kg)	0.485	0.959	1.990	4.991	0.501	0.916	1.881	4.796
%mean recovery	96.96	95.92	99.50	99.83	100.28	91.56	94.06	95.91
SD (mg/kg)	0.037	0.041	0.076	0.098	0.026	0.050	0.100	0.213
RSD _r (%)	4.96	3.32	3.35	4.99	5.24	5.45	5.33	4.80
PRSD _r (%)	16.57	10.56	9.51	8.29	16.57	10.56	9.51	8.29

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบซีลีเนียมจำนวน 10 ซ้ำ ในตัวอย่าง spiked sample ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในตัวอย่างอาหารโค และตัวอย่างอาหารจิ้งหรีด

	Selenium in Bovine feed (mg/kg)				Selenium in Cricket feed (mg/kg)			
	0.50	1.00	2.00	5.00	0.50	1.00	2.00	5.00
mean conc. (mg/kg)	0.464	0.903	1.946	4.915	0.501	1.012	1.956	4.869
%mean recovery	92.72	90.29	97.30	98.29	100.24	101.16	97.80	97.37
SD (mg/kg)	0.045	0.069	0.086	0.127	0.036	0.033	0.128	0.151
RSD _r (%)	9.70	7.61	4.41	2.58	7.18	3.30	6.55	3.10
PRSD _r (%)	16.57	10.56	9.51	8.29	16.57	10.56	9.51	8.29

6.5.2 การทดสอบ CRM

ทดสอบ CRM Material DORM-5 ชนิดตัวอย่าง fish protein จำนวน 10 ซ้ำ

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบซีลีเนียมในตัวอย่าง CRM DORM-5 ชนิดตัวอย่าง fish protein จำนวน 10 ซ้ำ และประเมิน trueness และ %Recovery

ผลการทดสอบซีลีเนียม	
$\bar{x}$ (mg/kg)	0.355
Standard Deviation (S) (mg/kg)	0.0178
True value or Certified value (μ) (mg/kg)	0.365
t_{cal}	1.73
t_{cirt}	2.26
% mean recovery (เกณฑ์การยอมรับ 80 - 110)	97.34

หาค่า t_{cal} จากการคำนวณ (ไม่คิดเครื่องหมาย) เปรียบเทียบ t_{cirt} จากตาราง โดย $df = n-1$ และ $p = 0.05$

พบว่า $t_{cal} < t_{cirt}$ แสดงว่าวิธีทดสอบมี trueness และมี %Recovery อยู่ในเกณฑ์การยอมรับของ AOAC (2023)

6.6 ผลทดสอบความเที่ยง (precision)

6.6.1 ผลทดสอบความเที่ยงแบบทวนซ้ำได้ (repeatability) โดยทดสอบ spiked sample ที่มีความเข้มข้นของซีลีเนียมทั้งหมด 4 ระดับคือ 0.05, 1.00, 2.00 และ 5.00 mg/kg ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ แล้วคำนวณหาค่า $\%RSD_r$ และ $\%PRSD_r$ พบว่าทุกระดับความเข้มข้นมีค่า $\%RSD_r$ น้อยกว่าค่า $\%PRSD_r$ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ แสดงว่าวิธีทดสอบนี้มีความเที่ยงแบบทวนซ้ำได้เป็นที่ยอมรับได้ ดังแสดงในตารางที่ 5 - 6

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

6.6.2 ผลทดสอบความเที่ยงแบบ within-laboratory reproducibility โดยทดสอบ spiked sample ที่มีความเข้มข้นของสารซีลีเนียมทั้งหมด 4 ระดับความเข้มข้นคือ ความเข้มข้น 0.05, 1.00, 2.00 และ 5.00 mg/kg ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ จำนวน 3 ชุดการทดสอบ ต่างวัน 7 และ 14 วัน การคำนวณหาค่า $\%RSD_R$ และ $\%PRSD_R$ พบว่าทุกระดับความเข้มข้นมีค่า $\%RSD_R$ น้อยกว่าค่า $\%PRSD_R$ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ แสดงว่าวิธีทดสอบมีความเที่ยงแบบทำซ้ำได้เป็นที่ยอมรับได้ ดังแสดงในตารางที่ 8 - 9

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

ตารางที่ 8 แสดงการประเมินหาความเที่ยงแบบ within-laboratory reproducibility ของซีลีเนียมในตัวอย่างอาหารไก่ และตัวอย่างอาหารสุกร ทดสอบความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ และทดสอบซ้ำห่างกัน 7 และ 14 วัน (รวมเป็น 3 ครั้ง)

	Selenium in Poultry feed (mg/kg)				Selenium in Swine feed (mg/kg)			
	0.05	1.00	2.00	5.00	0.05	1.00	2.00	5.00
Mean (mg/kg)	0.470	0.955	1.946	4.951	0.482	0.976	1.990	4.991
SD (mg/kg)	0.035	0.059	0.129	0.232	0.032	0.051	0.073	0.119
RSD _R (%)	7.47	6.20	6.62	4.69	6.57	5.27	3.66	2.83
PRSD _R (%)	25.11	16.00	14.41	12.56	25.11	16.00	14.41	12.56

ตารางที่ 9 แสดงการประเมินหาความเที่ยงแบบ within-laboratory reproducibility ของซีลีเนียมในตัวอย่างอาหารโค และอาหารจิ้งหรีด ทดสอบความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ และทดสอบซ้ำห่างกัน 7 และ 14 วัน (รวมเป็น 3 ครั้ง)

	Selenium in Bovine feed (mg/kg)				Selenium in Cricket feed (mg/kg)			
	0.05	1.00	2.00	5.00	0.05	1.00	2.00	5.00
Mean (mg/kg)	0.459	0.930	1.934	4.894	0.478	0.970	1.991	4.944
SD (mg/kg)	0.036	0.059	0.085	0.108	0.041	0.054	0.105	0.185
RSD _R (%)	7.77	6.39	4.38	2.21	8.62	5.52	5.28	3.74
PRSD _R (%)	25.11	16.00	14.41	12.56	25.11	16.00	14.41	12.56

7. สรุปผลการทดลอง

7.1 หาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง ICP-OES สำหรับทดสอบซีลีเนียมในอาหารสัตว์ ผลการทดสอบ linearity ของสารละลายมาตรฐานซีลีเนียมพบว่า coefficient of correlation (r) เท่ากับ 1.000 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ r ไม่น้อยกว่า 0.995

7.2 ผลการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ limit of detection (LOD) เป็นปริมาณซีลีเนียมต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถตรวจพบได้คือ LOD เท่ากับ 0.20 mg/kg

7.3 ผลการทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ limit of quantification (LOQ) เป็นปริมาณซีลีเนียมต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้คือ LOQ เท่ากับ 0.50 mg/kg

7.4 ผลการทดสอบความแม่นยำของวิธีทดสอบ

7.4.1 การทดสอบความแม่นยำโดยการ spiked sample ในตัวอย่างอาหารสัตว์ ที่มีความเข้มข้นของซีลีเนียมทั้งหมด 4 ระดับคือ 0.50, 1.00, 2.00 และ 5.00 mg/kg ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ มีค่า %mean recovery ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับของ AOAC (2023c)

7.4.2 การประเมิน trueness ตัวอย่าง CRM DORM-5 ชนิดตัวอย่าง fish protein จำนวน 10 ซ้ำ พบว่า $t_{cal} < t_{cirt}$ แสดงว่าวิธีทดสอบมี trueness และมี %Recovery อยู่ในเกณฑ์การยอมรับของ AOAC (2023)

7.5 ผลการทดสอบความเที่ยงของวิธีทดสอบ

7.5.1 ความเที่ยงแบบ repeatability จากการทดสอบ spiked sample ที่มีความเข้มข้นของซีลีเนียมทั้งหมด 4 ระดับ คือความเข้มข้น 0.50, 1.00, 2.00 และ 5.00 mg/kg ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ มีค่า %RSD_r น้อยกว่า ค่า %PRSD_r ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับของ AOAC (2023)

7.5.2 ความเที่ยงแบบ within-laboratory reproducibility จากการทดสอบ spiked sample ที่มีความเข้มข้นของสารซีลีเนียม ทั้งหมด 4 ระดับ คือความเข้มข้น 0.50, 1.00, 2.00 และ 5.00 mg/kg ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ จากนั้นทดสอบซ้ำห่างกัน 7 วัน และ 14 วัน (ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ) นำค่าทั้งหมดมาประเมินค่า %RSD_R พบว่า %RSD_R น้อยกว่าค่า %PRSD_R ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับของ AOAC (2023)

7.6 การทดสอบซีลีเนียมในอาหารสัตว์ สรุปได้ว่า ในช่วงการใช้งาน (working range) คือ 0.50 – 5.00 mg/kg วิธีทดสอบมีความแม่นยำและความเที่ยง

สรุปได้ว่าการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบซีลีเนียมในอาหารสัตว์ มีความแม่นยำและความเที่ยงเหมาะสมจะใช้เป็นวิธีทดสอบต่อไป

8. เอกสารอ้างอิง

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

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

วรรณพร ทะพิงค์แก. 2560. **อาหารและการให้อาหารสัตว์ (Feeds and Feeding)**. ศูนย์บริหารงานวิจัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. อุทัย คันโธ. 2559. **อาหารสุกรและสัตว์ปีกเชิงประยุกต์**. ยู เค ที, ฉะเชิงเทรา.

AOAC. 2023. **AOAC Official Method 935.13 Calcium in Animal Feed**. Ch.4. AOAC Official Methods of Analysis. 22nd 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, zinc, copper, manganese, cobalt, molybdenum and lead by ICP-AES**. European Committee for Standardization, Brussels.

European Commission. 2016. **COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) 2017/2330** of 14 December 2017 concerning the authorisation of Iron(II) carbonate, Iron(III) chloride hexahydrate, Iron(II) sulphate monohydrate, Iron(II) sulphate heptahydrate, Iron(II) fumarate, Iron(II) chelate of amino acids hydrate, Iron(II) chelate of protein hydrolysates and Iron(II) chelate of glycine hydrate as feed additives for all animal species and of Iron dextran as feed additive for piglets and amending Regulations (EC) No 1334/2003 and (EC) No 479/2006 Official Journal of the European Union. L182: 7-27.

European Union. 2019. **COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) 2019/49** of 4 January 2019 concerning the authorisation of sodium selenite, coated granulated sodium selenite and zinc-L- selenomethionine as feed additives for all animal species. Official Journal of the European Union. L10: 2-10.

European Union. 2014. **COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) No 847/2014** of 4 August 2014 concerning the authorisation of DL- selenomethionine as a feed additive for all animal species. Official Journal of the European Union. L232: 10-12

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>.

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

National Research Council. 2005. **Mineral Tolerance of Animals: Second Revised Edition**. The National Academies Press, Washington, DC.

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.

Suttle, N.F. 2021. **Mineral nutrition of livestock**. 5th ed. CAB International, Boston.