การพัฒนาวิธีทดสอบสารหนูในอาหารสัตว์ด้วยเครื่อง ICP-OES

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

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีทดสอบสารหนูในอาหารสัตว์โดยใช้เครื่อง Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer (ICP-OES) ด้วยเทคนิค Cyclonic spray chamber ได้ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน AOAC 984.27 (2016) โดยใช้ตัวอย่างทดสอบความชำนาญ (Proficiency testing, PT) ชนิด Soya flour มาทดสอบหาปริมาณสารหนูเปรียบเทียบกับเทคนิค Hydride generation ทำการทดสอบ Linearity ของสารละลายมาตรฐานสารหนูที่ระดับความเข้มข้น 0.01-1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรง โดยเทคนิค Cyclonic spray chamber มีค่า Regression coefficient(R^2) เท่ากับ 0.9999 และเทคนิค Hydride generation มีค่า Regression coefficient(R^2) เท่ากับ 0.9982 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (≥0.995) ทำการศึกษาเปรียบเทียบหาปริมาณสารหนูในตัวอย่าง PT ชนิด Soya flour ที่มีค่า Assigned value เท่ากับ 0.885 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยเทคนิค Cyclonic spray chamber และเทคนิค Hydride generation มีค่า %Recovery เท่ากับ 102.15 และ 104.07 (AOAC, 80-110%) และนำผลทดสอบของทั้ง 2 เทคนิคมาเปรียบเทียบและประเมินความเที่ยงโดยใช้สถิติ F-test พบว่า F_{cal} น้อยกว่า F_{crit} และผลการประเมินความแม่น (Accuracy) โดยใช้สถิติ t-test พบว่า t_{cal} น้อยกว่า t_{crit} แสดงว่าผลการทดสอบทั้ง 2 เทคนิคไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากนั้นห้องปฏิบัติการได้ทดสอบหาปริมาณสารหนูด้วยการ Spiked sample สารหนูในตัวอย่างอาหารไก่ อาหารเป็ด และ ปลาป่น โดยเครื่อง ICP-OES ด้วยเทคนิค Cyclonic spray chamber พบว่า ตัวอย่างอาหารไก่ ที่ระดับความเข้มข้น 1, 2 และ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่า %Recovery เท่ากับ 95.20, 100.10 และ 104.68 ตัวอย่างอาหารเป็ด ที่ระดับความเข้มข้น 1, 2 และ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่า %Recovery เท่ากับ 104.40, 103.35 และ 102.76 ตัวอย่างปลาป่นที่ระดับความเข้มข้น 2, 10 และ 30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่า %Recovery เท่ากับ 88.90, 96.33 และ 99.08 (AOAC, 80-110%) แสดงว่าผลทดสอบมีความแม่น และจากการทดสอบซ้ำแบบทวนซ้ำ (Repeatability) ของอาหารสัตว์ทั้ง 3 ชนิด พบว่า %RSDr ของผลทดสอบน้อยกว่า %PRSDr แสดงว่าผลทดสอบมีความเที่ยง

คำสำคัญ : สารหนู การพัฒนาวิธีทดสอบ อาหารสัตว์ ICP-OES

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Method Validation for Determination of Arsenic in Feed by ICP-OES

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

Method development is presented for determination of Arsenic by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) by cyclonic spray chamber technique. This method was modified according to AOAC 984.27 (2016) using PT sample, soya flour for determination of arsenic comparing with hydride generation technique. The study showed that the regression correlation (R^2) of the arsenic standard solution at level 0.01-1.00 mg/L by cyclonic spray chamber technique and Hydride generation technique was 0.9999 and 0.9982 (≥0.995). Soya flour which provided by PT provider with assigned value 0.885 mg/kg used for arsenic testing by using cyclonic spray chamber technique and hydride generation technique. The results revealed that %recovery of 2 techniques was within acceptable criteria (AOAC, 80-110 %) at 102.15 and 104.07, respectively. The method validation result from developed method evaluated the precision of 2 test methods by using F-test showed $F_{cal} < F_{crit}$ and t-test used for accuracy evaluation represented $t_{cal} < t_{crit}$. The test method results had no significantly difference. Laboratory, then, determined arsenic using spiked sample in chicken feed, duck feed and fish meal by ICP-OES with cyclonic spray chamber technique. Chicken feed sample spiked with 1, 2 and 5 mg/kg represented that %recovery was 95.20, 100.10 and 104.68, respectively, and %recovery of duck feed sample spiked with 1, 2 and 5 mg/kg was 104.40, 103.35 and 102.76, respectively. Spiked sample in fish meal at concentration level 2, 10 and 30 mg/kg showed that %recovery was 88.89, 96.33 and 99.08, respectively (AOAC, 80-110%) which showing accuracy of test method. Confirmation of method precision using repeatabily of 3 feed samples revealed $\%RSD_r < \%PRSD_r$.

Keywords : Arsenic, Method validation, Feed, ICP-OES

Feed Quality Control Laboratory Division, Bureau of Quality Control of Livestock Products

การพัฒนาวิธีทดสอบสารหนูในอาหารสัตว์ด้วยเครื่อง ICP-OES

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

บทนำ

สารหนู หรืออาร์เซนิก (Arsenic; As) เป็นธาตุกึ่งโลหะ (metalloid) มีคุณสมบัติเป็นทั้งโลหะ และอโลหะ เกิดขึ้นตามธรรมชาติ พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม โดยสารหนูบริสุทธิ์ (metallic arsenic) มีลักษณะเป็นของแข็งสีเทา แต่ส่วนใหญ่มักพบสารหนูอยู่รวมกับธาตุอื่น ๆ เช่น ออกซิเจน คลอรีน และกำมะถัน เป็นต้น สารหนูที่รวมกับธาตุเหล่านี้เรียกว่าสารหนูอนินทรีย์ สารหนูที่รวมกับคาร์บอน และไฮโดรเจนเรียกว่าสารหนูอินทรีย์ โดยสารประกอบสารหนูอินทรีย์และอนินทรีย์ส่วนใหญ่เป็นผงสีขาวหรือไม่มีสี ไม่ระเหย ไม่มีกลิ่น และไม่มีรสชาติใดเป็นพิเศษ ความเป็นพิษของสารหนูในรูปสารหนู อนินทรีย์มีความเป็นพิษมากกว่าสารหนูบริสุทธิ์และสารหนูอินทรีย์และสารหนู รูปแบบไตรเวเลนต์ (trivalent; As^{3+}) มีความเป็นพิษมากกว่าสารหนูในรูปแบบ เพนตะเวเลนต์ (pentavalent;As^{5+}) (เนาวรัตน์, 2559)

สารหนูเข้าสู่ร่างกายมากที่สุดจากการกินอาหารและน้ำที่มีสารหนูปนเปื้อนและจะถูกตับเปลี่ยนเป็นสารประกอบ methyl arsenic compound ที่มีความเป็นพิษน้อย โดยอาศัยกระบวนการ biomethylation แล้วขับออกจากร่างกายทางปัสสาวะและน้ำดี แต่หากได้รับสารหนูปริมาณมากจนมีการตกค้างในร่างกายอาจสร้างความเป็นพิษโดยเข้าสู่เซลล์ผ่านช่องแคลเซียม (Calcium channel) และจับกับหมู่ซัลฟ์ไฮดริล (sulfhydryl; -SH) เป็นสารประกอบ As-S complex ทำให้โปรตีนหรือเอนไซม์เสียสภาพไม่สามารถทำงานได้ หรือจับกับฟอสเฟตในเซลล์เป็น arsenoester ทำให้ขาด ATP ที่เป็นสารให้พลังงานกับเซลล์ หรือทำให้เซลล์สร้างสารประเภทอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species) เช่น H_2O_2, $ROO^{\bullet}$, $HO^{\bullet}$, NO ทำลายสารชีวโมเลกุลของเซลล์ การสัมผัสสารประกอบสารหนูเป็นระยะเวลานานโดยเฉพาะจากการทำงานจะทำให้เซลล์ผิวหนังแบ่งตัวเพิ่มจำนวนจนหนานูน (arsenic keratosis) ทำลายหลอดเลือดที่บริเวณสัมผัสจนเกิดภาวะเขียวคล้ำ (acrocyanosis) ตามด้วยภาวะเนื้อตายเป็นหย่อม ๆ หรือ โรคเท้าดำ (blackfoot disease) และอาจกลายเป้นมะเร็งผิวหนังชนิด squamous cell carcinoma โดยสารหนูในรูป As^{3+} จะทำหน้าที่เป็นโปรโมเตอร์เข้าไปจับกับเอนไซม์ DNA ligase ขัดขวางการซ่อมแซมดีเอ็นเอของเซลล์ ส่วนสารหนูในรูป As^{5+} ทำหน้าที่จับกับฟอสเฟตของดีเอ็นเอจนชำรุดและกลายพันธุ์เป็นมะเร็ง (เนาวรัตน์, 2559; วีรวรรณ, 2558)

การหาปริมาณสารหนูในอาหารสัตว์ที่มีการใช้โดยทั่วไปจะใช้เทคนิค Hydride generation สารหนูที่อยู่ในรูป As^{3+} เมื่อทำปฏิกิริยากับ Sodium borohydride ($NaBH_4$) ในสภาวะที่เป็นกรดอ่อนจะเปลี่ยนเป็นสารประกอบไฮไดรด์ซึ่งอยู่ในรูปของแก๊สอาร์ไซน์ (AsH_3) ส่วนสารหนูที่อยู่ในรูป As^{5+} ต้องเปลี่ยนให้เป็น As^{3+} ด้วย KI และ Ascorbic acid ก่อนทำปฏิกิริยากับ Sodium borohydride (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2558) และแก๊สอาร์ไซน์ (Arsine; AsH_3)

ซึ่งเทคนิค Hydride Generation มีการใช้สารเคมีหลายชนิด มีค่าใช้จ่ายของการวิเคราะห์สูง และขั้นตอนการวิเคราะห์ค่อนข้างยุ่งยาก ซึ่งต้องมีการต่อชุด Hydride Generator กับเครื่องด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) อีกทั้งผู้ปฏิบัติงานอาจเกิดอันตรายจากการสูดดมสัมผัสสารเคมี เนื่องจากแก๊สอาร์ไซน์ (Arsine; AsH_3) ซึ่งเป็นพิษ มีกลิ่นคล้ายกระเทียมเมื่อเข้าสู่ร่างกายทำให้เม็ดเลือดแดงแตก จนเกิดภาวะเซลล์ขาดออกซิเจน และอาจเสียชีวิตได้จากภาวะไตวายเฉียบพลันเนื่องจากส่วนประกอบเม็ดเลือดแดงที่แตกอุดตันในท่อหน่อยไต (วีรวรรณ, 2558)

ห้องปฏิบัติการงานเคมี กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ จึงได้ศึกษาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารหนู โดยใช้เครื่อง ICP-OES ด้วยเทคนิค Cyclonic spray chamber โดยใช้ตัวอย่างทดสอบความชำนาญ (Proficiency testing, PT) ที่ทราบค่า Assigned value ทำการทดสอบหาปริมาณสารหนูเปรียบเทียบกับเทคนิค Hydride generation และนำผลทดสอบทั้ง 2 เทคนิคมาประเมินผลทางสถิติ จากนั้นได้เลือกใช้เทคนิค Cyclonic spray chamber ในการ Spiked sample สารหนูในอาหารสัตว์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในสภาวะการทดสอบแบบทวนซ้ำได้ (Repeatability) และทำการประเมินความแม่นและความเที่ยงของวิธีต่อไป

1. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีทดสอบสารหนูในอาหารสัตว์โดยเครื่อง ICP-OES ด้วยเทคนิค Cyclonic spray chamber โดยดัดแปลงจากวิธี AOAC 984.27 (2016) เพื่อให้ได้วิธีทดสอบที่เหมาะสมและจะได้ทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบต่อไป

2. ขอบข่าย

2.1 ดำเนินการเปรียบเทียบวิธีทดสอบสารหนูในอาหารสัตว์โดยเครื่อง ICP-OES ด้วยเทคนิค Cyclonic spray chamber และ Hydride generation

2.2 ทดสอบความแม่น (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีทดสอบสารหนูในอาหารสัตว์โดยเครื่อง ICP-OES ด้วยเทคนิค Cyclonic spray chamber

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

3.1 ได้วิธีทดสอบสารหนูในอาหารสัตว์โดยเครื่อง ICP-OES ด้วยเทคนิค **Cyclonic spray chamber** ซึ่งจะได้ทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบต่อไป

3.2 เพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นและยอมรับในวิธีทดสอบสารหนูในอาหารสัตว์ที่ได้ทำการพัฒนาขึ้นมา

4. วิธีดำเนินการ

4.1 ตัวอย่าง

4.1.1 ตัวอย่างทดสอบความชำนาญ (PT) ของ FAPAS ชนิด Soya Flour (07322) มีค่า Assigned value เท่ากับ 0.885 mg/kg

4.1.2 ตัวอย่างอาหารไก่

4.1.3 ตัวอย่างอาหารเป็ด

4.1.4 ตัวอย่างปลาป่น

4.2 สารเคมี

4.2.1 กรดไนตริก(HNO_3) ความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 65%

4.2.2 กรดไนตริก 2% (v/v) เตรียมโดยเติมน้ำขจัดไอออนประมาณ 500 mLลงใน Volumetric flask ขนาด 1000 mL แล้วเติมกรดไนตริก (ข้อ 4.2.1) ปริมาตร 20 mL เขย่าให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำขจัดไอออนจนครบ 1000 mL ผสมให้เข้ากัน

4.2.3 กรดเปอร์คลอริก($HClO_4$) ความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 70%

4.2.4 กรดไฮโดรคลอริก(HCl) ความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 37%

4.2.5 กรดไฮโดรคลอริก 10% (v/v) เตรียมโดยเติมน้ำขจัดไอออนประมาณ 100 mL ลงใน Volumetric flask ขนาด 200 mL แล้วเติมกรดไฮโดรคลอริก (ข้อ 4.2.4) ปริมาตร 20 mL เขย่าให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำขจัดไอออน ผสมให้เข้ากัน

4.2.6 Potassium iodide (KI)

4.2.7 Ascorbic acid ($C_6H_8O_6$)

4.2.8 สารละลาย KI/$C_6H_8O_6$ 5% (w/v) เตรียมโดยชั่ง KI 10 กรัม และ$C_6H_8O_6$ 10 กรัม ละลายด้วยน้ำขจัดไอออน ถ่ายใส่ Volumetric flask ขนาด 200 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำขจัดไอออน ผสมให้เข้ากัน

4.2.9 Sodium borohydride ($NaBH_4$)

4.2.10 Sodium hydroxide (NaOH)

4.2.11 สารละลาย Reductant ($NaBH_4$ 0.5% ใน NaOH 0.05%) เตรียมโดยชั่ง $NaBH_4$ 5 กรัม ละลายด้วยน้ำขจัดไอออน 100 mL และNaOH 0.5 กรัม ละลายด้วยน้ำขจัดไอออน 100 mL แล้วถ่ายใส่ Volumetric flask ขนาด 1000 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำขจัดไอออน ผสมให้เข้ากัน

4.2.12 น้ำขจัดไอออน ความต้านทานไม่น้อยกว่า 18 MΩ/cm

4.3 สารละลายมาตรฐาน

4.3.1 Stock arsenic standard solution ความเข้มข้น 1000 mg/L

4.3.2 การเตรียม Intermediate arsenic standard solution ความเข้มข้น 10 mg/L ปิเปต Stock arsenic standard solution ความเข้มข้น 1000 mg/L ปริมาตร 1 mL ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 100 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยกรดไนตริก 2%

4.3.3 การเตรียม Working arsenic standard solution สำหรับการทดสอบด้วยเทคนิค Cyclonic spray chamber ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.10, 0.50, และ 1.00 mg/L ปรับปริมาตรด้วยกรดไนตริกความเข้มข้น 2% ดังนี้

4.3.3.1 Working arsenic standard solution ความเข้มข้น 1.00 mg/L เตรียมโดยปิเปต Intermediate arsenic standard solution เข้มข้น 10 mg/L ปริมาตร 5000 µL ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 50 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยกรดไนตริกความเข้มข้น 2%

4.3.3.2 Working arsenic standard solution ความเข้มข้น 0.50 mg/L เตรียมโดยปิเปต Intermediate arsenic standard solution เข้มข้น 10 mg/L ปริมาตร 2500 µL ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 50 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยกรดไนตริกความเข้มข้น 2%

4.3.3.3 Working arsenic standard solution ความเข้มข้น 0.10 mg/L เตรียมโดยปิเปต Intermediate arsenic standard solution เข้มข้น 10 mg/L ปริมาตร 500 µL ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 50 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยกรดไนตริกความเข้มข้น 2%

4.3.3.4 Working arsenic standard solution ความเข้มข้น 0.05 mg/L เตรียมโดยปิเปต Intermediate arsenic standard solution เข้มข้น 10 mg/L ปริมาตร 250 µL ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 50 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยกรดไนตริกความเข้มข้น 2%

4.3.3.5 Working arsenic standard solution ความเข้มข้น 0.01 mg/L เตรียมโดยปิเปต Intermediate arsenic standard solution เข้มข้น 10 mg/L ปริมาตร 50 µL ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 50 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยกรดไนตริกความเข้มข้น 2%

4.3.4 การเตรียม Working arsenic standard solution สำหรับการทดสอบด้วยเทคนิค Hydride generation ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.10, 0.50, และ 1.00 mg/L ดังนี้

4.3.4.1 Working arsenic standard solution ความเข้มข้น 1.00 mg/L เตรียมโดยปิเปต Intermediate arsenic standard solution เข้มข้น 10 mg/L ปริมาตร 5000 µL ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 50 mL เติมกรดไฮโดรคลอริก 6 mL แล้วเติม 5% KI/$C_6H_8O_6$ 2 mL เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 45 นาที แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำขจัดไอออน ผสมให้เข้ากัน

4.3.4.2 Working arsenic standard solution ความเข้มข้น 0.50 mg/L เตรียมโดยปิเปต Intermediate arsenic standard solution เข้มข้น 10 mg/L ปริมาตร 2500 µL ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 50 mL เติมกรดไฮโดรคลอริก 6 mL แล้วเติม 5% KI/$C_6H_8O_6$ 2 mL เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 45 นาที แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำขจัดไอออน ผสมให้เข้ากัน

4.3.4.3 Working arsenic standard solution ความเข้มข้น 0.10 mg/L เตรียมโดยปิเปต Intermediate arsenic standard solution เข้มข้น 10 mg/L ปริมาตร 500 µL ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 50 mL เติมกรดไฮโดรคลอริก 6 mL แล้วเติม 5% KI/$C_6H_8O_6$ 2 mL เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 45 นาที แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำขจัดไอออน ผสมให้เข้ากัน

4.3.4.4 Working arsenic standard solution ความเข้มข้น 0.05 mg/L เตรียมโดยปิเปต Intermediate arsenic standard solution ความเข้มข้น 10 mg/L ปริมาตร 250 µL ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 50 mL เติมกรดไฮโดรคลอริก 6 mL แล้วเติม 5% KI/$C_6H_8O_6$ 2 mL เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 45 นาที แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำขจัดไอออน ผสมให้เข้ากัน

4.3.4.5 Working arsenic standard solution ความเข้มข้น 0.01 mg/L เตรียมโดยปิเปต Intermediate arsenic standard solution ความเข้มข้น 10 mg/L ปริมาตร 50 µL ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 50 mL เติมกรดไฮโดรคลอริก 6 mL แล้วเติม 5% KI/$C_6H_8O_6$ 2 mL เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 45 นาที แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำขจัดไอออน ผสมให้เข้ากัน

4.4 อุปกรณ์

4.4.1 เครื่องวิเคราะห์แร่ธาตุ (Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectrometer; ICP-OES) ยี่ห้อ Thermo Scientific รุ่น iCAP7400

4.4.2 ชุด Hydride generator

4.4.3 เครื่องชั่งไฟฟ้า ชั่งได้ละเอียด 0.0001 g

4.4.4 แผ่นให้ความร้อน (Hot plate)

4.4.5 Erlenmeyer flask ขนาด 50 mL

4.4.6 Volumetric flask class A ขนาด 50,100 และ 1000 mL

4.4.7 Volumetric pipette class A ขนาด 1 mL

4.4.8 Micropipette ขนาด 100, 1000 และ 5000 µL

4.4.9 กระดาษกรองเบอร์ 5

4.5 วิธีการ

4.5.1 วิธีทดสอบสารหนูในอาหารสัตว์โดยเครื่อง ICP-OES ด้วยเทคนิค Cyclonic spray chamber

4.5.1.1 ชั่งตัวอย่าง 1-2 g ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 50 mL

4.5.1.2 เติมกรดไนตริกเข้มข้น ปริมาตร 10 mL และเติมกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น ปริมาตร 4 mL

4.5.1.3 นำไปย่อยบนแผ่นให้ความร้อนจนเกิดควันขาวและสารละลายตัวอย่างใส วางทิ้งให้เย็น

4.5.1.4 ถ่ายใส่ Volumetric flask ขนาด 50 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำขจัดไอออน ผสมให้เข้ากัน แล้วกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 5

4.5.1.5 Conditions ของเครื่อง ICP-OES ที่ใช้ทดสอบเทคนิค Cyclonic spray chamber

Measure Mode	Axial
Exposure Time (s)	UV 45/VIS 5
RF Power (W)	UV 1150/VIS 1150
Nebulizer Gas Flow (L/min)	UV 0.55/VIS 0.55
Auxiliary Gas Flow ((L/min)	0.50
Coolant gas flow (L/min)	12
Pump speed (rpm)	50
Flush Pump Speed (rpm)	50
Uptake Time (s)	60
Rinse (s)	30
Replicate	3

4.5.1.6 ตรวจหาปริมาณสารหนูในสารละลายด้วยเครื่อง ICP–OES ที่ความยาวคลื่น 189.042 นาโนเมตร

4.5.2 วิธีทดสอบสารหนูในอาหารสัตว์โดยเครื่อง ICP-OES ด้วยเทคนิค Hydride generation

4.5.2.1 ชั่งตัวอย่าง 1-2 g ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 50 mL

4.5.2.2 เติมกรดไนตริกเข้มข้น ปริมาตร 10 mL และเติมกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น ปริมาตร 4 mL

4.5.2.3 นำไปย่อยบนแผ่นให้ความร้อนจนเกิดควันขาวและสารละลายตัวอย่างใส วางทิ้งให้เย็น

4.5.2.4 ถ่ายใส่ Volumetric flask ขนาด 50 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำขจัดไอออน ผสมให้เข้ากัน แล้วกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 5

4.5.2.5 ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 20 mL ใส่ลงในหลอดตัวอย่างขนาด 50 mL

4.5.2.6 เติมกรดไฮโดรคลอริก 6 mL แล้วเติม 5% $KI/C_6H_8O_6$ 2 mL เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 45 นาที

4.5.2.7 ปรับปริมาตรด้วยน้ำขจัดไอออน ผสมให้เข้ากัน

4.5.2.8 Conditions ของเครื่อง ICP-OES ที่ใช้ทดสอบวิธี Hydride generation

Measure Mode	Axial
Exposure Time (s)	UV 30/VIS 5
RF Power (W)	UV 1200/VIS 1200
Nebulizer Gas Flow (L/min)	UV 0.40/VIS 0.40
Auxiliary Gas Flow ((L/min)	0.50
Coolant gas flow (L/min)	12
Pump speed (rpm)	50
Flush Pump Speed (rpm)	50
Uptake Time (s)	60
Rinse (s)	30
Replicate	3

4.5.2.9 ตรวจหาปริมาณสารหนูในสารละลายด้วยเครื่องICP–OES ที่มีการต่อกับชุด Hydride generator โดยตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 189.042 นาโนเมตร

4.6 การพัฒนาวิธีทดสอบสารหนูในอาหารสัตว์โดยเครื่อง ICP-OES ด้วยเทคนิค Cyclonic spray chamber เปรียบเทียบกับเทคนิค Hydride generation

4.6.1 การทดสอบหาช่วงความเข้มข้นที่ให้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรง (Linearity ranges)

4.6.1.1 ทำการวัดสารละลายมาตรฐานสารหนู (Working arsenic standard solution) ความเข้มข้น 0.01,0.05, 0.10, 0.50 และ1.00 mg/L ที่ระดับความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ โดยเทคนิค Cyclonic spray chamber และเทคนิค Hydride generation

4.6.1.2 สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานสารหนูแต่ละระดับกับความเข้มแสงที่อ่านได้เทคนิค Cyclonic spray chamber และเทคนิค Hydride generation

4.6.2 การทดสอบตัวอย่าง PT ชนิด Soya Flour โดยเครื่อง ICP-OES ด้วยเทคนิค Cyclonic spray chamber กับเทคนิค Hydride generation

4.6.2.1 ชั่งตัวอย่าง 1-2 g ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 50 mL

4.6.2.2 เติมกรดไนตริกเข้มข้น ปริมาตร 10 mL และเติมกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น ปริมาตร 4 mL

4.6.2.3 นำไปย่อยบนแผ่นให้ความร้อนจนเกิดควันขาวและสารละลายตัวอย่างใส วางทิ้งให้เย็น

4.6.2.4 ถ่ายใส่ Volumetric flask ขนาด 50 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำขจัดไอออน ผสมให้เข้ากันแล้วกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 5

4.6.2.5 นำสารละลายที่ได้ (ข้อ4.6.2.4) แบ่งใส่หลอดทดสอบ 2 หลอด หลอดที่ 1 นำไปตรวจวัดหาปริมาณสารหนูโดยเครื่อง ICP-OES ด้วยเทคนิค Cyclonic spray chamber ส่วนหลอดที่ 2 ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 20 mL ใส่ลงในหลอดตัวอย่างขนาด 50 mL เติมกรดไฮโดรคลอริก 6 mL แล้วเติม 5% KI/$C_6H_8O_6$ 2 mL เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 45 นาที แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ ขจัดไอออน ผสมให้เข้ากัน นำไปตรวจวัดหาปริมาณสารหนูโดยด้วยเทคนิค Hydride generation

4.6.3 Spiked sample ในตัวอย่าง อาหารไก่และอาหารเป็ดที่ระดับความเข้มข้น 1, 2 และ 5 mg/kg และปลาป่นที่ระดับความเข้มข้น 2, 10 และ 30 mg/kg

4.6.3.1 ชั่งตัวอย่าง 1-2 g ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 50 mL

4.6.3.2 เติมสาร Intermediate arsenic standard solution ความเข้มข้น 10 mg/L ในอาหารไก่และอาหารเป็ด ปริมาตร 100 , 200 และ 500 µL และปลาป่นที่ระดับความเข้มข้น 200, 1000 และ3000 µL ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

4.6.3.3 เติมกรดไนตริกเข้มข้น ปริมาตร 10 mL และเติมเปอร์คลอริกเข้มข้น ปริมาตร 4 mL

4.6.3.4 นำไปย่อยบนแผ่นให้ความร้อนจนเกิดควันขาวและสารละลายตัวอย่างใส วางทิ้งให้เย็น

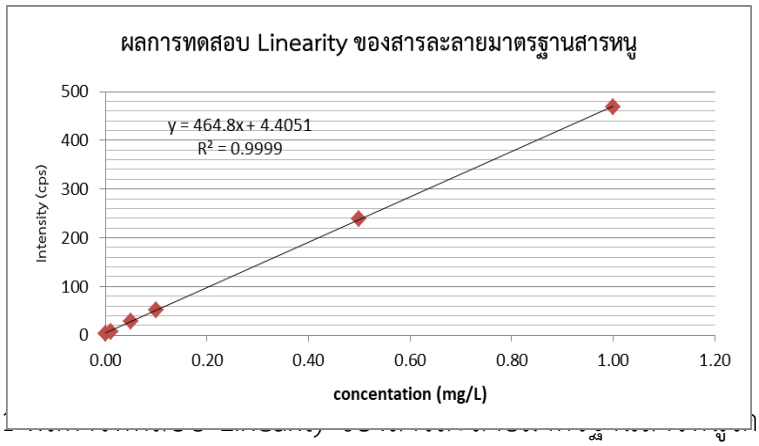
4.6.3.5 ถ่ายใส่ Volumetric flask ขนาด 50 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำขจัดไอออน ผสมให้เข้ากันแล้วกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 5

4.6.3.6 นำสารละลายตัวอย่างไปตรวจวัดหาปริมาณสารหนูโดยเครื่อง ICP–OES ด้วยเทคนิค Cyclonic spray chamber ที่ความยาวคลื่น 189.042 นาโนเมตร

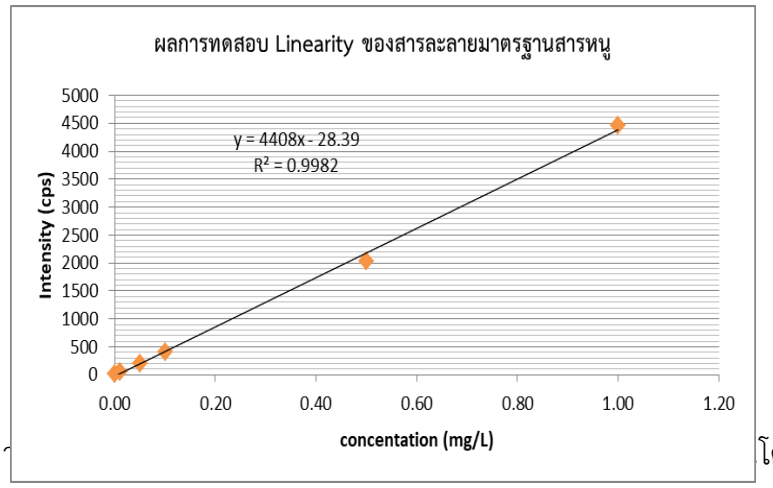
5. ผลการทดลอง

5.1 การพัฒนาวิธีทดสอบสารหนูในอาหารสัตว์โดยเครื่องICP-OES ด้วยเทคนิค Cyclonic spray chamber เปรียบเทียบกับเทคนิค Hydride generation

5.1.1 ผลการทดสอบ Linearity ของสารละลายมาตรฐานสารหนูที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.10, 0.50 และ 1.00 mg/L โดยเครื่อง ICP-OES ด้วยเทคนิค Cyclonic spray chamber และเทคนิค Hydride generation พบว่า Relative of determination(R^2) เท่ากับ 0.9999 (ภาพที่ 1) และ 0.9982 (ภาพที่ 2) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับทั้งสองเทคนิคคือ ≥0.995



ภาพที่ [illegible] ยเครื่อง ICP-OES ด้วยเทคนิค Cyclonic spray chamber



ภา[illegible] โดยเครื่อง ICP-OES ด้วยเทคนิค Hydride generation

5.1.2 ผลการทดสอบตัวอย่าง PT ชนิด Soya Flour มีค่า Assigned value เท่ากับ 0.885 mg/kg โดยมีการตรวจวัดสารละลายตัวอย่างโดยเครื่อง ICP-OES ด้วยเทคนิค Cyclonic spray chamber กับเทคนิค Hydride generation

จากตารางที่ 1 พบว่าผลทดสอบสารหนูตัวอย่าง PT ชนิด Soya Flour ที่ได้จากเทคนิค Cyclonic spray chamber และเทคนิค Hydride generation มีค่า %Recovery เท่ากับ 102.15 และ 104.07 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (AOAC, 80-110%)

จากตารางที่ 2 ผลการเปรียบเทียบของวิธีทดสอบสารหนูในตัวอย่าง PT ชนิด Soya Flour โดยเปรียบเทียบ 2 วิธี คือเทคนิค Cyclonic spray chamber กับเทคนิค Hydride generation และประเมินความเที่ยงโดยใช้สถิติ F-test พบว่า F_{cal} น้อยกว่า F_{crit} แสดงว่าเทคนิคการวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธีไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากตารางที่ 3 ผลการเปรียบเทียบของวิธีทดสอบสารหนูในตัวอย่าง PT ชนิด Soya Flour โดยเปรียบเทียบ 2 วิธี คือเทคนิค Cyclonic spray chamber กับเทคนิค Hydride generation และประเมินความแม่นโดยใช้สถิติ t-test พบว่า t_{cal} น้อยกว่า t_{crit} แสดงว่าค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบทั้ง 2 วิธี ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 1 แสดงผลทดสอบสารหนูในตัวอย่าง PT ชนิด Soya Flour (10 ซ้ำ) ด้วยเทคนิค Cyclonic spray chamber กับ เทคนิค Hydride generation และหาค่า % recovery

	Cyclonic spray chamber	Hydride generation
$\bar{X}$ (mg/kg)	0.904	0.921
SD (mg/kg)	0.0614	0.0679
% Recovery	102.15	104.07

ตารางที่ 2 ผลการประเมินความเที่ยง (Precision) จากการทดสอบสารหนูในตัวอย่าง PT ชนิด Soya Flour (10 ซ้ำ) โดยเปรียบเทียบ 2 วิธี คือเทคนิค Cyclonic spray chamber กับ เทคนิค Hydride generation

	Hydride generation	Cyclonic spray chamber
Mean	0.921	0.904
Variance	0.00461	0.00377
Observations	10	10
df	9	9
F_{cal}	1.22	
P(F<=f) one-tail	0.3852	
F_{Crit} (one-tail)	3.18	

F_{crit} ได้จากตาราง F-test ที่ p=0.05 และ $df_1 = 9$ $df_2 = 9$

ตารางที่ 3 ผลการประเมินความแม่น (Accuracy) จากการทดสอบสารหนูในตัวอย่าง PT ชนิด Soya Flour (10 ซ้ำ) โดยเปรียบเทียบ 2 วิธี คือเทคนิค Cyclonic spray chamber กับ เทคนิค Hydride generation

	Hydride generation	**Cyclonic spray chamber**
Mean	0.921	0.904
Variance	0.00461	0.00377
Observations	10	10
Pooled Variance	0.0042	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	18	
t_{cal}	0.57	
P(T<=t) one-tail	0.2867	

t_{crit} (one-tail)	1.73
P(T<=t) two-tail	0.5735
t_{crit} (two-tail)	2.10

t_{crit} ได้จากตาราง t-test ที่ p=0.05 และ df = $n_1+n_2-2 = 18$

5.1.3 ผลการทดสอบ Spiked sample ในตัวอย่าง อาหารไก่และอาหารเป็ดที่ระดับความเข้มข้น 1, 2 และ 5 mg/kg และปลาป่นที่ระดับความเข้มข้น 2, 10, และ 30 mg/kg

จากตารางที่ 4 ผลการทดสอบ Spiked sample ตัวอย่างอาหารไก่ที่ระดับความเข้มข้น 1,2 และ 5 mg/kg พบว่า มีค่า %Recovery เท่ากับ 95.15, 100.09 และ 104.67 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (AOAC, 80-110%) และจากการทดสอบแบบทวนซ้ำได้ (Repeatability) พบว่า %RSDr ของผลทดสอบน้อยกว่า %PRSDr แสดงว่าผลทดสอบมีความเที่ยง

จากตารางที่ 5 ผลการทดสอบ Spiked sample ตัวอย่างอาหารเป็ดที่ระดับความเข้มข้น 1,2 และ 5 mg/kg พบว่า มีค่า %Recovery เท่ากับ 104.39, 103.34 และ102.77 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (AOAC, 80-110%) และจากการทดสอบแบบทวนซ้ำได้ (Repeatability) พบว่า %RSDr ของผลทดสอบน้อยกว่า %PRSDr แสดงว่าผลทดสอบมีความเที่ยง

จากตารางที่ 6 ผลการทดสอบ Spiked sample ตัวอย่างปลาป่นที่ระดับความเข้มข้น 2,10 และ 30 mg/kg พบว่า มีค่า %Recovery เท่ากับ 88.89, 96.33 และ 99.08 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (AOAC, 80-110%) และจากการทดสอบแบบทวนซ้ำได้ (Repeatability) พบว่า%RSDr ของผลทดสอบน้อยกว่า %PRSDr แสดงว่าผลทดสอบมีความเที่ยง

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบ Spiked sample สารหนูในตัวอย่างอาหารไก่ ที่ระดับความเข้มข้น 1,2 และ 5 mg/kg โดยทดสอบ 10 ซ้ำ

	สารหนูในอาหารไก่					
	1 mg/kg		2 mg/kg		5 mg/kg	
	Conc.	%Recovery	Conc.	%Recovery	Conc.	%Recovery
mean	0.952	95.20	2.002	100.10	5.234	104.68
SD	0.0408		0.0933		0.0939	
%RSD	4.28		4.66		1.79	
%PRSDr	10.56		9.51		8.29	

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบ Spiked sample สารหนูในตัวอย่างอาหารเป็ด ที่ระดับความเข้มข้น 1,2 และ 5 mg/kg โดยทดสอบ 10 ซ้ำ

	สารหนูในอาหารเป็ด					
	1 mg/kg		2 mg/kg		5 mg/kg	
Rep.	Conc.	%Recovery	Conc.	%Recovery	Conc.	%Recovery
mean	1.044	104.40	2.067	103.35	5.138	102.76
SD	0.0311		0.0540		0.1982	

%RSD	2.98	2.61	3.86
%PRSDr	10.56	9.51	8.29

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบ Spiked sample สารหนูในตัวอย่างปลาป่น ที่ระดับความเข้มข้น 2,10 และ 30 mg/kg โดยทดสอบ 10 ซ้ำ

	สารหนูในปลาป่น					
	2 mg/kg		10 mg/kg		30 mg/kg	
	Conc.	%Recovery	Conc.	%Recovery	Conc.	%Recovery
mean	1.778	88.89	9.633	96.33	29.725	99.08
SD	0.0822		0.3562		0.6725	
%RSD	4.62		3.70		2.26	
%PRSDr	9.51		7.47		6.33	

6. สรุปผลการทดลอง

การพัฒนาวิธีทดสอบสารหนูในอาหารสัตว์โดยเครื่อง ICP-OES ด้วยเทคนิค Cyclonic spray chamber ได้ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน AOAC Official Method 984.27 (2016) โดยใช้ตัวอย่างทดสอบความชำนาญ (PT) ชนิด Soya flour เป็นตัวอย่างทดสอบและได้ทำการตรวจวัดสารละลายตัวอย่างเพื่อหาปริมาณสารหนูโดยเครื่อง ICP-OES ด้วยเทคนิค Cyclonic spray chamber เปรียบเทียบกับผลทดสอบปริมาณสารหนูด้วยเทคนิค Hydride generation พบว่าผลการทดสอบ Linearity ของสารละลายมาตรฐานสารหนูที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.10, 0.50 และ 1.00 mg/L โดยเครื่อง ICP-OES ด้วยเทคนิค Cyclonic spray chamber และเทคนิค Hydride generation มีค่า Relative of determination(R^2) เท่ากับ 0.9999 และ 0.9982 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับทั้งสองเทคนิค (≥0.995) และผลการทดสอบสารหนูในตัวอย่าง PT ชนิด Soya Flour ที่มีค่า Assigned value เท่ากับ 0.885 mg/kg โดยมีการตรวจวัดสารละลายตัวอย่างโดยเครื่อง ICP-OES ด้วยเทคนิค Cyclonic spray chamber กับเทคนิค Hydride generation มีค่า %Recovery เท่ากับ 102.15 และ 104.07 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (AOAC, 80-110%) แสดงว่าวิธีทดสอบทั้ง 2 เทคนิคให้ผลทดสอบที่มีความถูกต้อง และเมื่อนำผลทดสอบของทั้ง 2 เทคนิคมาเปรียบเทียบและประเมินความเที่ยงโดยใช้สถิติ F-test พบว่า F_{cal} น้อยกว่า F_{crit} แสดงว่าเทคนิคการวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธีไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และผลการประเมินความแม่น (Accuracy) โดยใช้สถิติ t-test พบว่า t_{cal} น้อยกว่า t_{crit} แสดงว่าค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบทั้ง 2 เทคนิค ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากนั้นห้องปฏิบัติการได้เลือกใช้วิธีทดสอบหาปริมาณสารหนูโดยเครื่อง ICP-OES ด้วยเทคนิค Cyclonic spray chamber ทำการทดสอบ Spiked sample สารหนูในตัวอย่างอาหารไก่และอาหารเป็ดที่ระดับความเข้มข้น 1, 2 และ 5 mg/kg พบว่า ผลการทดสอบ Spiked sample สารหนูในตัวอย่างอาหารไก่ที่ระดับความเข้มข้น 1,2 และ 5 mg/kg มีค่า %Recovery เท่ากับ 95.20, 100.10 และ104.68 ผลการทดสอบ Spiked sample สารหนูในตัวอย่างอาหารเป็ดที่ระดับความเข้มข้น 1,2 และ 5 mg/kg พบว่า มีค่า %Recovery เท่ากับ 104.40, 103.35 และ 102.76 และผลการทดสอบ Spiked sample สารหนูในตัวอย่างปลาป่นที่ระดับความเข้มข้น 2, 10, และ 30 mg/kg มีค่า %Recovery เท่ากับ 88.89, 96.33 และ 99.08 ซึ่งผลทดสอบของอาหารสัตว์ทั้ง 3 ชนิดมีค่า %Recovery อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (AOAC, 80-110%) แสดงว่าผลทดสอบมีความแม่น และจากการทดสอบแบบทวนซ้ำได้ (Repeatability) ของอาหารสัตว์ทั้ง 3 ชนิด พบว่า %RSDr ของผลทดสอบมีค่าน้อยกว่า %PRSDr แสดงว่าผลทดสอบมีความเที่ยง

7. ข้อเสนอแนะ

-

8. กิตติกรรมประกาศ

ผลงานวิชาการเรื่องการพัฒนาวิธีทดสอบสารหนูในอาหารสัตว์ด้วยเครื่อง ICP-OES นี้ได้รับการสนับสนุนโดยสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ขอขอบคุณ นายวรวิชญ์ วราอัศวปติ ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ นางสุทธิพร พิริยายน ผู้เชี่ยวชาญด้านตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ และเจ้าหน้าที่ทดสอบงานเคมี กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ที่ช่วยดำเนินงานจนการศึกษาครั้งนี้สำเร็จ

9. เอกสารอ้างอิง

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2558. **วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 3**. โรงพิมพ์สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

เนาวรัตน์ สุธัมนาถพงษ์. 2559. **พิษวิทยาทางการสัตวแพทย์**. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

วีรวรรณ เล็กสกุลไชย. 2558. **ความเป็นพิษของสารและผลิตภัณฑ์เคมี**. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

AOAC. 2016. AOAC Official Method 984.27 Calcium, Copper, Iron, Magnesium, Manganese, Phosphorus, Potassium, Sodium, and Zinc in Infant formula ch.50 pp. 17-18. AOAC Official Methods of Analysis. 20th ed. **AOAC International**, Gaithersburg, MD.

"Continuous Flow Hydride Generation Using the Optima ICP", The Perkin-Elmer Corporation (2004).