

การพัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบปรอทในอาหารสัตว์ และอาหารสัตว์เลี้ยงด้วย
เทคนิค thermal decomposition cold vapor atomic absorption spectrometry

รัชชานนท์ รักชีพ

เอกชา ตนานนท์ชัย

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบปรอทในอาหารสัตว์ และอาหารสัตว์เลี้ยงด้วยเทคนิค thermal decomposition cold vapor atomic absorption spectrometry (TD-CVAAS) ผลการพัฒนาวิธี พบว่าสถานะที่เหมาะสมในการเผาสารละลายมาตรฐาน อุณหภูมิขั้นที่หนึ่ง 150°C และขั้นที่สอง 800°C ให้พื้นที่ใต้กราฟสูงกว่าที่อุณหภูมิอื่นที่ศึกษา และมีเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานปรอทในช่วงปริมาณต่ำ 0 - 10 ng และช่วงปริมาณสูง 10 - 500 ng โดยมีค่า coefficient of correlation (r) เท่ากับ 1.0000 และ 0.9999 ตามลำดับ และสถานะที่เหมาะสมในการเผาตัวอย่าง คือ อุณหภูมิขั้นที่หนึ่ง 180°C และขั้นที่สอง 850°C ให้ค่าร้อยละการกลับคืนเฉลี่ยใกล้เคียง 100 มากที่สุด ผลการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบปรอทในอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยง จำนวน 13 ชนิด ด้วยเทคนิค TD-CVAAS ตามแนวทางของ Eurachem guide พบว่า ขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 0.01 และ 0.03 mg/kg ตามลำดับ การทดสอบตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (spiked sample) ที่ระดับความเข้มข้น 0.03, 0.1, 0.5, 1 และ 2 mg/kg ให้ค่าร้อยละการกลับคืนเฉลี่ยอยู่ในช่วง 82 - 108.72 ความเที่ยงของการทวนซ้ำมีค่า %RSD_r อยู่ในช่วง 1.1 - 10.56 และความเที่ยงของการทำซ้ำมีค่า %RSD_R อยู่ในช่วง 1.21 - 10.68 ผลการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ ดังนั้น วิธีทดสอบนี้จึงมีความเหมาะสมสำหรับใช้ทดสอบปรอทในอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยงในช่วงการใช้งาน 0.03 - 2 mg/kg ผลการเข้าร่วมกิจกรรมทดสอบความชำนาญของ FAPAS ในตัวอย่าง soya flour ได้ค่า z-score เท่ากับ 0.1 แสดงให้เห็นถึงความถูกต้องและความเชื่อมั่นของวิธีทดสอบนี้ และได้นำวิธีที่พัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้มาแล้ว ไปใช้ทดสอบตัวอย่างที่ส่งมาตรวจในห้องปฏิบัติการเคมี สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ได้จำนวน 24 ตัวอย่าง

คำสำคัญ : การพัฒนาวิธี การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ปรอท อาหารสัตว์

อาหารสัตว์เลี้ยง thermal decomposition cold vapor atomic absorption spectrometry

เลขทะเบียนวิชาการ : 68(2)-0304-055

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์

91 หมู่ 4 ถนนติวานนท์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมืองปทุมธานี จังหวัดปทุมธานี 12000

**Method development and validation for the determination of mercury in
animals feed and pet food by thermal decomposition cold vapor atomic
absorption spectrometry**

Ratchanon Rakcheep

Aekkacha tananonchai

Abstract

This study aimed to develop and validate an analytical method for the determination of mercury in animal feed and pet food using thermal decomposition cold vapor atomic absorption spectrometry (TD-CVAAS). Method development showed that the optimal combustion conditions for mercury standard solutions were a first-stage temperature of 150 °C and a second-stage temperature of 800 °C, which produced higher peak areas than those obtained at other studied temperatures. The mercury calibration curves exhibited good linearity over a low concentration range of 0 - 10 ng and a high concentration range of 10 - 500 ng, with correlation coefficients (r) of 1.0000 and 0.9999. The optimal combustion conditions for sample analysis were a first-stage temperature of 180°C and a second-stage temperature of 850°C, yielding mean recovery values closest to 100%. Method validation for mercury determination in 13 types of animal feed and pet food using TD-CVAAS was performed in accordance with the Eurachem Guide. The limit of detection and the limit of quantification were 0.01 and 0.03 mg/kg. The mean recovery of spiked sample 0.03, 0.1, 0.5, 1.0, and 2.0 mg/kg ranged from 82 - 108.72%. The repeatability precision (RSD_r) at the same concentration levels ranged from 1.1 - 10.56%, while the within-laboratory reproducibility (RSD_R) ranged from 1.21 - 10.68%. All performance characteristics met the acceptable criteria. Therefore, this method is suitable for the determination of mercury in animal feed and pet food within the working range of 0.03 – 2 mg/kg. Participation in FAPAS proficiency testing on soy flour samples resulted in a 0.1 z-score. This method development and validation were tested on 24 samples in the chemistry laboratory, Bureau of quality control of livestock products.

Keyword: Method development, Method validation, Mercury, Animal feed,

Pet food, thermal decomposition cold vapor atomic absorption spectrometry

Registered No.: 68(2)-0304-055

Feed Quality Laboratory, Bureau of Quality Control of Livestock Products

91 Moo. 4 Tiwanont Bangkadi Mueang Pathumthani 12000

บทนำ

ปรอท (Mercury, Hg) เป็นโลหะหนักที่มักถูกตรวจพบในสิ่งแวดล้อม ซึ่งมีสาเหตุมาจากกิจกรรมต่างๆของมนุษย์ อาทิ น้ำทิ้งจากภาคอุตสาหกรรม ฝุ่นละอองจากการเผาไหม้ถ่านหินในกระบวนการผลิตกระแสไฟฟ้า การปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำจากการทำเหมืองแร่ ปรอทเป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ เนื่องจากปรอทสามารถตกค้างในสิ่งแวดล้อมเป็นระยะเวลายาวนาน (Olivero, 2005) โดยทั่วไปมักพบปรอทในรูปของเกลือ mercuric (Hg^{+2}) ซึ่งละลายน้ำได้ดี สามารถดูดซึมผ่านระบบย่อยอาหารของสัตว์ได้ดี และมีค่าความเป็นพิษสูงกว่า mercurous (Hg^{+1}) (Rice *et al.*, 2014) โดยจุลินทรีย์ในหมักและลำไส้ของปลาจะเปลี่ยน mercuric (Hg^{+2}) ให้เป็น alkyl mercury compounds เช่น methyl mercury หรือ ethyl mercury ทำให้ถูกขับออกจากตัวปลาได้ในปริมาณน้อย ส่งผลให้เกิดการสะสมภายในตัวปลา ปรอทจึงมักถูกพบในรูปของ methyl mercury (สุภาพร และคณะ, 2545) ถ้าสะสมอยู่ในปริมาณมาก พิษของปรอทจะส่งผลให้เกิดอาการทางประสาท ไม่สามารถควบคุมการทำงานของอวัยวะได้ (Lim, 1998)

อาหารสัตว์ หมายถึง วัตถุที่มุ่งหมายเพื่อใช้หรือใช้เลี้ยงสัตว์ โดยการให้กิน ต้ม เลี้ยว หรือนำเข้าสู่ร่างกายสัตว์ โดยวิธีการใดๆ หรือ วัตถุที่มุ่งหมายเพื่อใช้หรือใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารสัตว์ โดยมีส่วนประกอบหลักคือ พืช โปรตีนจากพืชหรือโปรตีนจากสัตว์ วิตามิน และแร่ธาตุ จากการศึกษาค้นคว้าของ Ericksen *et al.* (2006) พบว่าพืชมีความสามารถในการดูดซับปรอทในดินได้ในปริมาณต่ำ และระดับความเข้มข้นของปรอทในวัตถุดิบจากพืชไม่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นของปรอทที่สะสมอยู่ในดิน ดังนั้นการปนเปื้อนปรอทในอาหารสัตว์ส่วนใหญ่มีมาจากรวมกันของวัตถุดิบที่เป็นแหล่งโปรตีนจากสัตว์ เช่น ปลาป่น (EFSA, 2008) โดยปลาป่นนิยมเป็นแหล่งโปรตีน เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบของอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยง ดังนั้นการปนเปื้อนของปรอทในปลาป่นจึงส่งผลโดยตรงต่อสัตว์ และสัตว์เลี้ยง ในปี 1950 เกิดเหตุการณ์การปนเปื้อนปรอทลงสู่ทะเล ที่เมืองมินามาตะ ประเทศญี่ปุ่น มีการรายงานถึงความผิดปกติของสัตว์เลี้ยงที่กินปลาจากทะเลที่มีการปนเปื้อนปรอท นอกจากนั้นยังพบความผิดปกติของมนุษย์ที่ทานอาหารทะเลจากแหล่งเดียวกัน ซึ่งมีสาเหตุมาจากการสะสมพิษจากปรอทปริมาณมากในร่างกาย (Luippold and Gustin, 2016) เมื่อสัตว์มีการสะสมปรอทสู่ร่างกายในปริมาณมาก จะทำให้เกิดความผิดปกติของความดันโลหิต อัตราการเต้นของหัวใจ อวัยวะสืบพันธุ์ของสัตว์ตัวผู้ ความเสียหายต่อไต กระเพาะอาหาร และลำไส้ใหญ่ นอกจากนี้ยังส่งผลถึงอัตราการตายของตัวอ่อนเพิ่มมากขึ้น หรือเกิดความผิดปกติในสัตว์ตั้งแต่กำเนิด เช่น ความผิดปกติทางเนื้อเยื่อในสมองส่วน cerebellum ต่อมไทรอยด์ กระจกตาหลังหรือกระจกตีก่อนเกิด (ATSDR, 2022) ซึ่งในปัจจุบันประเทศไทยยังไม่กำหนดมาตรฐานทางกฎหมายเพื่อควบคุมปริมาณปรอทในอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยง ในขณะที่สหภาพยุโรปได้กำหนดค่ามาตรฐานปริมาณการปนเปื้อนปรอทในอาหารสัตว์สำเร็จรูปไม่เกิน 0.1 mg/kg วัตถุดิบอาหารสัตว์ที่ไม่ได้ผลิตมาจากปลาหรือสัตว์ทะเลอื่นๆ ไม่เกิน 0.1 mg/kg วัตถุดิบปลาป่นไม่เกิน 0.5 mg/kg และอาหารสัตว์เลี้ยงไม่เกิน 0.3 mg/kg (commission regulation (EU) 2019/1869)

ประเทศไทยมีสินค้าปศุสัตว์ทั้งนำเข้าและส่งออกจำนวนมาก หนึ่งในหน้าที่ของกรมปศุสัตว์คือกำกับดูแลคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ให้เป็นไปตามมาตรฐานสากล สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์เป็นห้องปฏิบัติการของกรมปศุสัตว์ ที่ควบคุมคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ทุกประเภท หนึ่งในนั้นคือการตรวจสอบ ป้องกัน การปนเปื้อนปรอทในอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยง ภายใต้กิจกรรมแผนเฝ้าระวังสารตกค้าง (residue monitoring plan) ประจำปี และกิจกรรมตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์นำเข้า ปัจจุบันมีหลายเทคนิคทดสอบที่เกี่ยวข้องกับการปนเปื้อนปรอทในอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยง ซึ่งจะมีความไว (sensitivity) ระดับต่างๆ กัน เช่น การใช้ชุดทดสอบเบื้องต้น (test kit) สามารถตรวจหาปรอทปริมาณมากในตัวอย่างระดับเปอร์เซ็นต์ วิธี colorimetry สามารถทดสอบปรอทปริมาณน้อยๆ ในตัวอย่างระดับหนึ่งต่อล้านส่วน (part per million, ppm) และเทคนิคอื่น แต่เทคนิคที่มีความจำเพาะสูง (selectivity) ความไวสูง และมีความน่าเชื่อถือของผลการทดสอบสูง อีกทั้งสามารถตรวจหาปรอททั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณได้อย่างถูกต้องและแม่นยำเช่น inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) และ TD-CVAAS เป็นต้น

เทคนิค ICP-MS เป็นเทคนิคที่สามารถทดสอบได้รวดเร็ว หลายธาตุพร้อมกัน และมีค่าขีดจำกัดตรวจพบได้ต่ำ การนำเทคนิคนี้วัดปริมาณปรอทจะเกิด memory effect ซึ่งทำให้ต้องล้างสายนำตัวอย่างนานขึ้น ความไวลดลง และอาจส่งผลต่อกราฟมาตรฐานไม่เป็นเส้นตรง ทำให้ต้องใช้สาร L-cysteine ในการล้างสายนำตัวอย่างเพิ่มเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 1 นาที ส่งผลให้เพิ่มระยะเวลาทดสอบมากขึ้น การใช้สาร L-cysteine เป็นเวลานาน อาจจะทำให้สายนำตัวอย่างอุดตันง่ายขึ้นจากการสะสมของคาร์บอนใน spray chamber (Li *et al.*, 2005)

เทคนิค TD-CVAAS เป็นเทคนิคที่นิยมนำมาใช้งานอย่างแพร่หลาย โดยนำตัวอย่างเผาจนสารประกอบปรอทระเหย เข้าสู่เตาเผาอีกชั้นเพื่อกำจัดสิ่งรบกวนต่างๆ และเปลี่ยนปรอทให้อยู่ในรูป Hg^{+0} ปรอทจะเก็บกับแผ่นโลหะผสมกับทองคำ หลังจากเผาตัวอย่างเสร็จสิ้น จะให้ความร้อนแผ่นโลหะผสมกับทองคำ เพื่อวัดปริมาณปรอทที่เก็บไว้ด้วยค่าดูดกลืนแสง 253.7 นาโนเมตร เป็นวิธีที่ไม่ต้องเตรียมตัวอย่างในการทดสอบ สามารถนำตัวอย่างที่เป็นของแข็งหรือของเหลวใช้เวลาทดสอบ 6 นาทีต่อตัวอย่าง วิธีนี้วัดได้เฉพาะปรอท แต่มีความจำเพาะสูง ความไวสูง และไม่เกิด memory effect (Rahman *et al.*, 2013) อีกทั้งเป็นเทคนิคมาตรฐานจากสำนักงานปกป้องสิ่งแวดล้อมสหรัฐ (United States Environmental Protection Agency) (U.S. EPA., 1998) แต่ไม่ได้เจาะจงในการทดสอบอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยง ห้องปฏิบัติการจึงเลือกใช้เทคนิคนี้เพื่อการทดสอบ รับรองคุณภาพและความปลอดภัยของอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยงภายในประเทศและส่งออก ให้มีความปลอดภัยตามมาตรฐานสหภาพยุโรป โดยห้องปฏิบัติการจึงต้องพัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ตามแนวทางของ Eurachem guide (Cantwell, 2025) โดยดำเนินการพัฒนาวิธีเพื่อหาสภาวะในการเผาตัวอย่าง เพื่อทดสอบหาปริมาณปรอท จากนั้นพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ โดยใช้พารามิเตอร์ในการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีได้แก่

การทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานปรอท (linearity) การพิสูจน์ผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect) การทดสอบหาค่า LOD และ LOQ การทดสอบหาค่าความแม่นยำ (accuracy) จากนั้นใช้วิธีที่ผ่านการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีเข้าร่วมกิจกรรมทดสอบความชำนาญ (proficiency testing) และทดสอบตัวอย่างที่ส่งตรวจในห้องปฏิบัติการงานเคมี กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สามารถนำวิธีที่พัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้ไปขอรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการ ISO/IEC 17025 ได้อีกด้วย

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 1.1 เครื่องวิเคราะห์ปรอท (Direct Thermal Decomposition Mercury Analyzer)
ยี่ห้อ NIPPON Instruments Corporation (NIC) รุ่น MA-3000
- 1.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าอ่านละเอียด 0.1 mg
- 1.3 Micropipette ขนาด 10 - 100 μ L และ 100 - 1,000 μ L
- 1.4 Sample ceramic boat

2. สารเคมีและสารมาตรฐาน

- 2.1 Nitric Acid (HNO_3) AR grade ความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 65%
- 2.2 L-cysteine ($\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$) reagent grade ยี่ห้อ nacalai tesque
- 2.3 สารละลาย L-cysteine
ชั่ง L-cysteine 0.1000 ± 0.0002 g เติมน้ำปราศจากไอออน และเติม nitric acid 2 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน ให้ได้ 1,000 mL ผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ $2 - 8^\circ\text{C}$ ห้ามโดนแสง
- 2.4 สารละลายมาตรฐานปรอท ความเข้มข้น $1,000 \text{ mg/mL} \pm 2.4\%$ ยี่ห้อ AccuStandard
- 2.5 Oxygen gas 99.99%
- 2.6 น้ำปราศจากไอออน (Deionized water, DI)
- 2.7 Additive B ยี่ห้อ NIC ผลิตที่ Wako Pure Chemical Industries, Ltd.
- 2.8 Intermediate mercury standard solution ปิเปตสารละลายมาตรฐานปรอท ปริมาตร 100 mL ดังตารางที่ 1 ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย L-cysteine สารละลายมาตรฐานปรอทเก็บที่อุณหภูมิ $2 - 8^\circ\text{C}$ ห้ามโดนแสง

ตารางที่ 1 การเตรียม intermediate mercury standard solution

ความเข้มข้นที่ใช้เตรียม (mg/L)	ปริมาตรที่ใช้เตรียม (mL)	ความเข้มข้นที่เตรียมได้ (mg/L)
1,000	1	10
10	10	1
10	1	0.1
1	1	0.01
0.01	1	0.001

3. ตัวอย่างที่ใช้พัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

ตัวอย่างอาหารสัตว์ และอาหารสำหรับสัตว์เลี้ยง (ชนิดแห้ง) ได้แก่ อาหารสุกร อาหารไก่ อาหารโค อาหารจิ้งหรีด ข้าวโพดป่น กากถั่วเหลือง รำละเอียด ปลาป่น อาหารแมวและอาหารสุนัข ตัวอย่างที่เตรียมต้องบดละเอียด เก็บรักษาไว้ในที่อุณหภูมิห้อง

ตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยง (ชนิดเปียก) ได้แก่ อาหารแมวชนิดเปียก อาหารสุนัขชนิดเปียก อาหารขบเคี้ยวชนิดเปียก ตัวอย่างที่เตรียมต้องบดละเอียด เก็บรักษาที่ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ 2 – 8°C ก่อนนำมาชั่งตัวอย่าง วางทิ้งไว้ในที่อุณหภูมิห้องจนตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยงมีอุณหภูมิใกล้เคียงอุณหภูมิห้อง

วัสดุอ้างอิงรับรอง Certified Reference Material (CRM) ชนิดตัวอย่าง fish protein DORM-5 ผลิตโดย National Research Council ประเทศแคนาดา มีค่าปรอทในช่วง 0.299 – 0.333 mg/kg

4. การพัฒนาวิธีทดสอบปรอทในอาหารสัตว์ ด้วยเครื่องวิเคราะห์ปรอท

4.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างกราฟมาตรฐานปรอท (calibration curve) และทดสอบตัวอย่าง

4.1.1 ขั้นตอนในการให้ความร้อนตัวอย่าง ดังนี้

4.1.1.1 การให้อุณหภูมิขั้นที่หนึ่ง (atomize 1) เพื่อเผาไล่สารประกอบอื่นที่ไม่ใช่ปรอทให้ระเหยออกไปให้มากที่สุด แต่ต้องน้อยกว่าจุดเดือดปรอท (356.7°C)

4.1.1.2 การให้อุณหภูมิขั้นที่สอง (atomize 2) เป็นขั้นตอนให้ความร้อนเพื่อให้สารประกอบที่เหลือและปรอท ระเหยออกไปให้หมด ควรใช้ความร้อนมากกว่า 600°C

4.1.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างกราฟมาตรฐานปรอท โดยเติมสารละลายมาตรฐานปรอทความเข้มข้น 0.01 mg/L ปริมาตร 50 μ L ใน sample ceramic boat ที่มี additive B อยู่ประมาณครึ่งหนึ่งของความสูง โดย atomize 1 ทำการทดสอบหาอุณหภูมิการเผา 3 ค่า คือ 130, 150 และ 170°C แต่ละอุณหภูมิใช้ระยะเวลา 60 sec และอัตราการไหลของแก๊สออกซิเจน 0.40 L/min ในขั้นตอน atomize 2 ทำการทดสอบหาอุณหภูมิการเผา 3 ค่า คือ 700, 800 และ 900°C แต่ละอุณหภูมิใช้ระยะเวลา 120 sec เวลาในการเพิ่มอุณหภูมิ 120 sec และอัตราการไหลของแก๊สออกซิเจน 0.40 L/min ทดสอบชุดละ 10 ซ้ำ ตรวจสอบพื้นที่ใต้กราฟมากที่สุด เพื่อกำหนดอุณหภูมิที่ใช้งาน จากนั้นนำอุณหภูมิ เวลาและอัตราการไหลของแก๊สออกซิเจนที่เหมาะสม ใช้เป็นวิธีสำหรับการสร้างกราฟมาตรฐานปรอท

4.2 การทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (linearity)

4.2.1 บี เปต L-cysteine 50 μ l (Hg 0 ng) และ intermediate mercury standard solution ตามตารางที่ 2 ใส่ใน sample ceramic boat ทำการวัดปริมาณปรอทในสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 4.1

4.2.2 สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณปรอทกับพื้นที่ใต้กราฟ มีเกณฑ์การยอมรับ coefficient of correlation (r) ไม่น้อยกว่า 0.995

ตารางที่ 2 ปริมาตรปรอทสำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน

ความเข้มข้น intermediate mercury standard solution ที่ใช้เตรียม (mg/L)	ปริมาตรที่ใช้เตรียม (μ L)	ปริมาณสาร mercury (ng)
10	50	500
10	10	100
1	50	50
1	10	10
0.1	50	5
0.1	10	1
0.01	50	0.5
0.01	10	0.1
0.001	30	0.03

4.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบตัวอย่าง โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานที่มีความเป็นเส้นตรงแล้ว โดย spiked สารละลายมาตรฐานปรอทความเข้มข้น 1 mg/L ปริมาตร 50 µL น้ำหนักตัวอย่างในช่วง 100 ± 10 mg เพื่อให้ได้ปริมาณปรอท 0.5 mg/kg (50 ng) โดยขั้นตอน atomize 1 ทำการทดสอบหาอุณหภูมิการเผา 3 ค่า คือ 150, 180 และ 200°C แต่ละอุณหภูมิใช้ระยะเวลา 60 sec และอัตราการไหลของแก๊สออกซิเจน 0.40 L/min ในขั้นตอน atomize 2 ทำการทดสอบหาอุณหภูมิการเผา 3 ค่า คือ 700, 800, 850 และ 900 °C แต่ละอุณหภูมิใช้ระยะเวลา 120 sec เวลาในการเพิ่มอุณหภูมิ 120 sec และอัตราการไหลของแก๊สออกซิเจน 0.40 L/min ทดสอบชุดละ 10 ซ้ำ คำนวณหาค่า % mean recovery เพื่อกำหนดอุณหภูมิที่ใช้งาน จากนั้นนำอุณหภูมิ เวลาและอัตราการไหลของแก๊สออกซิเจนที่เหมาะสม ใช้เป็นวิธีสำหรับการทดสอบ ตัวอย่างอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยง

5. การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

5.1 การพิสูจน์ผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect)

หาความแตกต่างระหว่างปริมาณปรอทในสารละลายมาตรฐานปรอท และ spiked sample ในตัวอย่างอาหารสัตว์ และอาหารสัตว์เลี้ยง ทั้ง 9 ระดับ คือ 0.03, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 และ 500 ng โดยใช้การคำนวณทางสถิติ Pair t-test (two-tailed) (Rosie, 2004)

$$\text{โดยที่} \quad t = \frac{\bar{d}}{SD/\sqrt{n}}$$

เมื่อ $\bar{d}$ คือ ค่าเฉลี่ยของความแตกต่าง

SD คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่าง

n คือ จำนวนความเข้มข้น, n=9 ระดับ

5.2 การทดสอบหาค่า LOD และ LOQ

5.2.1 ทดสอบ sample blank ได้แก่ อาหารสุกร อาหารไก่ อาหารโค อาหารจิ้งหรีด ข้าวโพดป่น กากถั่วเหลือง รำละเอียด ปลาป่น อาหารแมว อาหารสุนัข อาหารแมว ชนิดเปียก อาหารสุนัขชนิดเปียกและอาหารขบเคี้ยวชนิดเปียก ทดสอบตัวอย่างละ 10 ซ้ำ หาค่าเฉลี่ย (mean) ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD, S_0) หาค่า S'_0 แล้ว คำนวณหาค่า LOD และ LOQ ดังนี้

LOD คือ $3S'_0$

LOQ คือ $10S'_0$

$$\text{โดยที่} \quad S'_0 = S_0 \sqrt{\frac{1}{n}}$$

เมื่อ S'_0 คือ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณค่า LOD และ LOQ

S_0 คือ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาณโปรทที่วัดได้

n คือ จำนวนการทำซ้ำของตัวอย่างตามวิธีทดสอบ, $n=2$

5.2.2 การยืนยันค่า LOQ ของการทดสอบ

เตรียม spiked sample ที่ความเข้มข้นซึ่งใกล้เคียงกับค่า LOQ ที่คำนวณได้ นำไปตรวจวัดหาโปรท หักลบค่า mean sample blank ที่ได้จากข้อ 5.2.1 จากนั้นคำนวณหาค่า mean, SD, %mean recovery, %Repeatability (%RSD_r) และ %within-laboratory reproducibility (%PRSD_r) โดยพิจารณาความแม่นยำจากค่า %mean recovery ต้องอยู่ในเกณฑ์การยอมรับของ AOAC (AOAC International, 2023c) และพิจารณาความเที่ยงแบบ repeatability จากค่า %RSD_r ต้องมีค่าน้อยกว่า %PRSD_r ที่คำนวณจากสมการ Horwitz

$$\text{โดยที่} \quad \%RSD_r = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

เมื่อ SD คือ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของแต่ละความเข้มข้น
 $\bar{x}$ คือ ค่าเฉลี่ยปริมาณโปรทของแต่ละความเข้มข้น

$$\text{โดยที่} \quad \%PRSD_r = 0.66 \times 2C^{-0.1505}$$

เมื่อ C คือ concentration ratio

5.3 การทดสอบหาค่าความแม่นยำ (accuracy)

5.3.1 ประเมินความถูกต้อง (trueness) ทดสอบ CRM จำนวน 10 ซ้ำ นำไปตรวจวัดหาปริมาณโปรท ตรวจสอบค่า bias โดยสถิติ t-test ด้วยการคำนวณหาค่า t_{cal} เปรียบเทียบกับค่า t_{crit} จากตาราง ที่ $df = n-1$ และ $p = 0.05$ และมีการนำผลทดสอบมาคำนวณหา %mean recovery การคำนวณ t_{cal}

$$\text{โดยที่} \quad t_{cal} = \frac{(\bar{X} - \mu)}{SD/\sqrt{n}}$$

เมื่อ $\bar{X}$ คือ ค่าเฉลี่ยขอผลการทดสอบ CRM

μ คือ True value หรือ Certified value

SD คือ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

n คือ จำนวนซ้ำ, $n=10$

5.3.2 ประเมินความถูกต้อง (trueness) โดยพิจารณา %recovery

5.3.2.1 ทดสอบ spiked sample ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0.03, 0.1, 0.5, 1 และ 2 mg/kg ลงในตัวอย่างทั้ง 13 ชนิด ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

5.3.2.2 คำนวณหาค่า %recovery ของแต่ละซ้ำ และนำมาคำนวณหาค่า %mean recovery ของแต่ละความเข้มข้น โดยความเข้มข้นที่ 0.03 mg/kg กำหนดเกณฑ์การยอมรับ %mean recovery 60 – 115% และความเข้มข้น ช่วง 0.1 – 2 mg/kg เกณฑ์การยอมรับ %mean recovery 80 – 110% ตามมาตรฐาน AOAC (AOAC International, 2023c)

5.3.3 ประเมินความเที่ยงแบบทวนซ้ำได้ (repeatability) ของแต่ละความเข้มข้น จากข้อมูลการทดสอบ ข้อ 5.3.2 โดยหาค่า %RSD_r และ %PRSD_r ดังสมการข้อ 5.2.2

5.3.4 ประเมินความเที่ยงแบบทำซ้ำได้ (within-laboratory reproducibility) โดยทดสอบ spiked sample ความเข้มข้น 5 ระดับคือ 0.03, 0.1, 0.5, 1 และ 2 mg/kg ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ จำนวน 3 ชุดทดสอบ ชุดที่ 1 โดยเป็นข้อมูลจาก ข้อ 5.3.2 (วันที่ 1 ของการทดสอบ) ส่วนชุดที่ 2 และ 3 ทดสอบเพิ่มในวันที่ 8 และ 15 คำนวณค่า %RSD_R ของแต่ละชุดความเข้มข้นนั้น ต้องมีค่าน้อยกว่า %PRSD_R ตามมาตรฐาน AOAC (AOAC International, 2023b) ที่คำนวณจากสมการ Horwitz

$$\text{โดยที่ } \%PRSD_R = 2C^{-0.1505}$$

เมื่อ C คือ concentration ratio

5.4 การเข้าร่วมกิจกรรมทดสอบความชำนาญ (proficiency testing)

มีการเข้าร่วมกิจกรรมทดสอบความชำนาญปริมาณโปรตีนในตัวอย่างอาหารสัตว์ของ FAPAS Food Chemistry Proficiency Test 07550 ในตัวอย่าง Soya Flour ประจำปี 2568

5.5 การตรวจหาปริมาณโปรตีนในอาหารสัตว์ และอาหารสัตว์เลี้ยง

นำวิธีทดสอบที่พัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบเรียบร้อยแล้วมาตรวจอาหาร สัตว์ และอาหารสัตว์เลี้ยง จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างอาหารสัตว์ 22 ชนิดและ ตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยง 2 ชนิด

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การพัฒนาวิธีทดสอบปรอท

1.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างกราฟมาตรฐานปรอท

ในการทดสอบปรอทที่อยู่ในของเหลว เช่น สารละลายมาตรฐาน จะต้องใช้ additive B อยู่ประมาณครึ่งหนึ่งของความสูง sample ceramic boat เนื่องจาก additive B เป็นสารเติมแต่งที่มีรูปพรุนให้สารละลายเข้าอยู่ภายในได้ เมื่อให้ความร้อนสารละลายจะระเหยอย่างช้าๆ ไม่เดือดแบบรุนแรง ทำให้ gold amalgamator สามารถตรวจจับปรอทได้ดี ผลการตรวจวัดแม่นยำขึ้น (Nippon Instrument Corporation, 2015) และผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างกราฟมาตรฐานปรอทดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างกราฟมาตรฐานปรอท

Standard mercury	Atomize 1	Atomize 2	Max area
0.5 ng	130	700	0.29958
		800	0.30598
		900	0.32567
	150	700	0.32674
		800	0.33530
		900	0.33531
	170	700	0.32576
		800	0.33498
		900	0.33499

จากตารางที่ 3 ผลการทดสอบสารละลายมาตรฐานปรอทปริมาณ 0.5 ng ที่ atomize 1 อุณหภูมิ 150 และ 170°C และที่ atomize 2 อุณหภูมิ 800 และ 900°C ให้ผลพื้นที่ใต้กราฟสูงสุดใกล้เคียงกันคือ 0.33530 – 0.33531 ซึ่งหมายถึงสภาวะที่กำหนดสามารถเผาปรอทให้เป็นไอได้หมดใกล้เคียงกัน จึงเลือกใช้ atomize 1 ที่อุณหภูมิ 150°C และ atomize 2 ที่อุณหภูมิ 800°C ดังตารางที่ 4 โดยไม่จำเป็นต้องใช้อุณหภูมิ atomize 1 และ atomize 2 ที่สูงเกินไป ซึ่งเป็นการช่วยลดระยะเวลาในการเพิ่มอุณหภูมิ และระยะเวลา ในการวิเคราะห์ลดลง ซึ่งอุณหภูมิที่เลือกใช้มีความสอดคล้องกับแนวทางการทดสอบปรอทในอาหาร AOAC method 971.21 (AOAC International, 2023a) ซึ่งแนะนำว่าการตรวจหาปริมาณปรอทด้วยเทคนิค TD-CVAAS ควรใช้อุณหภูมิ atomize 1 ในช่วง 120 - 200 °C และ atomize 2 ในช่วง 650 - 850 °C

ตารางที่ 4 การตั้งสภาวะการสร้างกราฟมาตรฐานปรอท

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (s)	Flow (L/min)
Atomize 1	150	60	0.40
Atomize 2	800	120	0.40

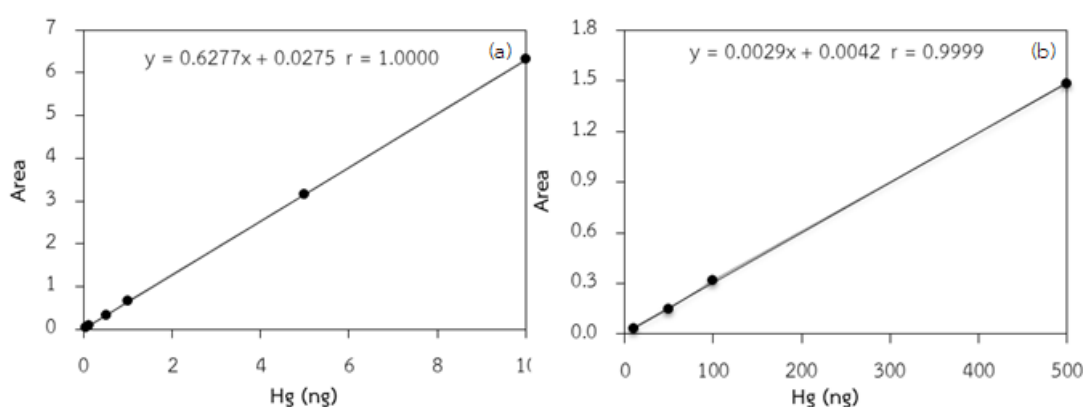
1.2 ผลทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity)

เครื่องวิเคราะห์ปรอทด้วยเทคนิค TD-CVAAS มีระบบตรวจวัด (detector) 2 ชุด (Nippon Instrument Corporation, 2015) สำหรับ 2 ช่วงการตรวจวัด ได้แก่ long cell ซึ่งมีความไวในการตรวจวัดสูง จึงเหมาะสำหรับตรวจวัดปริมาณปรอทในช่วงต่ำและ short cell ซึ่งเหมาะสำหรับตรวจวัดปริมาณปรอทในช่วงสูง ทั้งนี้ นำสถานะจากตารางที่ 4 มาทดสอบสารละลายมาตรฐานปรอทที่ปริมาณต่างๆ เพื่อหาพื้นที่ใต้กราฟ ได้ผลดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบพื้นที่ใต้กราฟของปรอทที่ปริมาณ 0 – 500 ng

Hg long cell (ng)	0	0.03	0.1	0.5	1	5	10
Area	0.02289	0.04682	0.09909	0.33530	0.65812	3.15486	6.31108
Hg short cell (ng)	10	50	100	500	-	-	-
Area	0.03182	0.14888	0.31818	1.48508	-	-	-

จากตารางที่ 5 หากสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณปรอทที่ปริมาณ 0 – 500 ng กราฟจะไม่เป็นเส้นตรง จึงสร้างกราฟเป็นสองช่วงตามการอ่านค่าของตัวตรวจวัด พบว่าปริมาณปรอท 0 - 10 ng มีค่า r เท่ากับ 1.0000 และที่ปริมาณ 10 - 500 ng มีค่า r เท่ากับ 0.9999 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ทั้งสองช่วง แสดงว่าสามารถวัดปรอทในช่วงปริมาณ 0 – 10 ng และ 10 - 500 ng แล้วให้กราฟมาตรฐานปรอทเป็นเส้นตรง ดังรูปที่ 2 (a) และ (b)



รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่าง area และปริมาณของสารละลายมาตรฐานปรอท (a) ที่ปริมาณ 0, 0.03, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 ng และ (b) ที่ปริมาณ 10, 50, 100, 500 ng

จากรูปที่ 2 (a) เป็นช่วงการวัดปรอทปริมาณต่ำเนื่องจากระบบการแยกแสงใน path length เป็นแบบ long cell ทำให้ปรอทอยู่ใน path length ได้นาน การตรวจพบปรอทได้ละเอียด ทำให้ detection limit ต่ำกว่าแบบ short cell (U.S. EPA., 1998) จึงเหมาะสมต่อการใช้กราฟมาตรฐานปรอทเพื่อตรวจวัดปริมาณปรอทไม่เกิน 10 ng

จากรูปที่ 2 (b) เป็นช่วงการวัดปรอทปริมาณสูงเนื่องจากระบบการแยกแสงใน path length เป็นแบบ short cell ทำให้ปรอทอยู่ใน path length สั้น detection limit จึงสูงกว่า path length แบบ long cell (U.S. EPA., 1998) จึงเหมาะสมต่อการใช้เป็นกราฟมาตรฐานเพื่อตรวจวัดปริมาณปรอทเกิน 10 ng

การสร้างกราฟมาตรฐานปรอทไม่จำเป็นต้องสร้างใหม่ทุกครั้งในการทดสอบตัวอย่าง เนื่องจากกราฟมาตรฐานปรอทสร้างจากค่าดูดกลืนแสงกับปริมาณปรอท ที่ออกแบบเพื่อทดสอบปรอทเท่านั้น ส่วนตรวจวัดไม่สามารถปรับความยาวคลื่นได้ เพราะอยู่ในระบบปิด มีเส้นทางเคลื่อนที่ของไอปรอทคงที่ ความยาว path length คงที่ จึงสามารถใช้กราฟมาตรฐานปรอทเดิมได้ ยกเว้นหากมีการซ่อมแซมเครื่องมือ หรือเปลี่ยนรุ่นการผลิตสารมาตรฐานจะต้องมีการสร้างกราฟมาตรฐานปรอทใหม่ทุกครั้ง (U.S. EPA., 1998) และจำเป็นต้องทดสอบกราฟมาตรฐานปรอททุกครั้งก่อนใช้งาน ด้วย continuing calibration Standard (CCS) หรือ calibration verification of standard (CVS) ด้วยสารมาตรฐานปรอทที่ปริมาณ 10 ng ทดสอบ 3 ซ้ำและคำนวณค่าเฉลี่ย ปริมาณ 10 ng เป็นปริมาณที่ใช้ตรวจสอบกราฟมาตรฐานปรอททั้งช่วงตรวจวัดปริมาณปรอทต่ำและสูงเกณฑ์การยอมรับ CCS อยู่ในช่วง $\pm 5\%$ ของปริมาณปรอท 10 ng (อยู่ในช่วง 9.5 – 10.5 ng) และ CVS อยู่ในช่วง $\pm 10\%$ ของปริมาณปรอท 10 ng (อยู่ในช่วง 9 – 11 ng) โดยหาก CCS หรือ CVS ผ่านเกณฑ์การยอมรับ สามารถใช้ calibration curve เดิมในการทดสอบตัวอย่างต่อไป หากไม่อยู่ในเกณฑ์การยอมรับให้สร้าง calibration curve ใหม่ (Csuros, 1994)

1.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบตัวอย่างอาหารสุกร (เป็นตัวแทนอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยง) ได้ผลดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบตัวอย่างอาหารสุกร

Feed type	Atomize 1	Atomize 2	Mercury (mg/kg)	%Mean recovery
Swine Feed 0.5 mg/kg	150	700	0.390	78.00
		800	0.413	82.60
		850	0.414	82.80
		900	0.40	81.88
	180	700	0.412	82.40
		800	0.493	98.60
		850	0.500	100.00
		900	0.504	100.80
	200	700	0.452	90.40
		800	0.498	99.56
		850	0.499	99.80
		900	0.508	101.68

ผลการทดสอบอาหารสุกรที่เติมสารละลายมาตรฐานปรอทให้มีความเข้มข้น 0.5 mg/kg พบว่าการตั้งสภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอน atomize 1 ที่อุณหภูมิ 180°C และ 200°C และ atomize 2 ที่อุณหภูมิ 800°C, 850°C และ 900°C ให้ค่า %mean recovery อาหารสุกรใกล้เคียง 100% จึงได้เลือกใช้อุณหภูมิ 850°C เนื่องจากให้ %mean recovery ใกล้เคียงมากที่สุด สภาวะที่เหมาะสมต่อการทดสอบตัวอย่างที่เป็นของแข็งและของแข็งกึ่งเหลว สามารถใช้อุณหภูมิเดียวกันได้ เนื่องจากตัวอย่างของแข็งกึ่งเหลวมีลักษณะเป็นของแข็งเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ (U.S. EPA., 1998) สรุปสภาวะที่ใช้ทดสอบปรอทในอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยงดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 การตั้งสภาวะการทดสอบปรอทในอาหารสัตว์ และอาหารสัตว์เลี้ยง

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (s)	Flow (L/min)
Atomize 1	180	120	0.40
Atomize 2	850	120	0.40

2. การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

2.1 ผลการทดสอบ matrix effect อาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยง 13 ชนิด ดังในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบ matrix effect

Feed type	$\bar{d}$	SD	t_{cal}	Feed type	$\bar{d}$	SD	t_{cal}
Swine Feed	0.482	6.42	0.23	Soy meal	1.467	4.96	0.89
Poultry Feed	5.153	9.90	1.56	Corn meal	1.654	4.91	1.01
Bovine Feed	3.078	4.72	1.95	Rice bran meal	1.709	3.55	1.44
Dog food	0.472	1.02	1.38	Fish meal	2.842	5.01	1.70
Cat food	0.470	1.02	1.37	Wet Cat food	0.666	1.85	1.08
Cricket feed	3.902	7.48	1.56	Wet Dog food	-1.409	2.93	-1.44
				Wet stick food	1.233	2.09	1.77

จากผลคำนวณในตารางที่ 8 พบว่า t_{cal} ที่คำนวณได้มีค่าน้อยกว่า t_{crit} ($t_{crit} = 2.30$ ที่ $df = 8$) แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังนั้นวิธีทดสอบหาปริมาณปรอทในอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยง 13 ชนิด ด้วยเครื่อง Direct Thermal Decomposition Mercury Analyzer ไม่มี matrix effect

2.2 ผลการทดสอบหาค่า limit of detection (LOD) และ limit of quantification (LOQ) ให้ผลดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบปรอทในอาหารสัตว์ และอาหารสัตว์เลี้ยง เพื่อหาค่า LOD และ LOQ

	Mercury (mg/kg)												
	Swine feed	Poultry feed	Bovine feed	Soybean meal	Corn meal	Rice bran meal	Fish meal	Cricket feed	Cat food	Dog food	Wet Cat food	Wet Dog food	Wet stick food
mean	0.004	0.002	0.005	0.002	0.002	0.007	0.065	0.001	0.005	0.003	0.002	0.001	0.003
S ₀	0.0007	0.0010	0.0005	0.0008	0.0005	0.0008	0.0006	0.0010	0.0044	0.0014	0.0008	0.0009	0.0011
S ₀ '	0.0005	0.0007	0.0004	0.0006	0.0004	0.0006	0.0004	0.0007	0.0031	0.0010	0.0006	0.0007	0.0007
LOD	0.002	0.002	0.001	0.002	0.001	0.002	0.001	0.002	0.009	0.003	0.002	0.002	0.002
LOQ	0.005	0.007	0.004	0.006	0.004	0.006	0.004	0.007	0.031	0.010	0.006	0.007	0.008

จะได้อาการทดสอบหาปริมาณปรอทในตัวอย่างอาหารสัตว์ และอาหารสัตว์เลี้ยง ดังตารางที่ 9 ค่า LOD อยู่ช่วง 0.001 – 0.009 mg/kg จึงเลือกค่าสูงเพื่อให้ครอบคลุมชนิดตัวอย่าง ที่นำมาทดสอบ โดยเลือกค่า 0.009 mg/kg และปัดตัวเลขได้ค่า LOD เท่ากับ 0.01 mg/kg คำนวณหาค่า LOQ อยู่ในช่วง 0.004 - 0.031 mg/kg จึงทำการยืนยันค่า LOQ โดยทดสอบ spiked sample ที่มีความเข้มข้นของปรอท 0.03 mg/kg ทดสอบตัวอย่างละ 10 ซ้ำ ได้ผลดัง ตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบปรอทในอาหารสัตว์ และอาหารสัตว์เลี้ยง เพื่อยืนยันค่า LOQ (0.03 mg/kg)

Feed type	Mean Conc (mg/kg)	%Mean recovery	SD (mg/kg)	RSD _r (%)
Swine feed	0.029	96.00	0.001	3.19
Poultry feed	0.028	93.67	0.001	2.02
Bovine feed	0.028	94.57	0.001	2.05
Soy meal	0.027	91.00	0.001	2.47
Corn meal	0.027	96.00	0.000	1.77
Cricket feed	0.029	96.57	0.001	2.32
Dog food	0.028	92.67	0.000	1.52
Cat food	0.026	86.67	0.001	3.63
Fish meal	0.028	94.67	0.001	3.40
Rice bran meal	0.028	94.00	0.002	5.74
Wet Cat food	0.025	82.00	0.001	9.62
Wet Dog food	0.029	95.97	0.001	3.94
Wet stick food	0.031	103.33	0.001	3.04

ผลการยืนยัน LOQ ในการทดสอบหาปริมาณปรอทในตัวอย่างอาหารสัตว์ และอาหารสัตว์เลี้ยง พบว่าทุกตัวอย่างมีค่า %mean recovery อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (60 - 115%) และ %RSD_r น้อยกว่า %PRSD_r ตามแนวทาง AOAC (AOAC International, 2023b) เมื่อ %PRSD_r ทุกชนิดอาหารสัตว์ คือ 17.90 แสดงว่า LOQ มีความแม่นยำและความเที่ยง

2.3 ผลการทดสอบความแม่นยำ

2.3.1 ประเมินความถูกต้อง (trueness) โดยใช้ CRM DORM-5 ชนิดตัวอย่าง fish protein ทำการประเมินด้วยสถิติ t-test และ %mean recovery ได้ผลดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ผลการประเมินความถูกต้อง โดยใช้ตัวอย่าง CRM DORM-5 ชนิดตัวอย่าง fish protein

CRM	Mercury
Mean ($\bar{x}$) (mg/kg)	0.314
Standard Deviation (SD) (mg/kg)	0.001
True value or Certified value (μ) (mg/kg)	0.315
t_{cal}	2.121
t_{crit}	2.262
%mean recovery (เกณฑ์การยอมรับ 80 - 110)	99.68

จากผลการทดสอบพบว่าได้ค่า $t_{cal} < t_{crit}$ ($t_{crit} = 2.262$ ที่ $df = 9$) และเมื่อคำนวณหา %mean recovery พบว่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ %mean recovery 80 - 110% ตามเกณฑ์ AOAC (AOAC International, 2023) แสดงว่าวิธีทดสอบมีความถูกต้อง

2.3.2 ทดสอบความถูกต้อง (trueness) โดยทดสอบ spiked sample ที่มีความเข้มข้นของปรอท แล้วคำนวณหาค่า %mean recovery พบว่าความเข้มข้น 0.03 mg/kg มี %mean recovery อยู่ในช่วง 82 - 103.33 อยู่ในเกณฑ์การยอมรับช่วง 60 - 115% ตาม AOAC (AOAC International, 2023c) และเมื่อทดสอบความเข้มข้น 0.1 - 2 mg/kg มี %mean recovery อยู่ในช่วง 92.8 - 108.72 อยู่ในเกณฑ์การยอมรับช่วง 80 - 110% ตาม AOAC (AOAC International, 2023c) ดังในตารางที่ 12 - 13 แสดงว่าวิธีทดสอบนี้มีความแม่นยำเป็นที่ยอมรับได้

2.3.3 ทดสอบความเที่ยงแบบทวนซ้ำได้ (repeatability) โดยทดสอบ spiked sample ที่มีความเข้มข้นของปรอท แล้วคำนวณหาค่า %RSD_r และ %PRSD_r พบว่าทุกระดับความเข้มข้นมีค่า %RSD_r น้อยกว่าค่า %PRSD_r ดังในตารางที่ 12 - 13 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ แสดงว่าวิธีทดสอบนี้มีความเที่ยงแบบทวนซ้ำได้เป็นที่ยอมรับได้

ตารางที่ 12 ผลการประเมินความถูกต้อง (trueness) จาก %mean recovery และความเที่ยงแบบทวนซ้ำได้ (repeatability) ในตัวอย่างอาหารสัตว์

Feed type	Spiked conc (mg/kg)	Mean conc (mg/kg)	%Mean recovery	SD (mg/kg)	RSD _r (%)	PRSD _r (%)
Swine feed	0.03	0.029	96.00	0.001	3.19	17.90
	0.1	0.094	93.90	0.002	2.63	14.93
	0.5	0.485	97.02	0.026	5.41	11.72
	1	1.045	104.47	0.035	3.30	10.56
	2	2.062	103.09	0.064	3.09	9.51
Poultry feed	0.03	0.028	93.67	0.001	2.02	17.90
	0.1	0.095	95.10	0.002	2.50	14.93
	0.5	0.483	96.62	0.008	1.57	11.72
	1	1.076	107.56	0.022	2.01	10.56
	2	2.075	103.74	0.032	1.52	9.51
Bovine feed	0.03	0.028	94.56	0.001	2.39	17.90
	0.1	0.094	93.60	0.004	3.78	14.93
	0.5	0.491	98.14	0.006	1.27	11.72
	1	1.074	107.35	0.016	1.53	10.56
	2	2.090	104.48	0.048	2.30	9.51
Cricket feed	0.03	0.029	96.56	0.001	2.32	17.90
	0.1	0.098	97.50	0.003	2.70	14.93
	0.5	0.497	99.32	0.007	1.37	11.72
	1	1.049	104.86	0.034	3.28	10.56
	2	1.916	95.80	0.026	1.37	9.51
Soy meal	0.03	0.027	91.00	0.001	2.47	17.90
	0.1	0.097	96.70	0.002	2.34	14.93
	0.5	0.501	100.24	0.009	1.88	11.72
	1	1.063	106.34	0.031	2.88	10.56
	2	2.119	105.94	0.030	1.39	9.51
Corn meal	0.03	0.027	91.00	0.000	1.77	17.90
	0.1	0.094	94.40	0.003	2.79	14.93
	0.5	0.495	99.08	0.010	2.10	11.72
	1	1.075	107.51	0.018	1.64	10.56
	2	2.090	104.49	0.040	1.93	9.51
Rice bran meal	0.03	0.028	94.00	0.002	5.74	17.90
	0.1	0.093	92.80	0.002	2.43	14.93
	0.5	0.495	99.06	0.010	1.96	11.72
	1	1.087	108.69	0.025	2.28	10.56
	2	2.100	105.02	0.026	1.25	9.51
Fish meal	0.03	0.028	94.66	0.001	3.40	17.90
	0.1	0.100	99.80	0.002	2.05	14.93
	0.5	0.505	100.90	0.008	1.52	11.72
	1	1.056	105.55	0.038	3.64	10.56
	2	2.083	104.15	0.027	1.30	9.51

ตารางที่ 13 ผลการประเมินความถูกต้อง (trueness) จาก %mean recovery และความเที่ยงแบบทวนซ้ำได้ (repeatability) ในตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยงชนิดแห้งและเปียก

Feed type	Spiked conc (mg/kg)	Mean conc (mg/kg)	%Mean recovery	SD (mg/kg)	RSD _r (%)	PRSD _r (%)
Cat food	0.03	0.026	86.66	0.001	3.63	17.90
	0.1	0.094	93.80	0.002	2.06	14.93
	0.5	0.477	95.46	0.008	1.58	11.72
	1	1.079	107.86	0.016	1.48	10.56
	2	2.091	104.56	0.041	1.94	9.51
Dog food	0.03	0.028	92.66	0.000	1.52	17.90
	0.1	0.095	94.60	0.002	2.18	14.93
	0.5	0.496	99.20	0.010	1.92	11.72
	1	1.078	107.77	0.013	1.23	10.56
	2	2.015	100.73	0.086	4.26	9.51
Wet cat food	0.03	0.025	82.00	0.002	9.62	17.90
	0.1	0.096	95.80	0.009	9.91	14.93
	0.5	0.480	95.92	0.051	10.56	11.72
	1	1.046	104.61	0.029	2.80	10.56
	2	1.928	96.40	0.069	3.60	9.51
Wet dog food	0.03	0.029	95.96	0.001	3.94	17.90
	0.1	0.094	93.70	0.005	5.56	14.93
	0.5	0.504	100.86	0.007	1.39	11.72
	1	1.037	103.66	0.041	3.96	10.56
	2	2.134	106.68	0.052	2.43	9.51
Wet stick food	0.03	0.031	103.33	0.001	3.04	17.90
	0.1	0.095	95.20	0.005	5.46	14.93
	0.5	0.514	102.72	0.006	1.10	11.72
	1	1.087	108.72	0.014	1.24	10.56
	2	2.155	107.74	0.044	2.04	9.51

2.3.4 ผลการประเมินความเที่ยงแบบทำซ้ำได้ (within-laboratory reproducibility)

โดย spiked sample ที่มีความเข้มข้นของปรอท จำนวน 3 ชุดทดสอบ ต่างวัน และทำการคำนวณหาค่า %RSD_R และ %PRSD_R พบว่าทุกระดับความเข้มข้นมีค่า %RSD_R น้อยกว่าค่า %PRSD_R ดังในตารางที่ 14 – 15 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ แสดงว่าวิธีทดสอบมีความเที่ยงแบบทำซ้ำได้เป็นที่ยอมรับได้

ตารางที่ 14 ผลการประเมินความเที่ยงแบบ within-laboratory reproducibility ของปรอทในตัวอย่างอาหารสัตว์

Feed type	Spiked conc (mg/kg)	Mean conc (mg/kg)	SD (mg/kg)	RSD _R (%)	PRSD _R (%)
Swine feed	0.03	0.029	0.001	2.86	27.12
	0.1	0.093	0.003	2.85	22.62
	0.5	0.495	0.019	3.93	17.76
	1	1.038	0.032	3.11	16.00
	2	2.091	0.047	2.25	14.41
Poultry feed	0.03	0.029	0.001	4.27	27.12
	0.1	0.095	0.005	5.76	22.62
	0.5	0.488	0.012	2.43	17.76
	1	1.048	0.042	2.99	16.00
	2	2.085	0.037	1.78	14.41
Bovine feed	0.03	0.029	0.001	3.34	27.12
	0.1	0.093	0.004	4.37	22.62
	0.5	0.489	0.006	1.21	17.76
	1	1.048	0.043	4.09	16.00
	2	2.089	0.039	1.89	14.41
Cricket feed	0.03	0.030	0.001	3.94	27.12
	0.1	0.096	0.004	3.72	22.62
	0.5	0.493	0.009	1.87	17.76
	1	1.037	0.052	5.04	16.00
	2	2.001	0.078	3.89	14.41
Soy meal	0.03	0.028	0.001	2.98	27.12
	0.1	0.094	0.003	3.38	22.62
	0.5	0.514	0.025	4.86	17.76
	1	1.055	0.029	2.78	16.00
	2	2.109	0.047	2.22	14.41
Corn meal	0.03	0.028	0.001	3.14	27.12
	0.1	0.093	0.003	3.01	22.62
	0.5	0.497	0.022	4.40	17.76
	1	1.030	0.040	3.87	16.00
	2	2.078	0.069	3.34	14.41
Rice bran meal	0.03	0.028	0.001	3.70	27.12
	0.1	0.093	0.003	3.29	22.62
	0.5	0.503	0.016	3.28	17.76
	1	1.048	0.051	4.85	16.00
	2	2.089	0.035	1.67	14.41
Fish meal	0.03	0.028	0.001	4.52	27.12
	0.1	0.096	0.004	3.96	22.62
	0.5	0.487	0.030	6.17	17.76
	1	1.061	0.038	3.59	16.00
	2	2.072	0.042	2.02	14.41

ตารางที่ 15 ผลการประเมินความเที่ยงแบบ within-laboratory reproducibility ของปรอทในตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยงชนิดแห้งและเปียก

Feed type	Spiked conc (mg/kg)	Mean conc (mg/kg)	SD (mg/kg)	RSD _R (%)	PRSD _R (%)
Dog food	0.03	0.028	0.001	3.99	27.12
	0.1	0.094	0.003	3.29	22.62
	0.5	0.492	0.008	1.69	17.76
	1	1.044	0.043	4.16	16.00
	2	2.057	0.071	3.45	14.41
Cat food	0.03	0.026	0.001	4.46	27.12
	0.1	0.092	0.003	3.28	22.62
	0.5	0.490	0.015	3.11	17.76
	1	1.044	0.041	3.94	16.00
	2	2.077	0.044	2.14	14.41
Wet cat food	0.03	0.023	0.002	9.02	27.12
	0.1	0.092	0.010	10.68	22.62
	0.5	0.490	0.034	6.96	17.76
	1	0.978	0.082	8.42	16.00
	2	2.003	0.110	5.48	14.41
Wet dog food	0.03	0.030	0.001	4.67	27.12
	0.1	0.095	0.003	3.64	22.62
	0.5	0.497	0.017	3.44	17.76
	1	1.041	0.037	3.51	16.00
	2	2.114	0.084	3.96	14.41
Wet stick food	0.03	0.029	0.002	6.11	27.12
	0.1	0.097	0.004	4.05	22.62
	0.5	0.514	0.008	1.64	17.76
	1	1.079	0.020	1.89	16.00
	2	2.135	0.042	1.95	14.41

3. การเข้าร่วมกิจกรรมทดสอบความชำนาญของ FAPAS (proficiency testing) ในตัวอย่าง soya flour ทดสอบรายการ mercury (total) มีค่าเท่ากับ 609 µg/kg ด้วยเทคนิคที่พัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้นี้ ผลเป็นที่น่าพอใจมีค่า z-score เท่ากับ 0.1 ($|z| < 2$) (International Organization for Standardization, 2022) ดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 การเข้าร่วมกิจกรรมทดสอบความชำนาญของ FAPAS รายการ mercury (total) FAPAS Food Chemistry Proficiency Test 07550 ในตัวอย่าง Soya Flour

จำนวนห้องปฏิบัติการ ที่เข้าร่วม	Assigned value (µg/kg)	Laboratory result (µg/kg)	z-score	จำนวนห้องปฏิบัติการ ที่ผลทดสอบ $ z < 2$
27	602	609	0.1	22

เมื่อพิจารณาผู้เข้าร่วมกิจกรรมทดสอบความชำนาญที่ใช้เครื่องมืออื่นๆ เช่น Atomic Absorption Spectroscopy (AAS), Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES), ICP-MS และ Flow Injection Atomic Spectroscopy for Mercury (FIAS) พบว่าผลการทดสอบที่ใช้เครื่องมือแตกต่างกัน ให้ผลทดสอบอยู่ในเกณฑ์ที่น่าพอใจ ($|z| \leq 2$) จำนวน 22 ห้องปฏิบัติการ คิดเป็นร้อยละ 81 ของผู้เข้าร่วมทดสอบ (Food Chemistry Proficiency Test Report 07550,2024)

4. การตรวจหาปริมาณปรอทในอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยง

เมื่อได้พัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบปรอทในอาหารสัตว์ และอาหารสัตว์เลี้ยง ด้วยเทคนิค TD-CVAAS แล้วดำเนินการทดสอบตัวอย่างอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยง โดยใช้ CRM เป็น QC control ดังตารางที่ 17

ตารางที่ 17 ผลทดสอบอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยง

กิจกรรมที่ ทดสอบ	ชนิดตัวอย่าง	จำนวน ตัวอย่าง	ผลทดสอบ (mg/kg)	เกณฑ์ EU (mg/kg)
กิจกรรม ตรวจสอบ คุณภาพอาหาร สัตว์นำเข้า	ปลาปน	2	0.04 - 0.13	≤ 0.5 ¹
	ตับหมึกปน	3	0.05 - 14.47	≤ 0.5 ¹
	เปลือกกุ้งปน	1	ไม่พบ	≤ 0.5 ¹
	ผงผสมอาหาร KRILL MEAL	2	ไม่พบ - น้อยกว่า 0.03	≤ 0.5 ¹
	อาหารเสริมโปรตีนกุ้ง	1	0.03	≤ 0.2 ²
กิจกรรมแผน เฝ้าระวังสาร ตกค้างประจำปี	อาหารไก่	7	ไม่พบ	≤ 0.1 ³
	อาหารสุกร	1	ไม่พบ	≤ 0.1 ³
	อาหารจิ้งหรีด	5	ไม่พบ	≤ 0.1 ³
	อาหารแมว	2	ไม่พบ	≤ 0.3 ⁴

หมายเหตุ เกณฑ์มาตรฐานตาม commission regulation (EU) 2019/1869 กำหนดให้ mercury ใน

¹ ปลา สัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์ที่ใช้ผลิตอาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับสัตว์ไม่เกิน 0.5 mg/kg

² อาหารเสริมแร่ธาตุสำหรับสัตว์ไม่เกิน 0.2 mg/kg

³ วัตถุดิบอาหารสัตว์ไม่เกิน 0.1 mg/kg

⁴ อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับสุนัข แมว ปลาสวยงามและสัตว์จำพวกขนยาว (fur) ไม่เกิน 0.3 mg/kg

สรุปผลการทดลอง

การพัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบนี้ แสดงให้เห็นว่าวิธีการทดสอบนี้เหมาะสมสำหรับการทดสอบปรอทในอาหารสัตว์ และอาหารสัตว์เลี้ยงด้วยเทคนิค TD-CVAAS ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นได้ผ่านการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบอ้างอิงตามวิธีของ Eurachem guide (Cantwell, 2025) เป็นวิธีที่มีความจำเพาะ มีช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน โดยมีค่า LOD เท่ากับ 0.01 mg/kg ค่า LOQ เท่ากับ 0.03 mg/kg และช่วงของการใช้งานที่ 0.03 - 2 mg/kg มีความเที่ยงและความแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ยอมรับของ AOAC (AOAC International, 2023c) ทำให้วิธีการทดสอบนี้มีแม่นยำและความเที่ยงและผลการทดสอบน่าเชื่อถือ สามารถนำไปใช้เป็นวิธีทดสอบตัวอย่าง เพื่อตรวจสอบกับค่ามาตรฐานของสหภาพยุโรปได้ และสามารถนำผลทดสอบใช้เป็นข้อมูลประกอบการพิจารณาจัดทำมาตรฐานอาหารสัตว์ภายในประเทศได้

ข้อเสนอแนะ

นอกจากการพัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบปรอทในอาหารสัตว์ และอาหารสัตว์เลี้ยงด้วยเทคนิค TD-CVAAS แล้ว ควรประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด (uncertainty) จากวิธีทดสอบนี้ ซึ่งสามารถหาแหล่งความไม่แน่นอนจากปัจจัยต่างๆในการวัด ซึ่งในแต่ละระดับของการวัดจะเกิดความไม่แน่นอนของการวัดสะสมขึ้นเรื่อย ๆ ขึ้นอยู่กับความสามารถในการถ่ายทอดการวัดของแต่ละห้องปฏิบัติการ ความไม่แน่นอนอาจเกิดขึ้นจากหลายสาเหตุ จึงควรหาค่าความไม่แน่นอนของการวัด เพื่อให้สอดคล้องกับมาตรฐาน ISO/IEC 17025 สามารถใช้ในการขอรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการ ISO/IEC 17025 ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์อุดม เจือจันทร์ ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงาน นางสาววิภาดา สิริสมภพชัย ผู้เชี่ยวชาญด้านการวิเคราะห์คุณภาพสินค้าปศุสัตว์ นางสาวสุนีย์ คณาพิพัฒน์ หัวหน้ากลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำ นางสาวสุกัญญา พวงเสียง นางสาวพรชนิตร์ พรหมคุณ และบุคลากรงานเคมี กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ ที่ช่วยให้การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้สำเร็จได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

สุภาพร สิริมานุยุตต์, นิรชา วงษ์จินดา, ปรีดา เมธาทิพย์, รัชดา ภิรมย์รักษ์ และสมยศ ราชนิยม. 2545. ปริมาณตะกั่ว ปรอท และแคดเมียมในปลาทะเลเศรษฐกิจที่จำหน่ายในตลาดสดในเขตกรุงเทพมหานคร และสะพานปลา. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 17 หน้า.

พระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558, 5 มีนาคม 2558. ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 132 ตอนที่ 15 ก

- สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2557. ปริมาณและหน่วย เล่ม 15: ศัพท์มาตรฐานวิทยา - แนวคิดพื้นฐานและแนวคิดทั่วไปพร้อมคำศัพท์ที่เกี่ยวข้อง. มอก. 235 เล่ม 15-2557.
- AOAC International. 2023a. AOAC Official Method 971.21 *Mercury in Food*. AOAC *Official Methods of Analysis*. 22nd ed. Oxford University Press. New York.
- AOAC International. 2023b. *Appendix E: Laboratory Quality Assurance*. AOAC *Official Methods of Analysis*. 22nd ed. Oxford University Press. New York.
- AOAC International. 2023c. *Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirement*. AOAC *Official Methods of Analysis*. 22nd ed. Oxford University Press. New York.
- ATSDR (Agency for Toxic Substance and Disease Registry). 2022. *Toxicological profile for mercury April 2022*. Department of Health and Human Services. Georgia, USA. pp. 456-510.
- Cantwell, H. 2025. *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. 3rd ed. [Online]. Available: <https://www.eurachem.org>. Accessed February 1, 2025
- Csuros, M. 1994. *Environmental sampling and analysis for technicians*. CRC Press.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2008. Mercury as undesirable substance in animal feed scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. The EFSA Journal. 654: 1-76.
- Ericksen, J.A., Gustin, M.S., Xin, M., Weisberg, P.J. and Fernandez, G.C.J. 2006. *Air-soil exchange of mercury from background soils in the United States*. Sci Tot. Env. 366: 851-863.
- European Commission. 2019. Commission Regulation (EU) 2019/1869 of the European Parliament and of the council. Official Journal of the European Union. L289/32-L289/36
- Fapas. 2024. Fapas® – Food Chemistry Proficiency Test Report 07550. หน้า 10/27.
- International Organization for Standardization. 2022. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison (ISO/IEC 13528:2022). [Online]. Available: <https://www.iso.org/standard/78879.html>
- Li, Y., Chen, C., Li, B., Sun, J., Wang, J., Gao, Y., Zhao, Y. and Chai, Z. 2005. Elimination efficiency of different reagents for the memory effect of mercury using ICP-MS. Journal of Analytical Atomic Spectrometry. 21(1): 94-96.

- Lim, P.Y. 1998. *Chemical contamination in seafood - heavy metals. In the 6th regional training course in fish quality assessment method-seafood safety, 23 August - 5 September 1998*, Marine Fisheries Research Department, SEAFDEC, Singapore. pp. 21-25.
- Luippold, A. and Gustin, M. S. 2016. *Mercury concentrations in wet and dry cat and dog food*. *Animal Feed Science and Technology*. 222: 190-193.
- Nippon Instruments Corporation. 2015. *Fully-automatic Thermal Vaporization Mercury Analysis System Mercury/MA-3000 Instruction Manual*. Nippon Instruments Corporation, Japan.
- Olivero, J. 2005. Mercury in the aquatic environment of the village of Caimito at the Mojana region, North of Columbia, *Water Air Soil Poll.* 159: 409-420
- Rahman, M.M., Brown, R.J.C., Kim, K.H., Yoon, H.O. and Phan N. 2013. Evaluation of the memory effect on gold-coated silica adsorption tubes used for the analysis of gaseous mercury by cold vapor atomic absorption spectrometry. *The Scientific World Journal*. 2013: 1-10.
- Rice, K.M., Walker, J.E.M., Wu, M., Gillette, C. and Blough, E.R. 2014. *Environmental mercury and its toxic effects. journal of preventive medicine & public Health*. 47(2): 74-83.
- Rosie, S. 2004. *Statistics 1.1 Paired t-tests, Mathematics Learning Support Centre*. Available on [<http://www.statstutor.ac.uk/resources/uploaded/paired-t-test.pdf>] [8 November 2025]
- U.S. EPA. 1998. *Method 7473 (SW-846) Mercury in Solids and Solutions by Thermal Decomposition, Amalgamation, and Atomic Absorption Spectrophotometry*. Revision 0. Washington, DC.