

การพัฒนาและตรวจสอบ ความใช้ได้ของวิธีทดสอบสังกะสี และทองแดงในอาหารจิ้งหรีดด้วย
เทคนิค inductively coupled plasma optical emission spectrometry

เอกชา ตนานนท์ชัย* รัชชานนท์ รักชีพ

บทคัดย่อ

สังกะสี และทองแดง เป็นแร่ธาตุที่มักพบในสิ่งแวดล้อมและวัตถุดิบอาหารสัตว์และถูกนำมาใช้เพื่อเป็นสารเสริมแร่ธาตุในอาหารจิ้งหรีด อย่างไรก็ตามการใช้สังกะสีและทองแดง เพื่อเป็นสารเติมแต่งในอาหารจิ้งหรีด ส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนสู่ห่วงโซ่อาหาร หากมนุษย์ได้รับในปริมาณมาก ย่อมส่งผลเสียต่อสุขภาพ การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสังกะสีและทองแดงในอาหารจิ้งหรีด ด้วยเทคนิค inductively coupled plasma optical emission spectrometry โดยศึกษาเปรียบเทียบหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างกรดไนตริกและกรดเปอร์คลอริกที่ใช้ย่อยตัวอย่างได้สมบูรณ์ ผลการศึกษาพบว่ากรดไนตริกและกรดเปอร์คลอริก ในอัตราส่วน 25:10 ml มีความเหมาะสมในการย่อยตัวอย่างอาหารจิ้งหรีด โดยมีค่าร้อยละการกลับคืนของสังกะสี และทองแดง เท่ากับ 94.97 และ 90.80 อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของ AOAC ผลการตรวจสอบความใช้ได้ตามแนวทางของ Eurachem พบว่ากราฟมาตรฐานสังกะสีและทองแดง มีความเป็นเชิงเส้นในช่วงความเข้มข้น 0.1-10 mg/l โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) เท่ากับ 1 มีขีดจำกัดของการตรวจพบสังกะสีและทองแดง เท่ากับ 1.33 และ 1.01 mg/kg และขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณของสังกะสีและทองแดง เท่ากับ 5.00 mg/kg มีความแม่นยำจากร้อยละการกลับคืนเฉลี่ยของสังกะสีและทองแดง ในช่วง 89.08-98.46 และ 95.50-100.47 มีความเที่ยงของการทวนซ้ำของสังกะสีและทองแดง โดยพิจารณาจากค่า %RSD, อยู่ในช่วง 1.23-4.67 และ 0.8-4.35 จากผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีพบว่าวิธีทดสอบนี้อยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ จึงเหมาะสมสำหรับใช้ทดสอบสังกะสีและทองแดงในอาหารจิ้งหรีด ที่มีช่วงใช้งาน 5-200 mg/kg

คำสำคัญ: การพัฒนาวิธี การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ สังกะสี ทองแดง อาหารจิ้งหรีด ICP-OES

เลขทะเบียนวิชาการ: 68(2)-0304-056

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์

91 หมู่ 4 ถนนติวานนท์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 1200

*ผู้รับผิดชอบ, e-mail: Talktoaekkacha@gmail.com

Method development and validation for the determination of zinc and copper in cricket feed by inductively coupled plasma optical emission spectrometry

Aekkacha Tanannonchai* Ratchanon Rakcheep

Abstract

Zinc and copper are trace elements commonly found in the environment and in animal feed ingredients, and they are often added as supplements in cricket feed. However, excessive use of these elements as feed additives can lead to contamination of the food chain, posing potential health risks to humans. This study aimed to develop and validate an analytical method for determining zinc and copper in cricket feed using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES). The digestion conditions were optimized by comparing different ratios of nitric acid and perchloric acid to achieve complete sample digestion. The results indicated that digestion with a nitric-to-perchloric acid ratio of 25:10 ml was suitable for cricket feed samples, yielding recoveries of 94.97% for zinc and 90.80% for copper, both within the AOAC acceptable range. Method validation following the Eurachem guidelines demonstrated that the calibration curves for zinc and copper were linear over the concentration range of 0.1–10 mg/L, with coefficients of determination (r^2) of 1.0 for both elements. The limits of detection (LOD) for zinc and copper were 1.33 and 1.01 mg/kg, respectively, while the limits of quantification (LOQ) were 5.00 mg/kg for both. The method showed good accuracy, with average recoveries ranging from 89.08% to 98.46% for zinc and from 95.50% to 100.47% for copper. Repeatability (%RSDr) values ranged from 1.23% to 4.67% for zinc and from 0.80% to 4.35% for copper. These findings indicate that the developed method meets the required acceptance criteria and is suitable for determining zinc and copper in cricket feed within the working range of 5–200 mg/kg.

Keyword: Method development, Method validation, zinc, copper, cricket feed, ICP-OES

Registered No.: 68(2)-0304-056

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

91 Moo. 4 Tiwanont Bangkadi Mueang Pathum Thani 12000

*Corresponding author, e-mail: Talktoaekkacha@gmail.com

บทนำ

การเลี้ยงจิ้งหรีดเพื่อเป็นแหล่งโปรตีนทางเลือกได้รับความนิยมมากขึ้นทั้งในประเทศและต่างประเทศ เนื่องจากจิ้งหรีดมีคุณค่าทางโภชนาการสูง และสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและอาหารสัตว์ (Halloran *et al.*, 2018; Krongdang *et al.*, 2023) ทั้งนี้คุณภาพและความปลอดภัยของจิ้งหรีดแปรผันตรงกับอาหารที่ใช้เลี้ยง โดยเฉพาะแร่ธาตุที่จำเป็น เช่น สังกะสี (Zn) และทองแดง (Cu) ซึ่งเป็นแร่ธาตุที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต การสังเคราะห์โปรตีน และการทำงานของเอนไซม์ในร่างกายมนุษย์ (McFarlane, 1976; Prasad, 2014) อย่างไรก็ตาม การได้รับในปริมาณที่มากเกินไปกว่าค่าที่แนะนำอาจก่อให้เกิดพิษและการสะสมในห่วงโซ่อาหาร (Zhang *et al.*, 2012) องค์การอนามัยโลก (WHO) และองค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO) กำหนดให้ปริมาณสังกะสีที่บริโภคได้ต่อวันสูงสุดที่ปลอดภัย (Tolerable Upper Intake Level; UL) สำหรับผู้ใหญ่ไม่เกิน 40 mg/day และทองแดงไม่เกิน 10 mg/day (WHO/FAO, 2001) การได้รับสังกะสีเกินระดับดังกล่าวอาจทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง และลดการดูดซึมทองแดงและธาตุเหล็ก (Plum *et al.*, 2010) ส่วนการได้รับทองแดงเกินขนาดอาจทำให้เกิดความเสียหายต่อตับและไต และก่อให้เกิดภาวะ oxidative stress ซึ่งสัมพันธ์กับโรคเรื้อรังหลายชนิด (Gaetke *et al.*, 2014) สำหรับการเลี้ยงจิ้งหรีดในปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้อาหารไก่ และอาหารสุกร ในกระบวนการเลี้ยงจิ้งหรีด เพื่อเพิ่มอัตราการรอด และเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของจิ้งหรีด (Rumpold and Schluter, 2013 ; Halloran *et al.*, 2018) ทั้งนี้ประเทศไทย โดยสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ ได้ผลักดันจิ้งหรีดเป็น “แมลงเศรษฐกิจ” ที่มีศักยภาพการผลิตในเชิงอุตสาหกรรม (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2559) อย่างไรก็ตาม เพื่อยกระดับการแข่งขันในตลาดโลก โดยเฉพาะการส่งออกไปยังสหภาพยุโรป (EU) จำเป็นต้องมีข้อมูลความปลอดภัยที่น่าเชื่อถือ เนื่องจากสหภาพยุโรปมีข้อกำหนดเข้มงวดด้านปริมาณโลหะหนักและสารเจือปนในอาหาร (European Commission, 2015; 2016; 2018)

ทองแดง เป็นแร่ธาตุที่มักพบในสิ่งแวดล้อม และถูกนำมาใช้ในหลายๆ ด้าน อาทิ เป็นสารเติมแต่งอาหารสำหรับอาหารสัตว์ (Labidi *et al.*, 2016) โดยสารประกอบ คอปเปอร์(II)ซัลเฟต (CuSO_4) เป็นสารประกอบที่มักพบในแผงวงจรอิเล็กทรอนิกส์ แบตเตอรี่ โทรศัพท์มือถือ เซมิคอนดักเตอร์ ท่อน้ำ อุตสาหกรรมปุ๋ย อุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ สารฆ่าเชื้อรา ยาฆ่าแมลง ตัวเร่งปฏิกิริยาผลิตภัณฑ์แปรรูปโลหะ และอาหารสัตว์ (Vardhan *et al.*, 2019) ปัจจุบันมีการเติมแร่ธาตุอาหารที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสัตว์ในรูปแบบของอาหารเสริมแร่ธาตุ เช่น การเติมทองแดงลงในอาหารสัตว์ เพื่อกระตุ้นให้เกิดการเจริญเติบโต (Zhang *et al.*, 2012) ทองแดงเป็นธาตุที่จำเป็นต่อร่างกายมนุษย์และเป็นธาตุอาหารรองของพืชและสัตว์ ทองแดงจะเป็นพิษหาก มีปริมาณเกินขีดจำกัดที่กำหนดไว้ (Sudha Rani *et al.*, 2018)

สังกะสี เป็นแร่ธาตุที่พบได้น้อยในสิ่งแวดล้อม สังกะสีถูกนำมาใช้ประโยชน์ในชีวิตมนุษย์หลายด้าน อาทิ การใช้สังกะสีออกไซด์ (ZnO) เป็นสารเสริมแร่ธาตุในอาหารสัตว์ (Vardhan *et al.*, 2019)

การใช้สังกะสีออกไซด์ สังกะสีซัลเฟต (ZnS) สังกะสีคาร์บอเนต (ZnCO_3) และสังกะสีซิลิเกต (Zn_2SiO_4) เป็นปุ๋ยให้กับพืช เนื่องจากสังกะสีเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับพืชและมีบทบาทในกระบวนการทางสรีรวิทยาของพืชหลายประการ เช่น การสังเคราะห์แสง การหายใจและการสังเคราะห์โปรตีน (Mohammadi and Khoshgoftarmansh, 2014) จากการใช้สารประกอบสังกะสีในอาหารสัตว์ ส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนสู่ห่วงโซ่อาหารของมนุษย์ หากมนุษย์ได้รับในปริมาณมากย่อมส่งผลเสียต่อสุขภาพของมนุษย์ (Fatemi *et al.*, 2020)

การเตรียมตัวอย่างอาหารสัตว์สำหรับการวิเคราะห์แร่ธาตุ เช่น สังกะสี และทองแดง เป็นขั้นตอนสำคัญที่ส่งผลต่อความถูกต้องและความแม่นยำของผลการวิเคราะห์ เนื่องจากอาหารสัตว์มีองค์ประกอบของ โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต ซึ่งอาจรบกวนการตรวจวัดโลหะหากไม่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ (Palma *et al.*, 2015) การเตรียมตัวอย่างสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การย่อยด้วยกรด (wet acid digestion) ซึ่งใช้กรดออกซิดิซเข้มข้นภายใต้อุณหภูมิสูง เช่น กรดไนตริกร่วมกับกรดเปอร์คลอริก กรดไฮโดรคลอริก หรือไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เพื่อทำลายอินทรีย์วัตถุและเปลี่ยนโลหะให้อยู่ในรูปไอออน พร้อมสำหรับการตรวจวัดด้วยเทคนิคสเปกโตรสโกปี (Hseu, 2004; Sleimi *et al.*, 2022; Badran *et al.*, 2018) ซึ่งปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้ระบบการย่อยด้วยพลังงานไมโครเวฟสร้างความร้อนและแรงดันสูงในระบบปิดเพื่อให้การย่อยเกิดขึ้นรวดเร็ว สมบูรณ์ และลดการสูญเสียธาตุระเหยง่าย และเพิ่มความปลอดภัยจากไอระเหยของกรด (Kwon *et al.*, 2024) นอกจากนี้ยังมีการเผาไหม้แห้ง (dry ashing) ที่ใช้อุณหภูมิสูง 450–550 °C เพื่อเผาอินทรีย์วัตถุให้เหลือเฉพาะเถ้าและละลายในกรดเจือจางเพื่อวิเคราะห์แร่ธาตุ (Welz and Sperling, 1999) ซึ่งวิธีนี้มีความปลอดภัยและไม่เกิดไอระเหยของกรด แต่การเผาที่อุณหภูมิสูงอาจทำให้สูญหายของแร่ธาตุที่ระเหยง่าย (Oliveira *et al.*, 2018) จึงเหมาะกับตัวอย่างที่มีอินทรีย์วัตถุน้อยหรือไม่ต้องการใช้กรดเข้มข้น

เทคนิคการวิเคราะห์แร่ธาตุด้วยสเปกโตรสโกปีที่ได้รับการยอมรับมีหลายวิธี เช่น atomic absorption spectrophotometry (AAS) ซึ่งอาศัยการดูดกลืนแสงของอะตอมโลหะในสถานะไอ โดยแบ่งเป็น flame ที่เหมาะกับตัวอย่างที่ปริมาณแร่ธาตุสูง และ graphite furnace ที่เหมาะสมกับตัวอย่างที่มีแร่ธาตุปริมาณต่ำ (Welz and Sperling, 1999) เทคนิค inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) เป็นเทคนิคที่ตรวจวัดมวลของไอออนโลหะในพลาสมา ให้ความไวสูง เหมาะกับตัวอย่างที่มีแร่ธาตุปริมาณต่ำ (Houk, 1986) เทคนิค inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) เป็นเทคนิคที่สามารถวิเคราะห์ธาตุหลายชนิดพร้อมกันได้ อย่างแม่นยำและรวดเร็ว (Boss & Fredeen, 2004) โดยอาศัยพลาสมาอาร์กอนที่มีอุณหภูมิสูงเพื่อกระตุ้นอะตอมให้เปล่งแสงเฉพาะตัว (Oral *et al.*, 2016)

ห้องปฏิบัติการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ซึ่งรับผิดชอบในการตรวจวิเคราะห์คุณภาพและความปลอดภัยในสินค้าปศุสัตว์ ตระหนักถึงความสำคัญที่ต้องเตรียมวิธีการทดสอบเพื่อรองรับการทดสอบตัวอย่างอาหารจิ้งหรีดตามกิจกรรมแผนเฝ้าระวังสารตกค้างประจำปี โดยปัจจุบันยังไม่พบว่ามีวิธีทดสอบสังกะสีและทองแดงในอาหารจิ้งหรีด จึงทำการพัฒนาวิธีการย่อยด้วยกรด

และการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสังกะสีและทองแดงด้วยเทคนิค ICP-OES โดยใช้แนวทางการทดสอบแคลเซียมในอาหารสัตว์ของ AOAC method 935.13 (AOAC International, 2023a) และการทดสอบสังกะสีและทองแดงในนมผงสำหรับทารกของ AOAC method 984.27 (AOAC International, 2023b) เมื่อได้วิธีที่เหมาะสมจากการพัฒนาแล้วจึงดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีโดยใช้พารามิเตอร์ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตามแนวทางของ Eurachem guide (Cantwell, 2025) เพื่อยืนยันความถูกต้องในพารามิเตอร์ได้แก่ ขีดจำกัดในการตรวจพบ (limit of detection, LOD) ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantification, LOQ) ความแม่นยำ (accuracy) ความเที่ยง (precision) ผลการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีสามารถนำไปใช้ในการทดสอบตัวอย่างอาหารจิ้งหรีดตามกิจกรรมแผนเผื่อระวังสารตกค้าง และสามารถเข้าร่วมกิจกรรมทดสอบความชำนาญ รายการสังกะสีและทองแดงได้ นอกจากนี้ยังใช้เป็นข้อมูลในการขอการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025 (International Organization for Standardization, 2017) ได้อีกด้วย ซึ่งเป็นการรองรับการส่งออกผลิตภัณฑ์จิ้งหรีดไปยังประเทศต่างๆ และสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบการพิจารณาจัดทำมาตรฐานอาหารจิ้งหรีดภายในประเทศได้

อุปกรณ์และวิธีการ

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 1.1 เครื่อง ICP-OES ยี่ห้อ PerkinElmer รุ่น Avio 550 max
- 1.2 เครื่องชั่งอิเล็กทรอนิกส์ ความละเอียด 0.0001 g
- 1.3 แท่นความร้อน (hot plate)

2. สารเคมีและสารมาตรฐาน

2.1 สารเคมี

2.1.1 กรดไนตริก (analytical grade) ความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 69%

2.1.2 กรดไนตริก 2% (v/v)

เติมน้ำจัดไอออนประมาณ 300 ml ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 500 ml ตวงกรดไนตริก 10 ml ผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำจัดไอออนและเขย่าให้เข้ากัน

2.1.3 กรดเปอร์คลอริก (analytical grade) ความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 70%

2.1.4 น้ำจัดไอออน ความต้านทานไม่น้อยกว่า 18 M Ω ·cm

2.2 สารมาตรฐานและการใช้วัสดุอ้างอิงรับรอง (certified reference material; CRM)

2.2.1 สารละลายมาตรฐาน (standard solution) ได้แก่ สังกะสี (Zn) ทองแดง (Cu) แคดเมียม (Cd) และแคลเซียม (Ca) ยี่ห้อ PerkinElmer แต่ละธาตุมีความเข้มข้น $1,000 \pm 50$ $\mu\text{g/ml}$ อ้างอิงข้อมูลจาก certificate of analysis

2.2.2 CRM ชนิด fish protein DORM-5 ผลิตโดย National Research Council ประเทศแคนาดา ประกอบด้วยทองแดง 3.30 ± 0.07 mg/kg สังกะสี 28.7 ± 1.0 mg/kg

2.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเจือจาง (intermediate standard solution) สังกะสีและทองแดง โดยเตรียมความเข้มข้นดังต่อไปนี้

2.3.1 ความเข้มข้น 100 mg/l โดยปิเปต standard solution สังกะสีและทองแดง ความเข้มข้น 1,000 µg/ml ภาตุละ 10 ml ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยกรดไนตริก 2%

2.3.2 ความเข้มข้น 10 mg/l โดยปิเปต intermediate standard solution สังกะสีและทองแดง ความเข้มข้น 100 mg/l ภาตุละ 10 ml ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วยกรดไนตริก 2%

2.3.3 ความเข้มข้น 1 mg/l โดยปิเปต intermediate standard solution สังกะสีและทองแดงความเข้มข้น 10 mg/l ภาตุละ 10 ml ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วยกรดไนตริก 2%

2.4 การเตรียมสารละลายสำหรับทำกราฟมาตรฐาน (standard calibration curve)

เตรียมสารละลายสังกะสีและทองแดง ที่ 5 ระดับความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1, 5, และ 10 mg/l โดยปิเปต intermediate standard solution ดังตารางที่ 1 และปรับปริมาตรด้วยกรดไนตริกความเข้มข้น 2%

ตารางที่ 1 การเตรียมสารละลายสำหรับทำ standard calibration curve ของสังกะสีและทองแดง

intermediate standard solution (mg/l)	ปิเปตปริมาตร (ml)	ปริมาตรที่ เตรียมได้ (ml)	ความเข้มข้นที่ เตรียมได้ (mg/l)
1	10	100	0.1
10	5	100	0.5
10	10	100	1
100	5	100	5
100	10	100	10

3. การเตรียมตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่างอาหารจิ้งหรีด มาใช้เป็น sample blank โดยนำตัวอย่างอาหารจิ้งหรีด มาบดละเอียดแบบคัดขนาดผ่าน sieve ขนาด 1 mm ให้เป็นเนื้อเดียวกันและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 ± 5 °C)

4. การพัฒนาวิธีทดสอบ

เปรียบเทียบการย่อยตัวอย่างอาหารจิ้งหรีดโดยใช้อัตราส่วนระหว่าง กรดไนตริก : กรดเปอร์คลอริกที่ 5 อัตราส่วน คือ 25:5, 25:10, 25:15, 25:20 และ 25:25 ml โดยทำการทดสอบ อัตราส่วนละ 10 ซ้ำ ตามขั้นตอนดังนี้

4.1 ชั่งตัวอย่างอาหารจิ้งหรีดปริมาณ 1.0000 ± 0.0002 g จำนวน 50 ตัวอย่าง ลงใน ปีกเกอร์ ขนาด 100 ml

4.2 เติม standard solution สังกะสีและทองแดงความเข้มข้น 10 mg/l ปริมาตร 1 ml

4.3 เติมกรดไนตริก ปริมาตร 25 ml ปิดด้วยกระจกนาฬิกา และย่อยตัวอย่างบนแท่น ความร้อน โดยใช้อุณหภูมิ 150–180 °C ให้อัตราการเดือดเล็กน้อยและมีความสม่ำเสมอ จนกระทั่ง คำนวณน้ำตาลจากหายไปหมด

4.4 เติมกรดเปอร์คลอริก ปริมาตร 5, 10, 15, 20 และ 25 ml (ปริมาตรละ 10 ชั่วโมง) ย่อยจนสารละลายใสและเกิดควันขาวที่บ

4.5 ตั้งสารละลายตัวอย่างทิ้งไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง

4.6 ถ่ายสารละลายตัวอย่างลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 ml และปรับปริมาตร ด้วยน้ำขจัดไอออน

4.7 กรองสารละลายตัวอย่างผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4

4.8 ทดสอบหาปริมาณสังกะสีและทองแดง ด้วยเครื่อง ICP-OES โดยสภาวะของเครื่อง ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สภาวะการทดสอบสังกะสีและทองแดง ด้วยเทคนิค ICP-OES

Parameters	Conditions	
Wavelength	Zn	206.200 nm
	Cu	327.393 nm
RF Power	1,500	watts
Flow Gas:		
- Plasma Gas Flow	10	L/min
- Auxiliary Gas Flow	0.2	L/min
- Nebulizer Gas Flow	0.7	L/min
Plasma View	Axial	
Pump Speed	1	mL/min
Read Parameters	Min 2	min
	Max 10	min

4.9 คำนวณ %recovery และพิจารณาความแม่นยำ (accuracy) จากค่าร้อยละ การกลับคืนเฉลี่ย (%mean recovery, %MR) เกณฑ์การยอมรับต้องอยู่ช่วง 80-110 % (AOAC International, 2023e)

$$\text{สมการ \%recovery} = \frac{\text{ความเข้มข้นของ spiked matrix sample} - \text{ความเข้มข้นของ sample blank} \times 100}{\text{ความเข้มข้นของ standard solution ที่เติมลงไป}}$$

5. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

5.1 ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (linearity of calibration curve)

5.1.1 ตรวจวัด standard solution สังกะสีและทองแดงที่ระดับความเข้มข้นตามตารางที่ 1 ด้วยเทคนิค ICP-OES สภาวะตามตารางที่ 2 ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

5.1.2 สร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง ความเข้มข้นของ standard solution กับ ค่าความเข้มของสัญญาณ (intensity) โดยเกณฑ์การยอมรับค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, r^2) ต้องไม่น้อยกว่า 0.995 (U.S. Food and Drug Administration, 2023)

5.2 ผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect)

การประเมิน matrix effect ของวิธีทดสอบสังกะสี และทองแดง ในอาหารจิ้งหรีดโดยเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่าง standard solution และ spiked matrix sample ตัวอย่างอาหารจิ้งหรีด ที่เติม standard solution สังกะสี และทองแดงให้มีความเข้มข้นในสารละลายที่ย่อยได้เท่ากับ standard solution คือ 0.1, 0.5, 1, 5 และ 10 mg/l เพื่อทดสอบว่ามีการรบกวนจากองค์ประกอบของเมทริกซ์หรือไม่ โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติแบบ paired t-test (two-tailed) พิจารณาว่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่าง standard solution และ spiked matrix sample ตามแนวทางของ AOAC (AOAC International, 2023c) ที่ระบุให้ตรวจสอบความแตกต่างของสัญญาณใน standard solution และใน matrix จริง เพื่อยืนยันว่าไม่มีการรบกวนที่มีนัยสำคัญต่อการวัดเชิงปริมาณ ดังสมการต่อไปนี้ (Montgomery and Runger, 2014)

$$\text{สมการ} \quad t = \frac{\bar{d}}{SD\sqrt{n}^{-1}}$$

เมื่อ $\bar{d}$ = ค่าเฉลี่ยของความแตกต่างระหว่าง standard solution และ spiked matrix sample
 SD = ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่าง
 n = จำนวนความเข้มข้น ($n=5$ ระดับ)

5.3 ทดสอบหาค่า LOD และค่า LOQ

5.3.1 ย่อยและทดสอบ sample blank ตามวิธีที่จากการพัฒนา จำนวน 10 ซ้ำ

5.3.2 หาค่าเฉลี่ย (mean) และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD , S_0) นำค่า S_0 ไปคำนวณหาค่า LOD และ LOQ ตามสมการของ Eurachem guide (Cantwell, 2025) ดังนี้

สมการ	$LOD = 3S_0'$
สมการ	$LOQ = 10S_0'$
โดยที่	$S_0' = S_0 \sqrt{n^{-1} + n_b^{-1}}$
เมื่อ	S_0' = ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณค่า LOD และ LOQ
	S_0 = ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นที่วัดได้
	n = จำนวนการทำซ้ำของตัวอย่างตามวิธีทดสอบ ($n=2$)
	n_b = จำนวนการทดสอบ blank ในงานทดสอบ ($n_b=1$)

5.3.3 การยืนยัน LOQ ของการทดสอบ

เตรียม spiked matrix sample โดยเติม standard solution สังกะสี และทองแดงที่ความเข้มข้นใกล้เคียงกับค่าที่คำนวณได้จากข้อ 5.3 ความเข้มข้นใกล้เคียงกับค่าที่คำนวณได้ลงใน sample blank จำนวน 10 ซ้ำ นำตัวอย่างไปย่อยตามวิธีที่ได้พัฒนาขึ้น และตรวจวัดด้วยเทคนิค ICP-OES คำนวณหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้น %recovery ค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ภายใต้สภาวะการทำซ้ำ (%RSD_r) และค่าร้อยละของค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ภายใต้สภาวะการทำซ้ำที่คาดการณ์ได้ (%PRSD_r) โดยพิจารณาความแม่นยำจากค่า%MR เกณฑ์การยอมรับต้องอยู่ช่วง 80-110 % (AOAC International, 2023e) และพิจารณาความเที่ยงแบบ repeatability จากค่า %RSD_r ต้องมีค่าน้อยกว่าค่า %PRSD_r

สมการ	$\%RSD_r = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$
เมื่อ	SD = ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของแต่ละความเข้มข้น
	$\bar{X}$ = เฉลี่ยของแต่ละความเข้มข้น
สมการ	$\%PRSD_r = 0.66 \times 2C^{-0.1505}$
เมื่อ	C = concentration ratio

5.4 การทดสอบความแม่นยำ

5.4.1 การ spiked matrix sample

5.4.1.1 ทดสอบ spiked matrix sample ที่มีความเข้มข้นของสังกะสีและทองแดงธาตุละ 5, 50, 100 และ 200 mg/kg ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

5.4.1.2 คำนวณหา %recovery ของแต่ละซ้ำ และ %MR ของแต่ละความเข้มข้น กำหนดเกณฑ์ยอมรับ %MR ของ spiked matrix sample ความเข้มข้น 5–50 mg/kg เท่ากับ 80–110 % และความเข้มข้น 100–200 mg/kg เท่ากับ 90–107 % (AOAC International, 2023e)

5.4.2 การใช้วัสดุอ้างอิงรับรอง (certified reference material, CRM)

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

5.4.2.2 ประเมินความถูกต้อง (trueness) โดยคำนวณค่า t_{cal} เปรียบเทียบกับค่า t_{crit} จากตาราง โดย $df = n-1$ และ $p = 0.05$ และมีการนำผลทดสอบมาคำนวณหา %recovery

5.4.2.3 การคำนวณ t_{cal} ตามสมการของ Gosset (1908) ดังสมการต่อไปนี้

สมการ	$t_{cal} = \frac{(\bar{X} - \mu)}{SD/\sqrt{n}}$
เมื่อ	$\bar{X}$ = ค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบ CRM
	μ = True value หรือ Certified value
	SD = ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	n = จำนวนซ้ำ ($n=10$)

5.5 การทดสอบความเที่ยง

5.5.1 ประเมิน repeatability โดยใช้ข้อมูลการ spiked matrix sample จากข้อ 5.4.1 คำนวณค่า %RSD_r ของแต่ละความเข้มข้นในชุดนั้นๆ ต้องมีค่าน้อยกว่า %PRSD_r ที่คำนวณจากสมการ Horwitz and Albert (2006)

5.5.2 ประเมินความเที่ยงแบบทำซ้ำได้ (within-laboratory reproducibility) โดยทดสอบ spiked matrix sample ที่ความเข้มข้น 4 ระดับคือ 5, 50, 100 และ 200 mg/kg ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ จำนวน 3 วัน คือ วันที่ 1 (ข้อมูลข้อ 5.5.1), 8 และ 15 ของการทดสอบ ($N=30$) คำนวณค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ภายใต้สภาวะการทำซ้ำ (%RSD_R) ของแต่ละชุดความเข้มข้นนั้นต้องมีค่าน้อยกว่า ค่าร้อยละของค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ภายใต้สภาวะการทวนซ้ำที่คาดการณ์ได้ (%PRSD_R) ที่คำนวณจากสมการของ Horwitz and Albert (2006) ดังสมการต่อไปนี้

สมการ	$\%RSD_R = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$
เมื่อ	SD = ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของแต่ละความเข้มข้น
	$\bar{X}$ = ค่าเฉลี่ยของแต่ละความเข้มข้น
สมการ	$\%PRSD_R = 2C^{-0.1505}$
เมื่อ	C = concentration ratio

6.การเข้าร่วมกิจกรรมทดสอบความชำนาญ (proficiency testing) ในตัวอย่างอาหารสัตว์

การเข้าร่วมกิจกรรมทดสอบความชำนาญ (proficiency testing) ในตัวอย่างอาหารสัตว์ PTF-FA02-2501 ของกรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

7.ตรวจหาปริมาณสังกะสีและทองแดงในอาหารจิ้งหรีด

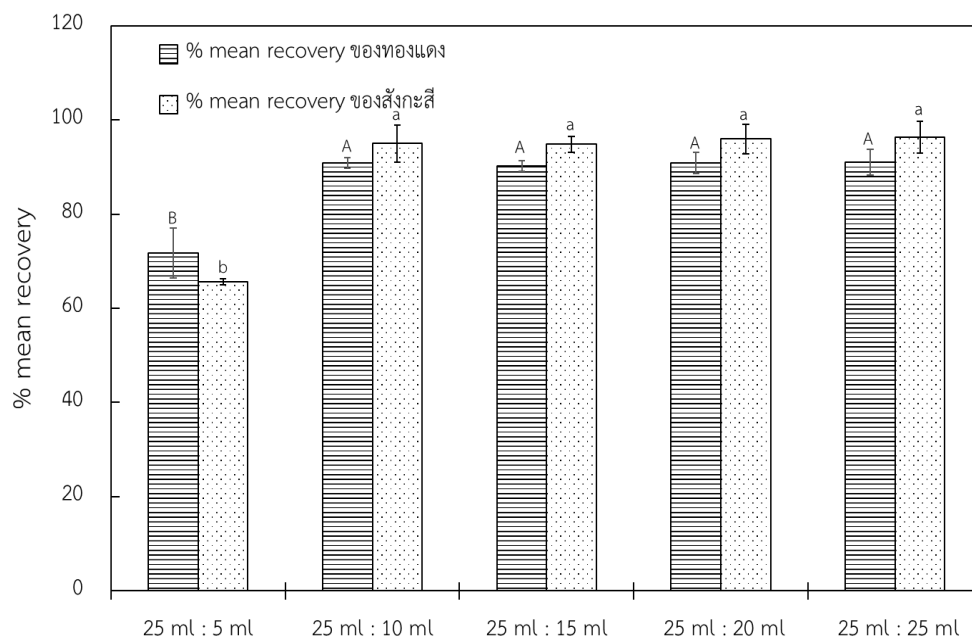
นำวิธีทดสอบที่พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีแล้ว มาทดสอบอาหารจิ้งหรีด ที่ส่งมาทดสอบในปีงบประมาณ 2568 จำนวน 20 ตัวอย่าง

ผลการทดลองและวิจารณ์

1.การพัฒนาวิธีทดสอบ

จากการศึกษาการหาอัตราส่วนกรดไนตริกและกรดเปอร์คลอริก ที่เหมาะสมในการย่อยตัวอย่างอาหารจิ้งหรีดที่มีสังกะสีและทองแดงธาตุละ 10 mg/kg อัตราส่วนละ 10 ซ้ำ พบว่าการเพิ่มปริมาณกรดเปอร์คลอริกส่งผลให้ค่า %MR ของสังกะสีและทองแดงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อพิจารณา ค่า %MR ของการย่อยตัวอย่างอาหารจิ้งหรีด พบว่า การย่อยในอัตราส่วน 25:5 ml ให้ค่า %MR ของสังกะสีและทองแดง เท่ากับ 65.60 และ 71.72 ซึ่งไม่ผ่านเกณฑ์การยอมรับ AOAC International (2023e) สำหรับการย่อยด้วยกรดไนตริกและกรดเปอร์คลอริกในอัตราส่วน 25:10, 25:15, 25:20 และ 25:25 ml ให้ค่า %MR ของสังกะสีเท่ากับ 94.97, 94.84, 95.96 และ 96.37 ตามลำดับ และ %MR ของทองแดงเท่ากับ 90.80, 90.25, 90.85 และ 90.99 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่ AOAC International (2023e) กำหนด เมื่อเปรียบเทียบทั้ง 5 อัตราส่วน โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ Duncan new multiple leng test (one-way anova) พบว่า ค่า %MR ของสังกะสีและทองแดง ที่ย่อยด้วยกรดไนตริกและกรดเปอร์คลอริกในอัตราส่วน 25:10, 25:15, 25:20 และ 25:25 ml ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 1

จากการศึกษาจะเห็นได้ว่าการย่อยโดยใช้กรดเปอร์คลอริกที่เพิ่มขึ้นช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยตัวอย่าง ส่งผลให้การย่อยตัวอย่างอาหารจิ้งหรีดเพื่อวิเคราะห์สังกะสีและทองแดงมีความสมบูรณ์ ทำให้การวิเคราะห์เกิดความถูกต้อง แต่อย่างไรก็ตามการใช้กรดเปอร์คลอริกต้องระมัดระวัง เนื่องจากเป็นกรดที่มีความเข้มข้นสูง มีปฏิกิริยารุนแรง และสามารถระเบิดได้เมื่อสัมผัสกับสารอินทรีย์หรือความร้อนสูง ส่งผลให้เกิดอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงาน ดังนั้น กรดไนตริกและกรดเปอร์คลอริกในอัตราส่วน 25:10 ml มีความเหมาะสมในการย่อยตัวอย่างอาหารจิ้งหรีดในการทดสอบหาปริมาณสังกะสี และทองแดง เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับการศึกษาของ AOAC International (2023e) ที่ทำการทดสอบแคลเซียมในอาหารสัตว์ ที่ย่อยตัวอย่างด้วยกรดไนตริกและกรดเปอร์คลอริกในอัตราส่วน 2:1 และวิเคราะห์ด้วยวิธี complexometric titration ใช้ปริมาณกรดเปอร์คลอริกสูงกว่าวิธีที่พัฒนาการย่อยด้วยกรด และวิเคราะห์ด้วยวิธี ICP-OES ในการศึกษาครั้งนี้จึงนำอัตราส่วน 25:10 ml มาใช้ย่อยตัวอย่างในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบต่อไป



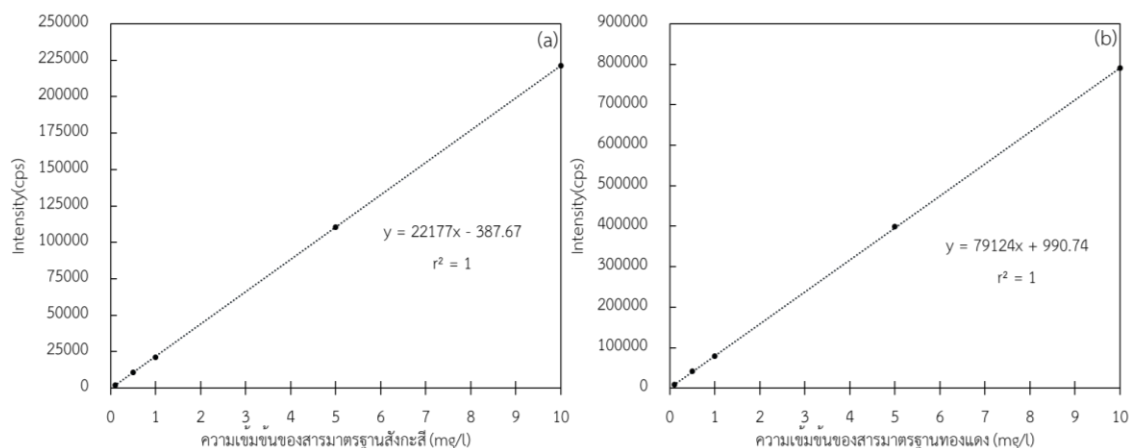
อัตราส่วนระหว่าง กรดไนตริก : กรดเปอร์คลอริก
 หมายถึง A, B, a และ b เป็นสัญลักษณ์แสดงการเปรียบเทียบข้อมูลทางสถิติ
 สัญลักษณ์ต่างกันแสดงว่าผลการทดสอบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

รูปที่ 1 กราฟเปรียบเทียบ %MR ของการย่อยตัวอย่างอาหารจิ้งหรีด
 โดยใช้อัตราส่วนกรดไนตริกและกรดเปอร์คลอริกที่แตกต่างกัน

2. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

2.1 ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

การทดสอบความเป็นเส้นตรงของสังกะสี และทองแดง ความเข้มข้น 0.01–1 mg/l จะใช้ standard solution สังกะสีและทองแดงที่ 5 ระดับ คือ 0.1, 0.5, 1, 5 และ 10 mg/l นำผลการทดสอบมาหาค่าเฉลี่ยและสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า intensity และค่าความเข้มข้นของ standard solution และคำนวณค่า r^2 ผลการคำนวณค่า r^2 พบว่ามีค่าเท่ากับ 1.000 ดังรูปที่ 2(a) และ 2(b) ซึ่งสูงกว่าเกณฑ์ที่กำหนดไว้ (>0.995) แสดงให้เห็นว่าความสัมพันธ์ระหว่างค่า intensity และความเข้มข้นของ standard solution สังกะสีและทองแดงมีความเป็นเส้นตรง สามารถใช้ในการตรวจวัดสังกะสีและทองแดงในช่วงความเข้มข้น 0.01–1 mg/l ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาลักษณะกราฟมาตรฐาน พบว่าในช่วง ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบคือ 10 mg/l ไม่ปรากฏลักษณะของความอิ่มตัวของสัญญาณ (signal saturation) หรือการเบี่ยงเบนออกจากเส้นตรง ซึ่งบ่งชี้ว่าการทดสอบสังกะสีและทองแดง ในช่วงดังกล่าวมีความเหมาะสม (Skooq *et al.*, 2018) อีกทั้งการที่กราฟยังคงเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นสูง แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของระบบการวัดและการตั้งค่าพารามิเตอร์ของเครื่องมือที่สามารถคงความเชิงเส้นได้ดี ทำให้มั่นใจได้ว่าผลการวิเคราะห์มีความถูกต้องและเชื่อถือได้ในช่วงการใช้งานที่กำหนด (Miller and Miller, 2010)



รูปที่ 2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง intensity (cps) และค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน

(a) สังกะสี ที่ความเข้มข้น 0.1 - 10 mg/l และ (b) ทองแดง ที่ความเข้มข้น 0.1-10 mg/l

2.2 ผลการพิสูจน์ matrix effect

จากการเปรียบเทียบปริมาณทองแดงและสังกะสีระหว่าง standard solution และ spiked matrix sample ตัวอย่างอาหารจิ้งหรีด เพื่อประเมิน matrix effect โดยใช้การทดสอบทางสถิติแบบคู่ (Paired t-test) พบว่าค่า t_{cal} ที่คำนวณได้มีค่า -0.27 และ -0.05 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ซึ่งมีความน้อยกว่าค่า t_{crit} ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ค่า $t_{crit}(t_{crit}=2.78$ ที่ $df = 4)$ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบในตัวอย่างอาหารจิ้งหรีด เช่น โปรตีน ไขมัน และสารอินทรีย์อื่นๆ ไม่ได้รับกวนการเกิดสัญญาณแสงของอะตอมทองแดง และสังกะสีในกระบวนการกระตุ้นของพลาสมา (plasma excitation) ซึ่งโดยทั่วไปเมทริกซ์ที่มีสารอินทรีย์สูงอาจทำให้เกิดการดูดกลืนพลังงานหรือเปลี่ยนแปลงสภาพของอะตอมในพลาสมา ส่งผลให้ค่าการวัดเบี่ยงเบนได้ (Mermet, 2005; Boss and Fredeen, 2004) อีกทั้งการไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและการย่อยที่ใช้มีประสิทธิภาพ ทำให้สัญญาณการวัดแปรผันตรงกับค่าความเข้มข้นของธาตุจริง ซึ่งมีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Sleimi *et al.* (2022) ที่พบว่าการวิเคราะห์โลหะหนักในตัวอย่างชีวภาพโดยใช้เทคนิค ICP-OES ภายใต้เงื่อนไขการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสม เช่น การใช้กรดแก่ย่อยและการควบคุมอุณหภูมิ สามารถลดผลกระทบจากเมทริกซ์ได้อย่างมีนัยสำคัญและให้ผลการวัดที่มีความเที่ยงตรงสูง ดังนั้นการทดสอบหาปริมาณสังกะสีและทองแดงในอาหารจิ้งหรีด ด้วยเทคนิค ICP-OES จึงสามารถใช้ standard solution ทองแดง สังกะสี ในการทำกราฟมาตรฐานได้

2.3 ค่า LOD และค่า LOQ

จากการทดสอบ sample blank จำนวน 10 ซ้ำ และนำผลที่ได้มาคำนวณหาค่า LOD สำหรับสังกะสีและทองแดง ได้ค่า LOD เท่ากับ 1.33 และ 1.01 mg/kg และค่า LOQ สำหรับสังกะสี และทองแดง ได้ค่า LOQ เท่ากับ 3.38 และ 4.43 mg/kg จึงทำการทดสอบ spiked matrix sample ที่มีความเข้มข้นของสังกะสีและทองแดง 5 mg/kg ซึ่งเป็นค่าใกล้เคียงกับค่าที่คำนวณได้ จำนวน 10 ซ้ำ เพื่อยืนยันค่า LOQ แล้วคำนวณหาค่า %recovery ของสังกะสีและทองแดงได้ เท่ากับ 96.25% และ 100.60% และค่า %RSD,

เท่ากับ 3.45% และ 4.12% ค่า %PRSD_r เท่ากับ 8.29% และ 8.29% เมื่อทำการพิจารณาเปรียบเทียบกับเกณฑ์มาตรฐาน พบว่า ค่า %recovery อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ 80-110% ค่า %RSD_r น้อยกว่าค่า %PRSD_r จึงสรุปได้ว่าค่า LOQ ที่ 5.00 mg/kg มีความแม่นยำและความเที่ยง

2.4 ค่าความแม่นยำ

2.4.1 จากการทดสอบ spiked matrix sample ที่มีความเข้มข้นของสังกะสีและทองแดง 4 ระดับคือ 5, 50, 100 และ 200 mg/kg ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ มีค่าเท่ากับ 98.46, 89.08, 96.46 และ 96.37% ตามลำดับความเข้มข้น และค่า %MR ของทองแดง มีค่าเท่ากับ 95.50, 98.80, 100.47 และ 98.06% ตามลำดับความเข้มข้น ผลการทดสอบทุกความเข้มข้นอยู่ในเกณฑ์การยอมรับของ AOAC International (2023e) แสดงว่าวิธีทดสอบนี้มีความแม่นยำเป็นที่ยอมรับได้ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การทดสอบความแม่นยำของสังกะสีและทองแดงในตัวอย่าง spiked matrix sample

Element	Zn				Cu			
Spiked matrix sample (mg/kg)	5	50	100	200	5	50	100	200
Mean conc (mg/kg)	4.92	44.54	96.46	192.75	4.78	49.40	100.47	196.12
%MR	98.46	89.08	96.46	96.37	95.50	98.80	100.47	98.06
เกณฑ์การยอมรับ %MR	80-110	80-110	90-107	90-107	80-110	80-110	90-107	90-107
SD	0.230	0.547	1.321	2.512	0.208	1.664	1.029	1.564
RSD _r (%)	4.67	1.23	1.37	1.39	4.35	3.37	1.02	0.80
PRSD _r (%)	8.29	5.86	5.28	4.76	8.29	5.86	5.28	4.76

2.4.2 การทดสอบ CRM DORM-5 ชนิดตัวอย่าง fish protein จำนวน 10 ซ้ำ พบว่า t_{cal} มีค่าเท่ากับ -2.253 สำหรับสังกะสี และ 1.400 สำหรับทองแดง t_{crit} มีค่าเท่ากับ 2.26 สำหรับสังกะสีและทองแดง เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบพบว่าค่า $t_{cal} < t_{crit}$ แสดงว่าวิธีทดสอบมีความถูกต้อง (trueness) เมื่อพิจารณาค่า %MR ของสังกะสี และทองแดง มีค่าเท่ากับ 98.27 และ 100.33% แสดงว่าวิธีทดสอบมีความแม่นยำตามเกณฑ์การยอมรับของ AOAC International (2023e) ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การทดสอบ CRM DORM-5 ชนิดตัวอย่าง fish protein

Element	Zn	Cu
Mean conc ($\bar{x}$) (mg/kg)	104.98	33.10
Standard Deviation (S) (mg/kg)	0.4492	0.246
True value or Certified value (μ) (mg/kg)	105.30	32.99
t_{cal}	-2.253	1.400
t_{crit}	2.26	2.26
%MR	98.27	100.33
	(เกณฑ์การยอมรับ 90 - 107)	(เกณฑ์การยอมรับ 80 - 110)

2.5 ค่าความเที่ยง

2.5.1 การประเมินความเที่ยงแบบทวนซ้ำได้ โดย spiked matrix sample ที่มีความเข้มข้นของสังกะสีและทองแดง ทั้งหมด 4 ระดับคือ 5, 50, 100 และ 200 mg/kg พบว่าค่า %RSD_r เท่ากับ 3.45% และ 4.12% ค่า %PRSD_r เท่ากับ 8.29% และ 8.29% เมื่อทำการพิจารณาเปรียบเทียบจะเห็นว่าทุกระดับความเข้มข้นมีค่า %RSD_r น้อยกว่าค่าร้อยละของค่า %PRSD_r ซึ่งอยู่เกณฑ์การยอมรับ แสดงว่าวิธีทดสอบนี้มีความเที่ยงแบบทวนซ้ำได้เป็นที่ยอมรับได้

2.5.2 การประเมินความเที่ยงแบบทำซ้ำได้ โดย spiked matrix sample ที่มีความเข้มข้นของสังกะสีและทองแดง ทั้งหมด 4 ระดับคือ 5, 50, 100 และ 200 mg/kg จำนวน 3 ชุดการทดสอบ วันที่ 1, 8 และ 15 ของการทดสอบ และทำการคำนวณค่า %RSD_R และค่า %PRSD_R พบว่าทุกระดับความเข้มข้นมีค่า %RSD_R น้อยกว่าค่า %PRSD_R ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ แสดงว่าวิธีทดสอบมีความเที่ยงแบบทำซ้ำได้เป็นที่ยอมรับได้ และการทดสอบที่ต่างวันผลการทดสอบยังคงมีความเที่ยงเหมาะที่จะใช้เป็นวิธีทดสอบต่อไปดังแสดงในตารางที่ 5 และ 6

ตารางที่ 5 การประเมินหาความเที่ยงแบบทำซ้ำได้ของสังกะสี

Element		Zn											
Conc	5 mg/kg			50 mg/kg			100 mg/kg			200 mg/kg			
Day	1	8	15	1	8	15	1	8	15	1	8	15	
Mean	4.78	4.43	4.55	49.40	48.36	48.01	100.47	99.35	98.98	196.12	198.04	197.56	
conc													
(mg/kg)	4.58			48.59			99.60			197.24			
SD													
(mg/kg)	0.253			1.294			1.364			1.713			
RSD _R (%)	5.53			2.66			1.37			0.87			
PRSD _R (%)	12.56			8.88			8.00			7.21			

ตารางที่ 6 การประเมินหาความเที่ยงแบบทำซ้ำได้ของทองแดง

Element		Cu											
Conc	5 mg/kg			50 mg/kg			100 mg/kg			200 mg/kg			
Day	1	8	15	1	8	15	1	8	15	1	8	15	
Mean	4.92	4.46	4.53	44.54	47.54	47.61	96.46	94.42	94.56	192.75	188.88	189.68	
conc (mg/kg)	4.64			46.56			95.14			190.44			
SD (mg/kg)	0.306			1.985			1.386			2.621			
RSD _R (%)	6.59			4.26			1.46			1.38			
PRSD _R (%)	12.56			8.88			8.00			7.21			

3. การเข้าร่วมกิจกรรมทดสอบความชำนาญ ในตัวอย่างอาหารสัตว์

การเข้าร่วมกิจกรรมทดสอบความชำนาญ ในตัวอย่าง feeding stuffs PTF-FA02-2501 รายการทดสอบสังกะสี และทองแดง ผลทดสอบปริมาณสังกะสี และทองแดง มีค่าเท่ากับ 1,926 และ 367 mg/kg โดยผลเป็นที่น่าพอใจ ($|z| \leq 2$) ดังตารางที่ 7 ทั้งนี้เมื่อพิจารณาผู้เข้าร่วมกิจกรรมทดสอบความชำนาญจากหน่วยงานอื่น พบว่าวิธีการเตรียมตัวอย่างมีหลายวิธีเช่น wet digestion, dry ashing, microwave digestion และ ultra wave digestion เป็นต้น ในส่วนของการวิเคราะห์ มีการใช้เครื่องมือที่แตกต่างกันเช่น AAS (Flame), ICP-OES, ICP-MS และ microwave plasma atomic emission spectrometry (MP-AES) เป็นต้น ผลการทดสอบที่ใช้วิธีการย่อยและเครื่องมือที่แตกต่างกันให้ผลทดสอบสังกะสีและทองแดงอยู่ในเกณฑ์ที่น่าพอใจ จำนวน 30 และ 31 ห้องปฏิบัติการ ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 85 และ 83.8 ของผู้เข้าร่วมในแต่ละรายการทดสอบ ทั้งนี้ผู้จัดกิจกรรมทดสอบความชำนาญได้ให้ข้อเสนอแนะกับห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วม ว่าการเตรียมตัวอย่างควรมีความเหมาะสมกับแต่ละธาตุโดยคำนึงถึงการสูญหายของสารและการปนเปื้อน กล่าวคือ วิธีการ wet digestion เกิดการสูญหายของสารที่ระเหยน้อยกว่า วิธี dry ashing แต่ใช้เวลานานและมีโอกาสปนเปื้อนมากกว่าวิธี microwave digestion และกระบวนการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค wet digestion และ microwave digestion ควรเลือกชนิดและปริมาณของกรดหรือสารออกซิไดซ์ ให้มีความเหมาะสมกับตัวอย่างเพื่อให้กระบวนการย่อยเกิดอย่างสมบูรณ์ โดยควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสมกับชนิดของกรดอีกด้วย (ศูนย์ทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์บริการ, 2568)

ตารางที่ 7 การเข้าร่วมกิจกรรมทดสอบความชำนาญรายการสังกะสีและทองแดง

รายการ	ค่า laboratory result mg/kg	ค่า assigned value mg/kg	z-score	จำนวน ห้องปฏิบัติการ ที่เข้าร่วม	จำนวนห้องปฏิบัติการ ที่ผลทดสอบ $ z < 2$
สังกะสี	1,926	1,857	0.37	35	30
ทองแดง	367	349	0.51	37	31

4. ตรวจหาปริมาณสังกะสีและทองแดงในอาหารจิ้งหรีด

การตรวจหาปริมาณสังกะสีและทองแดงในอาหารจิ้งหรีด ด้วยเทคนิค ICP-OES โดยใช้วิธีทดสอบที่ได้พิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีแล้ว จำนวน 20 ตัวอย่าง พบว่าปริมาณสังกะสี ในอาหารจิ้งหรีด อยู่ในช่วง 32.88–128.81 mg/kg และปริมาณทองแดง ในอาหารจิ้งหรีด อยู่ในช่วง 6.99–69.98 mg/kg

สรุปผลการทดลอง

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบนี้ แสดงให้เห็นว่าวิธีทดสอบนี้เหมาะสมสำหรับการทดสอบสังกะสีและทองแดงในอาหารจิ้งหรีด ด้วยเทคนิค ICP-OES ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้น

ได้ดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบอ้างอิงตามวิธีของ Eurachem guide (Cantwell, 2025) เป็นวิธีที่มีความจำเพาะ มีช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน มีความเที่ยงและความแม่นยำในเกณฑ์ยอมรับของ AOAC International (2023e) โดยมีค่า LOD ของสังกะสีและทองแดง เท่ากับ 1.33 และ 1.01 mg/kg และ LOQ ของสังกะสีและทองแดง เท่ากับ 5.00 mg/kg สามารถนำไปใช้เป็นวิธีทดสอบตัวอย่างอาหารจิ้งหรีด เพื่อใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการส่งออกจิ้งหรีดเป็นฐานข้อมูลการกำหนดทิศทางการนโยบายต่อไป และสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลประกอบการขอรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการตามระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025

ข้อเสนอแนะ

นอกจากการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสังกะสีและทองแดงในอาหารจิ้งหรีดโดยใช้เทคนิค ICP-OES แล้ว ควรดำเนินการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด (measurement uncertainty) ของวิธีทดสอบดังกล่าว เพื่อใช้เป็นตัวชี้วัดความเชื่อมั่นของผลการทดสอบ และสะท้อนถึงผลกระทบจากปัจจัยต่างๆ ที่อาจก่อให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการวัดความไม่แน่นอนของการวัดอาจเกิดจากหลายแหล่ง เช่น การเตรียมตัวอย่าง การเตรียมสารมาตรฐาน การสอบเทียบเครื่องมือ การอ่านค่าผลวิเคราะห์ และการทำซ้ำภายใต้สภาวะเดียวกัน ซึ่งจะสะสมเพิ่มขึ้นตามลำดับขั้นของกระบวนการวัด การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัดจึงได้ดำเนินการตามหลักเกณฑ์ของ Eurachem guide (Cantwell, 2025) เพื่อให้มั่นใจว่าผลการทดสอบมีความถูกต้อง และเชื่อถือได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์อุดม เจือจันทร์ ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงาน นางสาววิภาดา สิริสมภพชัย ผู้เชี่ยวชาญด้านการวิเคราะห์คุณภาพสินค้าปศุสัตว์ นางสาวสุนีย์ คณาพิพัฒน์ หัวหน้ากลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ นางสาวประภาพร วรรณเขียว และบุคลากรกลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ ที่ช่วยให้การศึกษาครั้งนี้สำเร็จได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่องกำหนดวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ ปริมาณการใช้ และเงื่อนไขในการห้ามผลิต นำเข้า หรือขาย อาหารสัตว์ พ.ศ. 2559. 26 ธันวาคม 2559.
ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 133 ตอนพิเศษ 306 ง หน้า 18-26

- ศูนย์ทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์บริการ. 2568. ข้อคิดเห็นทางเทคนิค. รายงานผลการทดสอบความชำนาญกิจกรรมทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการของกรมวิทยาศาสตร์บริการ สาขาอาหารรายการ Minerals (Ca, Cu, Fe, Mn, K, Na, Zn and P) in Feeding stuffs PTFF-FA02-2501. หน้า 9/86-10/86.
- สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2559. เกษตรฯดันจิ้งหรีดขึ้นแท่นแมลงเศรษฐกิจ. แหล่งที่มา.http://www.acfs.go.th/read_news.php?id=14191&ntype=13. [3 ธันวาคม พ.ศ. 2567]
- AOAC International. 2023a. AOAC Official method 935.13: Calcium in animal feed (wet ash method). *AOAC Official Methods of Analysis*. 22nd ed. Oxford University Press. New York.
- AOAC International. 2023b. AOAC Official Method 984.27 Calcium, Copper, Iron, Magnesium, Manganese, Phosphorus, Potassium, Sodium, and Zinc in Infant formula inductively coupled plasma emission spectroscopic method. *AOAC Official Methods of Analysis*. 22nd ed. Oxford University Press. New York.
- AOAC International. 2023c. Appendix D: Guidelines for standard method performance requirement. *AOAC Official Methods of Analysis*. 22nd ed. Oxford University Press. New York.
- AOAC International. 2023d. Appendix E: Laboratory quality assurance. *AOAC Official Methods of Analysis*. 22nd ed. Oxford University Press. New York.
- AOAC International. 2023e. Appendix F: Guidelines for standard method performance requirement. *AOAC Official Methods of Analysis*. 22nd ed. Oxford University Press. New York.
- Badran, M., Morsy, R., and Soliman, H. 2018. Assessment of wet acid digestion methods for ICP-MS determination of trace elements in biological samples by using multivariate statistical analysis. *Journal of Elementology*. 23(1):179–189.
- Boss, C. B., and Fredeen, K. J. 2004. *Concepts, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry* (3rd ed.). PerkinElmer.
- 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.

- European Commission. 2015. *Commission Regulation (EU) 2015/2283 of the European Parliament and of the council*. Official Journal of the European Union. L327/1-L327/22.
- European Commission. 2016. *Commission Regulation (EC) 2016/1095 concerning the authorization of Zinc acetate dihydrate, Zinc chloride anhydrous, Zinc oxide, Zinc sulphate heptahydrate, Zinc sulphate monohydrate, Zinc chelate of amino acids hydrate, Zinc chelate of protein hydrolysates, Zinc chelate of glycine hydrate (solid) and Zinc chelate of glycine hydrate (liquid) as feed additives for all animal species*. Official Journal of the European Union. L182/11-L182/27.
- European Commission. 2018. *Commission Regulation (EC) 2018/1039 concerning the authorisation of Copper(II) diacetate monohydrate, Copper(II) carbonate dihydroxy monohydrate, Copper(II) chloride dihydrate, Copper(II) oxide, Copper(II) sulphate pentahydrate, Copper(II) chelate of amino acids hydrate, Copper(II) chelate of protein hydrolysates, Copper(II) chelate of glycine hydrate (solid) and Copper(II) chelate of glycine hydrate (liquid) as feed additives for all animal species*. official journal of the european union. Commun. L186 23/07/2018. 3-22.
- Fatemi, H., Zaghdoud, C., Nortes, P. A., Carvajal, M. and Martínez-Ballesta, M. d. C. 2020. Differential aquaporin response to distinct effects of two Zn concentrations after foliar application in Pak Choi (*Brassica rapa* L.). *Plants Agronomy*. 10(3): 450-468. <https://doi.org/10.3390/agronomy10030450>
- Gaetke, L. M., Chow, C. K., and Copper, T. 2014. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*. 189(1–2):147–163. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2003.08.009>
- Gosset, W. S. 1908. The probable error of a mean. *Biometrika*. 6(1):1–25.
- Halloran, A., Flore, R., Vantomme, P., and Roos, N. 2018. *Edible insects in sustainable food systems*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-74011-9>
- Horwitz, W., and Albert, R. 2006. The Horwitz ratio (HorRat): A useful index of method performance with respect to precision. *Journal of AOAC International*. 89(4):1095–1109.
- Houk, R. S. 1986. Inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 58(1):97A–105A. <https://doi.org/10.1021/ac00294a718>
- Hseu, Z. Y. 2004. Evaluating heavy metal contents in nine composts using four digestion methods. *Bioresource Technology*, 95(1):53–59. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.02.008>

- International Organization for Standardization. 2017. *ISO/IEC 17025:2017 – General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*. Geneva. Switzerland
- Krongdang, S., Phokasem, P., Venkatachalam, K., and Charoenphun, N. 2023. Edible Insects in Thailand: An Overview of Status, Properties, Processing, and Utilization in the Food Industry. *Foods*. 12 (11):1-24. <https://doi.org/10.3390/foods12112162>
- Kwon, S.Y., Kim, Y.I., Kim, Y.K., Lee, Y.B., and Mok, J. H. 2024. Microwave-assisted sample preparation for screening of heavy metal elements in food additives by ICP-MS. *Food Science and Technology*. 208; 116708. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116708>
- Labidi, A., Salaberria, A. M., Fernandes, S. C. M., Labidi, J. and Abderrabba, M. 2016. Adsorption of copper on chitin-based materials: Kinetic and thermodynamic studies. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 65:140-148. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2016.04.030>
- McFarlane, J. E. 1976. Influence of dietary copper and zinc on growth and reproduction of the house cricket (Orthoptera: Gryllide). *The Canadian Entomologist*. 108(4): 387–390. <https://doi.org/10.4039/Ent108387-4>
- Mermet, J. M. 2005. Is it still possible, necessary and beneficial to perform internal standardization in ICP-AES. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 20(2): 94–99.
- Miller, J. N. and Miller, J. C. 2010. *Statistics and chemometrics for analytical chemistry* (6th ed.). Pearson Education Limited.
- Mohammadi, P. and Khoshgoftarmanesh, A. H. 2014. The effectiveness of synthetic zinc (Zn)-amino chelates in supplying Zn and alleviating salt-induced damages on hydroponically grown lettuce. *Scientia Horticulture*. 172:117-123. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.03.047>
- Montgomery, D. C., and Runger, G. C. 2014. *Applied statistics and probability for engineers* (6th ed.). Hoboken, NJ: Wiley.
- Oliveira, T.S., Barros, V.P., Souza, R.M. 2018. Comparison of dry and wet digestion methods for elemental analysis of food samples. *Food Chemistry*. 240; 354–360. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.118>

- Oral, E., Ziyadanogullari, B., Aydin, F., Dinç, E., and Ziyadanogullari, R. 2016. ICP-OES Method for the Determination of Fe, Co, Mn, Cu, Pb, and Zn in Ore Samples from the Keban Region Using Experimental Design and Optimization Methodology. *Atomic Spectroscopy -Norwalk Connecticut*. 3:142-149.
<https://doi.org/10.46770/AS.2016.04.003>.
- Palma, M. N. N., Rocha, G. C., Valadares, R. F. D., and Detmann, E. 2015. Evaluation of acid digestion procedures to estimate mineral contents in materials from animal trials. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 28(11):1624–1631.
<https://doi.org/10.5713/ajas.15.0148>
- Prasad, A. S. 2014. Zinc is an antioxidant and anti-inflammatory agent: Role of zinc in degenerative disorders of aging. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 28(4):364–371.
- Plum, L. M., Rink, L., and Haase, H. 2010. The essential toxin: Impact of zinc on human health. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 7(4): 1342–1365. <https://doi.org/10.3390/ijerph7041342>
- Ricard, B., Francesc, G., Antoni, P., Elionor, P., and Rafael, C. 2004. Validation of mineralization procedures for the determination of selenium, zinc, iron and copper in chicken meat and feed samples by ICP-AES and ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 19(10): 1361-1369. <https://doi.org/10.1039/B404558K>
- Rumpold, B. A., and Schlüter, O. K. 2013. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57(5):802–823.
<https://doi.org/10.1002/mnfr.201200735>
- Sastre, J., Sahuquillo, A., Vidal, M., and Rauret, G. 2002. Determination of Cd, Cu, Pb and Zn in environmental samples: microwave-assisted total digestion versus aqua regia and nitric acid extraction. *Analytica Chimica Acta*. 462(1):59-72.
[https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00307-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00307-0)
- Sleimi, N., Chérif, J., Ben Youssef, N., Abbes, Z., Khedher, S., and Abdelly, C. 2022. Heavy metal accumulation and oxidative stress in plants: Comparative study between species growing in contaminated soils. *Environmental Monitoring and Assessment*. 194; 406. <https://doi.org/10.1007/s10661-022-09982-4>

- Skoog, D. A., Holler, F. J., and Crouch, S. R. 2018. *Principles of instrumental analysis* (7th ed.). Boston, MA: Cengage Learning.
- Sleimi, N., Boumaiza, H., Kouki, S., and Masmoudi, W. 2022. Assessment of extraction methods of trace metallic elements (Zn, Cu, Fe, and Mn) in compost and digestate. *Sustainability*. 14(3):1428. <https://doi.org/10.3390/su14031428>
- Somer, G. 2006. The effect of acid digestion on the recoveries of trace elements. *Turkish Journal of Chemistry*. 30:249-259.
- Student. 1908. The probable error of a mean. *Biometrika*. 6(1):1–25. <https://doi.org/10.1093/biomet/6.1.1>
- Sudha Rani, K., Srinivas, B., Gouru Naidu, K. and Ramesh, K. V. 2018. Removal of copper by adsorption on treated laterite. *Materials Today Proceedings*. 5(1):463-469. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2017.11.106>
- Thompson, M., Ellison, S. L. R., and Wood, R. 2002. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure and Applied Chemistry*, 74(5):835–855.
- U.S. Food and Drug Administration. 2023. Methods, method verification and validation, laboratory manual, ORA laboratory procedure, volume II, ORA-LAB.5.4.5.
- Vardhan, K. H., Kumar, P. S. and Panda, R. C. 2019. A review on heavy metal pollution, toxicity and remedial measures: Current trends and future perspectives. *Journal of Molecular Liquids*. 290:111197. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111197>
- Welz, B., and Sperling, M. 1999. *Atomic absorption spectrometry* (3rd ed.). Weinheim: Wiley-VCH.
- World Health Organization, and Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2001. *Human vitamin and mineral requirements: Report of a joint FAO/WHO expert consultation*. Bangkok, Thailand: WHO.
- Zhang, F., Li, Y., Yang, M. and Li, W. 2012. Content of heavy metals in animal feeds and manures from farms of different scales in northeast China. *Int J Environ Res Public Health*. 9:2658-2668.