
การทวนสอบวิธีวิเคราะห์ปริมาณปรอททั้งหมด ในอาหารทะเลด้วยเครื่องวิเคราะห์ปรอท โดยเทคนิคการเผา

เชมิกา เหมโลหะ และนิรันดร์ แร่กาสินธุ์

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11 สุราษฎร์ธานี อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี 84100

บทคัดย่อ ปรอทสามารถวิเคราะห์ได้หลายวิธี การวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ปรอทเทคนิคการเผาเป็นอีกหนึ่งวิธีที่ได้รับความสนใจ การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทวนสอบวิธีวิเคราะห์ปริมาณปรอททั้งหมดในอาหารทะเลด้วยเครื่องวิเคราะห์ปรอทโดยเทคนิคการเผาตามวิธี U.S. EPA. 7473 (2007) ทำการศึกษาช่วงและความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้อย่างแม่นยำ ความแม่นยำ และความเที่ยงของการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเดียว ผลการศึกษาพบว่า วิธีดังกล่าวมีความเป็นเส้นตรงในช่วง 0.01 – 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจมากกว่า 0.99 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้เท่ากับ 0.001 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้อย่างแม่นยำมีค่า 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนเท่ากับ 96.71 การทดสอบความแม่นยำได้ใช้วัสดุอ้างอิงที่มีใบรับรองมาตรฐานพบว่า ค่าเฉลี่ยของการทดสอบมีค่าไม่แตกต่างจากค่าอ้างอิงอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ความเที่ยงของการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเดียวมีค่าอยู่ในช่วงการยอมรับ ดังนั้นวิธีนี้เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณปรอททั้งหมดในอาหารทะเลในช่วงความเข้มข้น 0.01 – 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และพบว่าวิธีนี้สะดวก รวดเร็ว ลดปริมาณการใช้สารเคมีทำให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงานและสิ่งแวดล้อม

บทนำ

ปรอทเป็นโลหะที่พบได้ทั่วไปตามธรรมชาติในชั้นเปลือกโลก มีลักษณะเป็นสีเงินวาว เป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง ปรอทเกิดจากการสลายตัวของสินแร่ที่มีปรอทเป็นองค์ประกอบ โดยอาจปะปนมากับก๊าซจากการระเบิดของภูเขาไฟ มนุษย์นำปรอทมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น การผลิตเทอร์โมมิเตอร์ การใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการทางเคมี ใช้เป็นส่วนผสมของยารักษาโรคและการอุดฟัน ใช้เป็นส่วนประกอบของสารกำจัดศัตรูพืชในอุตสาหกรรม การเกษตร เป็นต้น ปรอทที่มีอยู่ตามธรรมชาติจะอยู่ในรูปของสารประกอบอินทรีย์ และสารประกอบอนินทรีย์ โดยสารประกอบอินทรีย์ในรูปเมทิลเมอร์คิวรีจะมีความเป็นพิษต่อมนุษย์มากที่สุด มนุษย์มีโอกาสได้รับเมทิลเมอร์คิวรีจากการบริโภคปลา และหอยทะเล เนื่องจากในธรรมชาติของระบบนิเวศในทะเล แบคทีเรียสามารถเปลี่ยนปรอทให้อยู่ในรูปเมทิลเมอร์คิวรี และสัตว์ทะเลที่มีขนาดใหญ่มีแนวโน้มที่จะมีการสะสมปรอทในตัวเองเนื่องจากการบริโภคสัตว์เล็กผ่านห่วงโซ่อาหาร พิษของปรอทชนิดเฉียบพลันจะทำให้เกิดการระคายเคืองระบบทางเดินอาหาร พิษเรื้อรังจะส่งผลกระทบต่อระบบประสาทส่วนกลาง ส่งผลให้การเคลื่อนไหวผิดปกติ ไม่สามารถทรงตัวได้ ปรอททั้งหมดจะถูกดูดซึมผ่านกระเพาะและจะสะสมในตับและไต^(1, 2) การวิเคราะห์ปริมาณปรอทสามารถทำได้หลายวิธี เช่น อะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรโฟโตเมทรีเทคนิคโคลเวเปอร์ อะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรโฟโตเมทรีเทคนิคไฮโดรเจนเนอเรนซ์ และอินดักทีฟลีคอปเปิลพลาสมาแมสสเปกโตรโฟโตเมทรี เป็นต้น ซึ่งวิธีดังกล่าวต้องมีการเตรียมตัวอย่างให้อยู่ในรูปของสารละลาย⁽³⁾ และใช้สารเคมีในกระบวนการวิเคราะห์ ส่งผลให้เกิดการสูญเสียจากสารเคมี แต่พบว่ามีอีกหนึ่งวิธีวิเคราะห์ที่ไม่ต้องเตรียมตัวอย่าง ใช้สารเคมีในกระบวนการวิเคราะห์น้อย สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งตัวอย่างที่เป็นของเหลว ของแข็ง และกึ่งของเหลว ได้แก่ การวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ปรอทโดยเทคนิคการเผา ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานอ้างอิงตาม United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA.) method 7473 (2007)⁽⁴⁾ โดยมีหลักการ คือ การทำให้ตัวอย่างแห้งและเผาภายใต้บรรยากาศของออกซิเจน สารที่ได้จากการเผาทั้งหมดจะถูกส่งไปยัง catalyst ซึ่งทำหน้าที่ดักจับสารประกอบอินทรีย์ น้ำ และสารประกอบออกไซด์ รวมทั้งรีดิวซ์ปรอทให้อยู่ในรูป Hg^0 ปรอทที่ได้ทั้งหมดจะถูกดักจับไว้ที่ amalgamator เมื่อให้ความร้อนไอปรอทจะถูกปลดปล่อยออกมาแล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 253.7 นาโนเมตร ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11 สุราษฎร์ธานี มีภารกิจสำคัญในการวิจัย ประเมินความเสี่ยง และการพัฒนาศักยภาพห้องปฏิบัติการอ้างอิง เพื่อนำองค์ความรู้ไปใช้ในการเฝ้าระวังคุณภาพผลิตภัณฑ์ โดยศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11 สุราษฎร์ธานี มีพื้นที่รับผิดชอบดูแลจังหวัดภาคใต้ตอนบน ได้แก่ ชุมพร ระนอง สุราษฎร์ธานี และนครศรีธรรมราช ซึ่งจังหวัดดังกล่าวมีพื้นที่ส่วนใหญ่ติดชายฝั่งทะเล อาหารทะเลจึงเป็นสิ่งที่ได้รับความนิยมทั้งการบริโภค และซื้อฝาก ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 (พ.ศ. 2529) เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน กำหนดให้ในอาหารทะเลมีการปนเปื้อนปรอทได้ไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11 สุราษฎร์ธานี ในฐานะที่เป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิง ได้ดำเนินการคัดเลือกและทวนสอบวิธีวิเคราะห์ ให้มีความเหมาะสม และถูกต้องเป็นไปตามระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025 การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทวนสอบวิธีวิเคราะห์ปริมาณปรอททั้งหมดในอาหารทะเลด้วยเครื่องวิเคราะห์ปรอทโดยเทคนิคการเผา โดยทำการศึกษาช่วงและความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้อย่างแม่นยำ ความแม่นยำและความเที่ยงของการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเดียว^(5, 6, 7, 8, 9) เพื่อให้ผลการทดสอบมีความน่าเชื่อถือ และเป็น การพัฒนาศักยภาพห้องปฏิบัติการให้เป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปรอทได้อย่างมีความถูกต้อง สำหรับการตรวจสอบ เฝ้าระวังความปลอดภัยของอาหารทะเล ซึ่งนอกจากจะเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคแล้วหากมีข้อมูล สถานการณ์ความปลอดภัยของอาหารทะเล สามารถใช้ข้อมูลดังกล่าวร่วมกับหน่วยงานอื่นในการวางแผนการจัดการ หรือ เผยแพร่ข้อมูลเพื่อช่วยกระตุ้นส่งเสริมเศรษฐกิจในพื้นที่ด้วย

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือ

เครื่องบดป่นอาหาร (Moulinex), เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด 4 ตำแหน่ง และเครื่องวิเคราะห์ปรอท โดยเทคนิคการเผา Direct mercury analyzer ยี่ห้อ Milestones รุ่น DMA-80 wide range

สารมาตรฐาน และสารเคมี

สารละลายมาตรฐานปรอท ผลิตภัณฑ์ของ FLUKA ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร, วัสดุอ้างอิง DROM-4 (Fish protein certified reference material for trace metals) ซึ่งมีความเข้มข้นของปรอททั้งหมดที่ 0.410 ± 0.055 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วัสดุอ้างอิง 1556b (Oyster tissue) ซึ่งมีความเข้มข้นของปรอททั้งหมดที่ 0.0371 ± 0.0013 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และกรดไนตริกความเข้มข้นร้อยละ 60 AR Grade

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

1. สารละลายมาตรฐานปรอทความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมโดย ปิเปตสารละลายมาตรฐาน 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 1% (v/v) กรดไนตริก เป็น 100 มิลลิลิตร
2. สารละลายมาตรฐานปรอทความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมโดย ปิเปตสารละลายมาตรฐาน 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 1% (v/v) กรดไนตริก เป็น 100 มิลลิลิตร
3. สารละลายมาตรฐานปรอทความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมโดย ปิเปตสารละลายมาตรฐาน 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 1% (v/v) กรดไนตริก เป็น 100 มิลลิลิตร
4. สารละลายมาตรฐานปรอทความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมโดย ปิเปตสารละลายมาตรฐาน 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 1% (v/v) กรดไนตริก เป็น 100 มิลลิลิตร
5. สารละลายมาตรฐานปรอทความเข้มข้น 0.001 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมโดย ปิเปตสารละลายมาตรฐาน 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 1% (v/v) กรดไนตริก เป็น 100 มิลลิลิตร

ตัวอย่าง และการเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างอาหารทะเล ได้แก่ ปลา หอย กุ้ง ปู และหมีก เตรียมตัวอย่างสำหรับทดสอบโดยล้างทำความสะอาด ตัวอย่างสดด้วยน้ำ เลือกละเฉพาะส่วนเนื้อที่บริโภคได้ นำมาบดป่นให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องบดป่นอาหาร ทำการทดสอบปริมาณปรอทในตัวอย่างทั้งหมด เลือกตัวอย่างที่มีปริมาณปรอทน้อย (ต่ำกว่า 0.001 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) เป็น Sample blank สำหรับการศึกษาในครั้งนี้

การทำความสะอาดภาชนะบรรจุตัวอย่างทดสอบ

เตรียมภาชนะบรรจุตัวอย่าง (boat) วางในถาดของเครื่องวิเคราะห์ปรอทโดยเทคนิคการเผา เลือกสภาวะเครื่องสำหรับการทำความสะอาด (clean method) เพื่อให้เผาไล่ปรอทที่ตกค้างในภาชนะบรรจุตัวอย่าง Clean method

Heat & Purge

650 °C

180 Sec

การวิเคราะห์ปริมาณปรอท

ซึ่งตัวอย่างที่จะทำการวิเคราะห์ 0.1 ± 0.05 กรัม ลงในภาชนะบรรจุตัวอย่างที่ผ่านการทำความสะอาด แล้วนำไปวางในถาดของเครื่องวิเคราะห์ปรอทโดยเทคนิคการเผา เลือกสภาวะเครื่องสำหรับการทดสอบ (test method)

Test method

- Dry	200 °C	120 Sec
- Heat & Purge	650 °C	240 Sec

ความยาวคลื่น 253.7 นาโนเมตร

การทวนสอบวิธีวิเคราะห์ (Method verification)

1. ทดสอบช่วงของความเข้มข้นเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานปรอทที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมความเข้มข้นละ 6 ข้าง นำไปวิเคราะห์ปริมาณปรอททั้งหมดด้วยเครื่องวิเคราะห์ปรอท สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นที่เตรียม (แกน x) กับสัญญาณที่ได้จากเครื่องมือ (แกน y) คำนวณสมการเส้นตรง และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination: R^2)

2. ทดสอบค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (limit of detection, LOD) และค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้อย่างแม่นยำ (limit of quantitative, LOQ) จากกราฟมาตรฐาน โดยการพิจารณาจุดตัดกราฟมาตรฐานของ y-intercept คือค่าความเข้มข้นต่ำสุด คำนวณความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (^xLOD) และค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้อย่างแม่นยำ (^xLOQ) จากสูตร

$$^x\text{LOD} = 3 \left(\frac{S_{y/x}}{b} \right)$$

$$^x\text{LOQ} = 10 \left(\frac{S_{y/x}}{b} \right)$$

เมื่อ $S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$

โดย y_i คือ ค่าสัญญาณที่อ่านจากเครื่องมือ

$\hat{y}_i$ คือ ค่าสัญญาณที่ควรเป็น คำนวณได้จากสมการ regression
ค่า y บน regression line ที่ค่า x ระดับต่างๆ

$y_i - \hat{y}_i$ คือ y-residual

$n - 2$ คือ degree of freedom ของ linear regression line

b คือ slope

ยืนยันความแม่นยำ และความเที่ยงที่ LOQ โดยการเติมสารมาตรฐานปรอทที่ระดับความเข้มข้นที่ได้จากการคำนวณลงใน sample blank (เตรียมจำนวน 10 ข้าง) นำไปวิเคราะห์ปริมาณปรอท คำนวณค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืน (% recovery) และร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

$$\text{Recovery (\%)} = \frac{(C_1 - C_2)}{C_3} \times 100$$

C_1 คือ ความเข้มข้นของ Sample blank ที่เติมสารละลายมาตรฐานปรอท

C_2 คือ ความเข้มข้นของ Sample blank

C_3 คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานปรอทที่เติมใน Sample blank

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

3. ทดสอบ Matrix effect โดยการวิเคราะห์ละลายสารมาตรฐาน ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และวิเคราะห์ Sample blank ที่เติมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นเดียวกัน โดยเตรียมความเข้มข้นละ 6 ข้ำเพื่อนำไปวิเคราะห์ (ซึ่ง Sample blank 6 ครั้งต่อการทดสอบที่ 1 ระดับความเข้มข้น) สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างสารมาตรฐาน (แกน x) กับความเข้มข้นของ Sample blank ที่เติมสารมาตรฐาน (แกน y) ทดสอบความเป็นเส้นตรงและทดสอบช่วงความเชื่อมั่น (confidence interval: CI) ของความชัน (slope) จากสมการ

$$\text{Confidence limits ของ slope (CI}_{\text{slope}}) = b \pm t_{(n-2)} S_b$$

$$\text{โดย } S_b \text{ คือ Standard deviation ของ slope } S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

4. ทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) โดย

4.1 ทดสอบ % recovery จากการวิเคราะห์ Sample blank ที่เติมสารละลายมาตรฐานที่เข้มข้น 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเตรียมความเข้มข้นละ 10 ข้ำเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณปรอททั้งหมด (ซึ่ง Sample blank 10 ครั้ง ต่อการทดสอบที่ 1 ระดับความเข้มข้น) คำนวณ % recovery

4.2 ทดสอบความถูกต้อง (trueness) จากการวิเคราะห์วัสดุอ้างอิง โดยซึ่งวัสดุอ้างอิงที่น้ำหนัก 0.1 ± 0.05 กรัม นำไปวิเคราะห์ปริมาณปรอททั้งหมด ทำการทดสอบจำนวน 10 ข้ำ (ซึ่งวัสดุอ้างอิง 10 ครั้ง) คำนวณค่า t จากสูตร

$$t = \frac{(\bar{X} - \mu)}{(S/\sqrt{n})}$$

$\bar{X}$ คือ ค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์

μ คือ ค่าจริง หรือค่าอ้างอิง

S คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของผลการวิเคราะห์

n คือ จำนวนครั้งที่วิเคราะห์

5. ความเที่ยง (Precision) โดย

5.1 ทดสอบความเที่ยงจากการวิเคราะห์ซ้ำ (Repeatability) จากการวิเคราะห์ Sample blank ที่เติมสารละลายมาตรฐานที่เข้มข้น 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเตรียมความเข้มข้นละ 10 ข้ำเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณปรอททั้งหมด (ซึ่ง Sample blank 10 ครั้งต่อการทดสอบที่ 1 ระดับความเข้มข้น) คำนวณ %RSD และ HORRAT

5.2 ทดสอบความเที่ยงจากการวิเคราะห์ภายในห้องปฏิบัติการเดียวโดยผู้วิเคราะห์คนเดียว เครื่องมือเดียว ต่างวัน (Within-laboratory reproducibility) จากการวิเคราะห์ Sample blank ที่เติมสารละลายมาตรฐานที่เข้มข้น 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเตรียมความเข้มข้นละ 6 ข้ำเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณปรอททั้งหมด (ซึ่ง Sample blank 6 ครั้งต่อการทดสอบที่ 1 ระดับความเข้มข้น) ทำซ้ำเหมือนเดิมแต่ต่างวันเป็นเวลา 5 วัน คำนวณ %RSD และ HORRAT

6. การประเมินผลการทวนสอบความถูกต้อง

6.1 ประเมิน matrix effect โดยทดสอบความเป็นเส้นตรงและทดสอบช่วงความเชื่อมั่น (confidential interval: CI) ของความชัน (slope) จากสมการ ถ้า CI_{slope} ผ่าน 1 แสดงว่าไม่มี matrix effect

6.2 ประเมิน %recovery ของการทดสอบความแม่นยำที่ระดับ LOQ และความแม่นยำจากการวิเคราะห์ตามเกณฑ์ AOAC กำหนด (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงค่าคาดหวังของค่าร้อยละการกลับคืนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (mg/kg)	Acceptable recovery (%)
0.01	70–125
1.0	75–120
10.0	80–115

6.3 ประเมินความถูกต้องจากการวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบค่า t ที่ได้จากการคำนวณ (t_{cal}) กับค่า t ทางสถิติจากตาราง ($t_{critical}$) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ถ้าค่าที่ได้จากการคำนวณ (t_{cal}) น้อยกว่าค่า t ทางสถิติจากตาราง ($t_{critical}$) แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างค่าจากการทดสอบ กับค่าจริงหรือค่าอ้างอิง

6.4 ประเมินผลความเที่ยงจากการคำนวณ %RSD เกณฑ์การยอมรับตาม Horwitz's equation (ตารางที่ 2)

Horwitz's equation สำหรับ repeatability, %RSDr $= 0.66 \times 2C^{-0.15}$

Horwitz's equation สำหรับ within-laboratory reproducibility, %RSDi $= 2C^{-0.15}$

เมื่อ C คือค่าความเข้มข้นที่ศึกษา (Concentration of analyst)

Concentration of analyst (mg/kg)	Expected %RSDr	Expected %RSDi
0.01	21.1	32.0
0.05	16.6	25.1
0.1	14.9	22.6
0.5	11.7	17.8
1.0	10.6	16.0

ตารางที่ 2 แสดงค่าคาดหวังความเที่ยงจากการคำนวณ %RSD ตาม Horwitz's equation

6.5 ประเมินความเที่ยงจากการคำนวณค่า HORRAT

$$\text{HORRAT} = \frac{\text{RSD}_{\text{obs}}}{\text{RSD}_{\text{expected}}}$$

RSD_{obs} คือ %RSD ที่ได้จากการทดสอบ

$\text{RSD}_{\text{expected}}$ คือ %RSD ที่ได้จาก Horwitz's equation

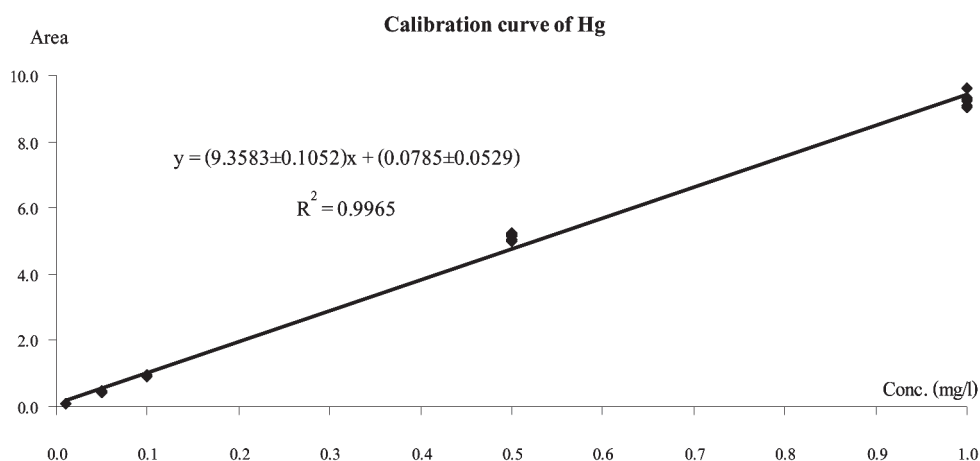
เกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ที่ AOAC กำหนดไว้ คือ <2

ผล

ช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์

จากการศึกษา พบว่าช่วงของการวิเคราะห์ มีค่า 0.01 ถึง 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อชั่งน้ำหนัก 0.1 กรัม โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจมากกว่า 0.99; $R^2 > 0.99$

ภาพที่ 1 แสดงกราฟมาตรฐานปรอททั้งหมดในช่วง 0.01 – 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร



ค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (limit of detection, LOD) และค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้อย่างแม่นยำ (limit of quantitative, LOQ)

ค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (LOD) มีค่า 0.001 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้อย่างแม่นยำ (LOQ) มีค่า 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมี %recovery เท่ากับ 96.71 และ %RSD เท่ากับ 3.85

Matrix effect

ผลการทดสอบ matrix effect พบว่า ค่า Confidence limits ของ slope (CI_{slope}) มีค่า 1.00 – 1.03

ความแม่นยำ (Accuracy)

พบว่ามีค่าเฉลี่ย % Recovery ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.10, 0.50 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เท่ากับ 96.71, 94.29, 90.25, 94.83 และ 98.53 ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนของการทดสอบความแม่นยำที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (mg/kg)	%Recovery $\pm$ SD
0.01	96.71 $\pm$ 3.73
0.05	94.29 $\pm$ 3.89
0.10	90.25 $\pm$ 2.42
0.50	94.83 $\pm$ 5.50
1.0	98.53 $\pm$ 2.12

ทดสอบความถูกต้อง (Trueness) จากการวิเคราะห์วัสดุอ้างอิงรับรองทั้ง 2 ตัวอย่าง ทำการทดสอบ 10 ซ้ำ พบว่า ค่า t_{cal} ที่ได้จากการคำนวณมีค่าน้อยกว่า t_{cal} ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 แสดงค่าเฉลี่ยและ t ที่ได้จากการทดสอบวัสดุอ้างอิง

Certificate reference material	Mean $\pm$ SD (mg/kg)	t_{cal}	$t_{critical}$
DORM-4	0.406 $\pm$ 0.019	0.67	1.83
1556b	0.0370 $\pm$ 0.0006	0.312	1.83

ความเที่ยง (Precision)

Repeatability พบว่า ค่า %RSD ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ซ้ำ มีค่า 4.09, 4.58, 1.21, 1.50 และ 3.23 ตามลำดับ และมีค่า HORRAT เท่ากับ 0.19, 0.28, 0.08, 0.13 และ 0.31 ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 แสดงค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์และค่า HORRAT ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของการทดสอบความเที่ยงจากการวิเคราะห์ซ้ำ ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

Concentration of analyst (mg/kg)	%RSD _r	HORRAT
0.01	4.09	0.19
0.05	4.58	0.28
0.1	1.21	0.08
0.5	1.50	0.13
1.0	3.23	0.31

Within-laboratory reproducibility พบว่า ค่า %RSD ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ซ้ำ เป็นระยะเวลา 5 วัน มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.85, 4.13, 2.68, 5.80 และ 2.15 ตามลำดับ และมีค่า HORRAT เท่ากับ 0.12, 0.16, 0.12, 0.33 และ 0.13 ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ และค่า HORRAT ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของการทดสอบความเที่ยงภายในห้องปฏิบัติการเดียวโดยผู้วิเคราะห์คนเดียว เครื่องมือเดียว ความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ เป็นระยะเวลา 5 วัน

Concentration of analyst (mg/kg)	%RSD _i	HORRAT
0.01	3.85	0.12
0.05	4.13	0.16
0.1	2.68	0.12
0.5	5.80	0.33
1.0	2.15	0.13

วิจารณ์

วิธีที่ทำการศึกษานี้เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว เนื่องจากลดขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและใช้สารเคมีน้อย ทำให้ลดของเสียที่เกิดจากกระบวนการวิเคราะห์ ปลอดภัยต่อนักวิเคราะห์และสิ่งแวดล้อม เนื่องจากปรอททั้งหมดที่ได้จากกระบวนการวิเคราะห์จะถูกดักจับไว้ที่ mercury trap ในขั้นตอนสุดท้ายของการวิเคราะห์ โดยวิธีดังกล่าวสามารถตรวจวิเคราะห์ปรอททั้งหมดได้ครอบคลุมตามเกณฑ์ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อนซึ่งกำหนดให้มีการปนเปื้อนปรอททั้งหมดในอาหารทะเลได้ไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม⁽¹⁰⁾ และเมื่อทวนสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์พบว่า วิธีที่ทำการศึกษามีความแม่นยำ และความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ นอกจากนี้ห้องปฏิบัติการได้เข้าร่วมทดสอบความชำนาญทางห้องปฏิบัติการกับ FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme) ในการทดสอบ Metallic contaminants in canned crab meat; May-June 2014. พบว่า ผลการทดสอบที่ห้องปฏิบัติการรายงานโดยใช้วิธีดังกล่าวมีความน่าเชื่อถือ ($|Z| < 2$)⁽¹¹⁾ ทั้งนี้วิธีที่ทำการศึกษามีข้อควรระวัง คือใช้ตัวอย่างในการวิเคราะห์น้อย โดยคู่มือของเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์แนะนำให้ชั่งตัวอย่าง 0.1 กรัม และอุปกรณ์สำหรับใส่ตัวอย่างในการวิเคราะห์มีขนาดบรรจุได้สูงสุดที่ 1.5 กรัม ดังนั้นในกระบวนการวิเคราะห์จึงควรระมัดระวังในขั้นตอนการชั่งตัวอย่าง และเนื่องวิธีดังกล่าวเป็นการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยตรงไม่ผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่าง โอกาสการปนเปื้อนปรอทจะอยู่ในขั้นตอนกระบวนการวิเคราะห์โดยเครื่องมือทั้งหมด ดังนั้นก่อนการวิเคราะห์จะต้องทำความสะอาดอุปกรณ์สำหรับใส่ตัวอย่าง รวมทั้งระบบภายในเครื่องมือเพื่อให้มั่นใจว่าอุปกรณ์ดังกล่าวไม่มีการปนเปื้อนปรอท โดยการนำภาชนะสำหรับใส่ตัวอย่างไปทำการเผาไล่ปรอทและให้เครื่องเผาไล่ปรอททั้งหมดภายในระบบโดยไม่มีตัวอย่าง ซึ่งค่าปรอททั้งหมดที่วิเคราะห์ได้ต้องมีค่าน้อยมาก การศึกษาในครั้งนี้ตั้งเกณฑ์ไว้ที่น้อยกว่า 0.1 นาโนกรัมของปรอท (น้อยกว่าค่า LOD ของการทดสอบ) ก่อนที่จะดำเนินการวิเคราะห์ตัวอย่าง และภายหลังจากการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีปริมาณปรอททั้งหมดสูง (ค่า Area เกิน 10) เพื่อให้มั่นใจว่าวิธีปฏิบัติดังกล่าวสามารถนำมาใช้ได้กับผลิตภัณฑ์ทำการทดสอบเท่านั้น การนำผลที่ได้จากการศึกษาไปใช้ในการปฏิบัติงานประจำวัน จะต้องมีการวางแผนการควบคุมคุณภาพในการวิเคราะห์ รวมถึงกำหนดเกณฑ์ในการประเมินผลการควบคุมคุณภาพให้เหมาะสม เพื่อเป็นการประกันคุณภาพผลการทดสอบ ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการศึกษาในครั้งนี้คือใช้เป็นแนวทางในการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์อื่น ๆ ต่อไป

สรุป

การตรวจวิเคราะห์ปรอททั้งหมดด้วยเครื่องปรอทเทคนิคการเผา ซึ่งอ้างอิงวิธีมาตรฐาน U.S. EPA. method 7473 (2007) สามารถใช้การตรวจวิเคราะห์ปริมาณปรอททั้งหมดในอาหารทะเลในช่วง 0.01 ถึง 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีความแม่นยำ และความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Mercury and health: fact sheet no. 361. [online]. Sep 2013; [4 screens]. Available from: URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs361/en>
2. United States Environmental Protection Agency. Mercury: health effects. [online]. 2014; [3 screens]. Available from: URL: <http://www.epa.gov/mercury/effects.htm>
3. Analytical methods. In: WHO. Elemental mercury and inorganic mercury compounds: human health aspects. Geneva: World Health Organization; 2003. p. 6-7.

4. United States Environmental Protection Agency. Method 7473 mercury in solids and solutions by thermal decomposition, amalgamation, and atomic absorption spectrophotometry (CAS No. 7439-97-6). Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency; 2007.
5. AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. [online]. 2002; [38 screens]. Available from: URL: http://www.aoac.org/imis15_prod/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf
6. AOAC official methods of analysis. Appendix F: guidelines for standard method performance requirements. Rockville, MD: AOAC International; 2012.
7. Eurachem guide. The fitness for purpose of analytical methods a laboratory guide to method validation and related topics. Teddington: Eurachem; 1998. p. 5-24.
8. Miller JN, Miller JC. Statistics and chemometrics for analytical chemistry. 5th ed. Harlow, England: Pearson Education; 2005.
9. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
10. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 (พ.ศ. 2529) เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน. ราชกิจจานุเบกษาฉบับพิเศษ เล่มที่ 103 ตอนที่ 23 (ลงวันที่ 16 กุมภาพันธ์ 2529).
11. The Food and Environment Research Agency. FAPAS 07213: canned crab meat, arsenic (total), arsenic (inorganic), cadmium, lead & mercury (total). Sand Hutton, York: FAPAS; 2014.

The Method Verification of Total Mercury Analysis in Seafood by Using Direct Mercury Analyzer Combustion Technique

Khemikar Hemloha and Nirundorn Raekasin

Regional Medical Sciences Center 11 Surat Thani, Amphoe Muang, Surat Thani 84100. Thailand.

ABSTRACT Nowadays, mercury contaminated in food could be analyzed by several techniques. Direct mercury analyzer combustion technique was now in attention. This study aimed to verify of total mercury analysis in seafood by using direct mercury analyzer combustion technique according U.S. EPA. Method 7473 (2007). The analysis was subjected on range and linearity, the limit of detection, the limit of quantitation, accuracy, and precision within single laboratory. The results were shown the linear range from 0.01 to 1.00 mg/kg. The determination coefficient was greater than 0.99, limit of detection was 0.001 mg/kg and limit of quantitation was 0.01 mg/kg related to 96.71 of average percentage recovery. Accuracy test using certified reference materials were found that average test value was not different than reference value significantly at 95% confidence level. The analysis precision in single laboratory was accepted. Thus, this method appropriate to apply in the determination of total mercury in seafood was concentration range of 0.01 to 1.0 mg/kg. However, in comparison this method is faster than other method, because sample preparation procedure was not required and could be chemical reduced, environmentally friendly and safe for human.

Key words: Mercury, Seafood, Method verification, Direct mercury analyzer combustion technique