การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สาร spinosad ในไขมันไก่ โดยเทคนิค LC-MS/MS

วิชุนันท์ ลีวรรณ์* สุวรรณี ศรีสุวรรณ

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สาร spinosad ในไขมันไก่ด้วยเทคนิค LC–MS/MS ชนิด triple quadrupole ซึ่งประกอบด้วย spinosyn A และ spinosyn D ผลการพัฒนาวิธี พบว่าวิธีที่เหมาะสมคือ การใช้ตัวทำละลาย hexane (Hex) : dichloromethane (DCM) (6:4) เขย่าผสมกับไขมันไก่ 1 กรัม แล้วนำสารสกัดไป clean up ด้วย SPE ชนิด silica ที่ผ่านการปรับสภาวะด้วย DCM : methanol (MeOH) (75:25), ACN, DCM และ Hex แล้วชะสารที่ต้องการวิเคราะห์ด้วย DCM : MeOH (75:25) นำไประเหยจนแห้งและปรับปริมาตรด้วย 0.1% formic acid ใน DI water : 0.1% formic acid ใน ACN (60:40) เมื่อนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC–MS/MS วิธีดังกล่าวให้ค่า %mean recovery (%MR) อยู่ในช่วง 70–120% ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และใช้ปริมาณสารเคมีน้อยกว่าการสกัดด้วย Hex:DCM ที่ใช้ปริมาณ Hex มากกว่าและที่มีขั้นตอนการสกัดซ้ำ จากผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี พบว่า spinosad ที่ความเข้มข้น 0.25-100 ng/mL (spinosyn A 0.21–84 ng/mL และ spinosyn D 0.04–16 ng/mL) มีความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน มีค่า $r^2 > 0.990$ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ของสาร spinosad เท่ากับ 0.2 และ 0.5 µg/kg ตามลำดับ และช่วงวิเคราะห์ของ spinosad ที่มีความแม่นและความเที่ยงตั้งแต่ 0.5–1500 µg/kg โดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ มีค่าน้อยกว่าปริมาณสารตกค้างสูงสุด และช่วงการวิเคราะห์มีค่า %MR อยู่ในช่วง 70–120% และ %RSD ไม่เกิน 20% ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ยอมรับของ SANTE 11312/2021 v2026 แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีความถูกต้อง แม่นยำ และเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สาร spinosad ในไขมันไก่

คำสำคัญ : การพัฒนาวิธี การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ spinosad ไขมันไก่ LC-MS/MS

เลขทะเบียนวิชาการ : 69(2)-0304-023

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์
91 หมู่ 4 ถนนติวานนท์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมืองปทุมธานี จังหวัดปทุมธานี 12000
*ผู้รับผิดชอบ, e-mail : vichunan.lee@gmail.com

Method development and validation for the determination of spinosad in chicken fat by LC-MS/MS

Vichunan leewan* Suwanee srisuwan

Abstract

This study aimed to develop and validate an analytical method for the determination of spinosad residues in chicken fat using triple quadrupole LC–MS/MS. Spinosad consists of two major components, spinosyn A and spinosyn D. Method development demonstrated that the optimal extraction procedure involved mixing 1 g of chicken fat with hexane (Hex) and dichloromethane (DCM) at a ratio of 6:4 (v/v). The extract was subsequently purified using SPE- silica cartridges conditioned sequentially with DCM (75:25, v/v), acetonitrile (ACN), DCM, and Hex. Target analytes were eluted with DCM (75:25, v/v), evaporated to dryness, and reconstituted with 0.1% formic acid in DI water and 0.1% formic acid in ACN (60:40, v/v) prior to LC–MS/MS analysis. The developed method provided mean recoveries within the acceptable range of 70–120%, while offering advantages in terms of simplicity, rapidity and reduced solvent consumption compared with conventional Hex extraction methods requiring higher solvent volumes and repeated extraction steps. Method validation showed that spinosad concentrations ranging from 0.25–100 ng/mL exhibited good linearity, with calibration ranges of 0.21–84 ng/mL for spinosyn A and 0.04–16 ng/mL for spinosyn D, yielding correlation coefficients (r^2) greater than 0.990. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for spinosad were determined to be 0.2 and 0.5 µg/kg, respectively. The validated working range with acceptable accuracy and precision was 0.5–1500 µg/kg. The LOQ obtained was lower than the maximum residue limit (MRL), and throughout the validated range, mean recoveries remained within 70–120% with relative standard deviations (%RSD) not exceeding 20%, complying with the acceptance criteria specified in SANTE 11312/2021 v2026. These results demonstrate that the developed analytical method is accurate, precise and suitable for the determination of spinosad residues in chicken fat.

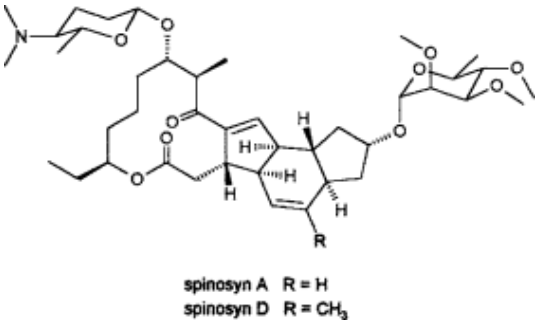
Keyword: Method development, Validation, Spinosad, Chicken fat, LC-MS/MS

Registered No.: 69(2)-0304-023

Veterinary Public Health Laboratory, Bureau of Quality Control of Livestock Products.
91 Moo. 4 Tiwanont Bangkadi Mueang Pathumthani 12000
*Corresponding author, e-mail : vichunan.lee@gmail.com

บทนำ

Spinosad เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากกระบวนการหมักของแบคทีเรีย *Saccharopolyspora spinosa* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะเป็นเส้นใยและไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ แบคทีเรียชนิดนี้ผลิตสารเมตาบอไลต์ที่เรียกว่า spinosad ซึ่งประกอบด้วย spinosyn A (สูตรเคมี $C_{41}H_{65}NO_{10}$) และ spinosyn D (สูตรเคมี $C_{42}H_{67}NO_{10}$) ตามภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างของ spinosyn A และ spinosyn D (ที่มา : Ujvary, 2001)

สารดังกล่าวมีคุณสมบัติในการกำจัดแมลงศัตรูพืชหลายชนิด เช่น หนอนผีเสื้อ เพลี้ยไฟ แมลงวัน ด้วง และไร โดยออกฤทธิ์ผ่านการกระตุ้นตัวรับ nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) และตัวรับ gamma-aminobutyric acid (GABA) ซึ่งมีผลต่อระบบประสาทของแมลง ทำให้เกิดอาการเกร็ง สั่น และนำไปสู่อัมพาตและการตายในที่สุด (Singh and Mazumdar, 2022) โดยมีการนำไปใช้ควบคุมหนอนกระทู้ข้าวโพด ซึ่งเป็นวัตถุดิบสำคัญในอาหารสัตว์ปีก โดยเมล็ดข้าวโพดนอกจากให้พลังงานแล้วยังมีแคโรทีนที่ช่วยทำให้สีของเนื้อไก่และไข่แดงเข้มขึ้นตามความนิยมของผู้บริโภค (กองอาหารสัตว์, 2538) นอกจากนี้ยังใช้ในฟาร์มไก่ เพื่อกำจัดด้วงดำ *Alphitobius diaperinus* ซึ่งสร้างความสูญเสียทางเศรษฐกิจให้กับเกษตรกรผู้เลี้ยงเป็นมูลค่ามหาศาล เนื่องจากด้วงดำเป็นแมลงศัตรูที่สำคัญในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ที่มักจะอาศัยและขยายพันธุ์อยู่ในแกลบสำหรับรองพื้นของฟาร์มเลี้ยงไก่ก่อให้เกิดปัญหามากมาย เช่น ด้วงดำเข้าไปกินอาหารสัตว์ที่เก็บไว้ภายในฟาร์ม อีกทั้งยังเป็นโฮสต์ของพยาธิตัวตืดในไก่ เมื่อไก่เลือกจิกกินด้วงดำเข้าไปทำให้ไก่กินอาหารได้น้อยลง ส่งผลให้การเจริญเติบโตชะงักและมีน้ำหนักตัวน้อยและเกิดการอุดตันของระบบทางเดินอาหาร ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลงอย่างรวดเร็วในไก่ นอกจากนี้ด้วงดำยังกัดไก่ทำให้เกิดรอยที่ผิวหนังของไก่ทำให้ไม่น่าบริโภค (สุดารัตน์ และคณะ, 2568) อย่างไรก็ตาม การใช้ spinosad อย่างไม่เหมาะสมในปริมาณมากอาจทำให้สารตกค้างในผลผลิตทางการเกษตรหรือสิ่งแวดล้อมได้ ซึ่งหากเข้าสู่ระบบห่วงโซ่อาหารโดยผ่านพืชหรือสัตว์ที่รับสารตกค้างเข้าไปอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค โดยเฉพาะต่อตับและไต หากได้รับสารดังกล่าวอย่างต่อเนื่องในระยะยาว (International Labour Organization and World Health Organization, 2004) และจากการศึกษาของ Martelli *et al.* (2022) พบว่า spinosad จัดอยู่ในกลุ่มสารประกอบประเภท polyketide macrolactone ซึ่งมีหมู่ฟังก์ชันหลายชนิด ได้แก่ ether, ester และ glycosidic

linkage โดยองค์ประกอบทางโครงสร้างดังกล่าวส่งผลให้สารมีคุณสมบัติกึ่งมีขั้ว (amphiphilic) จากคุณสมบัติทางเคมีกายภาพนี้ เมื่อสัตว์ได้รับ spinosad จากอาหารที่มีการปนเปื้อน สารนี้จึงมีแนวโน้มกระจายตัวเข้าสู่เนื้อเยื่อที่มีไขมันและอาจก่อให้เกิดการสะสมของสารในไขมันสัตว์ได้

จากข้อมูลแผนปฏิบัติการไก่เนื้อของกรมปศุสัตว์ ฉบับที่ 4 (พ.ศ. 2566-2570) การตลาดเนื้อไก่ของโลก อ้างถึงข้อมูลกระทรวงเกษตรสหรัฐอเมริกา (United States Department of Agriculture หรือ USDA) ช่วงระยะเวลาปี พ.ศ. 2561-2565 มีการขยายตัวเพิ่มขึ้นเฉลี่ยร้อยละ 1.81 ต่อปี ซึ่งประเทศไทยมีปริมาณการส่งออกเนื้อไก่เฉลี่ยปีละ 13.12 ล้านตัน คิดเป็นสัดส่วนร้อยละ 13.35 ของผลผลิตทั้งหมด โดยมีประเทศผู้นำเข้าเนื้อไก่ของไทยประกอบด้วย 3 กลุ่มหลัก ได้แก่ ประเทศญี่ปุ่น (ร้อยละ 44) สหราชอาณาจักร (ร้อยละ 17) และกลุ่มประเทศสหภาพยุโรป (ร้อยละ 14) ปริมาณรวมกันคิดเป็นร้อยละ 75 ทั้งนี้ กลุ่มประเทศสหภาพยุโรปเปิดตลาดโดยกำหนดปริมาณโควตาในแต่ละปีสำหรับสินค้าเนื้อสัตว์ปีกและผลิตภัณฑ์ (กองส่งเสริมและพัฒนาการปศุสัตว์, 2566) และสถานการณ์การส่งออกสินค้าปศุสัตว์ของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2567 พบว่ามีมูลค่าการส่งออกถึง 320,674 ล้านบาท เพิ่มขึ้นร้อยละ 11 จากปี พ.ศ. 2566 โดยสินค้าหลักคือ กลุ่มเนื้อสัตว์แช่แข็ง โดยเฉพาะเนื้อสัตว์ปีกซึ่งมีปริมาณการส่งออกสูงที่สุด และตลาดส่งออกสำคัญ ได้แก่ สหภาพยุโรป ญี่ปุ่น และจีน (กรุงเทพธุรกิจ, 2568) ซึ่งประเทศเหล่านี้มีข้อกำหนดมาตรฐานระดับสารตกค้างที่เข้มงวด โดยสหภาพยุโรปจึงได้กำหนดระดับสารตกค้างสูงสุด (maximum residue limits, MRLs) ของ spinosad (ผลรวมของ spinosyn A และ D) ในไขมันสัตว์ปีกไว้ที่ 1 mg/kg โดยมีข้อความกำกับว่า สำนักงานความปลอดภัยด้านอาหารของยุโรป (European Food Safety Authority) ระบุว่าข้อมูลบางส่วนเกี่ยวกับการศึกษาในอาหารยังไม่ครบถ้วน คณะกรรมาธิการจะทบทวนค่า MRL ของสารนี้อีกครั้ง หากส่งข้อมูลที่จำเป็นภายในวันที่ 17 เมษายน พ.ศ. 2560 หรือหากไม่ได้รับข้อมูลภายในวันดังกล่าว คณะกรรมาธิการจะดำเนินการประเมินใหม่โดยพิจารณาจากการขาดข้อมูลดังกล่าว (European Commission, 2022) ซึ่งในระเบียบข้อบังคับของสหภาพยุโรปฉบับที่ 396/2005 ว่าด้วยระดับสารตกค้างสูงสุดของสารฆ่าแมลงในอาหารและอาหารสัตว์ที่มีแหล่งกำเนิดจากพืชและสัตว์ โดยอาหารทุกชนิดที่มุ่งหมายให้มนุษย์หรือสัตว์บริโภคในสหภาพยุโรป (EU) จะต้องกำหนดค่า MRL ของสารฆ่าแมลงเจาะจงกับผลิตภัณฑ์นั้น เพื่อปกป้องสุขภาพของสัตว์และมนุษย์ โดยกฎหมายของสหภาพยุโรปกำหนดค่า MRL เริ่มต้น หรือ default MRL ที่ระดับ 0.01 mg/kg ในกรณีที่ไม่มีการกำหนดค่า MRL เฉพาะเจาะจง (European Commission, 2015) สำหรับญี่ปุ่นมีการกำหนดค่า MRL ของ spinosad ในไขมันสัตว์ปีกที่ระดับ 0.4 mg/kg (Ministry of Health, Labour and Welfare, 2011) ขณะที่จีนกำหนดค่า MRL สำหรับ spinosad เฉพาะในผลิตภัณฑ์จากพืชภายใต้มาตรฐาน GB 2763-2016 (National Health and Family Planning Commission of China, 2016) ซึ่งประเทศต่าง ๆ ล้วนมีมาตรฐานระดับสารตกค้างสูงสุดของสารฆ่าแมลงที่พบได้ในอาหาร ดังนั้นการควบคุมสารตกค้างในผลิตภัณฑ์สัตว์ปีกตามกฎหมายของสหภาพยุโรปจึงมีความเข้มงวดมากที่สุด เพื่อควบคุมสินค้าที่จำหน่ายและบริโภคภายในประเทศให้มีความปลอดภัยสูงสุด

ห้องปฏิบัติการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ซึ่งมีภารกิจในการตรวจสอบความปลอดภัยของสินค้าปศุสัตว์ ได้ตระหนักถึงความสำคัญในการตรวจสอบสารตกค้างกลุ่ม spinosad ในไขมันไก่เพื่อรองรับข้อกำหนดของประเทศคู่ค้าและสำหรับการดำเนินการตามแผนการตรวจสอบสารตกค้าง (residue monitoring plan) ทั้งนี้จากการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่าการศึกษาของ West and Turner (1998) ทำการสกัดตัวอย่างเมทริกซ์ไขมัน โดยประกอบด้วยขั้นตอนการทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน การสกัด การแยกชั้นของเหลว และการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยกำจัดสิ่งรบกวน (clean up) ด้วยเทคนิค solid phase extraction (SPE) ทั้งชนิด silica และ cyclohexyl ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-UV ซึ่งวิธีดังกล่าวมีขั้นตอนการสกัดที่ซับซ้อน การใช้สารเคมีที่ปริมาณมาก ทำให้ต้องใช้ระยะเวลาวิเคราะห์ รวมถึงความไวของตัวตรวจวัดที่ต่ำ จึงเป็นวิธีที่ไม่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์สารที่ระดับค่า default MRL (0.01 mg/kg) ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงทำการพัฒนาวิธีการสกัดและ clean up ตัวอย่างเมริกซ์ไขมันให้เหมาะสมและวิธีดังกล่าวต้องผ่านกระบวนการตรวจสอบความใช้ได้อย่างถูกต้องและครอบคลุมค่า default MRL ถึง 1 mg/kg โดยดำเนินการตามแนวทางของ SANTE 11312/2021 v2026 (European Commission, 2026) โดยทดสอบพารามิเตอร์ ดังนี้ ความจำเพาะเจาะจงของสารที่ทดสอบ ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ผลกระทบจากเมทริกซ์ ความแม่น และความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ ตามแนวทางของ Eurachem (2025) ในการทดสอบพารามิเตอร์ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ และความเป็นเส้นตรงของช่วงวิเคราะห์ โดยมีเป้าหมายให้ผลทดสอบมีความถูกต้อง แม่นยำ เชื่อถือได้ และเพื่อขยายขอบข่ายรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

1.1 เครื่อง LC-MS/MS (triple quadrupole) ยี่ห้อ Thermo scientific รุ่น TSQ quantis และรุ่น TSQ endura

1.2 HPLC Column inertsil ODS-3 ขนาด 2.1 X 150 mm, 3 µm ยี่ห้อ GL Sciences

1.3 เครื่องลดปริมาตรสารละลายโดยการระเหยแห้งภายใต้สุญญากาศ (Rotary Vacuum Evaporator) ยี่ห้อ Heidolph รุ่น Hei-VAP Precision

1.4 เครื่องลดปริมาตรสารละลายโดยการเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจนแบบอัตโนมัติ (N-Evap) ยี่ห้อ Detelogy รุ่น FV64

1.5 SPE ชนิด Silica ปริมาณ 500 mg ขนาด 6 mL ยี่ห้อ Vertical

1.6 Membrane filter ชนิด nylon ขนาด 0.25 µm ยี่ห้อ Vertical

2. สารเคมีและสารมาตรฐาน

2.1 สารเคมี

- เกรด AR ได้แก่ Hexane (Hex), Dichloromethane (DCM), Acetronitrile (ACN), Formic acid
- เกรด HPLC ได้แก่ Acetronitrile (ACN), Methanol (MeOH),

2.2 น้ำปราศจากไอออน (deionized water, DI water) มีความต้านทานไฟฟ้าไม่น้อยกว่า 18.2 MΩ.cm

2.3 สารมาตรฐาน spinosad ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer Lot no. G1100667 โดยมีส่วนประกอบของ spinosyn A = 84% และ spinosyn D = 16% โดยขั้นตอนการเตรียมสารละลายมาตรฐานมีดังนี้

2.3.1 Stock standard solution : ชั่งสารมาตรฐาน spinosad จำนวน 5 mg ละลายและปรับปริมาตรเป็น 25 mL ด้วย MeOH:ACN (50:50) ใน volumetric flask สารละลายมาตรฐานที่ได้จะมีความเข้มข้นประมาณ 200 µg/mL (spinosyn A = 168 µg/mL และ spinosyn D = 32 µg/mL)

2.3.2 Intermediate standard solution ระดับความเข้มข้น 2000, 1000, 100 และ 10 ng/mL โดยปิเปตสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นและปริมาตรต่างๆ ใส่ใน volumetric flask ตามตารางที่ 1 แล้วปรับปริมาตรด้วย 0.1% formic acid ใน DI water : 0.1% formic acid ใน ACN (60:40)

2.3.3 Standard in solvent calibration (SSC) เตรียมจากสารละลายมาตรฐานของ spinosad ใน mobile phase และ matrix matched calibration (MMC) เตรียมโดยเติมสารละลายมาตรฐาน spinosad ลงในสารสกัดจากตัวอย่างไขมันไก่ sample blank (SB) ที่ผ่านการสกัดด้วยวิธีที่เหมาะสมตามข้อ 4.3 เพื่อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายที่ระดับความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 40, 60, 80 และ 100 µg/L ตามตารางที่ 1-2

ตารางที่ 1 การเตรียม Intermediate standard solution ของ spinosad

Standard solution		Volumetric flask (mL)	Intermediate standard solution conc. (ng/mL)		
Conc.	ปริมาตร (µL)		Spinosyn A (84 %)	Spinosyn D (16 %)	Spinosad
200 µg/mL	100	10	1680	320	2000
2000 ng/mL	500	1	840	160	1000
1000 ng/mL	100	1	84	16	100
100 ng/mL	100	1	8.4	1.6	10

ตารางที่ 2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับสร้าง calibration curve

Standard solution		0.1% formic acid ใน DI water : 0.1%formic acid ใน acetronitrile (60:40) ปริมาตร (µL)	Standard in solvent calibration (SSC) (ng/mL)		
Conc. (ng/mL)	ปริมาตร (µL)		Spinosyn A (84 %)	Spinosyn D (16 %)	Spinosad
1000	80	920	67.2	12.8	80
1000	60	940	50.4	9.6	60
100	400	600	33.6	6.4	40
100	200	800	16.8	3.2	20
100	150	850	12.6	2.4	15
100	100	900	8.4	1.6	10
10	500	500	4.2	0.8	5
10	100	900	0.84	0.16	1
10	50	950	0.42	0.08	0.5
10	25	975	0.21	0.04	0.25

3. ตัวอย่างที่ใช้พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ตัวอย่างไขมันไก่ที่ส่งตรวจวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ ซึ่งผ่านการทดสอบว่าไม่พบการปนเปื้อนของ spinosad กำหนดให้เป็น sample blank (SB) บดสับให้ละเอียด ใส่ขวดแก้ววางในอ่างน้ำร้อนที่มีอุณหภูมิไม่เกิน 75 °C ประมาณ 2-3 ชั่วโมง จนกระทั่งมีลักษณะเป็นน้ำมัน ดูดใส่ใน erlenmeyer flask จำนวน 100 กรัม แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิไม่เกิน -16°C จนกระทั่งนำมาวิเคราะห์

4. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

4.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมของ LC-MS/MS

4.1.1 ส่วน Mass spectrometer (triple quadrupole)

ฉีดสารละลายมาตรฐาน spinosad ที่ความเข้มข้น 1 µg/mL เข้าส่วน mass spectrometer โดยตรงแบบ direct infusion โดยเลือกแหล่งกำเนิดไอออน (ion source) แบบ electrospray ionization (ESI) ที่ตรวจวัดไอออนบวก (positive) เพื่อหาพารามิเตอร์ที่เหมาะสม ได้แก่ spray voltage, sheath gas, auxiliary gas, ion transfer tube temperature และ vaporizer temperature สำหรับทำให้ precursor ions ของสารที่จะวิเคราะห์มี intensity สูงเมื่อได้ค่าพารามิเตอร์ของแหล่งกำเนิดไอออนที่เหมาะสมกับ precursor ions แล้ว หาสภาวะของ mass transition ได้แก่ RF lens, collision energy และ product ions ของแต่ละสารโดยใช้โหมด multiple reaction monitoring (MRM)

4.1.2 ส่วน Liquid Chromatograph (LC)

ปรับหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสาร โดยใช้ HPLC column ชนิด inertsil ODS-3 ขนาด 2.1 X 150 mm, 3 µm และปรับอัตราส่วนของ mobile phase ในการพาสารผ่านคอลัมน์ ได้แก่ mobile phase A คือ 0.1% formic acid ใน DI water และ mobile phase B คือ 0.1% formic acid ใน ACN ตั้งค่าสภาวะการทำงานของเครื่องแบบ gradient mode แล้วฉีดสารละลายมาตรฐาน spinosad ความเข้มข้น 10 ng/mL เพื่อดูการแยกของโครมาโทแกรม (chromatogram) ของ spinosyn A และ spinosyn D ตามตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สภาวะของส่วน LC

Parameters	**รายละเอียด/สภาวะการวิเคราะห์**		
Column	inertsil ODS-3 ขนาด 2.1 X 150 mm, 3 µm		
Mobile phase	A : 0.1% formic acid in water		
	B : 0.1% formic acid in acetonitrile		
	Gradient conditions :		
	time	mobile phase	
	(min)	A (%)	B (%)
	0	60	40
	7	20	80
	8	20	80
	9	60	40
	12	60	40
Flow rate	0.20 mL/min		
Oven temp	35 °C		
Injection volume	10 µL		

4.2 การหาค่า instrument detection limit (IDL)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน spinosad ที่ความเข้มข้น 0.25 ng/mL (spinosyn A = 0.21 ng/mL และ spinosyn D = 0.04 ng/mL) จำนวน 3 ซ้ำ นำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS ตามสภาวะเหมาะสมที่จากข้อ 4.1 แล้วตรวจสอบค่าสัญญาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์เทียบกับสัญญาณรบกวน (signal to noise ratio, S/N) โดยใช้โปรแกรมประมวลผลของเครื่อง LC-MS/MS กำหนดเกณฑ์ยอมรับของ S/N ต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 3

4.3 การพัฒนาวิธีการสกัดตัวอย่าง

ดัดแปลงวิธีการสกัดจาก West and Turner. (1998) ใช้ SB ที่ได้จากไขมันไก่ ชั่งน้ำหนัก 1 กรัม ใส่ในหลอดแก้วขนาด 125 mL จำนวน 28 หลอด กำหนดให้หลอดที่ 1-4 เป็น SB1-SB4 และหลอดที่ 5–28 เป็น spiked samples (SP1–SP24) โดยเติมสารมาตรฐาน spinosad ให้มีความเข้มข้น 5 µg/kg (spinosyn A = 4.2 µg/kg และ spinosyn D = 0.8 µg/kg) จากนั้นนำไปสกัดด้วยวิธีที่ 1–4 และ clean-up ตามที่แสดงใน

ตารางที่ 4 แต่ละวิธีประกอบด้วย 1SB และ 6SP ตัวอย่างที่ได้จากการสกัดจะถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC–MS/MS ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 4.1 ประเมินประสิทธิภาพของการสกัดและ clean-up โดยการเปรียบเทียบสัญญาณของสารวิเคราะห์กับกราฟมาตรฐานในตัวทำละลาย (standard in solvent calibration, SSC) และประเมินผลโดยการคำนวณค่าร้อยละการคืนกลับเฉลี่ย (%mean recovery, %MR) ซึ่งต้องอยู่ในช่วง 70–120% และ %RSD ต้องไม่เกิน 20% ตามเกณฑ์ของ SANTE 11312/2021 v2026 (European Commission, 2026)

ตารางที่ 4 ขั้นตอนการสกัดและ clean-up วิธีที่ 1-4

ขั้นตอน	วิธีที่ 1	วิธีที่ 2	วิธีที่ 3	วิธีที่ 4
การสกัดตัวอย่าง				
1. น้ำหนักตัวอย่าง	1 g	1 g	1 g	1 g
2. เติม Hex : DCM (6 : 4)	50 mL	10 mL	10 mL	10 mL
3. เขย่าผสมกันด้วย vortex mixer แล้วเทใส่กรวยแยก	1 min	1 min	1 min	1 min
4. เติม Hex ลงในกรวยแยก	10 mL	5 mL	5 mL	×
5. เติม ACN ลงในกรวยแยก	40 mL	10 mL	10 mL	×
6. เขย่าด้วยมือนาน 1 นาที ทิ้งไว้ให้แยกชั้น	√	√	√	×
7. เก็บส่วนล่างใส่ขวดก้นกลม	√	√	√	×
8. เติม ACN ลงในกรวยแยก	40 mL	10 mL	×	×
9. เติม DCM ลงในกรวยแยก	10 mL	x	x	x
10. เขย่าด้วยมือนาน 1 นาที ทิ้งไว้ให้แยกชั้น	√	√	×	×
11. เก็บส่วนล่างใส่ขวดก้นกลมเดิม	√	√	×	×
12. ระเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary vacuum evaporator	√	√	×	×
13. เติม Hex ใส่ตัวอย่างที่ระเหยแห้ง	10 mL	10 mL	×	×
การ clean-up				
14. ต่อ SPE กับ ชุด SPE vacuum manifold		√		
15. ปรับสภาวะ SPE ด้วย DCM:MeOH (75 : 25)		5 mL		
16. ปรับสภาวะ SPE ด้วย ACN		5 mL		
17. ปรับสภาวะ SPE ด้วย DCM		5 mL		
18. ปรับสภาวะ SPE ด้วย Hex		10 mL		
19. เทสารละลายสกัดตัวอย่างลงใน SPE		10 mL		
20. เติม Hex ลงใน SPE		15 mL		
21. เติม DCM ลงใน SPE		5 mL		
22. เติม ACN ลงใน SPE		4 mL		
23. Elute ด้วย DCM:MeOH (75:25)		10 mL		
24. ระเหยแห้งด้วย N-Evap		√		
25. เติม 0.1%formic acid ใน DI water : 0.1% formic acid ใน ACN (60:40)		1 mL		

หมายเหตุ : √ = ดำเนินการ, × = ไม่ดำเนินการ

5. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

5.1 ความจำเพาะเจาะจงของสารที่ทดสอบ (specificity)

เตรียม method blank (MB), SB และ SP ความเข้มข้นของสาร spinosad 1 µg/kg (spinosyn A = 0.84 µg/kg และ spinosyn D = 0.16 µg/kg) สกัดตัวอย่างด้วยวิธีที่เหมาะสมตามข้อ 4.3 เทียบกับสารมาตรฐาน spinosad ความเข้มข้น 0.5 ng/mL (spinosyn A = 0.42 ng/mL และ spinosyn D = 0.08 ng/mL) เพื่อตรวจสอบการรบกวนโดยจะต้องไม่มีพีคสารที่มี retention time (RT) และมวลต่อประจุ (m/z) ตรงกับพีคสารของสารมาตรฐานปรากฏใน MB และ SB สำหรับ SP นั้น ต้องพบพีคสาร spinosyn A และ D ที่ตรงกับพีคสารมาตรฐาน โดย RT และ ion ratio อยู่ในช่วงไม่เกิน ± 0.1 นาที และ ion ratio ไม่เกิน 30% ตามเกณฑ์ SANTE 11312/2021 v2026 (European Commission, 2026) โดยใช้โปรแกรมประมวลผลของเครื่อง LC-MS/MS

5.2 ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (linearity of calibration curve)

ตรวจวัดสารละลายมาตรฐาน spinosad แบบ SSC จำนวน 11 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.25, 0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 40, 60, 80 และ 100 ng/mL ตามตารางที่ 1-2 ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ด้วย LC-MS/MS ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 4.1 โดยสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน x) และค่าเฉลี่ยของ area (แกน y) และพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (correlation of determination, r^2) โดยค่า $r^2 \geq 0.990$ (U.S. Food and Drug Administration, 2023) และประเมินค่า %deviation of back-calculated concentration โดยคำนวณจากค่าความเข้มข้นจริง (C_{True}) เทียบกับความเข้มข้นที่คำนวณได้ ($C_{Measured}$) ของสารมาตรฐานแต่ละระดับความเข้มข้นตามสมการที่ 1 ซึ่งมีความคลาดเคลื่อนไม่เกิน $\pm$ 20% ตามเกณฑ์ SANTE 11312/2021 v2026 (European Commission, 2026)

$$\text{Deviation of back-calculated concentration(\%)} = (C_{Measured}-C_{True}) \times 100 / C_{True} \qquad \textbf{สมการที่ 1}$$

5.3 ผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect)

เปรียบเทียบสารละลายมาตรฐาน spinosad แบบ SSC ในข้อ 5.2 กับสารละลายมาตรฐานที่ละลายใน matrix ที่ได้จากการสกัดตัวอย่าง SB ด้วยวิธีที่เหมาะสมตามข้อ 4.3 แบบ matrix match calibration (MMC) จำนวน 11 ระดับความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 40, 60, 80 และ 100 ng/mL ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 4.1 นำผลวิเคราะห์มาสร้างกราฟหาสมการเส้นตรง $y = mx + c$ โดย x คือความเข้มข้น, y คือ peak area, m คือ slope ของ calibration curve และ c คือ จุดตัดของแกน y จากนั้นนำค่า slope ของ SSC และ MMC มาคำนวณค่า %matrix effect (%ME) โดยมีสูตรการคำนวณตามสมการที่ 2 (Matuszewski *et al*., 2003) โดยเกณฑ์ที่ยอมรับคือค่า %ME ต้องน้อยกว่า $\pm$ 20% ตามเกณฑ์ SANTE 11312/2021 v2026 (European Commission, 2026)

$$\%ME = \left[\frac{\text{Slope MMC}}{\text{Slope SSC}} - 1 \right] \times 100 \qquad \textbf{สมการที่ 2}$$

5.4 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (limit of detection, LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ (limit of quantitation, LOQ)

สกัด SP ที่มีความเข้มข้นของ spinosad 1 µg/kg (spinosyn A = 0.84 µg/kg และ spinosyn D = 0.16 µg/kg) จำนวน 10 ซ้ำ สกัดด้วยวิธีที่เหมาะสมตามข้อ 4.3 แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 4.1 นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่า standard deviation (SD=S'_0) แล้วคำนวณหาค่า LOD จาก 3 x S'_0 และค่า LOQ จาก 10 x S'_0 (Eurachem, 2025) แล้วนำค่าที่ได้ไปทำการยืนยันค่า LOD และ LOQ โดยเกณฑ์ค่า LOD คือ S/N มีค่าไม่น้อยกว่า 3 ส่วนเกณฑ์ค่า LOQ คือ %MR ต้องอยู่ในช่วง 70-120% และ %RSD ต้องไม่เกิน 20% ตามเกณฑ์ SANTE 11312/2021 v2026 (European Commission, 2026)

5.5 ความแม่น (accuracy) และความเที่ยง (precision) ของวิธีวิเคราะห์

5.5.1 ทดสอบความแม่นและความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้ (repeatability) โดยเตรียม SP ไขมันไก่ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 1000 และ 1500 µg/kg โดยการเติมสารมาตรฐานดังตารางที่ 5 ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ สกัดด้วยวิธีที่เหมาะสมตามข้อ 4.3 สำหรับสารสกัดที่ความเข้มข้น 1000 และ 1500 µg/kg ต้องทำการเจือจาง 20 เท่า ด้วยสารสกัด SB ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 4.1 แต่ละชุดความเข้มข้นทดสอบภายในวันเดียวกันด้วยผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน โดยเกณฑ์พิจารณาค่าความความแม่นคือ %MR ต้องอยู่ในช่วง 70-120% และค่าความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้คือ $\%RSD_r$ ต้องไม่เกิน 20% ตามเกณฑ์ SANTE 11312/2021 v2026 (European Commission, 2026)

5.5.2 ทดสอบความแม่นและความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ (within laboratory reproducibility) โดยเตรียม SP ไขมันไก่ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 10, 20, 1000 และ 1500 µg/kg ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ เพิ่มอีก 1 ชุด จากข้อ 5.5.1 โดยวิเคราะห์ต่างวันและต่างผู้วิเคราะห์ แล้วนำข้อมูลการทดสอบ SP ทั้ง 2 ชุด มาคำนวณ %MR และ $\%RSD_{wR}$ โดยเกณฑ์ยอมรับ %MR ต้องอยู่ในช่วง 70-120% และ $\%RSD_{wR}$ ต้องไม่เกิน 20% ตามเกณฑ์ SANTE 11312/2021 v2026 (European Commission, 2026)

5.6 ความเป็นเส้นตรงของช่วงวิเคราะห์ (linearity of working range)

วิเคราะห์ SP ไขมันไก่ที่มีความเข้มข้นของสาร spinosad ตั้งแต่ระดับ LOQ, 1, 5, 10, 15, 20, 40, 60, 80 และ 100 µg/kg ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ สร้างกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง $y = mx+c$ โดยแกน x คือความเข้มข้นที่เติม และแกน y คือ ความเข้มข้นเฉลี่ยที่วัดได้ (Eurachem, 2025) นำมาพิจารณาจากค่า r^2 โดยเกณฑ์ที่ยอมรับคือค่า $r^2 \geq 0.990$ (U.S. Food and Drug Administration, 2023)

ตารางที่ 5 การเตรียม spiked sample ไขมันไก่ สำหรับการวิเคราะห์ความแม่นและความเที่ยง

Standard conc.	ปริมาตรที่ pipette	Spiked sample conc. (µg/kg)		
(ng/mL)	(µL)	Spinosyn A	Spinosyn D	Spinosad
10	50	0.42	0.08	0.5
10	100	0.84	0.16	1
100	50	4.2	0.8	5
100	100	8.4	1.6	10
100	150	12.6	2.4	15
100	200	16.8	3.2	20
100	400	33.6	6.4	40
1000	60	50.4	9.6	60
1000	80	67.2	12.8	80
1000	100	84	16	100
2000	500	840	160	1000
2000	750	1260	240	1500

ผลและวิจารณ์

1. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

1.1 สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง LC-MS/MS

สภาวะของ MS ที่ได้จากการฉีดสารละลายมาตรฐาน spinosad (spinosyn A และ D) เข้าโดยตรงที่แหล่งกำเนิดไอออน เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับทำให้ precursor ion มี intensity สูง ตามตารางที่ 6 และสภาวะของ mass transition โดยให้โหมด MRM ตามตารางที่ 7 พบว่าสาร spinosyn A ใช้ precursor ที่ 732.5 m/z และ product ion เท่ากับ 97, 98 (qualification) และ 142 (quantification) m/z ส่วน spinosyn D ใช้ precursor ที่ 746.5 m/z และ product ion เท่ากับ 98, 99 (qualification) และ 142 (quantification) m/z ทั้งนี้ในส่วนของเครื่อง MS ควรระมัดระวังการตั้งค่าอุณหภูมิของแหล่งกำเนิดไอออน (ion source) และส่วนที่เกี่ยวข้องไม่ควรตั้งค่าสูงเกินไป เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงแม้จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการระเหยของตัวทำละลาย แต่การใช้งานในระยะยาวอาจส่งผลต่อความเสถียรและอายุการใช้งานของอุปกรณ์ภายในเครื่องได้ ดังนั้นการตั้งค่าอุณหภูมิควรอยู่ในระดับที่เหมาะสมเพียงพอให้สารละลายสามารถระเหยและเปลี่ยนเป็นไอได้อย่างสมบูรณ์ โดยไม่หลงเหลือเป็นหยดของเหลวภายในบริเวณแหล่งกำเนิดไอออน ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญของกระบวนการแตกตัวเป็นไอออน (ionization) ใน LC-MS/MS และการวิเคราะห์ในโหมด MRM จะทำการเลือก precursor ion จาก quadrupole แรก (Q1) ที่ให้ค่าสัญญาณสูงที่สุด จากนั้นทำให้เกิดการแตกตัวใน collision cell (Q2) และเลือก product ion ใน quadrupole ที่สอง (Q3) ซึ่งเป็นไอออนที่มีความจำเพาะต่อสารวิเคราะห์ โดยทั่วไปจะเลือก product ion อย่างน้อย 2–3

ไอออน เพื่อเพิ่มความจำเพาะของวิธี โดยกำหนดให้ไอออนที่มีความเข้มสูงสุดเป็น quantifier ion สำหรับการหาปริมาณ และไอออนรองเป็น qualifier ion สำหรับการยืนยันชนิดของสาร (Grebe and Singh, 2011)

ตารางที่ 6 ESI parameter เครื่อง LC-MS/MS (triple quadrupole)

Parameters	Value
Ionization mode	Positive
Spray voltage (V)	3500
Sheath gas pressure (Arb)	38
Auxiliary gas pressure (Arb)	11
Ion transfer tube temperature (^{O}C)	300
Vaporizer temperature (^{O}C)	280

ตารางที่ 7 ค่า RT และค่า MRM transition ของสาร spinosad ที่ตรวจวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS

Compound	Precursor Ion	Product Ion	RF Lens (V)	CE (V)	RT (min)	Polarity
Spinosyn A	732.5	97*	201	40	4.47	Positive
		98*	201	43		
		142**	201	27		
Spinosyn D	746.5	98*	197	44	4.92	Positive
		99*	197	39		
		142**	197	27		

หมายเหตุ : * = qualification, ** = quantification

ส่วนสภาวะการทำงานของ LC เมื่อใช้คอลัมน์ HPLC ชนิด Inertsil ODS-3 (2.1 × 150 mm, 3 µm) อุณหภูมิของ column oven ที่ 35 ℃ โดย mobile phase ประกอบด้วย A : 0.1% formic acid ใน DI water และ B: 0.1% formic acid ใน ACN ทำการชะสารแบบ gradient elution นั้น พบว่าสามารถแยกสาร spinosyn A, D และระบุค่า RT ชัดเจน ซึ่งการเติม formic acid ที่ความเข้มข้น 0.1% ลงใน mobile phase มีบทบาทสำคัญในการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเกิดไอออนของสารในแหล่งกำเนิดไอออน โดยเฉพาะในระบบ electrospray ionization (ESI) ส่งผลให้ความไวของการตรวจวิเคราะห์เพิ่มขึ้น นอกจากนี้อัตราการไหลของ mobile phase ยังเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อประสิทธิภาพของการแยกและความไวของการตรวจวิเคราะห์ โดยอัตราการไหลต่ำจะทำให้ระยะเวลาในการวิเคราะห์เพิ่มขึ้น ขณะที่อัตราการไหลสูงแม้จะช่วยลดเวลาในการวิเคราะห์ แต่จะทำให้เกิดแรงดันภายในคอลัมน์สูงขึ้น ซึ่งอาจส่งผลต่ออายุการใช้งานของคอลัมน์ รวมถึงลดประสิทธิภาพของการระเหยของละอองสารในแหล่งกำเนิดไอออน ส่งผลให้ความไวของสัญญาณลดลง (Kebarle and Verkerk, 2009) จากการศึกษานี้พบว่าอัตราการไหลของ mobile phase ที่

0.20 mL/min เป็นสภาวะที่เหมาะสม โดยให้ความไวของสัญญาณที่ดีและสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ชัดเจนภายในเวลา 12 นาทีต่อตัวอย่าง

1.2 ค่า instrument detection limit

จากการวิเคราะห์สาร spinosad ที่ความเข้มข้น 0.25 ng/mL ด้วยเครื่อง LC-MS/MS พบว่า S/N เฉลี่ยของแต่ละสาร spinosyn A และ spinosyn D มีค่า 381.44 และ 152.48 ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าเกณฑ์ที่กำหนด ดังนั้นความเข้มข้นข้างต้นสามารถนำมาใช้ตรวจสอบความไวของเครื่องวิเคราะห์ในการควบคุมคุณภาพภายในของห้องปฏิบัติการในงานทดสอบได้

1.3 การทดสอบประสิทธิภาพของวิธีการสกัดตัวอย่าง

จากการสกัด SP และ clean up ไขมันไก่ที่มีสาร spinosad ความเข้มข้น 5 µg/kg ตามวิธีที่ 1-4 วิธีละ 6 ซ้ำ นำค่าความเข้มข้นที่อ่านได้จาก SSC ไปคำนวณค่า %MR และ %RSD ได้ดังตารางที่ 8 พบว่าวิธีการสกัดตัวอย่างและ clean-up วิธีที่ 1, 2 และ 4 ได้ค่า %MR อยู่ในช่วง 70-120% และทุกวิธี %RSD ไม่เกิน 20% ด้วยจากการใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง Hex:DCM (6:4) ในการสกัดสาร spinosad จากเมทริกซ์ที่มีไขมัน อาศัยความแตกต่างของความมีขั้วของสารและตัวทำละลาย โดย spinosad มีคุณสมบัติกึ่งมีขั้ว (amphiphilic) เนื่องจากมีทั้งหมู่ฟังก์ชันที่มีขั้ว เช่น hydroxyl และ ester นอกจากนี้ยังมีโครงสร้างที่ไม่มีขั้วขนาดใหญ่ (macrolide) ขณะที่ hexane ซึ่งเป็นตัวทำละลายไม่มีขั้วสามารถละลายไขมันได้ดี และในขณะเดียวกัน DCM ซึ่งมีความเป็นขั้วปานกลางสามารถละลาย spinosad ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และช่วยดึงสารออกจากเมทริกซ์ไขมันเข้าสู่เฟสอินทรีย์ ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด (Hamilton and Crossley, 2004) นอกจากนี้การเติม ACN แล้วเขย่าจนเกิดการแยกชั้นมีบทบาทสำคัญในการลดปริมาณไขมันและสารรบกวนที่ถูกสกัดร่วม (co-extracted lipids) โดย ACN ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วปานกลางสามารถช่วยแยกสารวิเคราะห์ออกจากเมทริกซ์ไขมันร่วมกับ DCM ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงช่วยลดการรบกวนจากเมทริกซ์และเพิ่มความแม่นยำของการวิเคราะห์ (Niessen, 2006) ส่วนขั้นตอนการระเหยแห้งและการละลายกลับในวิธีที่ 1 และ 2 ยังช่วยเพิ่มความเข้มข้นของสารวิเคราะห์และเพิ่มความไวในการตรวจวิเคราะห์ นอกจากนี้การ clean-up ด้วย SPE ชนิด silica ซึ่งมีสมบัติเป็นสารดูดซับที่มีขั้ว สามารถกักเก็บสารที่มีคุณสมบัติกึ่งมีขั้ว เช่น spinosad ได้ และปล่อยสารที่มีคุณสมบัติไม่มีขั้ว เช่น ไขมันจะถูกชะออกมา ส่งผลให้ลดการรบกวนจากเมทริกซ์และเพิ่มความจำเพาะของวิธี (Poole, 2003)

วิธีที่ 1 เป็นวิธีที่ใช้ปริมาตรตัวทำละลายมากและมีขั้นตอนการสกัดซ้ำ (re-extraction) ทำให้มีประสิทธิภาพในการสกัดที่สูงกว่า เนื่องจากช่วยเพิ่มการกระจายตัวของสาร (analyte partitioning) และลดการคงค้างของสารในเฟสไขมัน ในขณะที่วิธีที่ 2 ใช้ปริมาตรตัวทำละลายน้อยลง ส่งผลให้ประสิทธิภาพการสกัดลดลงเล็กน้อย แต่ยังคงให้ค่า %MR อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ส่วนวิธีที่ 3 มีการใช้ปริมาณตัวทำละลายสกัดเหมือนวิธีที่ 2 แต่มีการสกัดเพียงครั้งเดียว นอกจากนี้ยังไม่มีขั้นตอนการระเหยแห้งและการละลายกลับ ทำให้ได้ปริมาณของสารวิเคราะห์ต่ำและมีสารรบกวนจากเมทริกซ์สูง ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ค่า %MR ต่ำกว่าเกณฑ์ที่กำหนด (Snyder *et al.,* 2010) สำหรับวิธีที่ 4 ใช้

เพียงตัวทำละลายผสม Hex:DCM โดยไม่มีขั้นตอนการสกัดของเหลว-ของเหลว (liquid-liquid extraction) ซึ่งอาศัยหลักการละลายของสารในของเหลวสองชนิดที่ไม่ละลายหรือเข้ากันไม่ได้จึงไม่มีการสกัดสาร spinosyn A และ spinosyn D ไปอยู่ใน ACN และแยกชั้น ACN ออกมา ดังวิธีที่ 1, 2 และ 3 แต่อาศัยหลักการสกัดด้วยทำละลายอินทรีย์ (solvent extraction) ซึ่งเกิดจากการซึมผ่านของตัวทำละลายเข้าสู่เมทริกซ์ตัวอย่าง (solvent penetration) และการถ่ายเทมวล (mass transfer) ของสารวิเคราะห์จากเมทริกซ์ไปยังเฟสตัวทำละลาย โดยการเขย่าช่วยเพิ่มพื้นที่สัมผัสระหว่างตัวทำละลายและเมทริกซ์ ส่งผลให้การแพร่และการเคลื่อนย้ายของสารวิเคราะห์เกิดขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Dean, 2009; Harris, 2020) ทั้งนี้กระบวนการลักษณะนี้ ทำให้มีสารรบกวน เช่น phospholipids, triglycerides และสารประกอบไขมันอื่นร่วมออกมาด้วย แต่การพัฒนาวิธีสามารถกำจัดสิ่งรบกวนเหล่านี้ด้วยขั้นตอน clean-up โดยใช้ SPE ชนิด silica นอกจากนี้การตรวจวัดสารด้วยเทคนิค LC–MS/MS ซึ่งเป็นเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารในเมทริกซ์ที่มีความซับซ้อนสูง ซึ่งในขั้นตอน liquid chromatograph (LC) คอลัมน์โครมาโทกราฟีและตัวทำละลายเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) มีบทบาทสำคัญในการแยกสาร spinosad โดยอาศัยความแตกต่างของคุณสมบัติทางเคมี เช่น ความมีขั้วและปฏิสัมพันธ์ระหว่างสารกับเฟสคงที่ (stationary phase) ภายในคอลัมน์ การแยกสารก่อนเข้าสู่ระบบตรวจวัดช่วยลดการเกิด co-elution ของสารรบกวนร่วมกับสารเป้าหมาย ซึ่งช่วยลดผลกระทบเมทริกซ์และเพิ่มประสิทธิภาพของการทำให้เป็นไอออนของสารที่ต้องการวิเคราะห์ในระบบ MS (Taylor, 2005; Ghosh *et al.,* 2012) หลังจากขั้นตอนการแยกด้วย LC แล้ว สารจะเข้าสู่ระบบ tandem mass spectrometry ซึ่งนิยมใช้ electrospray ionization (ESI) เปลี่ยนสารให้อยู่ในรูปไอออนที่สามารถตรวจสอบ precursor ion และ product ion ที่จำเพาะต่อ spinosyn A และ spinosyn D ได้ (Niessen, 2017) การใช้ triple quadrupole mass spectrometry ในโหมด MRM ช่วยเพิ่มความจำเพาะและความไวของการวิเคราะห์ เนื่องจากส่วน MS จะติดตามเฉพาะ transition ของสารเป้าหมาย ส่งผลให้ลดสัญญาณรบกวนจากสารอื่นและเพิ่มความถูกต้องของการวิเคราะห์ในเมทริกซ์ไขมันที่มีความซับซ้อนสูง (Niessen, 2017) เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ West and Turner (1998) ในการวิเคราะห์สาร spinosad ในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ได้แก่ เนื้อสัตว์ ตับ ไต ไขมัน ไข่ นม และครีม ด้วยเทคนิค HPLC-UV ซึ่งเป็นเทคนิคตรวจวัดที่มีความจำเพาะต่ำ จึงมีสารรบกวนจากเมทริกซ์ เช่น ไขมันและรงควัตถุ ที่ให้สัญญาณทับซ้อนกับสารวิเคราะห์ได้ง่าย จึงจำเป็นต้องมีการสกัดและการกำจัดสารรบกวนอย่างเข้มงวดผ่านหลายขั้นตอน เช่น การสกัดแบบของเหลว–ของเหลว และการ clean-up ด้วย SPE ชนิด silica และ cyclohexyl ดังนั้น การใช้เทคนิค LC-MS/MS โดยอาศัยการทำงานร่วมกันระหว่างระบบ LC ที่ช่วยแยกสารและระบบ MS/MS ที่ช่วยตรวจวัดอย่างจำเพาะ (Shen *et al.,* 2005) มีความเหมาะสมอย่างยิ่งในการวิเคราะห์สาร spinosad ในไขมันไก่ได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และเชื่อถือได้ นอกจากนี้เทคนิคดังกล่าวยังช่วยลดปริมาณของตัวอย่างรวมถึงลดขั้นตอนการสกัดและการ clean-up สาร

สกัดที่ซับซ้อนลง (Schwedler *et al.,* 2000) จึงเป็นการช่วยลดการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์และลดโอกาสการสูญเสียสารวิเคราะห์ระหว่างขั้นตอนต่าง ๆ ได้

โดยสรุปวิธีที่ 1, 2 และ 4 แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพที่เหมาะสมสำหรับการสกัดตัวอย่างวิเคราะห์ spinosad ในไขมันไก่ แม้ว่าวิธีที่ 1 จะให้ประสิทธิภาพในการสกัดสูงที่สุด และวิธีที่ 2 ที่ได้ %MR เป็นไปตามเกณฑ์ แต่ในการประยุกต์ใช้ในงานวิเคราะห์ประจำ ได้มีการพิจารณาปัจจัยด้านความสะดวก ความรวดเร็ว และการใช้สารเคมีร่วมด้วย ซึ่งพบว่าวิธีที่ 4 มีความเหมาะสมมากกว่า เนื่องจากมีขั้นตอนการสกัดที่สั้นกว่า ทำให้ใช้ปริมาณตัวทำละลายและระยะเวลาในการสกัดน้อยกว่าวิธีที่ 1, 2 ดังนั้นวิธีที่ 4 จึงถูกเลือกเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ spinosad ในไขมันไก่

ตารางที่ 8 %MR และ %RSD ของผลการทดสอบ spiked sample ความเข้มข้น 5 µg/kg วิธีการสกัดและการ clean-up ตัวอย่าง 4 วิธี

Method	Compound Name					
	Spinosyn A		Spinosyn D		Spinosad	
	%MR	%RSD	%MR	%RSD	%MR	%RSD
1	80.45	3.79	85.46	2.96	81.25	3.56
2	74.97	8.07	82.07	8.93	76.11	8.19
3	59.71	1.35	58.96	1.41	59.59	1.29
4	78.56	6.88	90.38	8.35	80.45	7.10

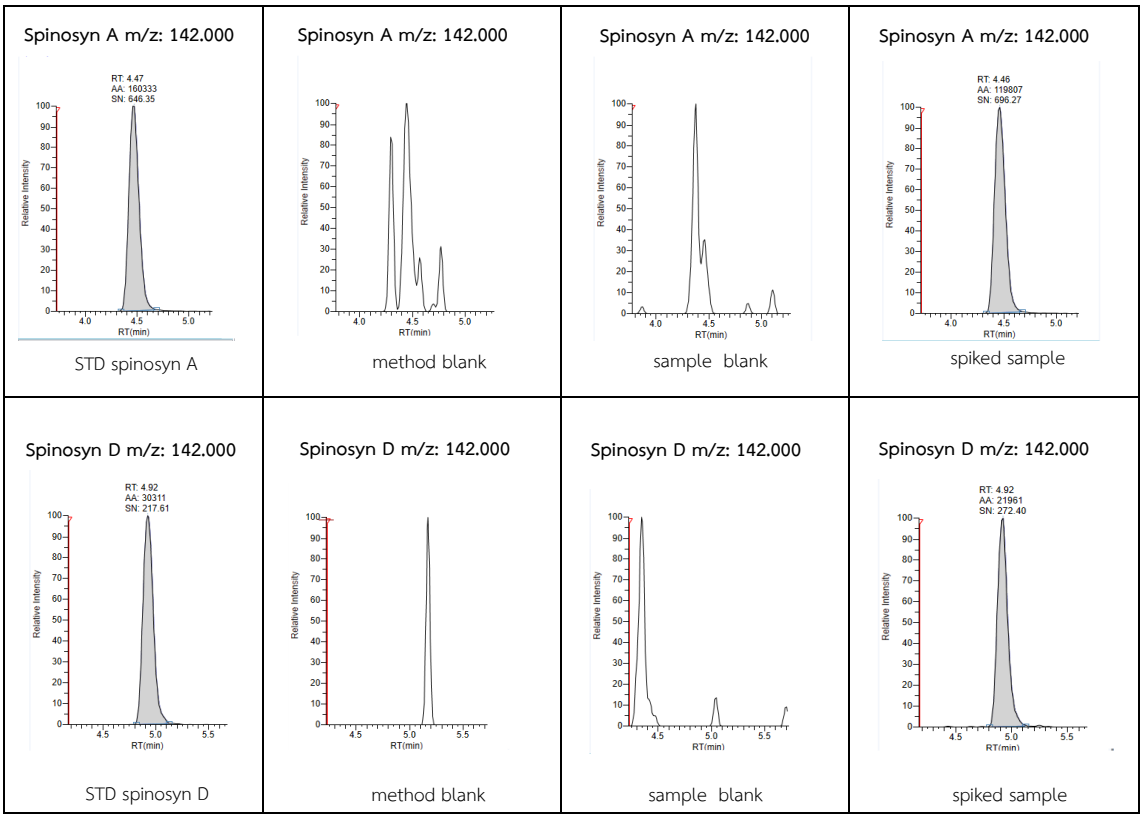
2. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

2.1 ความจำเพาะเจาะจงของสารที่ทดสอบ (specificity)

ผลการวิเคราะห์ MB, SB และ SP ที่มีความเข้มข้นของสาร spinosad 1 µg/kg (spinosyn A = 0.84 µg/kg และ spinosyn D = 0.16 µg/kg) เทียบกับสารมาตรฐาน spinosad ความเข้มข้น 0.5 ng/mL (spinosyn A = 0.42 ng/mL และ spinosyn D = 0.08 ng/mL) โดยใช้สภาวะของเครื่อง LC-MS/MS ที่สภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 4.1 พบว่า MB และ SB ไม่พบสารรบกวนที่ให้พีคสารและมวลต่อประจุตรงกันกับพีคสารมาตรฐาน สำหรับ SP เมื่อเทียบกับ RT กับสารมาตรฐาน ค่า RT ของสารต่างกันไม่เกิน ±0.1 นาที และ ion ratio ไม่เกิน 30% ได้ผลแสดงตามตารางที่ 9 ตามเกณฑ์ของ SANTE 11312/2021 v2026 (European Commission, 2026) ซึ่งการทดสอบสารพิษตกค้าง spinosad ในไขมันไก่ด้วยเทคนิค LC-MS/MS นี้เป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะ สามารถแยกชนิดของสาร spinosad แต่ละชนิดออกจากสัญญาณรบกวนได้ โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน MB SB และ SP ของสาร spinosyn A และ D แสดงตามภาพที่ 2

ตารางที่ 9 ค่า retention time และ ion ratio ของ spinosyn A และ D

Compound	RT STD (min)	RT spiked sample (min)	ความแตกต่างของ	
			RT (min)	Ion ratio (%)
Spinosyn A	4.47	4.46	0.01	16.14
Spinosyn D	4.92	4.92	0	16.06

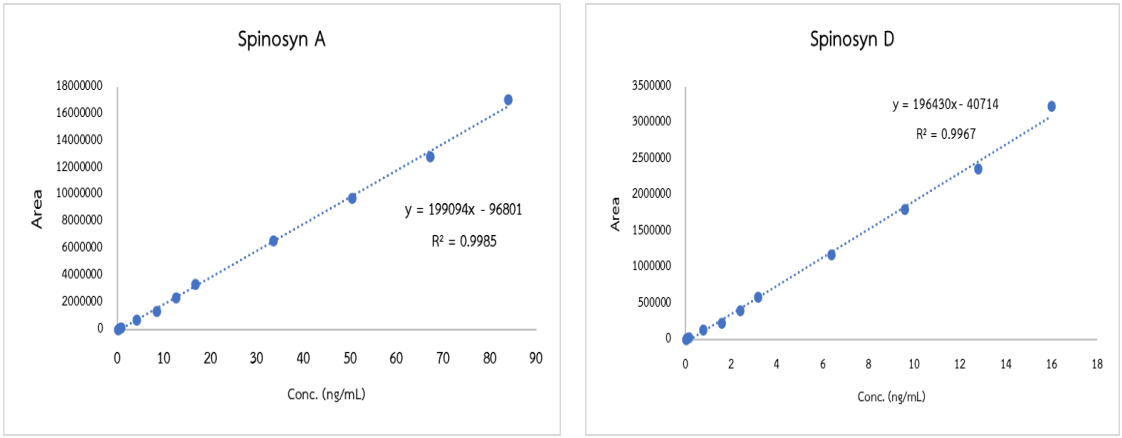


ภาพที่ 2 Extract ion chromatogram ของ MB, SB และ SP เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน spinosyn A ที่ความเข้มข้น 0.84 ng/mL และ spinosyn D ที่ความเข้มข้น 0.16 ng/mL

2.2. ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (linearity of calibration curve)

ผลการวิเคราะห์ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของ spinosad ในช่วงความเข้มข้น 0.25–100 ng/mL (spinosyn A = 0.21–84 ng/mL และ spinosyn D = 0.04–16 ng/mL ตามลำดับ) พบว่า ค่า r^2 ของ spinosyn A และ spinosyn D เท่ากับ 0.9985 และ 0.9967 ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่า 0.990 เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดโดย U.S. Food and Drug Administration (2023) ดังภาพที่ 3 และ %deviation of back-calculated concentration คลาดเคลื่อนไม่เกิน $\pm$ 20% ตามเกณฑ์ของ SANTE 11312/2021 v2026 (European Commission, 2026) ดังตารางที่ 10 แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์มีความเป็นเชิงเส้นที่ดีในช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา อย่างไรก็ตาม เนื่องจากสหภาพยุโรปได้กำหนดค่า MRL ของ spinosad ในไขมันสัตว์ปีกไว้ที่ 1 mg/kg (European Commission, 2022) ซึ่งเป็นค่าที่สูงมากในตัวอย่าง การฉีดสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นสูง (เช่น

1 mg/L) เข้าเครื่อง LC–MS/MS ที่มีความไวสูง ทำให้เกิดการตกค้างของสารในระบบ (carry-over) และปรากฏการณ์การกดสัญญาณไอออน (ion suppression) ได้ เมื่อวัดสัญญาณสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่ำ เช่น 1 ส่วนในพันล้านส่วน (parts per billion, ppb) จนถึงระดับสูงสาร เช่น 1 ส่วนในล้านส่วน (parts per million, ppm) อาจก่อให้เกิดการตอบสนองที่ไม่เป็นเชิงเส้น (non-linear response) ซึ่งจะทำให้การวิเคราะห์ความเข้มข้นในตัวอย่างไม่ถูกต้อง ดังนั้นการเจือจางความเข้มข้นของสารในกราฟมาตรฐานและตัวอย่างให้มีความเหมาะสม จึงมีความสำคัญ เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ รวมถึงช่วยยืดอายุการใช้งานของเครื่องมือ (Niessen, 2006)



(a) (b)

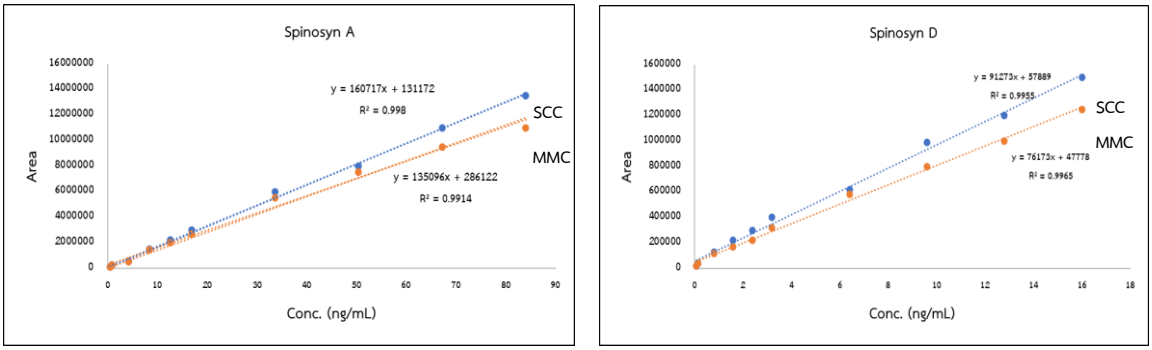
ภาพที่ 3 Calibration curve ของสารมาตรฐาน (a) spinosyn A ที่ระดับความเข้มข้น 0.21-84 ng/mL และ (b) spinosyn D ที่ระดับความเข้มข้น 0.04-16 ng/mL

ตารางที่ 10 ค่า deviation of back-calculated concentration (%) ของกราฟมาตรฐาน spinosyn A และ D

Conc. (ng/mL)		Deviation of back-calculated concentration (%)	
Spinosyn A	Spinosyn D	Spinosyn A	Spinosyn D
0.21	0.04	14.15	-17.56
0.42	0.08	9.55	-8.78
0.84	0.16	1.08	-13.15
4.2	0.8	11.28	-6.75
8.4	1.6	18.92	10.95
12.6	2.4	0.38	-0.74
16.8	3.2	2.13	4.55
33.6	6.4	-5.33	4.03
50.4	9.6	-4.06	-2.06
67.2	12.8	-2.73	-3.86
84	16	3.74	2.31

2.3. ผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect)

ผลการวิเคราะห์ matrix effect ของสาร spinosad ซึ่งสกัดด้วยวิธีที่ 4 แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS สร้างกราฟเส้นตรงของ MMC เปรียบเทียบกับ SSC ได้ดังภาพที่ 4 คำนวณค่า %ME ของ spinosyn A และ D ได้เท่ากับ -15.94 และ -16.54 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับคือ ค่า %ME ต้องน้อยกว่า $\pm$ 20% ตามเกณฑ์ SANTE 11312/2021 v2026 (European Commission, 2026) แสดงว่า เมทริกซ์ตัวอย่างไขมันไม่มีผลกระทบต่อการทดสอบ spinosad ในไขมันไก่ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ดังนั้นจึงเลือกใช้กราฟมาตรฐานแบบ SSC ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี



(a) **(b)**

ภาพที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง spinosyn A (a) และ spinosyn D (b) ที่เตรียมใน SSC และ MCC

2.4 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ (LOQ)

ผลการวิเคราะห์สาร SP ที่ระดับความเข้มข้น 1 µg/kg ถูกนำมาคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) จากนั้นนำค่า SD ไปคำนวณตามสมการที่กำหนดในแนวทางของ Eurachem (2025) เพื่อประเมินค่า LOD และ LOQ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.20 และ 0.50 µg/kg ตามลำดับ ดังตารางที่ 11

ผลการวิเคราะห์ค่า LOD ของ spinosad ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 µg/kg (spinosyn A = 0.168 µg/kg และ spinosyn D = 0.032 µg/kg) พบค่า S/N (เฉลี่ย) ของ spinosyn A เท่ากับ 233.71 และ spinosyn D เท่ากับ 106.95 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ S/N มากกว่า 3 และค่า LOQ ของ spinosad ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 µg/kg (spinosyn A = 0.42 µg/kg และ spinosyn D = 0.08 µg/kg) พบว่า %RSD ของการทดสอบ spinosad เท่ากับ 8.41% (spinosyn A = 8.49% และ spinosyn D = 8.17%) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ %RSD ไม่เกิน 20% และพิจารณาความแม่นของผลการทดสอบ ได้ค่า %MR ของ spinosad เท่ากับ 80.06% (spinosyn A = 80.00% และ

spinosyn D = 80.38%) ตามตารางที่ 11 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับอยู่ระหว่าง 70-120 % ตามเกณฑ์ SANTE 11312/2021 v2026 (European Commission, 2026)

ผลการศึกษาค่า LOD แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีความไว (sensitivity) สูง โดยสามารถตรวจวัดสาร spinosad ได้ตั้งแต่ 0.2 µg/kg ซึ่งมีความไวสูงกว่าการศึกษาของ West and Turner (1998) ที่มีค่า LOD ของ spinosad (spinosyn A และ D) ในไขมันไก่ โดยใช้เทคนิค HPLC-UV เท่ากับ 0.004 µg/g (4 µg/kg)

สำหรับค่า LOQ ของสาร spinosad ที่ได้นี้ (0.5 µg/kg) มีค่าน้อยกว่า default MRL (0.01 mg/kg) และ MRL (1 mg/kg) ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ SANTE 11312/2021 v2026 (European Commission, 2026) บ่งชี้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์ผลเชิงปริมาณได้ เนื่องจากผ่านเกณฑ์การทดสอบทั้งค่าความแม่นและความเที่ยง

ตารางที่ 11 ผลการทดสอบ spiked sample สาร spinosad เพื่อหาค่า LOD และ LOQ

Compound	1.00 µg/kg (n=10)			LOD (0.2 µg/kg, n=10)	LOQ (0.5 µg/kg, n=10)	
	SD	Estimated LOD (3 S'_0)	Estimated LOQ (10 S'_0)	S/N	%MR	%RSD_r
Spinosyn A	0.04	0.12	0.41	233.71	80.00	8.49
Spinosyn D	0.01	0.03	0.11	106.95	80.38	8.17
Spinosad	0.05	0.15	0.50	-	80.06	8.41

2.5 ความแม่น (accuracy) และความเที่ยง (precision) ของวิธีวิเคราะห์

ในการวิเคราะห์ผลการประเมินความแม่นและความเที่ยงของตัวอย่าง SP ที่ความเข้มข้น 1000 และ 1500 µg/kg ต้องทำการเจือจางตัวอย่าง 20 เท่า ซึ่งจะได้ความเข้มข้นสารสกัดเป็น 50 และ 75 ng/mL เพื่อให้การวิเคราะห์อยู่ในช่วงความเข้มข้นของกราฟมาตรฐานที่เป็นเส้นตรงของสาร spinosad (0.25–100 ng/mL)

ผลการวิเคราะห์ความแม่นและความเที่ยงแบบทวนซ้ำได้ (repeatability) ของสาร spinosad ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 1000 และ 1500 µg/kg พบว่า %MR อยู่ในช่วง 73.76-111.06% และ %RSD_r อยู่ในช่วง 2.68-10.37% สำหรับความแม่นและความเที่ยงแบบทำซ้ำได้ (within-laboratory reproducibility) ของสาร spinosad ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 10, 20, 1000 และ 1500 µg/kg พบว่า %MR อยู่ในช่วง 79.16-103.70% และ %RSD_{wR} อยู่ในช่วง 6.61-12.80% ตามตารางที่ 12 ผลการทดสอบความแม่น ความเที่ยงแบบทวนซ้ำได้และทำซ้ำได้ มีค่า %MR อยู่ในเกณฑ์ 70-120% และค่า %RSD_r และ %RSD_{wR} มีค่าไม่เกิน 20% เป็นไปตามเกณฑ์ของ SANTE 11312/2021 v2026 (European Commission, 2026) และแสดงว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นได้ ผลวิเคราะห์มี

ความแม่นและความเที่ยงที่ดีตั้งแต่ 0.5 (LOQ) –1500 µg/kg (spinosyn A = 0.42–1260 µg/kg และ spinosyn D = 0.08–240 µg/kg ตามลำดับ)

เมื่อเปรียบเทียบผลที่ได้จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นกับการศึกษาของ Ueno *et al.* (2011) ซึ่งใช้ porous diatomaceous earth column chromatography ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เครื่องในสัตว์ ไขมันสัตว์ อาหารทะเล นม ไข่ และน้ำผึ้ง ได้ %MR ของ spinosyn A และ D ที่ความเข้มข้น 10 และ 50 µg/kg อยู่ในช่วง 82.0-104.1% และค่า %RSD อยู่ในช่วง 1.4-8.7% กับการศึกษาของ Rahman *et al.* (2020) เมื่อสกัดตัวอย่างอกไก่ สุกร ไข่ และนมด้วยวิธี MWCNTs ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS พบว่าได้ %MR ของ spinosyn A และ D ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 100 µg/kg อยู่ในช่วง 74-104% และ %RSD มีค่าน้อยกว่า 9.68% ซึ่งจะเห็นได้ว่าวิธีที่ทำการพัฒนาขึ้นนั้น แสดงถึงประสิทธิภาพที่ดีกว่าเนื่องจากสามารถทดสอบตัวอย่างได้ที่ช่วงความเข้มข้นกว้างกว่า

ตารางที่ 12 ค่า %MR, $\%RSD_r$ และ $\%RSD_{wR}$ ของสาร Spinosyn A, D และ Spinosad

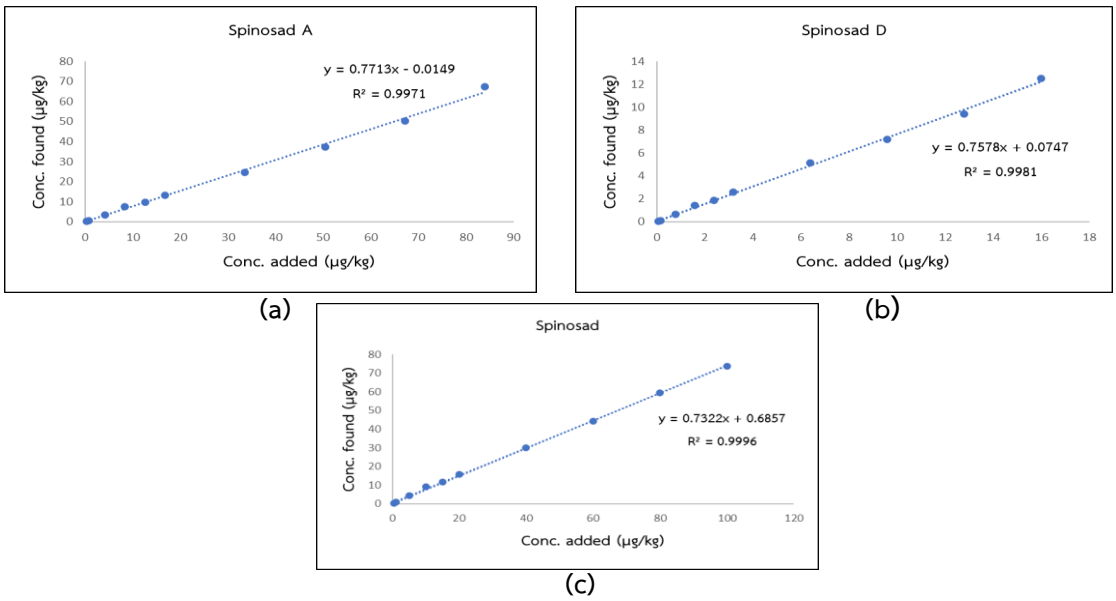
Compound	Spiked conc (µg/kg)	Accuracy/Repeatability				Accuracy/Within-laboratory reproducibility (n=10)	
		Day 1 (n=5)		Day 2 (n=5)			
		%MR	RSD_r (%)	%MR	RSD_r (%)	%MR	RSD_{wR} (%)
Spinosyn A	0.42 (LOQ)	77.67	4.67	82.33	10.66	85.71	11.46
	0.84	73.42	5.87	78.17	6.67	-	-
	4.2	82.03	4.69	88.74	8.84	-	-
	8.4	92.06	5.28	100.00	2.81	84.88	9.69
	12.6	74.87	2.66	79.77	4.97	-	-
	16.8	78.77	4.38	78.61	4.45	79.58	6.73
	840	74.73	2.69	75.99	7.08	74.29	9.84
	1260	110.25	3.96	88.53	8.70	100.99	14.42
Spinosyn D	0.08 (LOQ)	77.50	5.93	83.25	8.92	82.88	9.16
	0.16	75.50	6.41	86.25	4.99	-	-
	0.8	76.90	5.23	84.33	10.84	-	-
	1.6	89.04	5.22	88.04	2.71	79.38	13.19
	2.4	74.64	3.28	81.76	3.73	-	-
	3.2	80.65	4.26	82.63	8.79	76.88	10.01
	160	77.37	3.33	79.00	9.43	84.90	10.10
	240	115.32	4.60	108.27	9.29	114.02	8.84

ตารางที่ 12 (ต่อ) ค่า %MR, $\%RSD_r$ และ $\%RSD_{wR}$ ของสาร Spinosyn A, D และ Spinosad

	0.5 (LOQ)	77.64	4.86	82.48	10.37	86.00	11.03
	1	73.76	5.75	79.46	6.27	-	-
	5	81.21	4.75	88.04	9.13	-	-
Spinosad	10	91.58	5.26	90.52	2.77	84.10	10.20
	15	74.83	2.68	80.09	4.51	-	-
	20	79.07	4.31	79.25	5.16	79.16	6.61
	1000	75.15	2.78	77.38	9.89	80.81	9.87
	1500	111.06	4.07	92.60	4.53	103.70	12.80

2.6 ความเป็นเส้นตรงช่วงการใช้งานของวิธีวิเคราะห์ (linearity of working range)

จากการศึกษาความแม่นและความเที่ยงของตัวอย่าง SP ที่ความเข้มข้นของสาร spinosad 1000 และ 1500 µg/kg เพื่อให้ความเข้มข้นของสารสกัดอยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ในการตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของช่วงการใช้งานของวิธีวิเคราะห์สาร spinosad จึงตรวจสอบที่ช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ LOQ (0.5) –100 µg/kg (spinosyn A = 0.42–84 µg/kg และ spinosyn D = 0.08–16 µg/kg ตามลำดับ) พบว่าค่า r^2 ของ spinosyn A และ spinosyn D เท่ากับ 0.9971 และ 0.9981 ตามลำดับ ซึ่งมีค่า $r^2 \geq 0.990$ เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดโดย U.S. Food and Drug Administration (2023) ดังภาพที่ 5 ดังนั้น ในกรณีที่ตรวจพบปริมาณสารมากกว่า 100 µg/kg ตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้น 1000 และ 1500 µg/kg ต้องทำการเจือจางตัวอย่าง เพื่อให้ความเข้มข้นอยู่ภายในช่วงที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ซึ่งเป็นแนวปฏิบัติมาตรฐานในการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วย LC–MS/MS (Niessen, 2006)



ภาพที่ 5 ช่วงความเป็นเส้นตรงของ working range ที่ความเข้มข้นของสาร (a) spinosyn A 0.42-84 µg/kg , (b) spinosyn D 0.08-16 µg/kg และ (c) spinosad 0.5-100 µg/kg

สรุปผล

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สาร spinosad ในไขมันไก่ พบว่าวิธีที่ 4 ซึ่งใช้ตัวทำละลาย Hex:DCM (6:4) แล้วทำการ clean-up ด้วย SPE ชนิด silica ที่ผ่านการปรับสภาวะอย่างเหมาะสม จากนั้นชะสารด้วย DCM:MeOH (75:25) ระเหยจนแห้ง และปรับปริมาตรด้วย 0.1% formic acid ใน DI water : 0.1% formic acid ใน ACN (60:40) ก่อนนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วย LC–MS/MS เป็นวิธีที่มีความรวดเร็ว ใช้ปริมาณสารเคมีน้อยกว่าวิธีที่ 1, 2, 3 และให้ค่า %MR อยู่ในช่วง 70–120% ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีพบว่า spinosyn A และ spinosyn D มีค่า r^2 ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานเท่ากับ 0.9985 และ 0.9967 ตามลำดับ ค่า LOD และ LOQ มีค่าเท่ากับ 0.2 และ 0.5 µg/kg ตามลำดับ ช่วงวิเคราะห์ของ spinosad ที่มีความแม่นและความเที่ยงตั้งแต่ 0.5–1500 µg/kg โดยมีค่า %RSD ต่ำกว่า 20% และค่า %MR อยู่ในช่วง 70–120% โดยมีความเป็นเส้นตรงของช่วงการวิเคราะห์ตั้งแต่ 0.5–100 µg/kg ดังนั้นตัวอย่างที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 100 µg/kg สามารถเจือจางตัวอย่างก่อนวิเคราะห์เพื่อให้อยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานได้ ซึ่งผลการตรวจสอบทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความเหมาะสมสำหรับการเฝ้าระวังและควบคุมสารตกค้างของ spinosad ในไขมันไก่ เพื่อสนับสนุนความปลอดภัยอาหารและมาตรฐานการส่งออกผลิตภัณฑ์สัตว์ปีกของประเทศไทย

ข้อเสนอแนะ

นอกจากวิธีวิเคราะห์ที่ได้ผ่านการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้แล้ว ควรทำพารามิเตอร์อื่นๆ เพิ่มเติม ได้แก่ robustness โดยปรับอัตราส่วนของ Hex:DCM ปรับปริมาตรตัวทำละลายในขั้นตอนการ clean-up ปรับอุณหภูมิขั้นตอนการระเหยแห้ง และทดสอบต่างเครื่องมือวิเคราะห์ เพื่อตรวจสอบวิธีวิเคราะห์นี้คงตัวต่อความคลาดเคลื่อนเล็กน้อยในการทำงานจริงได้และให้ครอบคลุมเกณฑ์ SANTE 11312/2021 v2026 (European Commission, 2026) และประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด (uncertainty) เพื่อหาแหล่งความไม่แน่นอนจากปัจจัยต่างๆในการวัด ซึ่งในแต่ละระดับของการวัดจะเกิดความไม่แน่นอนของการวัดสะสมขึ้นเรื่อย ๆ ขึ้นอยู่กับความสามารถในการถ่ายทอดการวัดของแต่ละห้องปฏิบัติการ ความไม่แน่นอนอาจเกิดขึ้นจากหลายสาเหตุ จึงควรหาค่าความไม่แน่นอนของการวัด เพื่อให้ผลการทดสอบมีความแม่นยำมากยิ่งขึ้น และเพื่อให้สอดคล้องกับมาตรฐาน ISO/IEC 17025 สามารถใช้ในการขอรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการ ISO/IEC 17025 ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์จิรภัทร อินทร์สุข ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงาน นางสาววิภาดา สิริสมภพชัย ผู้เชี่ยวชาญด้านการวิเคราะห์คุณภาพสินค้าปศุสัตว์ นายสัตวแพทย์พิเชษฐ์ กุมภาว์ หัวหน้ากลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์และนายสราวุธ ชูกระชั้น หัวหน้ากลุ่มงานเคมีอาหาร สารตกค้าง และสารปนเปื้อนที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำ นายชัชวาลย์ โรจนทรัพย์ ที่ช่วยให้การศึกษาครั้งนี้สำเร็จได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

กรุงเทพธุรกิจ. 2568. ปศุสัตว์ นิวไฮ ส่งออกปี 67 ทะลุ 3.2 แสนล้านบาท กลุ่มเนื้อสัตว์ปีก นำโด่ง. แหล่งที่มา: https://www.bangkokbiznews.com/business/economic/1164617#google_vignette. [15 กรกฎาคม 2568].

กองส่งเสริมและพัฒนาการปศุสัตว์. 2566. แผนปฏิบัติการไก่เนื้อ ฉบับที่ 4 (พ.ศ. 2566-2570). กองส่งเสริมและพัฒนาการปศุสัตว์. กรมปศุสัตว์. หน้า 8.

กองอาหารสัตว์. 2538. วัตถุดิบอาหารสำหรับสุกรและสัตว์ปีก. กองอาหารสัตว์. กรมปศุสัตว์. หน้า 4.

สุดารัตน์ เจือจันทร์, สุนัยนา สท้านไตรภพ, ดำเนิน เสาะสืบงาม และชนนท์ สุยะหมุด. 2568. การทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์กำจัดแมลงต่อการสลบและการตายของตัวอ่อนและตัวเต็มวัยด้วงดำ Alphitobius diaperinus ที่เก็บจากฟาร์มเลี้ยงไก่. แหล่งที่มา: https://qcontrol.dld.go.th/images/stories/ejournal/ejournal201-2568/02.pdf. [1 สิงหาคม 2568].

Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Stajnbaher, D. and Schenck, F. J. 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, 86(2) : 412–431.

Dean, J. R. 2009. Extraction Techniques in Analytical Sciences. *Wiley.* 10: 95-130.

European Commission. 2005.Commission Implementing Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC Text with EEA relevance. *Official Journal of the European Union*. L 70/1–16.

European Commission. 2015. Commission Regulation (EU) 2015/603 of 13 April 2015 amending Annexes II, III and V to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for 2-naphthyloxyacetic acid, acetochlor, chloropicrin, diflufenican, flurprimidol, flutolanil and spinosad in or on certain products Text with EEA relevance *Official Journal of the European Union.* L 100/10–59.

European Commission. 2022. Annexes II, III and V to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for methoxyfenozide, propoxur, spinosad and thiram in or on certain products (Text with EEA relevance) Official Journal of the European Union. L 215/1–26.

European Commission. 2026. Analytical quality control and method validation 561 procedures for pesticide residues analysis in food and feed. SANTE 11312/2021 562 v2026). Supersedes Document No. SANTE/11312/2021. Implemented by 563 01/01/2026.

Grebe, S.K. and Singh, R.J. 2011. LC-MS/MS in the Clinical Laboratory – Where to From Here. *Clin Biochem*. 32(1):5–31.

Ghosh, C., Shinde, C. P., & Chakraborty, B. S. 2012. HybridSPE: A novel technique to reduce phospholipid-based matrix effect in LC–ESI-MS bioanalysis. *Bioanalysis*, 4(16), 2003–2025.

Hamilton, D. and Crossley, S. 2004. *Pesticide residues in food and drinking water: Human exposure and risks*. Chichester: John Wiley & Sons.

Harris, D. C., & Lucy, C. A. 2020. *Quantitative Chemical Analysis* (10th ed.). New York, NY: Macmillan Learning.

International Labour Organization and World Health Organization. 2004. Spinosad. [Online]. Available: https://chemicalsafety.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_card_id=1502&p_version =2&p_lang=th. Accessed July 15, 2025.

Kebarle, P. and Verkerk, U.H. 2009. Electrospray: From ions in solution to ions in the gas phase. *Mass Spectrometry Reviews*, 28, 898–917.

Martelli, F., Hernandes N.H., Zuo, Z., W, J., Wong, C.O., Karagas, N.E., Roessner, U., Rupasinghe, T., Robin, C., Venkatachalam, K., Perry, T., Batterham, P. and Bellen, H.J. 2022. Low doses of the organic insecticide spinosad trigger lysosomal defects, elevated ROS, lipid dysregulation, and neurodegeneration in flies. *eLife*. 2022;11:e73812.

Matuszewski, B.K., Constanzer, M.L. and Chavez, C.M. 2003. Matrix effect in quantitative LC–MS/MS analyses. *Analytical Chemistry.* 75(13), 3019–3030.

Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW). 2011. Maximum Residue Limits (MRLs) List of Agricultural Chemicals in Foods: Spinosad. Tokyo, Japan: Ministry of Health, Labour and Welfare. Available from: https://www.mhlw.go.jp/english/topics/ mrls/final/dl/mrls10-62.pdf. [Accessed 4 May 2026].

National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. 2016. National Food Safety Standard: Maximum Residue Limits for Pesticides in Food (GB 2763-2016). Beijing, China.

Niessen, W.M.A. 2006. Liquid Chromatography–Mass Spectrometry, 3rd ed. CRC Press, Boca Raton, FL.

Niessen, W. M. A. 2017. Interpretation of MS–MS Mass Spectra of Drugs and Pesticides. *Wiley.* 3: 1-40.

Poole, C. F. 2003. The essence of chromatography. *Elsevier Science*. 4: 267–429.

Rahman, M., Abd El-Aty, A.M., Ara, J., Park, J.H., Kim, M.R., Eun, J.B., Shin, H.C. and Shim, J.H. 2020. Quantification of spinosyn A and spinosyn D in animal-derived products using multiwalled carbon nanotubes coupled with LC–MS/MS for analysis. *Wiley analytical science*. 35:3.

Schwedler, D. A., Thomas, A. D. and Yeh, L. T. 2000. Determination of Spinosad and Its Metabolites in Food and Environmental Matrices. 2. Liquid Chomatography-Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem*. 48:5138–5145.

Shen, J. X., Motyka, R. J., Roach, J. P., & Hayes, R. N. (2005). Minimization of ion suppression in LC–MS/MS analysis through the application of strong cation exchange solid-phase extraction (SCX-SPE). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37(2), 359–367.

Singh, P. and Mazumdar, P. 2022. Microbial pesticides: trends, scope and adoption for plant and soil improvement. Bio-inoculant Science. 37-71.

Snyder, L. R., Kirkland, J. J., and Dolan, J. W. 2010. Introduction to Modern Liquid Chromatography (3rd ed.). *Wiley.* 5: 199–282.

Taylor, P. J. 2005. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry*, 38(4), 328–334.

Ueno, E., Ohno, H., Watanabe, M., Oshima, H., Mikami, E., Nemoto, S. and Matsuda, R. 2011. Analysis of spinosad in animal and fishery products by LC-MS. *Nationary of medicine*. 52 (6) : 330-5.

Ujvary, I. 2001. CHAPTER 3 - Pest Control Agents from Natural Products. *Hungarian Academy of Sciences.* 1:109-179.

U.S. Food and Drug Administration. 2023. ORA laboratory manual, Volume II: Methods, method verification and validation (ORA-LAB.5.4.5). *Office of Regulatory Affairs.* 3: 1-34.

West, S.D. and Turner, L.G. 1998. Determination of spinosad and its metabolites in meat, milk, cream, and eggs by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. J. *Agric. Food Chem*. 46(11):4620–4627.