เอกสารวิชาการ

เรื่องที่ 2

การพัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ยืนยันชนิดและปริมาณสารตกค้างยาปฏิชีวนะโคลิสตินในกล้ามเนื้อไก่ โดยเทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

โดย

อภิชญา สังข์ทอง

<u>พิชญา ไผทสิทธิ์</u>

เลขทะเบียนวิชาการ 62(2)-0404-086

สถานที่ดำเนินการ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

ระยะเวลาดำเนินการ มีนาคม 2561- กรกฎาคม 2562

การเผยแพร่ เว็บไซต์สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

http://qcontrol.dld.go.th/images/ejournal/ejournal%201-2563/06-ltcms.pdf

การพัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ยืนยันชนิดและปริมาณสารตกค้างยาปฏิชีวนะโคลิสตินในกล้ามเนื้อไก่ โดยเทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

<u>อภิชญา สังข์ทอง</u>[1] พิชญา ไผทสิทธิ์[1]

บทคัดย่อ

การพัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โคลิสตินในกล้ามเนื้อไก่ ได้ดำเนินการพัฒนาวิธีวิเคราะห์จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับตรวจวิเคราะห์โคลิสติน ได้แก่ ตัวทำละลาย การวัดมวลต่อประจุสำหรับเทคนิค LC-MS/MS และการเปรียบเทียบประสิทธิภาพขั้นตอนการสกัดด้วยคอลัมน์การแยกด้วยเฟสของแข็งชนิด Hydrophilic-Lipophilic Balance และ Weak Cation-Exchange ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าโคลิสตินละลายเป็นเนื้อเดียวกันในตัวทำละลายที่เป็นสารละลายผสมระหว่างอะซีโตไนไตรล์และน้ำขจัดไอออน อัตราส่วนต่อปริมาตร 1 ต่อ 4 โคลิสตินแตกตัวเป็นไอออนได้ดีในรูปประจุ 3+ ด้วยแหล่งกำเนิดแบบ Electrospray Ionization สำหรับเทคนิค LC-MS/MS และสารสกัดที่เหมาะสมคือสารละลายผสมระหว่างกรดไตรคลอโรอะซิติคและอะซีโตไนไตรล์ อัตราส่วนต่อปริมาตร 2 ต่อ 3 และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพขั้นตอนการสกัดด้วยคอลัมน์การแยกด้วยเฟสของแข็งพบว่าชนิด Weak Cation-Exchange สามารถแยกสารโคลิสตินและกำจัดสิ่งรบกวนในตัวอย่างได้ดีกว่า วิธีวิเคราะห์ที่ได้รับการพัฒนาขึ้นนี้ได้รับการยืนยันประสิทธิภาพโดยผ่านการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ที่ออกแบบและดำเนินการตามขั้นตอนของแนวมติคณะกรรมาธิการยุโรป Commission Decision 2002/657/EC สรุปได้ว่าการวิเคราะห์ยืนยันชนิดและปริมาณของสารตกค้างยาปฏิชีวนะโคลิสตินในกล้ามเนื้อไก่ สามารถวิเคราะห์แยกชนิดและระบุปริมาณยาสัตว์ตกค้างโคลิสตินเอและบีได้ ในช่วงความเข้มข้นของกราฟมาตรฐานที่มีความเป็นเส้นตรงของโคลิสตินรวม เท่ากับ 75-450 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และวิธีนี้มีความไวเพียงพอที่จะวัดปริมาณสารที่ระดับ 75 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมซึ่งเป็นปริมาณครึ่งหนึ่งของสารตกค้างสูงสุดที่อนุญาตให้มีได้ในกล้ามเนื้อไก่ โดยมีค่าเกณฑ์การตัดสินผลทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (CCα) เท่ากับ 165.4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ผลจากงานวิจัยนี้จึงสอดคล้องกับข้อกำหนดของสหภาพยุโรป และสามารถนำไปตรวจสารตกค้างยาปฏิชีวนะโคลิสตินในกล้ามเนื้อไก่ ตามแผนเฝ้าระวังสารตกค้างประจำปีของกรมปศุสัตว์ ตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

คำสำคัญ : การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ โคลิสติน กล้ามเนื้อไก่ LC-MS/MS

เลขทะเบียนวิชาการ : 62(2)-0404-086

[1]กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์

91 หมู่ 4 ถนนติวานนท์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000

Development and validation of confirmatory method of colistin in chicken muscle by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

Apichaya Sungthong[1] **Pichaya Phataisit**[1]

Abstract

Method development of confirmatory method of colistin or polymyxin E in chicken muscle was done by optimization of various factors including solvents, mass-per-charge (m/z) of colistin fragmentations and type of Solid-Phase Extraction between Hydrophilic-Lipophilic Balance and Weak Cation-Exchange. The results of method development showed that colistin dissolved well in mixture of acetonitrile and deionized water (1:4, volume by volume). Major fragmentations of molecule were founded in triply charged ions with Electrospray Ionization (ESI) on LC-MS/MS. Extraction solvent was mixture of trichloroacetic acid and acetonitrile (2:3, volume by volume). The best resolution of chromatogram was obtained by using WCX in Solid-Phase Extraction procedure. The developed method was ensured by method validation procedures of European Commission Decision 2002/657/EC on LC-MS/MS. The overall research showed that the method achieved the performance of identification and quantification of colistin A and colistin B in chicken muscle within the working range of calibration curve from 75 to 450 microgram per kilogram of sum colistin. It was sensitive enough to quantify concentration of compounds at 75 microgram per kilogram which is half of Maximum Residue Limit (MRL). The decision limit at 95 % confidence level was 165.4 microgram per kilogram of sum colistin. The accuracy and precision met criteria of Commission Decision 2002/657/EC. This research can be applied to national residue monitoring program of Department of Livestock Development for determination and quantitatively confirmation of method colistin A, colistin B and sum colistin residues in chicken muscle, which fulfils the objective of this experiment.

Keyword : Method development Method Validation Colistin Chicken muscle LC-MS/MS

Scientific No. : 62(2)-0404-086

[1] Veterinary Public Health Laboratory, Bureau of Quality Control of Livestock Products

91 Moo. 4 Tiwanont Bangkadi Mueang Pathumthai 12000

บทนำ

colistin หรือ polymyxin E ถูกนำมาใช้เป็นยาปฏิชีวนะทำลายเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบ เช่น *Escherichia coli, Salmonella* spp., *Acinetobacter spp*., *Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella spp*. และ *Enterobacter spp*. (Falagas and Kasiakou, 2005) ในทางปศุสัตว์ colistin เริ่มถูกใช้ตั้งแต่ พ.ศ. 2493 (European Medicines Agency, 2016) เป็นยารักษาภายใต้การควบคุมของสัตวแพทย์ เพื่อยับยั้งการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบในลำไส้หรืออาการท้องเสียรุนแรงจากเชื้อแบคทีเรียของสุกร เป็ด ไก่ และวัว สำหรับสหภาพยุโรปซึ่งเป็นกลุ่มประเทศผู้นำเข้าสินค้าปศุสัตว์ไทยรายสำคัญ ได้กำหนดปริมาณสารตกค้างสูงสุด (Maximum Residue Limit หรือ MRL) ที่กำหนดให้พบได้ในสินค้าปศุสัตว์ สำหรับ colistin ในกล้ามเนื้อสัตว์เพื่อการบริโภคทุกชนิด ที่ค่า 150 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (European Commission, 2009) Codex Alimentarius Commission (2018) และ Japan Food Chemical Research Foundation (2011) ได้กำหนดค่า MRL ของ colistin ที่เป็นผลรวมระหว่าง colistin A และ colistin B ในกล้ามเนื้อไก่ที่ 150 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งค่า MRL ดังกล่าวสอดคล้องกับประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่อง กำหนดมาตรฐานสารตกค้างสำหรับสินค้าปศุสัตว์ (กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2549)

ส่วนการใช้ colistin ในมนุษย์ การศึกษาทางการแพทย์เรื่องความสามารถของ colistin ในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในมนุษย์พบว่า colistin มีผลข้างเคียงที่อันตราย เช่น เป็นพิษต่อไตและระบบประสาท จึงเลือกที่จะใช้ยาปฏิชีวนะกลุ่มอื่นที่มีความปลอดภัยมากกว่า colistin จนกระทั่ง พ.ศ. 2530 colistin ได้ถูกนำกลับมาใช้ในการรักษาอีกครั้ง โดยได้รับการจัดอันดับเป็นยาขนานสุดท้ายสำหรับการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยา (วิษณุ, 2551; นิธิมา และคณะ, 2558) แต่ปัจจุบันประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะลดลงอย่างมากเพราะแบคทีเรียมีการปรับตัวให้ดื้อต่อยาปฏิชีวนะตลอดช่วง 30 ปีที่ผ่านมา ในขณะที่ไม่มียาปฏิชีวนะตัวใหม่ๆ มาใช้แทนที่ตัวเดิมซึ่งมีประสิทธิภาพลดลง จึงทำให้เกิดปัญหาในการดื้อยา สำหรับประเทศไทย มีปัญหาการดื้อยาจากเชื้อแบคทีเรียที่เป็นปัญหาในการเลี้ยงสัตว์และในอาหาร คือ *Escherichia coli*, *Campylobacter spp*. และ *Salmonella* spp. ซึ่งเป็นเชื้อดื้อยาที่สำคัญจากการจัดอันดับจากองค์การอนามัยโลก (คณะกรรมการประสานและบูรณาการงานด้านการดื้อยาต้านจุลชีพ, 2559) นอกจากนี้ Liu et al. (2015) ยังค้นพบยีนดื้อยา MCR-1 ซึ่งเป็นยีนที่บ่งชี้การดื้อยา colistin ในฟาร์มสุกรในประเทศจีน และเป็นยีนที่สามารถส่งต่อยีนดื้อยาข้ามสายพันธุ์ได้ (horizontal transferable resistance)

รายงานของ European Medicines Agency (2016) ยังระบุไว้ว่าปัจจัยสำคัญในการพิจารณาและประเมินความเสี่ยงในการส่งต่อเชื้อดื้อยาจากสัตว์สู่คน คือเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ถึงแม้ว่าปัจจุบันจะยังไม่มีหลักฐานที่ชัดเจนว่ามีการส่งต่อเชื้อดื้อยา colistin จากสัตว์สู่คนก็ตาม อีกทั้งแผนยุทธศาสตร์การจัดการการดื้อยาต้านจุลชีพประเทศไทย พ.ศ. 2560–2564 ยังระบุไว้ให้ colistin เป็นยาต้านจุลชีพที่มีผลกระทบสำคัญต่อมนุษย์และสัตว์ ที่ใช้เป็นสัญญาณเตือนระดับประเทศอีกด้วย (คณะกรรมการประสานและบูรณาการงานด้านการดื้อยาต้านจุลชีพ, 2559)

ทางด้านการปศุสัตว์ สัตว์ปีกเป็นสินค้าส่งออกสำคัญของประเทศไทยไปยังประเทศคู่ค้าอื่นๆ เช่น สหภาพยุโรป หรือ ญี่ปุ่น ซึ่งสหภาพยุโรปได้กำหนดว่าประเทศที่จะส่งสินค้าปศุสัตว์ไปยังสหภาพยุโรป จะต้องมีแผนเฝ้าระวังสารตกค้างประจำปีที่ผ่านการเห็นชอบจากคณะกรรมาธิการยุโรป ตามข้อกำหนด Council Directive 96/23/EC (European Commission, 1996) ซึ่งแผนนั้นเลือกที่จะตรวจสารตกค้างยาปฏิชีวนะ colistin ในกล้ามเนื้อไก่ เพื่อป้องกันผลกระทบต่อสุขภาพคน

จากรายงานการศึกษาการตรวจสารตกค้างยาปฏิชีวนะ colistin ในกล้ามเนื้อไก่ พบว่าสารมาตรฐาน colistin สามารถเตรียมได้ในตัวทำละลายหลายชนิด เช่น สารละลาย 2-propanol และน้ำ DI (Govaerts et al., 2002) hydrochloric acid (Decolin et al., 1997) หรือน้ำ DI เพียงอย่างเดียว (Qin et al., 2018)

ส่วนเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ colistin Decolin et al., 1997 ศึกษาการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-fluorescence ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมสาร ortho-Phthalaldehyde (OPA) และ 2-mercaptoethanol เพื่อทำให้เกิดอนุพันธ์ของ colistin ให้มีคุณสมบัติเหมาะสมกับการตรวจวัดด้วยเทคนิคนี้ ซึ่งต้องใช้เวลาในการเตรียมทั้งสิ้น 12 ชั่วโมงก่อนที่จะสามารถนำมาวิเคราะห์ได้ เทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) เป็นเทคนิคที่วัดมวลต่อประจุของสารที่มีความแม่นยำ ได้แก่ precursor ion และ product ion ซึ่งใช้สำหรับยืนยันชนิดและปริมาณของสารได้โดยตรง ไม่ต้องเปลี่ยนสาร colistin เป็นสารอนุพันธ์ จึงทำให้ใช้เวลาการทดสอบสั้นลง จึงเป็นอีกวิธีที่มีประสิทธิภาพและความน่าเชื่อถือของผลวิเคราะห์มากกว่าและเป็นที่ยอมรับระดับสากล (Boison et al., 2015, Sin et al., 2005, Qin et al., 2018 และ Wan et al., 2006) ซึ่งสาร colistin สามารถแตกตัวเป็น precursor ion ได้หลายประจุ สำหรับเทคนิค LC-MS/MS ที่มีแหล่งกำเนิดเป็น Electrospray ionization โดย precursor ion ของประจุ 1+ ของ colistin A และ colistin B ได้แก่ 1169 และ 1155 ตามลำดับ ให้ค่าความไวต่ำสุด (Qin et al., 2018) และเมื่อเปรียบเทียบกับประจุ 2+ และ 3+ Sin et al. (2005) และ Boison et al. (2015) ระบุว่า precursor ion

ของประจุ 2+ มีค่าความไวสูงสุด ได้แก่ 586 และ 578 สำหรับ colistin A และ colistin B ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตาม ยังมีรายงานว่า precursor ion ค่า 385 และ 380 ที่เป็นประจุ 3+ ให้ค่าสัญญาณสูงสุดในการตรวจ colistin A และcolistin B ตามลำดับ (Wan et al., 2006) และ (Qin et al., 2018)

สำหรับขั้นตอนการสกัดสารตกค้าง colistin ในตัวอย่างออกจากสิ่งรบกวน สามารถใช้คอลัมน์การแยกด้วยเฟสของแข็งชนิด (SPE) ชนิด Hydrophilic-Lipophilic Balance ได้ (Sin et al., 2005) และ (European Union Reference Laboratory, 2016) แต่ก็มีงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าสารตกค้าง colistin ในตัวอย่างสามารถสกัดได้ด้วยคอลัมน์การแยกด้วยเฟสของแข็งชนิด Weak Cation-Exchange ได้เช่นกัน (Qin et al., 2018)

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ในฐานะผู้ตรวจสอบสินค้าปศุสัตว์ให้มีคุณภาพต่อผู้บริโภคทั้งภายในและต่างประเทศ และยกระดับขีดความสามารถในการตรวจสอบให้เป็นมาตรฐานระดับสากล จึงเห็นความสำคัญในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยืนยันชนิดและปริมาณสารตกค้างยาปฏิชีวนะ colistin ในกล้ามเนื้อไก่ งานวิจัยนี้จึงเริ่มต้นวางแผนศึกษาตั้งแต่การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมที่ทำให้ colistin ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน บรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสมในการเก็บ colistin เพื่อรักษาปริมาณและความเสถียรของสาร โดยอาศัยหลักการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ที่เหมาะสมสำหรับการยืนยันชนิดและปริมาณสาร ซึ่งต้องศึกษาค่ามวลต่อประจุสำหรับการตรวจวัดที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ค่าสัญญาณสูงสุด และเปรียบเทียบประสิทธิภาพขั้นตอนการสกัดแยกด้วยคอลัมน์การแยกด้วยเฟสของแข็งระหว่างชนิด Hydrophilic-Lipophilic Balance ตามวิธีของ European Union Reference Laboratory, 2016 กับ Weak Cation-Exchange ตามวิธีของ Qin et al., 2018

หลังจากพัฒนาวิธีวิเคราะห์ได้ตามเกณฑ์ที่เหมาะสมแล้ว ผู้วิจัยจึงวางแผนพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารตกค้าง colistin ในกล้ามเนื้อไก่ โดยเทคนิค LC-MS/MS ให้มีความไวเพียงพอที่จะตรวจสารตกค้างดังกล่าวอย่างน้อยที่ระดับความเข้มข้นครึ่งหนึ่งของปริมาณสารตกค้างสูงสุดที่ยอมให้มีได้ในกล้ามเนื้อไก่ และสามารถยืนยันชนิดและปริมาณของ colistin ได้ โดยมีค่าความแม่น (accuracy) ค่าความเที่ยง (precision) ผ่านตามแนวมติคณะกรรมาธิการยุโรป Commission Decision 2002/657/EC เพื่อเป็นการยืนยันประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ให้มีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ สอดคล้องกับข้อกำหนดสากล และสามารถนำไปใช้ในการเฝ้าระวังและตรวจติดตามการตกค้างของยาต้านจุลชีพในแผนเฝ้าระวังสารตกค้างประจำปีของกรมปศุสัตว์ และมีผลเกื้อกูลกับยุทธศาสตร์การจัดการการดื้อยาต้านจุลชีพของประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. สารเคมีและสารมาตรฐาน

1.1 สารเคมี

1.1.1 สารเคมีเกรด HPLC ได้แก่ acetonitrile (ACN) และ methanol (MeOH)

1.1.2 สารเคมีเกรด AR ได้แก่ methanol (MeOH), sodium hydroxide (NaOH), 2-propanol, formic acid, trifluoroacetic acid (TFA), trichloroacetic acid (TCA), hydrochloric acid (HCl) และ ethylene glycol

1.1.3 น้ำขจัดไอออน (Deionized water หรือ น้ำ DI)

1.2 สารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน colistin ที่มีองค์ประกอบหลักเป็น colistin A หรือ polymyxin E_1 และ colistin B หรือ polymyxin E_2 และใช้สารมาตรฐาน polymyxin B เป็น internal standard เพื่อการคำนวณปริมาณความเข้มข้นของสาร colistin ในสารละลายตัวอย่าง ทั้ง 2 สารยี่ห้อ European Directorate for the Quality of Medicine & HealthCare (EDQM)

ตารางที่ 1 อัตราส่วนปริมาณองค์ประกอบของสาร colistin A, colistin B ใน colistin รวม ในแต่ละระดับความเข้มข้น

ความเข้มข้นของ colistin รวม (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	**ความเข้มข้น colistin (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)**	
	colistin A	**colistin B**
0	0	0
75	43	32
150	86	64
225	129	96
300	172	128
450	258	192

2. เครื่องมือและอุปกรณ์

2.1 เครื่อง LC-MS/MS ควบคุมการทำงานด้วยโปรแกรม LabSolutions ซึ่งประกอบด้วย

2.1.1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น 20A ประกอบด้วย pump, degasser, autosampler, column oven และ controller

2.1.2 Detector ประเภท Triple Quadrupole Mass Spectrometer ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น 8050

2.2 เฟสคงที่ (HPLC column) ยี่ห้อ Phenomenex ชนิด Kinetex C18 ขนาด 4.6 x 50 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 2.6 ไมโครเมตร

2.3 SPE ขนาดบรรจุ 3 มิลลิลิตร น้ำหนักเฟสของแข็ง 60 มิลลิกรัม จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB) ยี่ห้อ Waters และ Weak Cation-Exchange (WCX) ยี่ห้อ Waters

3. ตัวอย่างที่ศึกษา

ตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่ปลอดสาร (blank sample) คือตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่ที่ไม่พบสัญญาณในช่วง retention time ของ colistin

4. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

4.1 การศึกษาตัวทำละลาย

เตรียมสารละลายมาตรฐาน colistin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และนำสารละลายไปใส่ในอ่างคลื่นความถี่สูงอัลตร้าซาวด์ (ultrasonic bath) เพื่อเพิ่มความสามารถในการละลาย โดยเปรียบเทียบความสามารถในการทำละลายระหว่างตัวทำละลาย 7 ชนิด ที่ทำให้สาร colistin ละลายได้ดีและเป็นเนื้อเดียวกัน ได้แก่

4.1.1 น้ำ DI

4.1.2 Hydrochloric acid ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์

4.1.3 Formic acid ในตัวทำละลายน้ำ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1

4.1.4 สารละลายผสมระหว่าง ACN และ TFA อัตราส่วน 1 ต่อ 4

4.1.5 สารละลายผสมระหว่าง ACN และน้ำ DI อัตราส่วน 1 ต่อ 4

4.1.6 สารละลายผสมระหว่าง MeOH และน้ำ DI อัตราส่วน 1 ต่อ 4 และ

4.1.7 สารละลาย 2-propanol และน้ำ DI อัตราส่วน 1 ต่อ 1

4.2 การศึกษาค่ามวลต่อประจุที่เหมาะสมของ colistin สำหรับเทคนิค LC-MS/MS

เตรียมสารละลาย colistin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวทำละลายที่เหมาะสม ฉีดเข้าส่วน Mass Spectrometer โดยตรง เลือกแหล่งกำเนิดไอออนแบบ Electrospray ionization (ESI) ที่ตรวจวัดประจุบวก ทำการปรับค่าพลังงานในการแตกตัว (Collision Energy, CE หน่วย โวลต์) เพื่อให้ได้ค่า precursor ion และ product ion ที่มีสัญญาณสูงสุด

4.3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพขั้นตอนการสกัดด้วย SPE 2 ชนิด

เมื่อได้ค่า precursor ion และ product ion ที่มีสัญญาณสูงที่สุดแล้ว นำตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่ปลอดสาร จำนวน 7 ตัวอย่างที่ไม่ซ้ำกัน มาเติมสาร colistin ให้ได้ความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นครึ่งหนึ่งของค่า MRL และเติม internal standard ความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และทำการสกัดด้วย SPE 2 ชนิด ดังนี้

4.3.1 วิธีที่ 1 ใช้ SPE ชนิด Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB) (ดัดแปลงจากวิธีของ European Union Reference Laboratory, 2016)

นำตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่ที่ผ่านการบดและผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน น้ำหนัก 2 กรัม มาสกัดด้วยสารละลายผสมระหว่าง MeOH และน้ำ DI อัตราส่วนโดยปริมาตร 1 ต่อ 1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer เป็นระยะเวลา 20 วินาที เติม HCl ความเข้มข้น 6 โมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าอีก 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่แรงหนีศูนย์กลางสัมพัทธ์ 3,000 g อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที เจือจางสารสกัดด้วยน้ำ DI ปริมาตร 15 มิลลิลิตร และรอเทสารสกัดทั้งหมดลงใน SPE ชนิด HLB ซึ่งประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่

1. ขั้นตอนการปรับสภาพ SPE ด้วย MeOH และน้ำ DI ปริมาตรอย่างละ 3 มิลลิลิตร ตามลำดับ และเทสารสกัดทั้งหมดที่เจือจางแล้วลงใน SPE
2. ขั้นตอนการชะล้างสิ่งเจือปนอื่นๆ ด้วยสารละลายผสมระหว่าง MeOH และน้ำ DI อัตราส่วนโดยปริมาตร 5 ต่อ 95 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และทิ้งไว้ 20 นาทีภายใต้ระบบสุญญากาศ เพื่อให้เฟสของแข็งใน SPE แห้ง
3. ขั้นตอนการชะสารตกค้าง colistin ด้วยสารละลายผสมระหว่าง MeOH และ formic acid ร้อยละ 0.2 ในน้ำ DI อัตราส่วนโดยปริมาตร 9 ต่อ 1 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร

เมื่อได้สารตกค้าง colistin แล้ว เติมสารละลายผสมระหว่าง ethylene glycol และ MeOH อัตราส่วน 1 ต่อ 9 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เพื่อเป็นการรักษาสภาพโมเลกุลของ colistin ให้เสถียรในตัวทำละลาย นำไปประเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และเติมสารละลาย formic acid ร้อยละ 0.2 ในน้ำ DI กับ สารละลาย formic acid ร้อยละ 0.2 ใน ACN อัตราส่วนโดย

ปริมาตร 9 ต่อ 1 ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร นำสารละลายทั้งหมดไปกรองด้วยกระดาษกรองชนิดไนลอน ขนาด 0.2 ไมโครเมตรใส่ใน vial สีชา ชนิดที่มี insert

4.3.2 วิธีที่ 2 ใช้กับ SPE ชนิด Weak Cation-Exchange (WCX) (ดัดแปลงจากวิธีของ Qin et al., 2018)

นำตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่ที่ผ่านการบดและผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน น้ำหนัก 2 กรัม มาสกัดด้วยสารละลายผสมระหว่าง TCA และ ACN อัตราส่วนโดยปริมาตร 2 ต่อ 3 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer เป็นระยะเวลา 20 วินาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่แรงหนีศูนย์กลางสัมพัทธ์ 9,391 g อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที เทส่วนใสเก็บไว้ และสกัดซ้ำอีกครั้ง เทส่วนใสรวมกับส่วนแรกที่เก็บไว้ และปรับ pH ให้ได้ค่า 9.0 ด้วย NaOH ความเข้มข้น 10 โมลาร์ นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่แรงหนีศูนย์กลางสัมพัทธ์ 9,391 g อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และรอเทสารสกัดทั้งหมดลงใน SPE ชนิด WCX ซึ่งประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่

1. ขั้นตอนการปรับสภาพ SPE ด้วย MeOH และน้ำ DI ปริมาตรอย่างละ 3 มิลลิลิตร ตามลำดับ และเทสารสกัดทั้งหมดที่ปั่นเหวี่ยงแล้วลงใน SPE
2. ขั้นตอนการชะล้างสิ่งเจือปนอื่นๆ ด้วย น้ำ DI MeOH และ formic acid ในน้ำ DI ความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตรอย่างละ 3 มิลลิลิตร ตามลำดับ
3. ขั้นตอนการชะสารตกค้าง colistin ด้วยสารละลาย formic acid ในตัวทำละลาย MeOH ความเข้มข้นร้อยละ 20 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

เมื่อได้สารตกค้าง colistin แล้ว นำไปประเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ให้เหลือตัวทำละลายปริมาตรโดยประมาณ 200 ไมโครลิตร หลังจากนั้นปรับปริมาตรสารตกค้างด้วยน้ำ DI ให้มีปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปเขย่าเป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยปั่นเหวี่ยงด้วยแรงหนีศูนย์กลางสัมพัทธ์ 14,024 g อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และกรองด้วยกระดาษกรองชนิดไนลอน ขนาด 0.2 ไมโครเมตรใส่ใน vial สีชา ชนิดที่มี insert

เปรียบเทียบประสิทธิภาพขั้นตอนการสกัดด้วย SPE 2 ชนิด โดยคำนวณความเข้มข้นของ colistin ในตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่ทั้ง 7 ตัวอย่างจากการเทียบกับกราฟมาตรฐานในตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่ (matrix-matched calibration curve) ที่สกัดด้วยวิธีเดียวกัน ระดับความเข้มข้น 0, 75, 150, 225 และ 300 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และนำมาคำนวณค่าความแม่น (accuracy) จากร้อยละการกลับคืน (recovery) และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) จาก repeatability ดังสูตรข้อ 5.5 และพิจารณาตามเกณฑ์การประเมินสมรรถนะดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เกณฑ์การประเมินสมรรถนะของวิธีวิเคราะห์ตามแนวมติคณะกรรมาธิการยุโรป Commission Decision 2002/657/EC

ความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	ค่าความแม่น (accuracy)	ค่าความเที่ยง (precision) (ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน, %CV)	
	ช่วงการยอมรับของค่าเฉลี่ยการกลับคืน (ร้อยละ)	ค่าการทวนซ้ำของการวัด (repeatability)	ค่าการทำซ้ำได้ของการวัด (within – laboratory reproducibility)
10 ถึง 100	80-110	15	23
100 ถึง 1000		11	16

หมายเหตุ อ้างอิงจากคู่มือการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบตามแนวทางมติคณะกรรมการยุโรป. 2002/657/EC. สุจิตตรา พงศ์วิวัฒน์. 2555. หน้า 66-67.

โดยทำการศึกษาการเปรียบเทียบประสิทธิภาพขั้นตอนการสกัดด้วย SPE 2 ชนิด ภายใต้สภาวะของเครื่อง HPLC และ Mass Spectrometer ดังนี้

1. สภาวะเครื่อง HPLC

1.1 เฟสคงที่ (HPLC column) ได้แก่ Phenomenex Kinetex ชนิด C18 ขนาด 4.6 x 50 มิลลิเมตร 2.6 ไมโครเมตร อุณหภูมิของ HPLC column 40 องศาเซลเซียส

1.2 เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ได้แก่ สารละลายผสมระหว่าง ขวด A สารละลาย formic acid ร้อยละ 0.1 ในตัวทำละลายน้ำ DI และขวด B สารละลาย formic acid ร้อยละ 0.1 ในตัวทำละลาย ACN ตามอัตราส่วนและเวลาดัง**ตารางที่ 3** โดยอัตราการไหล 400 ไมโครลิตรต่อต่อนาที ปริมาตรต่อ vial ที่ใช้วิเคราะห์ผ่าน HPLC column 5 ไมโครลิตร ระยะเวลาการวิเคราะห์ 8 นาที

ตารางที่ 3 อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ต่อเวลา

ช่วงเวลา (นาที)	อัตราส่วนสารละลายผสม ขวด A (ร้อยละ)	อัตราส่วนสารละลายผสม ขวด B (ร้อยละ)
0.00	90	10
0.50	90	10
4.50	40	60
5.00	40	60
5.10	90	10
8.00	90	10

2. สภาวะของเครื่อง Mass Spectrometer

แหล่งกำเนิดไอออน	:	Electrospray Ionization
ขั้ว	:	Positive
อัตราการไหลของ nebulizing gas	:	3 ลิตรต่อนาที
อัตราการไหลของ heating gas	:	10 ลิตรต่อนาที
อัตราการไหลของ drying gas	:	10 ลิตรต่อนาที
อุณหภูมิของ interface	:	300 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของ DL	:	250 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของ heat block	:	400 องศาเซลเซียส

5. การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

เมื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ได้ตามเกณฑ์ที่เหมาะสมแล้ว จึงทำการยืนยันประสิทธิภาพของวิธี โดยการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ที่ออกแบบและดำเนินการตามขั้นตอนของแนวมติคณะกรรมาธิการยุโรป Commission Decision 2002/657/EC ข้อ 5.1.1-5.1.8 และตามเกณฑ์ของงานวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์และฮอร์โมน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ข้อ 5.2.1-ข้อ 5.2.2

โดย 1 ชุดการทดสอบประกอบด้วย ตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่ปลอดสาร 7 ตัวอย่างที่ไม่ซ้ำกัน นำมาเติมสาร colistin ตัวอย่างละ 4 ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 MRL (0, 75, 150 และ 225 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ) เพื่อให้ครอบคลุมค่า MRL และเติม internal standard ความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

ทำการวิเคราะห์ทั้งหมด 3 ชุดการทดสอบ (1 ชุด/วัน) รวมเป็นระดับความเข้มข้นละ 21 ซ้ำ คำนวณความเข้มข้นของ colistin ในแต่ละตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่เทียบกับกราฟมาตรฐานในตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่ (matrix-matched calibration curve) ที่สกัดในชุดการทดสอบเดียวกัน ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 MRL (0, 75, 150, 225, 300 และ 450 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ) เพื่อให้ครอบคลุมค่าปริมาณสารที่วิเคราะห์ในตัวอย่าง และทดสอบช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของวิธีวิเคราะห์ และเติม internal standard ความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

5.1 การคำนวณและประเมินตามเกณฑ์ของแต่ละพารามิเตอร์ที่ได้กำหนดในการพิสูจน์ความใช้ได้ ตามแนวมติคณะกรรมาธิการยุโรป Commission Decision 2002/657/EC ได้แก่

5.1.1 เกณฑ์การตัดสินผลทดสอบ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ที่ค่าความคลาดเคลื่อนอัลฟา หรือ CCα)

หาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของความเข้มข้นที่ระดับ MRL ของ 3 ชุดการทดสอบ (ทั้งหมด 21 ซ้ำ)

$$CC\alpha = \text{ค่าเฉลี่ยของผลทดสอบ} + 1.64 \times SD$$

5.1.2 ค่าความสามารถในการตรวจของวิธีทดสอบ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ที่ค่าความคลาดเคลื่อนที่เบต้า หรือ CCβ)

หาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของความเข้มข้นที่ระดับ MRL ของ 3 ชุดการทดสอบ (ทั้งหมด 21 ซ้ำ)

$$CC\beta = CC\alpha + 1.64 \times SD$$

5.1.3 ค่าความแม่น (accuracy) พิจารณาจากร้อยละการกลับคืน (recovery)

$$\text{ร้อยละการกลับคืน} = \frac{\text{ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)}}{\text{ความเข้มข้นที่เติมลงในตัวอย่าง (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)}} \times 100$$

5.1.4 ค่าความเที่ยง (precision) ของค่าการทวนซ้ำของการวัด (repeatability) พิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) ของแต่ละระดับความเข้มข้น ในชุดการทดสอบเดียวกัน (7 ซ้ำ)

5.1.5 ค่าความเที่ยง (precision) ของค่าการทำซ้ำได้ของการวัด (within-laboratory reproducibility) พิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) ของแต่ละระดับความเข้มข้น ทั้งหมด 3 ชุดการทดสอบ (21 ซ้ำ)

5.1.6 ค่าความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (linearity of calibration curve) และ ค่าความเข้มข้นช่วงที่ใช้งาน (working range)

พิจารณาเลือกช่วงความเข้มข้นของกราฟมาตรฐานที่มีความเป็นเส้นตรงจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient หรือ r) มากกว่า 0.995 (สุจิตตรา พงศ์วิวัฒน์, 2555) เพื่อกำหนดเป็นค่าความเข้มข้นช่วงที่ใช้งานสำหรับการตรวจวิเคราะห์ ดังการเตรียมกราฟมาตรฐานในตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่ 6 ระดับความเข้มข้น ที่กล่าวข้างต้น

5.1.7 ความจำเพาะหรือความสามารถในการแยกสาร (Specificity)

เลือกเติมสารมาตรฐานกลุ่ม aminoglycosides เนื่องจากโมเลกุลมีขนาดใหญ่ประกอบด้วยหมู่เอมีนและไฮดรอกซิล คล้ายคลึงกันกับโมเลกุลของ colistin โดยเติมสารกลุ่ม aminoglycosides ทั้งหมด 6 สาร ลงในตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่ ที่ระดับความเข้มข้น 75 ไมโครกรัม

ต่อกิโลกรัม ถ้าวิธีวิเคราะห์มีความจำเพาะต่อสาร colistin ที่ทำการตรวจวิเคราะห์อยู่ ต้องไม่พบสัญญาณรบกวนของสารมาตรฐานอื่นๆ บริเวณ retention time ของสาร colistin

5.1.8 ความเสถียร (stability) ของสาร colistin

5.1.8.1 ความเสถียรของสาร colistin ในกล้ามเนื้อไก่

เตรียมตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่ปลอดสาร 1 ตัวอย่าง น้ำหนัก 2.0 กรัม จำนวน 6 หลอด เติมสารมาตรฐาน colistin ที่ระดับความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และทำการวิเคราะห์ครั้งละ 2 หลอดในสัปดาห์ที่ 0 (วิเคราะห์ทันทีหลังจากเตรียมตัวอย่างเสร็จ) สัปดาห์ที่ 2 และสัปดาห์ที่ 4 โดยให้ค่าความเข้มข้นของสัปดาห์ที่ 0 มีค่าร้อยละการกลับคืนเป็น 100 และวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานในตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่ ที่สกัดในชุดการทดสอบเดียวกัน บันทึกค่าความเข้มข้นที่ได้ และคำนวณหาความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เหลือ โดยพิจารณาว่ามีความเสถียร เมื่อค่าความแม่น (accuracy) จากค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนผ่านเกณฑ์ตารางที่ 2

5.1.8.2 ความเสถียรของสาร colistin ในสารละลาย

เตรียมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณมากพอที่จะแบ่งเป็นขวดย่อยได้ 32 ขวด ทำการติดฉลาก เก็บรักษาและนำมาทดสอบตามสภาวะและเวลาที่กำหนดดังตารางที่ 4 เมื่อถึงกำหนดเวลา นำสารมาตรฐานที่เก็บไว้มาเจือจางให้มีความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ความเข้มข้นระดับต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้) และหาความเข้มข้นที่เหลือเทียบกับกราฟมาตรฐานที่สร้างจากสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เตรียมใหม่วันต่อวัน ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 MRL (0, 75, 150, 225, 300 และ 450 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ) ทำการวิเคราะห์ในชุดทดสอบเดียวกัน โดยพิจารณาว่ามีความเสถียร เมื่อค่าความแม่น (accuracy) จากค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืน ผ่านเกณฑ์ตารางที่ 2

5.2 การคำนวณและประเมินตามเกณฑ์ของแต่ละพารามิเตอร์ที่ได้กำหนดในการพิสูจน์ความใช้ได้ ตามเกณฑ์ของงานวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์และฮอร์โมน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ (อ้างอิงจาก Corley, 2003)

5.2.1 ค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจชนิดสารได้ (Minimum Detection Limit หรือ MDL)

หาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของความเข้มข้นที่ระดับ MRL ของ 3 ชุดการทดสอบ (ทั้งหมด 21 ซ้ำ) และคำนวณสถิติโดยใช้ t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

$$MDL = t_{99}(n-1) \times SD \text{ (เมื่อ Degree of Freedom = n-1)}$$

5.2.2 ค่าต่ำสุดที่สามารถยืนยันปริมาณสารได้ (Minimum Quantitation Limit หรือ MQL)

MQL = 3 x MDL

ตารางที่ 4 แผนการทดลองเพื่อศึกษาความเสถียรของสาร colistin ในสารละลาย

การเก็บรักษา	ระยะเวลาการเก็บรักษา	จำนวนขวด (ขวด)		
		- 20 °C	**4 °C**	**25 °C**
เก็บที่มืด	สัปดาห์ที่ 0 (หลังจากเตรียมใหม่)	2	2	2
	สัปดาห์ที่ 1	2	2	2
	สัปดาห์ที่ 2	2	2	2
	สัปดาห์ที่ 4	2	2	2
เก็บที่สว่าง	สัปดาห์ที่ 0 (หลังจากเตรียมใหม่)	-	-	2
	สัปดาห์ที่ 1	-	-	2
	สัปดาห์ที่ 2	-	-	2
	สัปดาห์ที่ 4	-	-	2

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

1.1 การศึกษาตัวทำละลาย

จากการทดลองเตรียมสารละลายมาตรฐาน colistin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวทำละลายต่างๆ 7 ชนิด และนำไปใส่ในอ่างคลื่นความถี่สูงอัลตราซาวด์ เพื่อเพิ่มความสามารถในการละลาย พบว่า ความสามารถของตัวทำละลายที่ทำให้สารเป็นเนื้อเดียวกัน เรียงจากมากไปน้อย ดังนี้

ตัวทำละลายผสมระหว่าง ACN และน้ำ DI อัตราส่วน 1 ต่อ 4 > น้ำ DI > hydrochloric acid ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ > formic acid ในตัวทำละลายน้ำ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 > สารละลายผสม

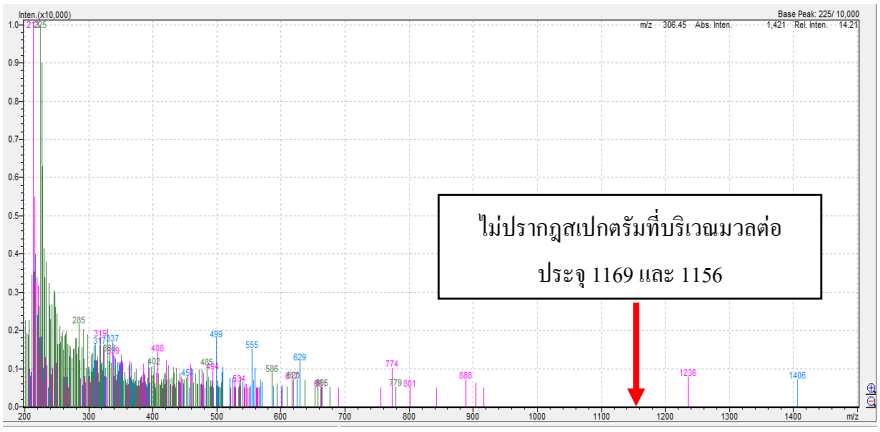
ระหว่าง ACN และ TFA อัตราส่วน 1 ต่อ 4 >สารละลายผสมระหว่าง MeOH และน้ำ DI อัตราส่วน 1 ต่อ 4 > สารละลาย 2-propanol และ น้ำ DI อัตราส่วน 1 ต่อ 1

พบว่า colistin สามารถละลายได้ดีและเป็นเนื้อเดียวกันในตัวทำละลายผสมระหว่าง ACN และน้ำ DI อัตราส่วน 1 ต่อ 4 จึงใช้เป็นตัวทำละลายสารมาตรฐานในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์และการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธี และที่ colistin ละลายได้ไม่ดีในตัวทำละลายอื่นๆ เช่น สารละลายผสม 2-propanol และน้ำ DI อัตราส่วน 1 ต่อ 1 เนื่องมาจาก colistin เป็นโพลีเปปไทด์ ประกอบด้วยกรดอะมิโนซึ่งมีขั้ว ทำให้ละลายได้ดีในน้ำ แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว เช่น hexane หรือ chloroform การเติมสารจำพวกกรดหรือด่างลงไปในตัวทำละลาย ทำให้ประจุบวกหรือลบไปจับกับกรดอะมิโน ทำให้ส่วนที่มีขั้วกลายเป็นกลางจึงเพิ่มความสามารถในการละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้มากขึ้น แต่ในการทดลองนี้พบว่า colistin ไม่สามารถละลายเป็นเนื้อเดียวกันได้ในน้ำ สอดคล้องกับรายงานในการศึกษาของ Falagas and Kasiakou (2005) ที่ระบุว่า colistin สกัดมาจากเชื้อ *Bacillus polyrnyxa* subspecies *colistinus* และประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 3 ชนิด ซึ่งถ้ากระบวนการผลิตต่างกัน อาจทำให้กรดอะมิโนเหล่านี้จับกับกรดไขมันต่างกัน ซึ่งทำให้มีสัดส่วนองค์ประกอบของ colistin A และ colistin B ต่างกันในแต่ละผู้ผลิต จึงส่งผลต่อการละลายของสารดังกล่าว

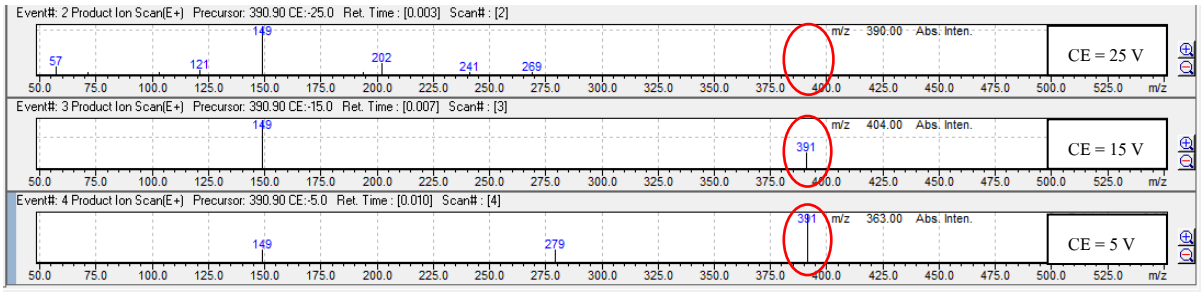
1.2 การศึกษาค่ามวลต่อประจุที่เหมาะสมของ colistin สำหรับเทคนิค LC-MS/MS

ผลการศึกษาหาค่ามวลต่อประจุที่เหมาะสมของ colistin A และ colistin B สำหรับเครื่อง Mass Spectrometer พบว่า ไม่ปรากฏสเปกตรัมของ precursor ion ของ colistin ที่ค่ามวลต่อประจุ 1169 และ 1156 ซึ่งเป็นประจุ 1+ ของมวลโมเลกุลของ colistin A และ colistin B ตามลำดับ ดังรูปที่ 1 เนื่องจากโมเลกุล colistin ไม่เสถียรในรูปประจุนี้และโมเลกุลส่วนใหญ่แตกตัวอยู่ในรูปประจุอื่นภายใต้สภาวะของเครื่อง Mass Spectrometer จึงทำการปรับค่าพลังงานการแตกตัว (Collision Energy, CE) ที่ค่า 5, 15 และ 25 โวลต์ เพื่อหาค่ามวลต่อประจุที่ค่า 586 และ 579 (ประจุ 2+ สำหรับ colistin A และ B ตามลำดับ) และ 391 และ 386 (ประจุ 3+ สำหรับ colistin A และ B ตามลำดับ) พบว่าหลังจากทำการปรับค่าพลังงานการแตกตัวที่ 5 โวลต์แล้ว ค่ามวลต่อประจุ 390.9 (391) และ 386.2 (386) (ประจุ 3+) เป็น precursor ion ที่มีสัญญาณสูงที่สุด ดังรูปที่ 2 และรูปที่ 3 แสดงให้เห็นว่าถึงแม้แหล่งกำเนิดไอออน (ion source) จะเป็นแบบ electrospray ionization (ESI) ซึ่งถือว่าเป็น soft ionization ที่คงสภาพไอออนของโมเลกุล (molecular ion) ไว้ดีที่สุด แต่ก็ยังพบว่าสำหรับสาร colistin ค่าสัญญาณของไอออนของโมเลกุลซึ่งมีประจุ 1+ ยังให้ค่าที่ต่ำกว่าประจุ 2+ และ 3+ ตามลำดับ ซึ่งผลจากการศึกษาค่ามวลต่อประจุที่เหมาะสมภายใต้สภาวะที่กำหนด ได้ค่า precursor

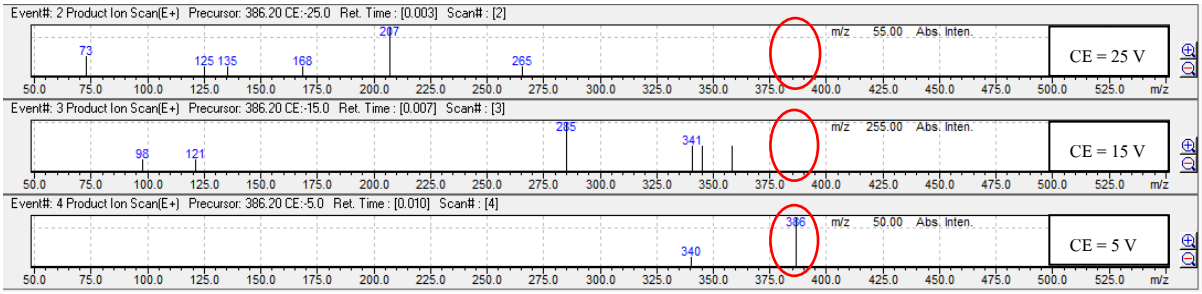
ion และ product ion ของ colistin A, colistin B และ polymyxin B สำหรับใช้ในการคำนวณหาปริมาณสารในตัวอย่างดังตารางที่ 5



รูปที่ 1 สเปกตรัมจากการปรับหาค่ามวลต่อประจุ precursor ion ของ colistin A และ colistin B ที่ ค่า 1169 และ 1156 ตามลำดับ (ประจุ 1+)



รูปที่ 2 สเปกตรัมเปรียบเทียบค่าความไว ที่ค่าพลังงานการแตกตัว (Collision Energy, CE) ที่ค่า 5, 15 และ 25 โวลต์ ที่ค่ามวลต่อประจุ 390.9 ของ colistin A



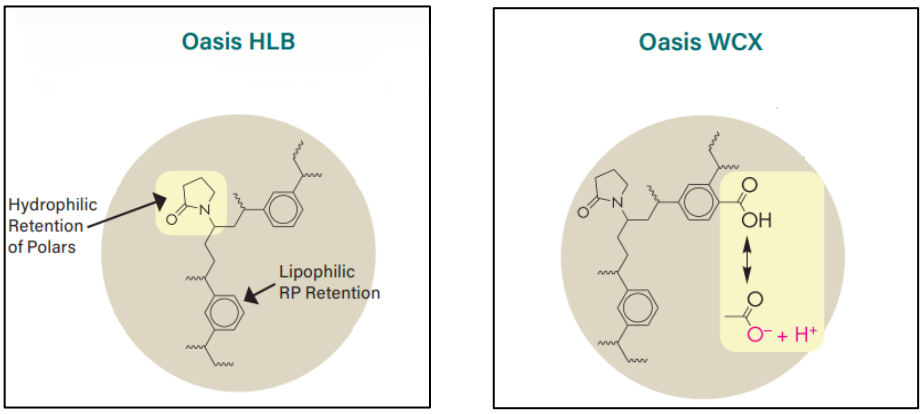
รูปที่ 3 สเปกตรัมเปรียบเทียบค่าความไว ที่ค่าพลังงานการแตกตัว (Collision Energy, CE) ที่ค่า 5, 15 และ 25 โวลต์ ที่ค่ามวลต่อประจุ 386 ของ colistin B

ตารางที่ 5 สรุปอัตราส่วนมวลต่อประจุ (Mass-to-Charge ratio หรือ m/z) ของการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Mass Spectrometer

สารตกค้าง	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)
colistin A	390.90	241.30, 101.1
colistin B	386.20	227.20, 101.0
polymyxin B	402.25	101.10

1.3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพขั้นตอนการสกัดด้วย SPE 2 ชนิด

การศึกษานี้ได้ทำการเปรียบเทียบความสามารถในการแยก colistin ออกจากสิ่งรบกวนด้วย SPE 2 ชนิด ที่มีความสามารถในการจับโมเลกุลสารที่แตกต่างกัน เนื่องจาก colistin เป็นยาปฏิชีวนะที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ เป็นโพลีเปปไทด์ที่ประกอบกรดอะมิโน ที่ประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิล (COOH-) และหมู่เอมีน (NH_3^+) เป็นหลัก แตกต่างกันที่ชนิดของกรดอะมิโน ซึ่งมีผลต่อความเป็นขั้วบวกหรือลบของ colistin ผู้วิจัยจึงศึกษาการสกัดแยกด้วย SPE ที่มีหมู่ฟังก์ชั่นต่างกัน 2 ชนิด ได้แก่ Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB) และชนิด Weak Cation Exchange (WCX) หมู่ฟังก์ชั่นในการทำงานแสดงดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 การทำงานของ SPE ชนิด Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB) และ Weak-Cation eXchange (WCX) (ที่มา : Waters, 2017)

จากการสกัดตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่ ที่เติมสาร colistin ให้มีความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมและเติม internal standard ความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และคำนวณความเข้มข้นของ colistin ในตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่ทั้ง 7 ตัวอย่างจากการเทียบกับกราฟมาตรฐานในตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่ (matrix-matched calibration curve) ที่สกัดด้วยวิธีเดียวกัน ระดับความเข้มข้น

0 ถึง 300 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่าร้อยละการกลับคืนและค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) แสดงดังตารางที่ 6

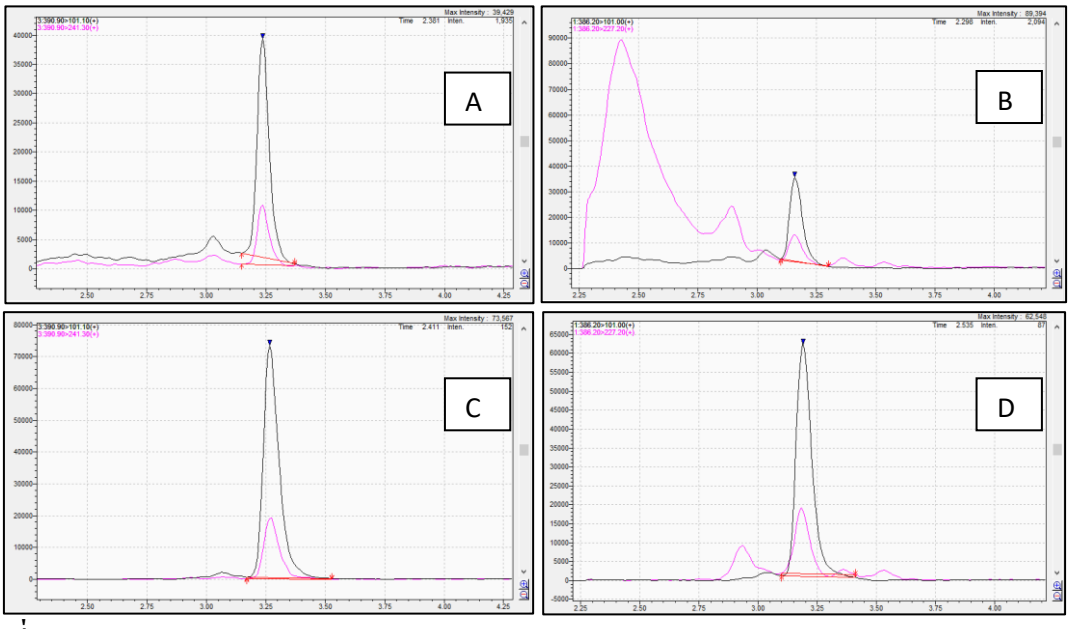
ตารางที่ 6 ค่าความแม่นแสดงในรูปค่าร้อยละการกลับคืนและความเที่ยงแสดงในรูปค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV)

ตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่เติมสาร	**ค่าร้อยละการกลับคืน**			
	colistin A		**colistin B**	
ชนิด SPE	**HLB**	**WCX**	**HLB**	**WCX**
ตัวอย่างที่ 1	76.0	104.6	41.4	84.4
ตัวอย่างที่ 2	66.8	104.2	42.6	92.2
ตัวอย่างที่ 3	75.8	108.6	47.5	102.7
ตัวอย่างที่ 4	73.0	108.9	41.6	103.0
ตัวอย่างที่ 5	84.0	106.1	53.8	102.1
ตัวอย่างที่ 6	93.0	107.8	62.4	103.8
ตัวอย่างที่ 7	69.3	108.7	27.5	98.8
ค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืน	**76.8**	**107.0**	**45.3**	**98.1**
%CV	**9.0**	**2.0**	**11.0**	**7.3**

จากผลการทดลองพบว่า การสกัดสาร colistin ด้วย SPE ชนิด HLB มีค่า %CV อยู่ในเกณฑ์การประเมิน แต่ค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนมีค่าต่ำกว่าเกณฑ์ฯ ตามตารางที่ 2 สาเหตุอาจเนื่องมาจากความไม่สม่ำเสมอในการแตกตัวของ colistin เอง จากขั้นตอนการวิเคราะห์ที่ไม่มีการควบคุมสภาพ pH ระหว่างการสกัด และความไม่จำเพาะของ SPE ชนิด HLB ที่มีหมู่ฟังก์ชั่นทั้งส่วน hydrophilic และ lipophilic ซึ่งถึงแม้ว่าอาจจะเพิ่มโอกาสในการจับ colistin ในทั้งส่วนที่มีประจุและไม่มีประจุ แต่จากผลการทดลองปรากฏว่าความไม่จำเพาะ ทำให้สูญเสีย colistin ไประหว่างการสกัดสูงสุดถึงร้อยละ 70 ดังค่าร้อยละการกลับคืนของ colistin B ในตัวอย่างที่ 7

สำหรับการสกัดสาร colistin ด้วย SPE ชนิด WCX ค่าร้อยละการกลับคืนและค่า %CV อยู่ในเกณฑ์ฯ ตามตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่า SPE ชนิดนี้เหมาะสมสำหรับการแยกสาร colistin เนื่องจากเมื่อมีการรักษาสภาวะให้ pH ประมาณ 9 จะทำให้ colistin เป็นประจุบวก ซึ่งสามารถจับกับหมู่ carboxylic acid ใน SPE ชนิด WCX ได้เป็นอย่างดี เมื่อ pH ของสารมากกว่า pKa ของ

carboxylic acid อย่างน้อย 2 หน่วย (ค่า pKa ของ carboxylic acid ประมาณ 4.8) ดังตารางที่ 6 นอกจากนี้เมื่อนำสารสกัดจากทั้ง 2 ชนิด SPE มาเปรียบเทียบ Chromatogram ดังรูปที่ 5 ที่แสดงความสามารถในการแยก (resolution) กับค่าสัญญาณ (intensity) ของ colistin A และ colistin B ภายใต้สภาวะของเครื่อง LC-MS/MS ที่กำหนดดังที่กล่าวข้างต้นนั้น การสกัดด้วย SPE ชนิด WCX โดยใช้สารสกัดเป็นสารละลายผสมระหว่าง TCA และ ACN ที่อัตราส่วน 2 ต่อ 3 นี้ เป็นวิธีที่เหมาะสม ซึ่งสอดคล้องกับ Qin et al., (2018) ที่ SPE ชนิด WCX ให้ค่าการกลับคืนที่ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับ SPE ชนิด PRiME HLB, Sep Pak C18 และ Bond Elut C18 ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกสภาวะต่างๆ เหล่านี้ในการดำเนินการการพิสูจน์ความใช้ได้ต่อไป



รูปที่ 5 Chromatogram เปรียบเทียบความสามารถในการแยกกับค่าสัญญาณ ระหว่าง SPE ชนิด HLB และ WCX ของ colistin A (ความเข้มข้น 86 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) และ colistin B ที่ความเข้มข้น (ความเข้มข้น 64 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)

(รูป A SPE ชนิด HLB colistin A, รูป B SPE ชนิด HLB colistin B, รูป C SPE ชนิด WCX colistin A, รูป D SPE ชนิด WCX colistin B)

2. การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

วิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นนี้ ได้ดำเนินการพิสูจน์ความใช้ได้ตามแนวมติคณะกรรมาธิการยุโรป Commission Decision 2002/657/EC และตามเกณฑ์งานวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์และฮอร์โมน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ฯ โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่ทั้งหมด 3 ชุดการทดสอบ โดย 1 ชุดประกอบด้วยตัวอย่าง 7 ตัว เติมสาร colistin ตัวอย่างละ 4 ระดับความเข้มข้นได้แก่ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 MRL (ความเข้มข้น 0, 75, 150 และ 225 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ) รวมทั้งสิ้นระดับความเข้มข้นละ 21 ซ้ำ โดยค่าของแต่ละตัวแปร

ตามข้อกำหนดฯ แสดงดังตารางที่ 7 ผลการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ในกล้ามเนื้อไก่ ซึ่งจะเห็นได้ว่า ค่าความแม่นหรือค่าร้อยละการกลับคืน ค่าความเที่ยงหรือค่าการทวนซ้ำของการวัดซึ่งพิจารณาแต่ละชุดทดสอบ ค่าการทำซ้ำได้ของการวัดของแต่ละระดับความเข้มข้นทั้งหมด 3 ชุดการทดสอบ ผ่านเกณฑ์การประเมิน ตามตารางที่ 2 ทุกพารามิเตอร์

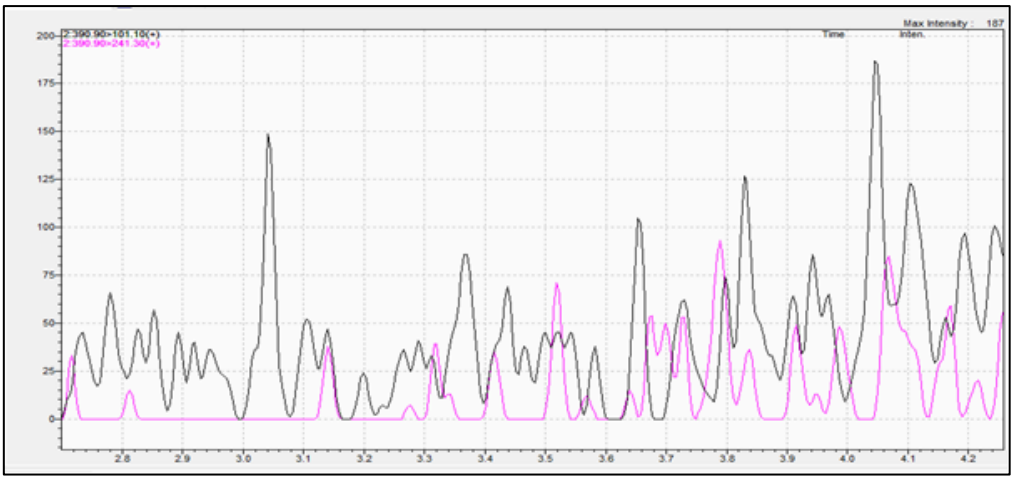
ตารางที่ 7 ผลการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ในกล้ามเนื้อไก่

สาร	ระดับความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	MDL (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	MQL (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	ร้อยละการกลับคืนเฉลี่ย	ค่าการทวนซ้ำของการวัด (%CV)			ค่าการทำซ้ำได้ของการวัด (%CV)
					ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3	
colistin A	43	4.92	14.75	96.62	5.77	3.88	2.91	4.4
	86			98.70	2.96	2.71	4.23	1.3
	129			100.14	3.59	2.77	6.03	1.5
colistin B	32	3.64	10.92	100.21	2.48	3.88	3.23	5.7
	64			99.56	1.99	2.71	3.13	1.7
	96			99.67	2.53	2.23	3.88	2.0

วิธีวิเคราะห์นี้มีความไวเพียงพอที่จะวัดปริมาณสาร colistin รวมที่ระดับ 75 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ผลรวมระหว่าง colistin A 43 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ colistin B 32 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ซึ่งเป็นปริมาณครึ่งหนึ่งของสารตกค้างสูงสุดที่อนุญาตให้มีได้ในกล้ามเนื้อไก่ ความเข้มข้นที่ใช้งานได้ ตั้งแต่ 75 ถึง 225 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ช่วงความเข้มข้นของกราฟมาตรฐานที่มีความเป็นเส้นตรง ตั้งแต่ 75 ถึง 450 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่าความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน หรือ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ของ colistin A เท่ากับ 0.998 และ colistin B เท่ากับ 0.999 ค่าเกณฑ์การตัดสินผลทดสอบ หรือ ค่า CCα ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ของ colistin รวมเท่ากับ 165.4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และค่าความสามารถในการตรวจของวิธีทดสอบ หรือ ค่า CCβ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ของ colistin รวม เท่ากับ 180.8 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

การทดสอบความจำเพาะหรือความสามารถในการแยกสารของวิธีวิเคราะห์นี้ เลือกทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานกลุ่ม aminoglycosides เนื่องจากโมเลกุลมีขนาดใหญ่ ประกอบด้วยหมู่เอมีนและไฮดรอกซิล คล้ายคลึงกันกับโมเลกุลของ colistin จากการทดสอบเติม aminoglycosides ที่ระดับความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 6 สาร ลงในตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่ปลอดสาร

และดูสัญญาณรบกวนในช่วง retention time ของ colistin พบว่าไม่ปรากฏสัญญาณรบกวนในช่วงเวลาดังกล่าว สรุปได้ว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความจำเพาะต่อสาร colistin A และ colistin B ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 Chromatogram ของการทดสอบความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ ที่เติมสารละลายมาตรฐานกลุ่ม Aminoglycosides ที่ระดับความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

ผลการทดลองการคำนวณปริมาณ colistin ในกล้ามเนื้อไก่ ที่เตรียมไว้ตั้งแต่วันแรกที่วิเคราะห์จนถึงสัปดาห์ที่ 4 โดยเทียบปริมาณ colistin จากกราฟมาตรฐานในตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่ที่สกัดในชุดทดสอบเดียวกัน พบว่า colistin มีค่าร้อยละการกลับคืน ผ่านตามเกณฑ์ตารางที่ 2 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1,2 และ 4 สัปดาห์ แสดงว่าสาร colistin ในตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่มีความเสถียรในกล้ามเนื้อไก่ที่สภาวะดังกล่าว และการวิเคราะห์ความเสถียรของ colistin ในสารละลาย โดยเทียบปริมาณ colistin จากกราฟมาตรฐานที่เตรียมจากการเจือจางสารละลายที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ที่เตรียมใหม่วันต่อวันก่อนการวิเคราะห์ พบว่าสารละลายมาตรฐาน colistin A และ colistin B มีค่าร้อยละการกลับคืน ผ่านตามเกณฑ์ตารางที่ 2 ที่สภาวะการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ แสดงว่าสารละลาย colistin มีความเสถียรในสภาวะดังกล่าว

สรุปผลการทดลอง

วิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาปฏิชีวนะ colistin ในกล้ามเนื้อไก่ ได้รับการพัฒนาในเรื่องการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับสาร colistin ซึ่งได้แก่สารละลายผสมระหว่าง ACN และน้ำ DI อัตราส่วนโดยปริมาตร 1 ต่อ 4 colistin แตกตัวเป็นไอออนได้ดีสำหรับการวัดมวลต่อประจุด้วยเทคนิค LC-MS/MS โดยมี precursor ion ได้แก่ 390.9 และ 386.2 สำหรับ colistin A และ colistin B

ตามลำดับ สารสกัดที่เหมาะสมคือสารละลายผสมระหว่าง TCA และ ACN อัตราส่วนต่อปริมาตร 2 ต่อ 3 โดยการแยกด้วย SPE ชนิด WCX วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ ได้รับการพิสูจน์ความใช้ได้ตามแนวเกณฑ์มติคณะกรรมาธิการยุโรป 2002/657/EC โดยมีค่าความแม่นและค่าความเที่ยงผ่านเกณฑ์ดังกล่าว จึงทำให้วิธีนี้เหมาะสมเพื่อใช้ตรวจยืนยันชนิดและปริมาณสารตกค้าง colistin A, colistin B และ colistin รวมในกล้ามเนื้อไก่ ซึ่งสามารถใช้ในการเฝ้าระวังและตรวจติดตามการตกค้างของยาต้านจุลชีพในแผนการเฝ้าระวังสารตกค้างประจำปีของกรมปศุสัตว์ และมีผลเกื้อกูลกับประเด็นยุทธศาสตร์การจัดการการดื้อยาต้านจุลชีพประเทศไทย เป็นไปตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

ข้อเสนอแนะ

ผู้วิจัยเสนอว่าในอนาคต ควรทดสอบความเสถียรของสาร colistin ในระยะยาวเพิ่มเติม เช่น ระยะเวลาการเก็บ 20 สัปดาห์ เพื่อเป็นข้อมูลในการเก็บรักษา และควรพัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารตกค้างปฏิชีวนะ colistin ในกล้ามเนื้อสัตว์อื่นๆ เช่น สุกร และด้วยเครื่องมือวิเคราะห์ LC-MS/MS เครื่องอื่นๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานให้เป็นไปอย่างต่อเนื่อง และเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค และควรนำผลจากงานวิจัยนี้ไปใช้จริงในการเฝ้าระวังและตรวจติดตามการตกค้างของยาปฏิชีวนะในแผนเฝ้าระวังสารตกค้างประจำปีของกรมปศุสัตว์ เพื่อให้สอดคล้องกับแผนการส่งออกสินค้าปศุสัตว์ไปยังสหภาพยุโรป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์วรวิชญ์ วราอัศวปติ ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงาน และบุคลากรของงานวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์และฮอร์โมน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ในความร่วมมือปฏิบัติงานให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. **ประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่อง กำหนดมาตรฐานสารตกค้างสำหรับสินค้าสัตว์**. 12 กรกฎาคม 2549.

คณะกรรมการประสานและบูรณาการงานด้านการดื้อยาต้านจุลชีพ. 2559. **แผนยุทธศาสตร์การจัดการการดื้อยาต้านจุลชีพประเทศไทย พ.ศ. 2560–2564.** กระทรวงสาธารณสุขและกระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

นิธิมา สุ่มประดิษฐ์, ศิริตรี สุทธจิตต์, สิตานันท์ พูลผลทรัพย์, รุ่งทิพย์ ชวนชื่น และภูษิต ประคองสาย. 2558. **ภูมิทัศน์ของสถานการณ์และการจัดการการดื้อยาต้านจุลชีพในประเทศไทย**. สำนักพิมพ์อักษรกราฟฟิคแอนด์ดีไซน์, กรุงเทพฯ.

วิษณุ ธรรมลิขิตกุล. 2551. โคลิสติน: ยาต้านจุลชีพสำหรับรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียกรัมลบดื้อยา. **เวชบันทึกศิริราช** 1(3): 152-158.

สุจิตตรา พงศ์วิวัฒน์. 2555. คู่มือการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ตามแนวมติคณะกรรมาธิการยุโรป 2002/657/EC สำหรับห้องปฏิบัติการทดสอบด้านสารตกค้างยาสัตว์ วิธียืนยันผลและวิธีคัดกรอง. สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์. ปทุมธานี.

Boison, J. O., S. Lee and J. Matus. 2015. A multi-residue method for the determination of seven polypeptide drug residues in chicken muscle tissues by LC-MS/MS. **Anal Bioanal Chem** 407: 4065-4078.

Codex Alimentarius Commission. 2018. Maximum Residue Limits (MRLs) and Risk Management Recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods.

Corley, J. 2003. Best Practices in establishing detection and quantification limits for pesticide residues in foods. **John Wiley & Sons**, New York.

Decolin, D., P. Leroy and A. Nicolas. 1997. Hyphenated liquid chromatographic method for the determination of colistin residues in bovine tissues. **Journal of Chromatographic Science** 35: 557-564.

European Commission. 2002. Commission Decision (EC) 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 95/23/EC: concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**. L 221, 8-36.

European Commission. 1996. Council Directive 96/23/EC of 23 May 1996: laying down analytical methods to be used for detecting certain substances and residues thereof in live animals and animal products (Revision of Commission Decision 93/256/EC). **Official Journal of the European Community**. L125, 10-32.

European Commission. 2009. Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on Pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. **Official Journal of the European Union** L15:1-72.

European Medicines Agency. 2016. Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health 27 July 2016. European Medicines Agency, United Kingdom.

European Union Reference Laboratory. 2016. Test method confirmatory method for the determination of polypeptide antibiotics in red and white meat by LC-MS/MS.

Falagas, M. E. and S. K. Kasiakou. 2005. Colistin: the revival of Polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. **Reviews of anti-infective agents** 40: 1333-1340.

Govaerts, C., J. Rozenski, J. Orwa, E. Roets, A. V. Schepdael and J. Hoogmartens. 2002. Mass spectrometric fragmentation of cyclic peptides belonging to the polymyxin and colistin antibiotics studied by ion trap and quadrupole/orthogonal acceleration time-of-flight technology. **Rapid Communications in mass spectrometry** 16: 823-833.

Japan Food Chemical Research Foundation. 2011. Table of MRLs for agricultural chemicals, colistin. Maximum Residue Limits (MRLs) List of Agricultural Chemicals in Foods. Available source : https://db.ffcr.or.jp/front/pesticide_detail?id=23900, June 14, 2017.

Liu, Y. Y., Y. Wang, T. R. Walsh, L. X. Yi, R. Zhang, J. Spencer, Y. Doi, G. Tian, B. Dong, and X. Huang. 2015. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet infectious diseases** 16(2): 161-168.

Sin, D. W.-mei*, C. Ho, Y.-C. Wong, S.-k. Ho and A. C.-b. Ip. 2005. Analysis of major components of residual bacitracin and colistin in food samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta** 535: 23–31.

Qin, F., L. Xiaowei, Z. Kangni, K. Yuebin, W. Yingyu, L. Wang, Y. Fugen and X. Xia. 2018. Determination of Colistin in animal tissues, egg, milk, and feed by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food chemistry** 24: 166-172.

Wan, E.C., C. Ho, S. D. W. and Y.-C. Wong. 2006. Analysis of colistin a and b in milk and animal tissues by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** 385(1): 181-188.

Waters. 2017. Oasis solid-phase extraction products. Sorbents. Available source : https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720001692en.pdf, June 14, 2017