

การพัฒนาวิธีทดสอบ colistin ในอาหารสัตว์ที่ผสมยาโดยเทคนิค liquid chromatography mass spectrometry

ชูศักดิ์ อาจสูงเนิน สุรินทร์ กิตติจรรวัฒนา งามอาจ บุญบรรล
ธนธรณ์ ดั่งทอง ปันดดา เต้าชัยภูมิ

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีทดสอบ colistin A และ colistin B ในอาหารสัตว์ที่ผสมยาโดยเทคนิค liquid chromatography mass spectrometry ใช้คอลัมน์ Phenomenex, Kinetex C₁₈, 1.7 ไมโครเมตร ขนาด 100 × 2.1 มิลลิเมตร อัตราการไหล 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาณการฉีด 5 ไมโครลิตร ใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่คือ 0.1% formic acid ใน water และ 0.1% formic acid ใน acetonitrile (95 : 5, v/v) ในแบบ gradient elution สามารถหาค่า colistin ได้ภายใน 6 นาที เปรียบเทียบการใช้และไม่ใช้ Polymyxin B เป็น internal standard (IS) และใช้เทคนิคการสกัดแบบ dispersive solid-phase extraction (d-SPE) ชนิด primary secondary amine (PSA), graphitized carbon black (GCB) และ C18 50 มิลลิกรัม พบว่าวิธีการเตรียมตัวอย่างแบบไม่ใช้ internal standard และใช้ PSA 50 มิลลิกรัม ในการสกัดแบบ matrix-fortified calibration curve ให้ความสัมพันธ์เชิงเส้นมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ที่ 0.9997 และ 0.9993 ตามลำดับ ดังนั้นวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบในอาหารสัตว์ที่ผสมยาโดยเทคนิค liquid chromatography mass spectrometry ได้ต่อไป

คำสำคัญ : colistin A, colistin B, Polymyxin B, internal standard, dispersive solid-phase extraction, liquid chromatography-mass spectrometry

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Method development for the determination of colistin in medicated feed by liquid chromatography mass spectrometry

Chusak Ardsoongnearn, Sunan Kittijaruwattana, Ongart Boonbanlu, Thanathorn Duangthong, Panadda Taochaiyaphum

Abstract

A quantitative method was developed for the determination of colistin A and colistin B in medicated feed using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). The analysis employed a Phenomenex, Kinetex C18 column (1.7 μ m particle size, 100 $\times$ 2.1 mm), with a flow rate of 0.2 mL/min and an injection volume of 5 μ L. Gradient elution was performed using a mobile phase comprising 0.1% formic acid in water and 0.1% formic acid in acetonitrile (95:5, v/v). Colistin A and B were eluted within 6 minutes. A comparison was made between using and not using Polymyxin B as an internal standard (IS), and the extraction process was carried out using dispersive solid-phase extraction (d-SPE) with primary secondary amine (PSA), graphitized carbon black (GCB), and C18 (50 mg). The sample preparation method, which excluded the internal standard and employed 50 mg PSA for matrix-fortified calibration, demonstrated linearity with correlation coefficients (*r*) of 0.9997 and 0.9993 for colistin A and colistin B, respectively. The developed method proved suitable for evaluating method validation for colistin A and colistin B in medicated feed using LC-MS.

Keywords: colistin A, colistin B, Polymyxin B, internal standard, dispersive solid-phase extraction, liquid chromatography-mass spectrometry

Veterinary Drugs and Hazardous Substances Assay Division, Bureau of Quality Control of Livestock Products, Department of Livestock Development.

บทนำ

ยาสัตว์เป็นปัจจัยการผลิตหนึ่งที่มีความสำคัญในการเลี้ยงสัตว์ เป็นต้นทุนในการเลี้ยงสัตว์ของเกษตรกรและเป็นเครื่องมือหนึ่งในการรักษาโรคที่มีผลต่อสุขภาพสัตว์ และมนุษย์จึงจำเป็นต้องมีการควบคุมคุณภาพยาสัตว์ที่ใช้ในประเทศที่มีวางจำหน่ายในร้านขายยาสัตว์ ตลอดจนถึงการควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ที่ผสมยาที่โรงงานผลิตอาหารสัตว์เพื่อการรักษาโรคสัตว์ได้ผลดีปราศจากปัญหาจากยาสัตว์ตกค้าง และช่วยชะลอปัญหาการเกิดเชื้อดื้อยาในสัตว์

ด้วยเหตุผลดังกล่าวภายใต้แผนยุทธศาสตร์การจัดการการดื้อยาต้านจุลชีพประเทศไทย พ.ศ. 2560–2564 ยุทธศาสตร์ที่ 4 การป้องกันและควบคุมเชื้อดื้อยาและควบคุมกำกับดูแลการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างเหมาะสมในภาคการเกษตรและสัตว์เลี้ยง กรมปศุสัตว์ได้มุ่งมั่นดำเนินการเพื่อให้บรรลุเป้าหมายในการลดการใช้ยาปฏิชีวนะลงร้อยละ 30 รวมถึงการควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ที่ผสมยาประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่อง กำหนดหลักเกณฑ์และวิธีการควบคุมการผลิตอาหารสัตว์ที่ผสมยา ซึ่งมีการกำหนดหลักเกณฑ์การควบคุมคุณภาพที่สำคัญคือ ทดสอบการกระจายอย่างสม่ำเสมอเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) และทดสอบการปนเปื้อนข้ามของยา (drug carryover) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้มีการกระจายตัวของยาอย่างสม่ำเสมอตามใบสั่งยาของสัตวแพทย์ควบคุมฟาร์มสามารถนำไปใช้ในการรักษาโรคสัตว์อย่างมีประสิทธิภาพ รวมถึงไม่เกิดการปนเปื้อนข้ามระหว่างชุดการผลิต ตามที่กฎหมายกำหนด เป็นการลดโอกาสเกิดสารตกค้างรวมถึงการเกิดเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพ ซึ่งการตรวจสอบกำหนดให้ใช้วิธีทางห้องปฏิบัติการในการวิเคราะห์ homogeneity และ carryover

Choosakoonkriang et al. (2013) ทำการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีในการทดสอบ colistin sulfate ทดสอบในตัวอย่างอาหารสัตว์และอาหารสัตว์ที่ผสมยา โดยใช้ high-performance liquid chromatographic (HPLC) ใช้ gentamicin sulfate เป็น internal standard ทำการสกัดด้วย water: acetonitrile (20: 80) นำไป sonicated เป็นเวลา 30 นาที และ stirred เป็นเวลา 30 นาที Clean-up โดยใช้ solid phase extraction (SPE) ชนิด C18 Sep-Pak cartridges ทดสอบด้วย HPLC โดยใช้คอลัมน์ ZORBAX Eclipse XDB-C18, 5 ไมโครเมตร ขนาด 150 x 4.6 มิลลิเมตร และใช้ UV detection ที่ 215 นาโนเมตร โดยใช้ 30 mM sulfate buffer (pH 2.5) : acetonitrile (76:24) เป็น mobile phase พบค่าสัมประสิทธิ์การตัดสีนใจ (r^2) เท่ากับ 0.998 ในช่วงความเข้มข้นอยู่ในช่วง 25 - 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ recovery อยู่ในช่วง 90.92 ถึง 93.77% โดยมีค่า precision ของ intra-day และ inter-day (%RSD, n=3) น้อยกว่า 7.9%

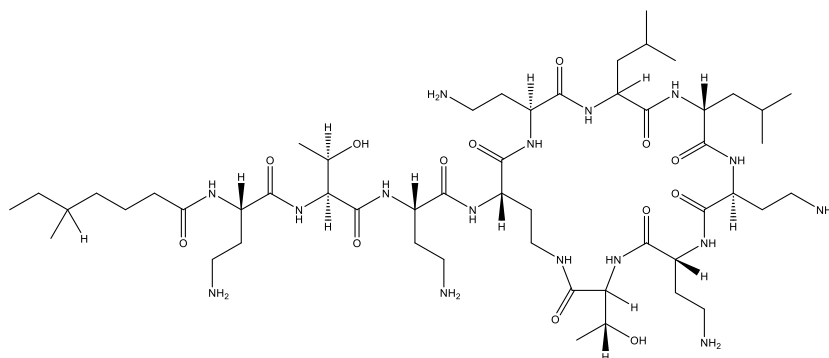


Fig. 1 Structure of colistin

Cancho Grande et al. (2001) ได้ทดสอบ colistin (COL) และ tiamulin (TML) ใน Medicated Premixes ชนิดเหลวและชนิดแข็ง โดยใช้ HPLC – diode array detector สแกนในช่วงความยาวคลื่น 200 - 380 นาโนเมตร สำหรับ COL และ 206 - 208 นาโนเมตร สำหรับ TML ใช้ 5 μ m Ultracarb ODS 30% C ขนาด 15 x 4.6 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Phenomenex โดยมี acetonitrile: water 20: 80 (v/v) ปรับ pH เป็น 2.5 ด้วย triethylamine เป็น mobile phase การเตรียมตัวอย่างชนิดเหลวโดยใช้น้ำในการละลายตัวอย่าง COL และ TML ให้ได้ความเข้มข้น 200 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และตัวอย่างชนิดแข็งสำหรับ COL นำไปเตรียมโดยละลายด้วยน้ำให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ สำหรับ TML ทำการสกัดโดยการเขย่าด้วยน้ำและนำไปทดสอบด้วย HPLC ความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรง (linear range) ของ COL อยู่ในช่วง 100 - 400 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TML อยู่ในช่วง 0.5 – 200 มิลลิกรัมต่อลิตร พบค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) ของ COL และ TML เท่ากับ 0.996 และ 0.999 ตามลำดับ %RSD ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ของ COL เท่ากับ 2.6% และ TML เท่ากับ 0.2% มีค่า LOQ เท่ากับ 18.9 และ 25.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ LOD เท่ากับ 14.3 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Song et al. (2019) ได้พัฒนาประสิทธิภาพวิธีทดสอบในการ ตรวจสอบการ ตรวจหาสาร cyclopolypeptide antibiotics พร้อมกันในระดับสารตกค้าง 7 ชนิด (vancomycin, polymyxin B, polymyxin E, teicoplanin A2, bacitracin A, daptomycin and virginiamycin M1) ในอาหารสัตว์ โดยใช้เทคนิค liquid chromatography-tandem mass spectrometry การสกัดตัวอย่างทำโดยใช้สารละลาย acidified methanol-aqueous และเปรียบเทียบประสิทธิภาพการ clean up ด้วยวิธี dispersive solid-phase extraction (DSPE) ระหว่าง packing 4 ชนิดได้แก่ primary secondary amine (PSA), multiwalled carbon nanotube (MWCNTs), C18 และ graphitized carbon black (GCB) ซึ่งพบว่า PSA มีประสิทธิภาพการสกัดดีที่สุด วิธีการทดสอบมีช่วงความเป็นเส้นตรงที่ดี การ spiked ที่ระดับความเข้มข้น 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ให้ recoveries อยู่ในช่วง 63.1% - 107.5% โดยที่ deviation relative standard (%RSD) น้อยกว่า 14.7% ในการประเมิน matrix effects ในอาหารสัตว์ที่แตกต่างกันหลายชนิดมีพบว่า strong signal suppression (>50%) ซึ่งมีความไวในการตรวจ cyclopolypeptides ที่ได้รับการอนุญาตและห้ามเติมในอาหารสัตว์

Xu et al. (2012) ได้ตรวจหา colistin A และ B ในผลิตภัณฑ์ประมง โดยใช้วิธี reversed phase ultra performance liquid chromatography - positive electrospray ionization tandem spectrometry (UPLC-ESI-MS/MS) ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ประมงปริมาณ 5 กรัมถูกสกัดด้วย 1.0 โมลต่อลิตร ของ hydrochloric acid ใน methanol: water ทำให้บริสุทธิ์ด้วย PLS solid phase extraction หลังจากนั้น elute และทำให้แห้งลดน้อยกว่า 1 มิลลิตร ภายใต้ภาวะอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และขั้นตอนสุดท้ายเติม formic acid: acetonitrile: water (0.2: 10: 90, v/v/v) ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิตร ใช้ 0.2% formic acid in acetonitrile และ 0.2% formic acid in water เป็น mobile phase อัตราการไหล 0.2 มิลลิตรต่อนาที และ calibration curve อยู่ในช่วงความเข้มข้น 200 ถึง 2000 นาโนกรัมต่อมิลลิตร สำหรับ colistin A และ B และ recoveries อยู่ระหว่าง 72.9 และ 82.9% ค่า LOD เท่ากับ 10.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ LOQ เท่ากับ 40.0 มิลลิกรัมต่อ

กิโลกรัม และ intra-day assay precision อยู่ระหว่าง 2.17 และ 9.00% และ inter-day อยู่ระหว่าง 2.80 และ 6.97%

1. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีทดสอบ colistin ในอาหารสัตว์ที่ผสมยาโดยเทคนิค liquid chromatography mass spectrometry

2. ขอบข่าย

ใช้สำหรับทดสอบปริมาณ colistin A และ colistin B ในตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ผสมยา และการกระจายอย่างสม่ำเสมอเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) ที่ และทดสอบการปนเปื้อนข้ามของยา (drug carryover)

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีที่ผ่านการพัฒนาวิธีทดสอบ colistin ในอาหารสัตว์ที่ผสมยาโดยเทคนิค liquid chromatography mass spectrometry และนำไปใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีต่อไป

4. วิธีดำเนินการ

4.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 4.1.1 เครื่อง LC-MS/MS ยี่ห้อ Thermo รุ่น TSQ plus
- 4.1.2 เครื่องผลิตน้ำบริสุทธิ์ ยี่ห้อ Thermo รุ่น Lab Tower EDI 30
- 4.1.3 เครื่องชั่งทศนิยม 5 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น XP205DR
- 4.1.4 ตู้ดูดควัน (fume hood)
- 4.1.5 Beaker ขนาด 50 มิลลิลิตร
- 4.1.6 Volumetric flask ขนาด 25 และ 100 มิลลิลิตร
- 4.1.7 Volumetric pipette ขนาด 1 มิลลิลิตร

4.2 วัสดุวิทยาศาสตร์

- 4.2.1 Acetonitrile, HPLC grade
- 4.2.2 Formic acid, AR grade
- 4.2.3 Methanol, AR grade
- 4.2.4 น้ำบริสุทธิ์ความต้านทานไม่น้อยกว่า 18.2 M Ω .cm (น้ำ DI)

4.3 สารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน colistin ยี่ห้อ HPC
สารมาตรฐาน Polymyxin B ยี่ห้อ Supelco

4.4 ขั้นตอนการทดลอง

4.4.1 การเตรียม mobile phase

- 4.4.1.1 Mobile phase A: 0.1% formic acid ใน water: เตรียมโดยปิ เปต formic acid 0.5 มิลลิลิตร ลงใน water 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน กรองผ่าน cellulose filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร และนำไป degas

- 4.4.1.2 Mobile phase B: 0.1% formic acid ใน acetonitrile: เตรียมโดยปิเปต formic acid 0.5 มิลลิลิตร ลงใน acetonitrile 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันกรองผ่าน cellulose filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร และนำไป degas
- 4.4.2 การเตรียม Internal standard Polymyxin B (IS)
- การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Polymyxin B ความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร: ชั่งสารมาตรฐาน Polymyxin B ประมาณ 50 มิลลิกรัม (บันทึกน้ำหนักจริง) ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย 0.1% formic acid in water
- 4.4.3 การเตรียม matrix-fortified calibration curve ความเข้มข้น 2 – 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
- 4.4.3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน colistin ความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร: ชั่งสารมาตรฐาน colistin ประมาณ 50 มิลลิกรัม (บันทึกน้ำหนักจริง) ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย 0.1% formic acid in water
- 4.4.3.2 การเตรียม matrix-fortified calibration curve level 1: ปิเปตสารละลายมาตรฐาน colistin ความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตรและสารละลายมาตรฐาน Polymyxin B ความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง 5 กรัม ตั้งพักไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง และนำไปสกัดตาม Fig. 2 และ Fig. 3
- 4.4.3.3 การเตรียม standard calibration curve solution level 2: ปิเปตสารละลายมาตรฐาน colistin ความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตรและสารละลายมาตรฐาน Polymyxin B ความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง 5 กรัม ตั้งพักไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง และนำไปสกัดตาม Fig. 2 และ Fig. 3
- 4.4.3.4 การเตรียม standard calibration curve solution level 3: ปิเปตสารละลายมาตรฐาน colistin ความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตรและสารละลายมาตรฐาน Polymyxin B ความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง 5 กรัม ตั้งพักไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง และนำไปสกัดตาม Fig. 2 และ Fig. 3
- 4.4.3.5 การเตรียม standard calibration curve solution level 4: ปิเปตสารละลายมาตรฐาน colistin ความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 4 มิลลิลิตรและสารละลายมาตรฐาน Polymyxin B ความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง 5 กรัม ตั้งพักไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง และนำไปสกัดตาม Fig. 2 และ Fig. 3

4.4.3.6 การเตรียม standard calibration curve solution level 5: บี เปต สารละลายมาตรฐาน colistin ความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตรและสารละลายมาตรฐาน Polymyxin B ความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง 5 กรัม ตั้งพักไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง และนำไปสกัดตาม Fig. 2 และ Fig. 3

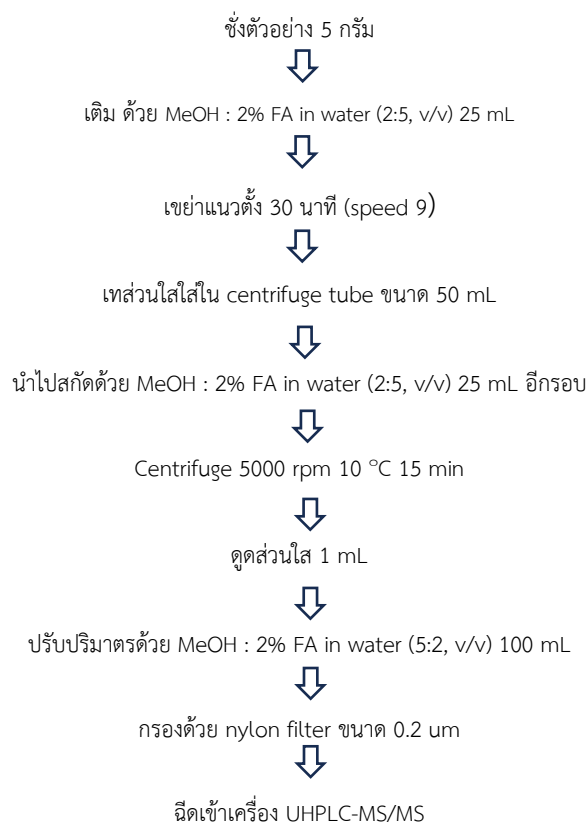


Fig. 2 Sample preparation.

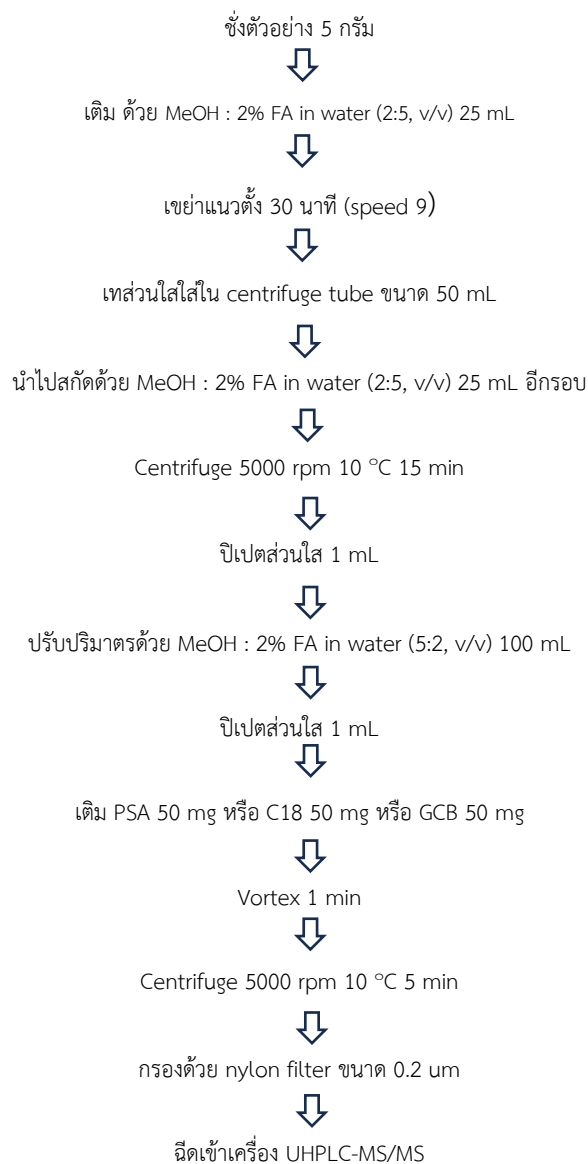


Fig. 3 Sample preparation using Dispersive Solid Phase Extraction.

4.4.4 ศึกษาการ optimize colistin A, colistin B และ polymyxin B โดยใช้ micro syringe ดูดสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิดความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปฉีดเข้า mass แบบ direct infusion ให้เครื่อง optimize ค่า parameters ที่เหมาะสมให้และนำค่า mass parameter ไปใช้ในการทดสอบ

- 4.4.5 ศึกษา condition ของ Liquid Chromatography (LC) และ mass parameters
- 4.4.5.1 การศึกษาสภาวะของ LC โดยการศึกษา องค์ประกอบ mobile phase อัตราการไหล ชนิดและขนาดของคอลัมน์ อุณหภูมิของคอลัมน์ และ ปริมาตรการฉีดสาร
- 4.4.5.2 ศึกษาพารามิเตอร์แรงดันไฟฟ้าและอุณหภูมิของแหล่งกำเนิดไอออน การตั้งค่า collision energy สำหรับ MS/MS เนื่องจากมีความสำคัญต่อการเพิ่ม ประสิทธิภาพและความแม่นยำในการทดสอบสารในระบบ mass spectrometry (MS)
- 4.4.6 ศึกษาเปรียบเทียบการสกัด matrix-fortified calibration curve แบบใช้และไม่ใช้ เทคนิค dispersive solid-phase extraction (d-SPE) โดยใช้ primary secondary amine (PSA), graphitized carbon black (GCB) และ C₁₈ และทำการทดสอบ แบบใช้และไม่ใช้ internal standard ในการสกัด

5. ผลการทดลอง

- 5.1 ผลการ optimize colistin A, colistin B และ polymyxin B โดยใช้ micro syringe ดูด สารละลายมาตรฐานแต่ละชนิดความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปฉีดเข้า mass แบบ direct infusion จะได้ค่า ตาม Table 1 และ Fig. 4-6 ซึ่งจะนำไปใช้ตั้งค่าในการทดสอบ

Table 1. MS detection colistin A, colistin B and Polymyxin B ESI positive mode

Compounds	Precursor ions (m/z)	Product ions (m/z)	Collision Energy (V)	RF Lens (V)	Dwell Time (ms)
Colistin A	390.56	100.967	20.04	118	148.175
		223.133	17.03	118	148.175
Colistin B	386.02	100.967	19.97	149	148.175
		227.05	13.52	149	148.175
Polymyxin B	401.9	101.05	17.82	147	148.175

จาก Table 1 ค่า collision energy (CE) อยู่ในช่วง 13.52-20.04 V และค่า RF Lens อยู่ใน ช่วง 118-149 V ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมสำหรับ colistin A colistin B และ Polymyxin B เนื่องจาก ค่า CE และ RF Lens ที่มีผลความไม่เสถียรในสัญญาณที่ได้ส่งผลต่อความแม่นยำและความถูกต้อง ของผลทดสอบ

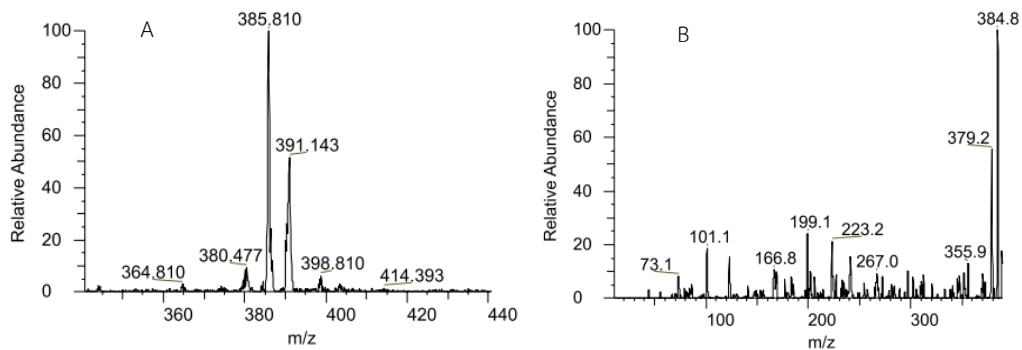


Fig. 4 Mass spectrum ของ colistin A: (A) precursor ion, (B) product ions

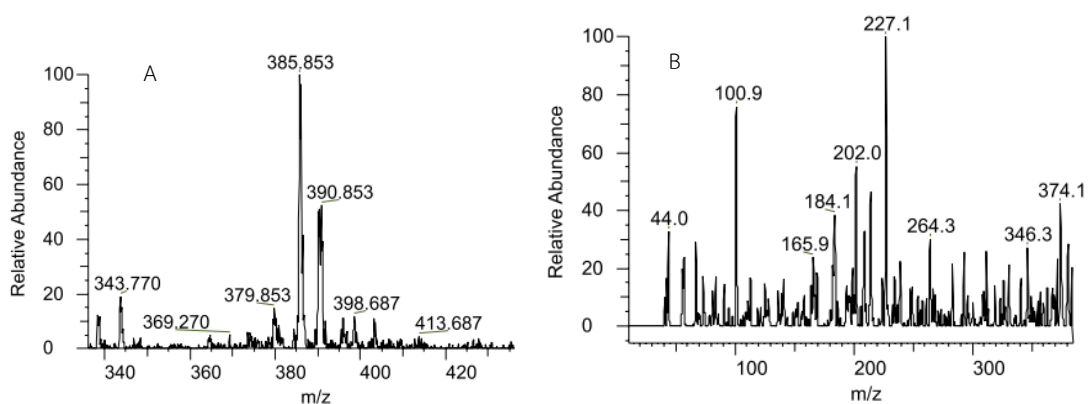


Fig. 5 Mass spectrum ของ colistin B: (A) precursor ion, (B) product ions

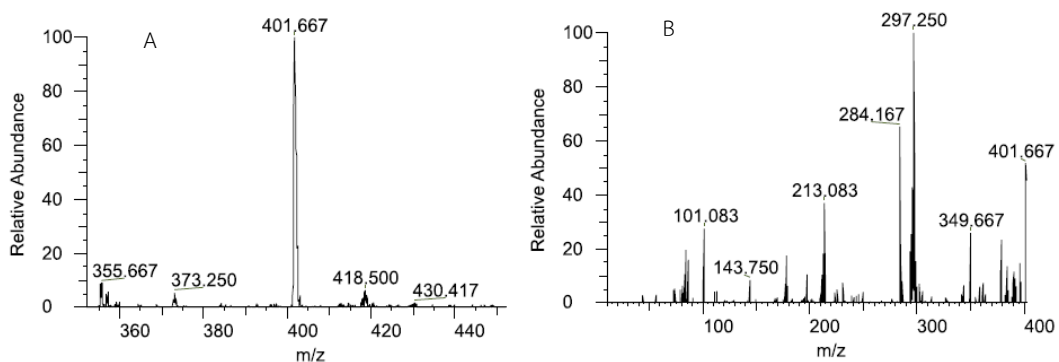


Fig. 6 Mass spectrum ของ Polymyxin B: (A) precursor ion, (B) product ions

5.2 ผลการศึกษา condition ของ LC (Table 2) และ mass parameters (Table 3) ที่ใช้ในการทดสอบโดยใช้คอลัมน์ยี่ห้อ Phenomenex, Kinetex 1.7 μ m C18 100 x 2.1 mm ใช้ 0.1% formic acid in water และ 0.1% formic acid in acetonitrile เป็น mobile phase ซึ่งจะทำให้ pH ของ mobile phase อยู่ในช่วงประมาณ 2.7 ซึ่งเหมาะสำหรับการเพิ่มประสิทธิภาพของการ ionization ในกระบวนการ electrospray ionization (ESI) formic acid เป็นสารที่มีความสามารถในการระเหยได้ดี ทำให้เหมาะสมสำหรับการใช้งานในระบบ LC-MS/MS เนื่องจากไม่ก่อให้เกิดปัญหาในการทำงานร่วมกับเครื่องมือ

Table 2. LC condition.

Parameters	Value
Column:	Phenomenex, Kinetex 1.7 μ m C18 100 x 2.1 mm
Mobile phase:	Time (min) 0.1 % FA in water 0.1 % FA in acetonitrile
	0 85 5
	1 20 20
	2 20 80
	3 85 80
	3.5 85 5
Flow rate:	0.2 mL/min
Column temperature:	40 °C
Sample temperature:	25 °C
Injection volume:	5 μ L
End time	6 min

Table 3. H-ESI parameters.

Parameters	Value
Positive Ion (V)	3500
Sheath Gas (Arb)	50
Aux Gas (Arb)	10
Sweep Gas (Arb)	1
Ion Transfer Tube Temp (°C)	325
Vaporizer Temp (°C)	300
CID gas (mTorr)	1.5

จาก Table 3 แรงดันไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการ ionization คือ 3500V ซึ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างไอออนของสาร ในขณะเดียวกันอุณหภูมิของแหล่งกำเนิดไอออนที่ตั้งไว้ที่ 300°C จะช่วยควบคุมความเร็วของโมเลกุลในกระบวนการ ionization ส่งผลให้เกิดการสร้างไอออนที่มีคุณภาพสูงมากยิ่งขึ้น

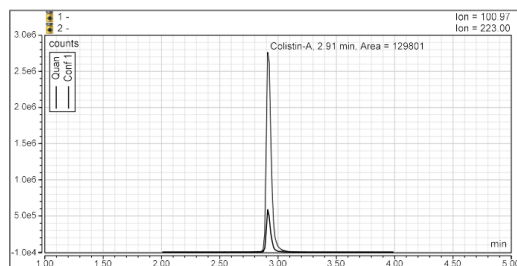


Fig. 7 Chromatogram colistin A

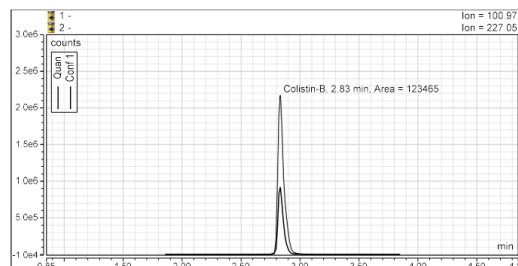


Fig. 8 Chromatogram colistin B

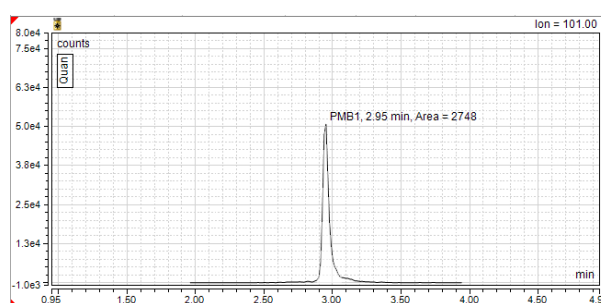


Fig. 9 Chromatogram Polymyxin B

5.3 ผลการศึกษาเปรียบเทียบการสกัด matrix-fortified calibration curve แบบใช้และไม่ใช้เทคนิค dispersive solid-phase extraction (d-SPE) โดยใช้ primary secondary amine (PSA), graphitized carbon black (GCB) และ C18 และทำการทดสอบแบบใช้และไม่ใช้ internal standard ในการสกัดได้ผลตาม Table 4-5 และ Fig 10-25

Table 4. matrix-fortified calibration curve not use internal standard

Parameters	เปรียบเทียบวิธีการสกัด							
	Not use d-SPE		d-SPE (C18)		d-SPE (GCB)		d-SPE (PSA)	
	Colistin A	Colistin B	Colistin A	Colistin B	Colistin A	Colistin B	Colistin A	Colistin B
Slope	318.3881	370.2753	-44.5557	-15.3133	-51.1303	-80.8437	656.7408	788.2690
Intercept	46.7972	138.8763	640.3068	664.5608	297.7245	415.0557	-72.6200	-199.4515
<i>r</i>	0.9970	0.9969	-0.7595	-0.3534	-0.9483	-0.9767	0.9997	0.9993

Table 5. matrix-fortified calibration curve use internal standard

Parameters	เปรียบเทียบวิธีการสกัดโดยใช้ IS							
	Not use d-SPE		d-SPE (C18)		d-SPE (GCB)		d-SPE (PSA)	
	Colistin A	Colistin B	Colistin A	Colistin B	Colistin A	Colistin B	Colistin A	Colistin B
Slope	59.5322	66.3479	12.0403	30.7963	163.2771	54.0676	53.4359	66.3876
Intercept	73.5247	117.9018	176.4299	171.4322	8.4816	314.4356	32.2338	18.9030
<i>r</i>	0.9041	0.8647	0.7324	0.9217	0.9492	0.2885	0.9801	0.9875

จาก Table 4 และ 5 พบว่าการทดสอบ matrix-fortified calibration curve โดยการสกัดตัวอย่างตาม Fig 2 และ 3 สกัดโดยไม่ใช้ internal standard ด้วยวิธี Not use d-SPE มีค่า *r* เท่ากับ 0.9970 และ 0.9969 ตามลำดับ และ d-SPE (PSA) ทั้ง colistin A และ colistin B มีค่า *r* เท่ากับ 0.9997 และ 0.9993 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ $r \geq 0.995$ (FDA, 2005)

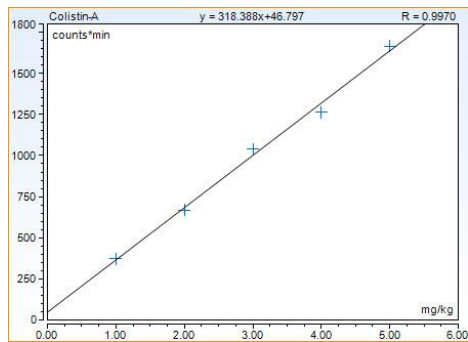


Fig. 10 Matrix-fortified calibration curve of colistin A Not use d-SPE

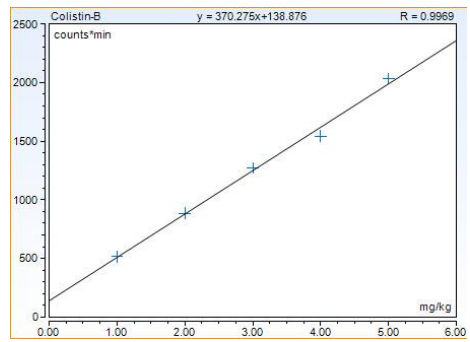


Fig. 11 Matrix-fortified calibration curve of colistin B Not use d-SPE

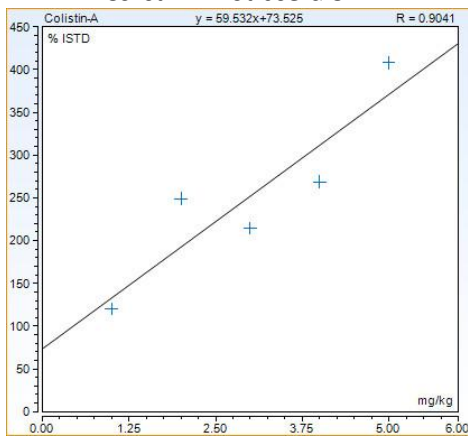


Fig. 12 Matrix-fortified calibration curve of colistin A Not use d-SPE (IS)

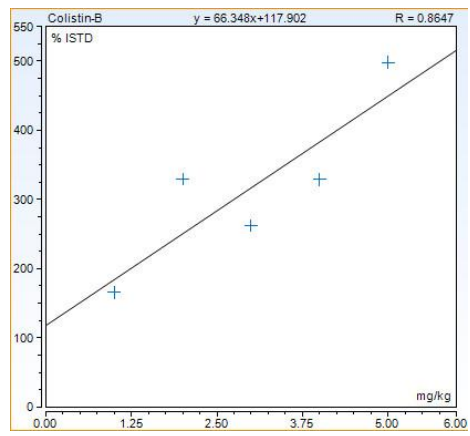


Fig. 13 Matrix-fortified calibration curve of colistin B Not use d-SPE (IS)

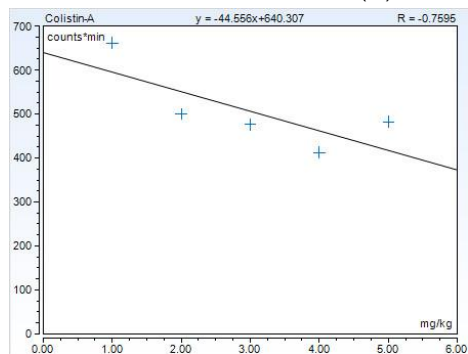


Fig. 14 Matrix-fortified calibration curve of colistin A d-SPE (C18)

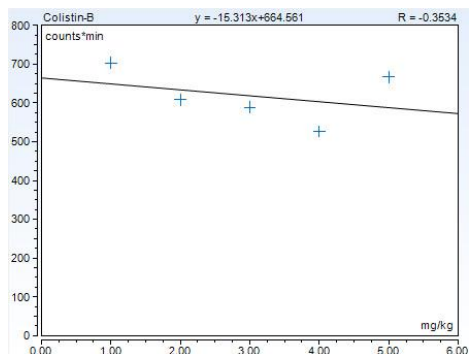


Fig. 15 Matrix-fortified calibration curve of colistin B d-SPE (C18)

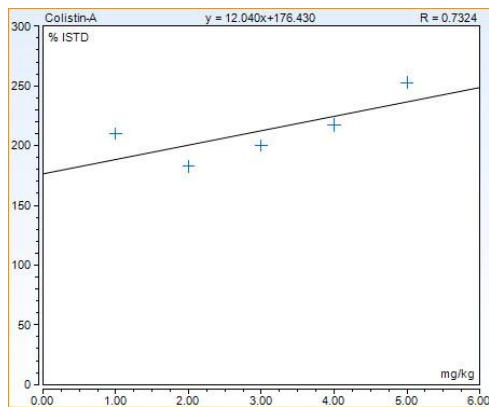


Fig. 16 Matrix-fortified calibration curve of colistin A d-SPE (C18) (IS)

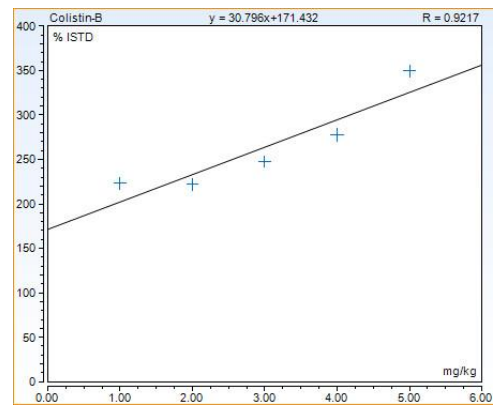


Fig. 17 Matrix-fortified calibration curve of colistin B d-SPE (C18) (IS)

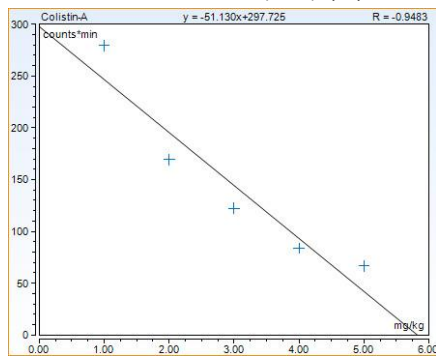


Fig. 18 Matrix-fortified calibration curve of colistin A d-SPE (GCB) (IS)

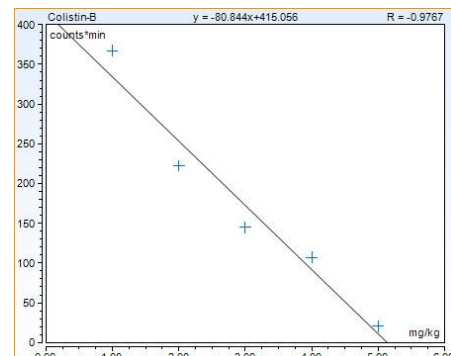


Fig. 19 Matrix-fortified calibration curve of colistin B d-SPE (GCB) (IS)

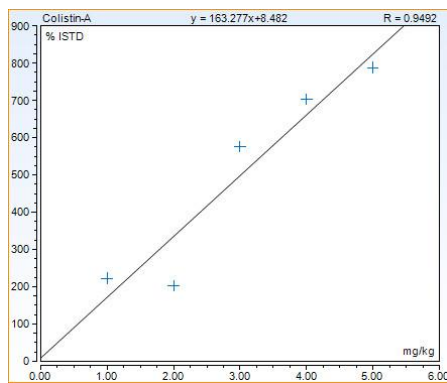


Fig. 20 Matrix-fortified calibration curve of colistin A d-SPE (GCB) (IS)

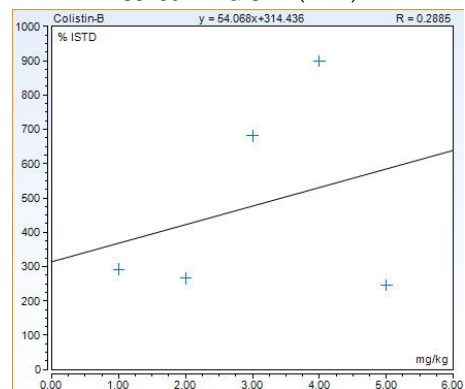


Fig. 21 Matrix-fortified calibration curve of colistin B d-SPE (GCB) (IS)

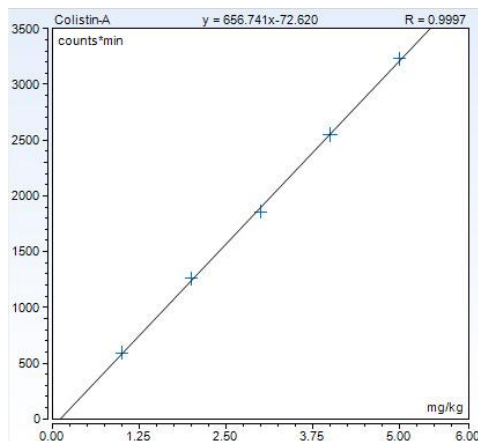


Fig. 22 Matrix-fortified calibration curve of colistin A d-SPE (PSA)

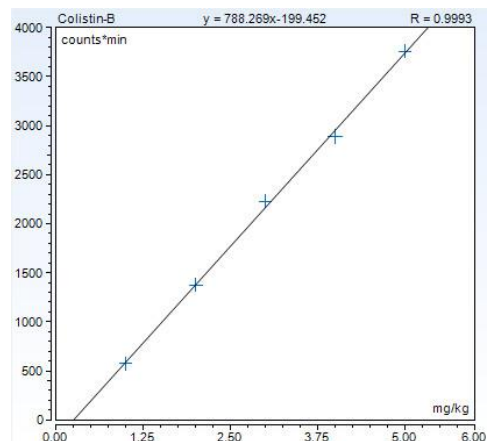


Fig. 23 Matrix-fortified calibration curve of colistin B d-SPE (PSA)

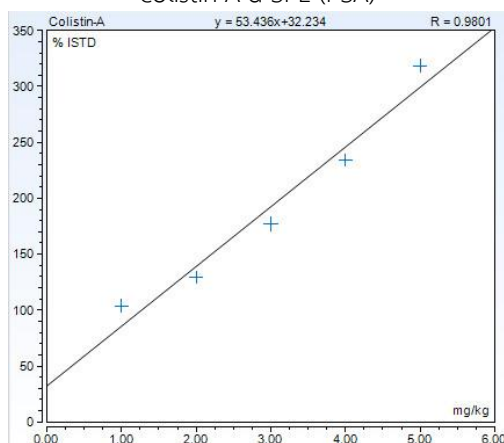


Fig. 24 Matrix-fortified calibration curve of colistin A d-SPE (PSA) (IS)

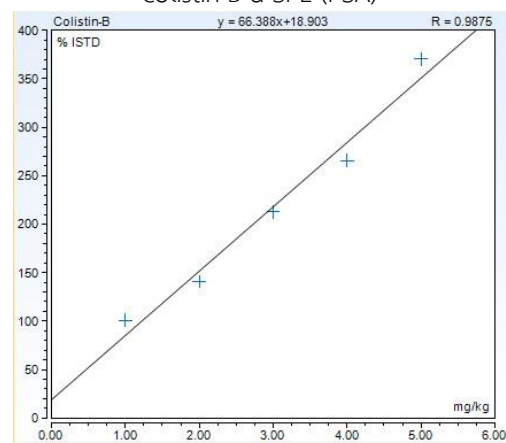


Fig. 25 Matrix-fortified calibration curve of colistin B d-SPE (PSA) (IS)

6. สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษา condition LC และการ optimize mass parameters ของ colistin A, colistin B และ polymyxin B สามารถนำค่าที่ได้ไปใช้ในการทดสอบตัวอย่างได้โดยเมื่อฉีดตัวอย่างแล้วพบพีคทั้ง 3 ชนิดสารตาม Fig. 7 - 9

การศึกษาเปรียบเทียบการสกัด matrix-fortified calibration curve แบบใช้และไม่ใช้เทคนิค dispersive solid-phase extraction (d-SPE) โดยใช้ primary secondary amine (PSA), graphitized carbon black (GCB) และ C18 และทำการทดสอบแบบใช้และไม่ใช้ internal standard พบว่าการทดสอบ matrix-fortified calibration curve โดยการสกัดตัวอย่างตาม Fig 2 และ 3 สกัดโดยไม่ใช้ internal standard ด้วยวิธี Not use d-SPE มีค่า r เท่ากับ 0.9970 และ 0.9969 ตามลำดับ และ d-SPE (PSA) ทั้ง colistin A และ colistin B มีค่า r เท่ากับ 0.9997 และ 0.9993 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ $r \geq 0.995$ (FDA, 2005) ดังนั้นจึงเลือกใช้การสกัดตัวอย่างแบบไม่ใช้ internal standard และใช้เทคนิคการสกัดแบบ d-SPE (PSA) ไปใช้ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ต่อไป

7. ข้อเสนอแนะ

-

8. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ที่พิจารณาให้ดำเนินการในปีงบประมาณ 2567 เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์ฯ ที่ช่วยเหลือในการปฏิบัติงานให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

9. เอกสารอ้างอิง

- Cancho Grande B., M.S. Garcia Falcon., C. Perez-Lamela., M. Rodriguez Comesana., J. Simal Gandara., 2001. Quantitative Analysis of Colistin and Tiamulin in Liquid and Solid Medicated Premixes by HPLC with Diode-Array Detection. *Chromatographia*, 53, Suppl., S-460-S463
- Choosakoonkriang S., S. Supaluknari., P. Puangkaew., 2013. High Performance Liquid Chromatographic Method for Determination of Colistin Sulfate and its Application in Medicated Premix and Animal Feed. *Journal of Chemical and Molecular Engineering* Vol: 7, No: 4. 224-228
- Food and Drug Administration (2005), Guidance for Industry Validation of Analytical Procedures for Type C Medicated Feeds, Available from :
<https://fda.report/media/70019/CVM-GFI--135-Validation-of-Analytical-Procedures-for-Type-C-Medicated-Feeds.pdf>
- Xuqin S., H. Qiwen., Z. Yingxia., Z. Meiyu., X. Jingmeng., 2019. Rapid multiresidue analysis of authorized/banned cyclopolypeptide antibiotics in feed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry based on dispersive solid-phase extraction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 170 234-242
- Yingjiang X., T. Xiuhui., R. Chuanbo Ren., H. Hui., Z. Xiuzhen., G. Xianghong., L. Huihui., Y. Zhaoqiang., Z. Limin., 2012. Analysis of colistin A and B in fishery products by ultra performance liquid chromatography with positive electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 899 14–20