

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์โคลิสตินในเนื้อสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS

รัตติยา สบู่ทอง นันทพร จีวแดง เย็นฤทัย เศรษฐา อภิษฎา สังข์ทอง

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์โคลิสตินในเนื้อสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS ได้ดำเนินการทดลองด้วยเครื่องมือวิเคราะห์ LC-MS/MS Applied Biosystem รุ่น API4000 และ LC-MS/MS ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น LCMS – 8050 ผลของการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ พบว่าวิธีนี้วิเคราะห์สามารถยืนยันชนิดและหาปริมาณสารตกค้างยาสัตว์นี้ได้ โดยมีความไวเพียงพอที่จะตรวจสอบสารตกค้างในตัวอย่างไม่เกิน 100 ng/g ที่ระดับครึ่งหนึ่งของระดับความเข้มข้นของสารตกค้างสูงสุดที่อนุญาตให้มีได้ Maximum Residue Limits (MRL) ที่กำหนดโดย Commission Regulation (EU) และคณะกรรมการอาหาร CODEX

คำสำคัญ: การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ โคลิสติน เนื้อสัตว์ LC-MS/MS

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Method development of colistin in muscle
by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

Rattiya Saboothong Nuntaporn Ngiwdang Yenrutai Shettha Apichaya Sungthong

Abstract

The method development was performed with LC-MS/MS instrument of Applied Biosystem, model API4000 and Shimadzu model LCMS – 8050. The results of method development assure that this method is suitable for qualitative and quantitative analysis of colistin A and colistin B and the sensitivity is enough to reach the concentration of compounds at half of maximum residue limit (MRL) which was set by the Commission Regulation (EU) and Codex

Key words: Method development, colistin, muscle, LC-MS/MS

Veterinary Public Health Laboratory, Bureau of Quality Control of Livestock Products,
Department of Livestock Development

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์โคลิสตินในเนื้อสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS

รัตติยา สบู่ทอง นันทพร จีวแดง เย็นฤทัย เศรษฐา อภิษฐา สังข์ทอง

บทนำ

โคลิสตินหรือโพลีมิกซิน อี (colistin หรือ polymyxin E) ถูกนำมาใช้เป็นยาปฏิชีวนะทำลายเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบ เช่น *Escherichia coli* *Salmonella* spp. *Acinetobacter* spp. *Pseudomonas aeruginosa* *Klebsiella* spp. และ *Enterobacter* spp. (Falagas and Kasiakou, 2005) ในทางปศุสัตว์ โคลิสตินเริ่มถูกใช้ตั้งแต่ พ.ศ. 2493 (European Medicines Agency, 2016) เป็นยารักษาภายใต้การควบคุมของสัตวแพทย์ เพื่อยับยั้งการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบในลำไส้หรืออาการท้องเสียรุนแรงจากเชื้อแบคทีเรียของสุกร เป็ด ไก่ และวัว แต่อย่างไรก็ตามควรให้ความสำคัญกับการให้ความรู้ในการใช้ยาแก่เกษตรกร และให้อยู่ในการกำกับดูแลของสัตวแพทย์อย่างใกล้ชิด เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดปัญหาสารตกค้างมาสู่ผู้บริโภค โดยกรมปศุสัตว์ได้ออกประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่อง กำหนดมาตรฐานสารตกค้างสำหรับสินค้าปศุสัตว์ ซึ่งระบุปริมาณสารตกค้างสูงสุด (Maximum Residue Limit; MRL) ที่กำหนดให้พบได้ในสินค้าปศุสัตว์สำหรับโคลิสตินในสัตว์เพื่อบริโภคทุกชนิดระบุปริมาณให้พบได้ในกล้ามเนื้อ 150 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และในไข่ 300 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2549) สำหรับสหภาพยุโรปซึ่งเป็นกลุ่มประเทศผู้นำเข้าสินค้าปศุสัตว์ไทยรายสำคัญ ได้กำหนดมาตรฐานสารตกค้างในสินค้าปศุสัตว์ไว้เช่นกันซึ่งมีค่าเท่ากับที่ระบุไว้ในประกาศกรมปศุสัตว์ (European Commission, 2009)

อย่างไรก็ตามความสามารถของโคลิสตินในการกำจัดเชื้อแบคทีเรีย มาพร้อมกับผลข้างเคียงที่อันตราย เช่น เป็นพิษต่อไตและระบบประสาท จึงทำให้มีการใช้ยาปฏิชีวนะกลุ่มอื่นที่มีความปลอดภัยมากกว่าโคลิสติน จนกระทั่ง พ.ศ. 2530 โคลิสตินได้ถูกนำกลับมาใช้ในการรักษาอีกครั้ง โดยได้รับการจัดอันดับเป็นยาขนานสุดท้ายสำหรับการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยา (วิษณุ, 2552; นิธิมา และคณะ, 2558) แต่ปัจจุบันประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะลดลงอย่างมาก เพราะแบคทีเรียมีการปรับตัวให้ดื้อต่อยาปฏิชีวนะตลอดช่วง 30 ปีที่ผ่านมา ในขณะที่ไม่มียาปฏิชีวนะตัวใหม่ๆ มาใช้แทนที่ตัวเดิมที่ซึ่งมีประสิทธิภาพลดลง จึงทำให้เกิดปัญหาในการดื้อยาที่สำคัญ สำหรับประเทศไทย มีปัญหาการดื้อยาที่สำคัญ โดยเชื้อแบคทีเรียที่เป็นปัญหาในการเลี้ยง

สัตว์และในอาหาร คือ E. coli, Campylobacter spp. และ Salmonella spp. ซึ่งเป็นเชื้อดื้อยาที่สำคัญจากการจัดอันดับจากองค์การอนามัยโลก (คณะกรรมการประสานและบูรณาการงานด้านการดื้อยาต้านจุลชีพ, 2559) นอกจากนี้ Liu et al. (2015) ยังมีการค้นพบยีนดื้อยาโคลิสตินในฟาร์มสุกรในประเทศจีน ซึ่งเป็นยีนที่สามารถส่งต่อยีนดื้อยาข้ามสายพันธุ์ได้ (horizontal transferable resistance)

นอกจากนี้ยังมีการระบุไว้ในรายงานของ European Medicines Agency (2016) ว่าปัจจัยสำคัญในการพิจารณาและประเมินความเสี่ยงในการส่งต่อเชื้อดื้อยาจากสัตว์สู่คน คือ เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ถึงแม้ว่าปัจจุบันจะยังไม่มีหลักฐานที่บ่งชี้ว่ามีการติดเชื้อมาจากสัตว์สู่คนก็ตาม และนอกจากนี้แผนยุทธศาสตร์การจัดการการดื้อยาต้านจุลชีพประเทศไทย พ.ศ. 2560-2564 ยังระบุไว้ให้โคลิสตินเป็นยาต้านจุลชีพที่มีผลกระทบสำคัญต่อมนุษย์และสัตว์ที่ใช้เป็นสัญญาณเตือนระดับประเทศอีกด้วย (คณะกรรมการประสานและบูรณาการงานด้านการดื้อยาต้านจุลชีพ, 2559)

ดังนั้นงานวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์และฮอร์โมน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์ ผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ซึ่งรับผิดชอบในการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์ เห็นความสำคัญในการตรวจสอบสารตกค้างยาสัตว์โคลิสตินในเนื้อสัตว์เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการวางแผนการจัดการความปลอดภัยทางอาหารและประกอบการป้องกันเชื้อดื้อยาแพร่ระบาดในคนและสัตว์ จึงวางแผนเพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์และพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารตกค้างโคลิสตินในกล้ามเนื้อไก่ โดยเทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry ให้มีความไวเพียงพอที่จะตรวจสอบสารตกค้างดังกล่าวอย่างน้อยที่ระดับความเข้มข้นครึ่งหนึ่งของปริมาณสารตกค้างสูงสุดที่ยอมให้มีได้ในอาหาร (0.5 MRL) และสามารถยืนยันชนิดและปริมาณของโคลิสตินได้ และทดลองพิสูจน์ความใช้ได้ตามปัจจัยต่างๆ ของเกณฑ์การประเมินสมรรถนะของสหภาพยุโรป (Commission Decision 2002/657/EC) เพื่อให้วิธีการวิเคราะห์มีประสิทธิภาพที่จะดำเนินการพิสูจน์ความใช้ได้และนำไปใช้ในการเฝ้าระวังและตรวจติดตามการตกค้างของยาต้านจุลชีพในแผนการเฝ้าระวังประจำปีและมีความสอดคล้องกับประเด็นยุทธศาสตร์การจัดการการดื้อยาต้านจุลชีพประเทศไทย

1. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์โคลิสติน เอและบี ในเนื้อสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS ที่สามารถยืนยันชนิดและหาปริมาณสารตกค้างยาสัตว์นี้ได้ โดยมีความไวเพียงพอที่จะ

ตรวจสอบสารตกค้างในตัวอย่างเนื้อสัตว์ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 MRL หรือเท่ากับ 75 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ผลรวมของโคลิสตินเอและบี)

2. ขอบข่าย

เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาปฏิชีวนะโคลิสติน เอ และบีในกล้ามเนื้อไก่ โดยเทคนิค LC-MS/MS

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

3.1 ได้วิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาปฏิชีวนะโคลิสติน 2 ชนิด คือ โคลิสติน เอและบี ในกล้ามเนื้อไก่ โดยเทคนิค LC-MS/MS

3.2 สามารถใช้วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ สำหรับการตรวจตัวอย่างกิจกรรมตามแผนสารตกค้างประจำปี ซึ่งเป็นการตรวจรับรองคุณภาพสินค้าปศุสัตว์เพื่อคุ้มครองผู้บริโภคทั้งภายในและภายนอกประเทศ

4. วิธีดำเนินการ

4.1 ค้นคว้า ศึกษาข้อมูลของสารตกค้างโคลิสติน พบว่าโคลิสตินหรือ Polymyxin E ประกอบด้วยองค์ประกอบหลัก 2 สาร ได้แก่ โคลิสติน A (Polymyxin E1): 45% และ โคลิสติน B (Polymyxin E2): 33%

4.2 ทดลองหาตัวทำละลายที่เหมาะสมของโคลิสติน

4.3 ทำการทดลองสกัดและวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยวิธีที่คัดเลือกไว้ ปรับเปลี่ยนวิธีสกัด และหาสภาวะของเครื่อง LC-MS/MS ที่เหมาะสม ด้วยเครื่องมือวิเคราะห์ ดังนี้

4.3.1 LC: Shimadzu 20A, MS/MS: Applied Biosystem รุ่น API4000, HPLC column ยี่ห้อ Waters รุ่น Cortecs+ ขนาด 2.7 μ m 3.0 x 50 mm

4.3.2 LC: Shimadzu LC-20ADXR, MS/MS: Shimadzu รุ่น LCMS-8050, HPLC column ยี่ห้อ Phenomenex รุ่น Kinetex C18 ขนาด 50 x 4.6 mm

4.4 สรุปผลการพัฒนาวิธีวิเคราะห์

5. ผลการทดลอง

5.1 ตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับโคลิสติน ได้แก่ Acetonitrile:น้ำ อัตราส่วน 1:4 โดยปริมาตร เนื่องจากสามารถทำละลายผงของสารมาตรฐานโคลิสตินได้จนเป็นสารละลายเนื้อเดียว

และเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS แล้วให้ผลค่าสัญญาณที่สูงที่สุด และ chromatogram ให้รูปร่างดีที่สุด

5.2 ขั้นตอนการสกัดสารตกค้างยาสัตว์โคลิสติน (Colistin/Polymyxin E) ได้แก่ Colistin A (Polymyxin E₁) และ Colistin B (Polymyxin E₂) และโดยใช้ internal standard ได้แก่ Polymyxin B ในเนื้อสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS รายละเอียด ดังนี้

สารตกค้างยาสัตว์สารตกค้างยาปฏิชีวนะโคลิสติน เอ และ บี ในกล้ามเนื้อไก่จะถูกสกัดออกมาจากตัวอย่างเนื้อสัตว์ ด้วย trichloroacetic acid (TCA) ความเข้มข้น 10% โดยปริมาตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วจึงเติมสารละลาย MeOH: 10% TCA ความเข้มข้น 50% โดยปริมาตร หลังจากนั้นเขย่าโดยเครื่องเขย่าแนวนอนความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที และนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วถ่ายส่วนใสด้านบนลงหลอดใหม่ เติม NaOH ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ได้ 25 มิลลิลิตรด้วยสารละลาย 0.2 % formic acid: acetonitrile ความเข้มข้น 20:80 % โดยปริมาตร หลังจากนั้นเป็นขั้นตอนการสกัดด้วย SPE ชนิด C18

จากนั้นนำไปวิเคราะห์แยกสารด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ ชนิด C18 เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมแบบสัดส่วนไม่คงที่ ระหว่าง 0.2% formic acid ในน้ำ กับ acetonitrile และตรวจยืนยันชนิดและวัดปริมาณสารด้วย Triple Quadrupole Mass Spectrometer (MS/MS) โดยการตรวจวัดค่ามวลต่อประจุ (m/z) ที่เกิดจากแหล่งกำเนิดประจุบวกแบบเล็กโทรสเปร์ย์ (ESI+) และใช้เทคนิค internal standard dilution mass spectrometry (IDMS) คือ การเติม internal standard ทุกหลอดในปริมาณเท่ากันตั้งแต่เริ่มต้น และใช้คำนวณกลับโดยการชดเชยส่วนที่สูญหายไปในแต่ละหลอด เพื่อให้คำนวณปริมาณสารได้ถูกต้องแม่นยำขึ้น

5.3 ผลการพัฒนาวิธีวิเคราะห์

วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถใช้วิเคราะห์โคลิสตินเอ และ บี ได้ที่ระดับ 0.5 MRL และช่วงการวิเคราะห์ (working range) (ตามตารางที่ 1) ให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) ของกราฟมาตรฐาน 5 ระดับความเข้มข้น มากกว่า 0.991 (อ้างอิงจากคู่มือการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบตามแนวมติคณะกรรมการอาหาร ยุโรป 2002/657/EC สพ.ญ สุจิตตรา พงศ์วิวัฒน์ 2555 หน้า 73) และมากกว่า 0.995 ตามเกณฑ์การวิเคราะห์ของงานวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์และฮอร์โมน

ตารางที่ 1 แสดงระดับความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน 5 ระดับสำหรับผลรวมโคลิสติน เอและบี

ลำดับ	สาร	ระดับความเข้มข้นที่ของกราฟมาตรฐาน (µg/kg)				
		ระดับที่ 1	ระดับที่ 2	ระดับที่ 3	ระดับที่ 4	ระดับที่ 5
1	Colistin (A+B)	0	75	150	225	300

6. สรุปผลการทดลอง

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์โคลิสตินในเนื้อสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS พบว่าวิธีนี้วิเคราะห์สามารถยืนยันชนิดและหาปริมาณสารตกค้างยาสัตว์นี้ได้ โดยมีความไวเพียงพอที่จะตรวจสอบสารตกค้างในตัวอย่างไม่飽 ที่ระดับครึ่งหนึ่งของระดับความเข้มข้นของสารตกค้างสูงสุดที่อนุญาตให้มีได้

7. ข้อเสนอแนะ

จากผลการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนั้นสามารถวัดที่ระดับความเข้มข้นอย่างน้อยที่ระดับความเข้มข้นครึ่งหนึ่งของปริมาณสารตกค้างสูงสุดที่ยอมให้มีได้ในอาหาร (0.5 MRL) ได้ แต่อย่างไรก็ตามควรทดลองการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ก่อนทำการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์จริง เนื่องจากในขั้นตอนการพิสูจน์ความใช้ได้ ต้องวัดหลากหลายปัจจัยและวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมาก ซึ่งประกอบด้วยตัวอย่างปลอดสารและตัวอย่างปลอดสารที่เติมสารที่สนใจลงไปที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ดังนั้นจึงควรเตรียมความพร้อมของเครื่องมือวิเคราะห์ ให้มีประสิทธิภาพ สามารถวิเคราะห์ได้อย่างต่อเนื่องและมีความพร้อมที่จะทดสอบเพื่อให้ผ่านเกณฑ์การยอมรับในทุกปัจจัยของการพิสูจน์ความใช้ได้ตามแนวมติคณะกรรมาธิการยุโรป 2002/657/EC

8. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์ไพโรจน์ อารังโสภา ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงานและบุคลากรของงานวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์ และฮอริโมน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ในความร่วมมือปฏิบัติงานให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

9. เอกสารอ้างอิง

กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่อง กำหนดมาตรฐานสารตกค้างสำหรับสินค้าสัตว์. 12 กรกฎาคม 2549.

คณะกรรมการประสานและบูรณาการงานด้านการดื้อยาต้านจุลชีพ. 2559. แผนยุทธศาสตร์การจัดการการดื้อยาต้านจุลชีพประเทศไทย พ.ศ. 2560–2564. กระทรวงสาธารณสุข และกระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

นิธิมา สุ่มประดิษฐ์, ศิริตรี สุทธจิตต์, สิตานันท์ พูลผลทรัพย์, รุ่งทิพย์ ชวนชื่น และภูษิต ประคองสาย. 2558.

ภูมิทัศน์ของสถานการณ์และการจัดการการดื้อยาต้านจุลชีพในประเทศไทย. สำนักพิมพ์อักษรกราฟฟิคแอนดี้ดีไซน์, กรุงเทพฯ.

วิชญ์ ธรรมลิขิตกุล. 2551. โคลิสติน: ยาต้านจุลชีพสำหรับรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบดื้อยา. เวชบัณฑิตยสาร 1(3): 152-158.

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. 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.

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.

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.M, 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.