# การพัฒนาชุดตรวจสอบเททระไซคลินโดยใช้เทคนิคเอนไซม์ลิงก์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์

นางสาวสุภาภรณ์ เทศวิเชียร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# DEVELOPMENT OF TETRACYCLINE TEST KIT USING ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY TECHNIQUE

Miss Suphaporn Tesvichian

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

532339

| | |
|---|---|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์ | การพัฒนาชุดตรวจสอบเททระไซคลินโดยใช้เทคนิคเอนไซม์ลิงก์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ |
| โดย | นางสาวสุภาภรณ์ เทศวิเชียร |
| สาขาวิชา | เทคโนโลยีชีวภาพ |
| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก | อาจารย์ ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส |
| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม | อาจารย์ ดร. นันทิกา คงเจริญพร |

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร. นันทิกา คงเจริญพร)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร. ศรีเมฆ ชาวโพงพาง)

สุภาภรณ์ เทศวิเชียร: การพัฒนาชุดตรวจสอบเททระไซคลินโดยใช้เทคนิคเอนไซม์ลิงก์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ (DEVELOPMENT OF TETRACYCLINE TEST KIT USING ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY TECHNIQUE) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ. ดร. นันทิกา คงเจริญพร, 124 หน้า.

กลุ่มยาเททระไซคลิน (Tetracyclines, TCs) เป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้แพร่หลายในปศุสัตว์ เพื่อป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อ ทำให้สัตว์มีสุขภาพดี เจริญอาหาร แต่การใช้ยาเททระไซคลินเป็นระยะเวลานานทำให้เกิดการตกค้างในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคในหลายประเทศจึงมีการกำหนดค่า MRLของ TC เทคนิค ELISA เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการตรวจสารเททระไซคลินที่ง่าย รวดเร็ว มีความแม่นยำสูงและความจำเพาะสูง วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อพัฒนาชุดตรวจเททระไซคลิน ด้วยเทคนิค ELISA โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเททระไซคลินเพื่อเตรียมชุดตรวจสอบสาร TC จากการทดลองเปรียบเทียบชุดตรวจสอบ 4 แบบ พบว่า Ab-captured direct competitive ELISA เป็นชุดตรวจสอบต้นแบบที่เหมาะสมที่สุด มีค่าเฉลี่ย $IC_{50}$ และปริมาณต่ำที่สุดที่ตรวจวัดได้ (LOD) เท่ากับ 2.63 และ 0.19 ppb ตามลำดับ โดยสามารถวัดเททระไซคลินได้ในช่วง 2.5 ถึง 100 ppb นอกจากนั้นพบว่าชุดตรวจสอบต้นแบบที่ได้มีปฏิกิริยาข้ามต่อสารกลุ่มเททระไซคลินในช่วง 19-86% โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่มเททระไซคลิน เมื่อนำชุดตรวจสอบต้นแบบไปทดสอบกับตัวอย่างน้ำผึ้ง พบว่า % recovery ที่ได้อยู่ในช่วง 91.64-99.39% และจากการตรวจวัดปริมาณเปรียบเทียบโดยการใช้ชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบที่พัฒนาขึ้นเองกับเทคนิค LC-MS-MS พบว่าให้ค่าที่วัดได้ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้จากการทดสอบความแปรปรวนของการวัดของชุดตรวจสอบต้นแบบ intra variation assay และ inter variation assay พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 1.94-8.35 % และ 12.75-17.94% ตามลำดับ ผลการทดลองต่างๆ แสดงว่าชุดตรวจสอบต้นแบบที่ได้สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณเททระไซคลินได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพ

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา 2553 ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

## 5072626123: MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS: TETRACYCLINE / ELISA TEST KIT

SUPHAPORN TESVICHIAN: DEVELOPMENT OF TETRACYCLINE TEST KIT USING ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY TECHNIQUE. ADVISOR: KITTINAN KOMOLPIS, Ph.D., CO- ADVISOR: NANTHIKA KHONGCHAREONPORN, Ph.D., 124 pp.

Tetracyclines (TCs) are broad spectrum antibiotics which have been commonly used in veterinary for the purpose of prevention and treatment of infectious diseases. The widespread use of TCs could lead to TCs residues in animal-producing foods. To ensure food safety for the consumers, several authorities around the world have established the maximum residue limit (MRL) for TCs. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is considered to be a good alternative because of its simplicity, rapidity, high sensitivity and specificity. The objective of this study was to evaluate the feasibility of using a monoclonal antibody in the preparation of an ELISA test kit for tetracycline detection. Four types of ELISA were prepared and tested for their sensitivities. It was found that Ab- captured direct competitive ELISA is the most suitable method with the average inhibition concentration at 50% ($IC_{50}$) and limit of detection (LOD) value of 2.63 ppb and 0.19 ppb, respectively. The detection range of the prepared test kit was from 2.5 to 100 ppb. In addition, the specificity of the test kit was also tested and found to cross-reacted with antibiotics in TC group between 19-86%. However, it did not cross-reacted with other tested compounds. The developed test kit was tested on honey. It revealed the % recovery of 91.64- 99.39%. Furthermore, comparative quantification of tetracycline using the developed ELISA test kit and LC-MS-MS technique showed that these methods gave comparable results. In addition, the intra-assay and inter-assay variations of the developed test kit were also investigated and found to be 1.94-8.35% and 12.75-17.94%, respectively. These indicated that the prototype test kit can be used to accurately and efficiently determine the amount of tetracycline.

Field of Study: Biotechnology

Academic Year: 2010

Student's Signature Suphaporn Tes

Advisor's Signature K. Komolpis

Co-advisor's Signature Nanthika K

# กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร. นันทิกา คงเจริญพร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม คุณทรงจันทร์ ภู่ทอง ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะแนวทางการทำวิจัย ตลอดจนให้ความเห็นในการปรับปรุงงานวิจัยจนสำเร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม ประธานกรรมการการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า และอาจารย์ ดร. ศรีเมฆ ชาวโพงพาง (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์) กรรมการการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความเห็นและคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณผู้บริหาร คณาจารย์ นักวิจัย และเจ้าหน้าที่ของสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกท่าน ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์ในการทำวิจัย คำแนะนำ พร้อมทั้งความช่วยเหลือ

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ และเจ้าหน้าที่หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ อย่างเต็มกำลังจนทำให้งานวิจัยสำเร็จได้

ขอขอบคุณหน่วยวิจัยการผลิตแอนติบอดี สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ที่สนับสนุนการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณอณุมาศ บัวเขียว คุณอุมาพร พิมพิทักษ์ รวมทั้งพี่ๆ และน้องๆ ในห้อง 803 ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ รวมถึงคำแนะนำและกำลังใจดีๆ ในทุกด้านเสมอมา ทำให้สามารถดำเนินงานมาได้อย่างราบรื่นและมีความสุขตลอดมา ตั้งแต่เริ่มทำการทดลองจนเสร็จสิ้น รวมทั้งเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ กำลังใจและการสนับสนุนในทุกด้านด้วยดีตลอดมา

และที่สำคัญอย่างที่สุด ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่ชายอย่างสุดซึ้งที่เลี้ยงดู ให้ความรัก ความห่วงใยและกำลังใจเสมอมา รวมถึงให้การสนับสนุนด้านการศึกษาอย่างไม่มีข้อแม้ใดๆ

# สารบัญ

หน้า


บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฎ

สารบัญภาพ ..... ฑ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ ..... ณ

บทที่

1. บทนำ ..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา ..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย ..... 2

1.3 ขอบเขตและวิธีการดำเนินงานวิจัย ..... 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ ..... 3

2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ..... 4

2.1 แนวคิดและทฤษฎี ..... 4

2.1.1 ยาปฏิชีวนะในกลุ่มเททระไซคลิน ..... 4

2.1.2 กลไกการทำงานและขอบเขตการออกฤทธิ์ของยาเททระไซคลิน ..... 7

2.1.3 การดูดซึม การกระจายยา และการขับถ่าย ..... 8

2.1.4 ผลกระทบจากการใช้ยาเททระไซคลิน ..... 10

2.1.5 การตรวจวิเคราะห์เททระไซคลิน ..... 12

2.1.5.1 การตรวจวิเคราะห์เททระไซคลินด้วยวิธีทางเคมี ..... 12

2.1.5.2 การตรวจวิเคราะห์เททระไซคลินโดยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา ..... 13

2.1.6 สถานการณ์และทิศทางการพัฒนาชุดตรวจสอบในประเทศไทย ..... 16

บทที่ หน้า

2.1.7 หลักการ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 17
2.1.7.1 Noncompetitive ELISA 18
2.1.7.3 Competitive ELISA 19
2.1.8 องค์ประกอบที่สำคัญของ ชุดตรวจ ELISA 22
2.1.8.1 แอนติเจน 22
2.1.8.2 แอนติบอดี 22
2.1.8.3 เอนไซม์และระบบการตรวจวัดปฏิกิริยา 28
2.1.8.4 พื้นผิวสำหรับการยึดตรึง 30
2.1.8.5 สับสเตรต 31
2.1.8.6 การประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ 31
2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 32
3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย 36
3.1 เซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย 36
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย 36
3.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย 38
3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย 41
3.4.1 การเพิ่มปริมาณแอนติบอดี 41
3.4.2 การเตรียมสารเชื่อมต่อระหว่างเททระไซคลินกับ OVA 42
3.4.3 การตรวจสอบการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ TC 43
3.4.4 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ โดยวิธี protein G affinity chromatography 43
3.4.5 การหาปริมาณแอนติบอดี 44
3.4.6 การทดสอบความไวของแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ ต่อเททระไซคลินในรูปอิสระ 45
3.4.7 การทดสอบความบริสุทธิ์และการหามวลโมเลกุล ของแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE 45
3.4.8 การเตรียมชุดตรวจสอบ 46
3.4.8.1 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Ag-captured direct competitive ELISA 46

บทที่ หน้า

3.4.8.2 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Ag-captured direct competitive ELISA ที่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูไมซ์ 47
3.4.8.3 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Ab-captured indirect competitive ELISA 48
3.4.8.4 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Ab-captured direct competitive ELISA 49
3.4.9 การสร้างกราฟมาตรฐาน 50
3.4.10 การเตรียมตัวอย่าง 51
3.4.11 การประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต้นแบบ 51
3.4.12 การวิเคราะห์เททระไซคลินในน้ำผึ้งที่มีจำหน่ายของไทย 54
3.4.13 การส่งตัวอย่างวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS-MS 54
4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง 55
4.1 การเชื่อมต่อระหว่างเททระไซคลินกับ OVA 55
4.2 การผลิตแอนติบอดี 56
4.3 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยใช้โครมาโตกราฟฟีแบบคอลัมน์สัมพรรคภาพของโปรตีนจี 58
4.4 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ของแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์ 60
4.5 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ต่อ TC 61
4.6 การเตรียมชุดตรวจสอบ 62
4.6.1 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Ag-captured direct competitive ELISA (Direct cELISA) 62
4.6.2 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Ag-captured direct competitive ELISA ที่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูไมซ์ (GAM) 65
4.6.3 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Ab-captured indirect competitive ELISA (Indirect cELISA) 68
4.6.4 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Ab-captured direct competitive ELISA 71
4.6.5 การวิเคราะห์เปรียบเทียบชุดตรวจสอบ ELISA แบบต่างๆ 74
4.7 การเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบด้วยวิธี Ab-captured direct competitive ELISA 75
4.7.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน 75

บทที่ หน้า

4.7.2 การศึกษาปัจจัยของเวลาที่ใช้ในการบ่มเททระไซคลินที่เชื่อมต่อ OVA กับแอนติบอดี ที่เชื่อมต่อไบโอติน และเททระไซคลินในรูปอิสระ ..... 77
4.7.3 การศึกษาปัจจัยของชนิดของ blocking solution ในการ block ปฏิกิริยา ..... 78
4.7.4 การศึกษาผลกระทบของตัวทำละลายต่อการวิเคราะห์ ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ ..... 79
4.7.5 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของชุดตรวจสอบเททระไซคลินต้นแบบ ..... 81
4.7.5 การประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต้นแบบ ..... 82
4.8 ผลการวิเคราะห์เททระไซคลินในตัวอย่างน้ำผึ้งด้วยชุดตรวดสอบต้นแบบ ..... 83
4.9 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยการใช้ชุดตรวจสอบ ELISA และเทคนิค LC-MS-MS ..... 88
4.10 ผลการวิเคราะห์ TC จากน้ำผึ้งที่มีจำหน่ายของไทย โดยเทคนิค Ab-captured direct ELISA ..... 91
5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ ..... 95
รายการอ้างอิง ..... 95
ภาคผนวก ..... 100
ภาคผนวก ก ..... 101
ภาคผนวก ข ..... 119
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ ..... 124

# สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 สูตรโครงสร้างของยาในกลุ่มเททระไซคลิน ..... 6

2.2 ระยะเวลาที่หยุดให้สารปฏิชีวนะในกลุ่มเททระไซคลินก่อนส่งโรงฆ่าของสัตว์ ..... 11

2.3 มาตรฐานปริมาณของยากลุ่มเททระไซคลินที่มนุษย์จะรับได้ในแต่ละวัน(ADI) และระดับสูงสุดที่อนุญาตให้ตรวจพบได้ในอาหาร (MRLs) ..... 12

2.4 การตรวจวิเคราะห์เททระไซคลินด้วยวิธีทางเคมี ..... 13

2.5 ประเทศผู้ผลิตและผู้ใช้ชุดตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์รายใหญ่ของโลก ..... 16

2.6 คุณสมบัติและข้อจำกัดในการผลิตระหว่างพอลิโคลนอลแอนติบอดี และโมโนโคลนอลแอนติบอดี ..... 24

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย ..... 36

3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย ..... 38

4.1 ปริมาณโปรตีนของ TC-OVA ด้วยวิธี BCA ..... 56

4.2 ผลการทดสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 12-3F ด้วยวิธี indirect ELISA ..... 57

4.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนและหลังการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี BCA ..... 59

4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลและระยะทางในการเคลื่อนที่จากการทำ SDS-PAGE ..... 60

4.5 อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีกับ TC-OVA ด้วยวิธี direct ELISA ..... 63

4.6 ผลการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีกับ TC-HRP ด้วยวิธี Direct ELISA เพื่อใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA ที่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูไมซ์ ..... 66

4.7 ผลการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีกับ TC-OVA ด้วยวิธี Indirect ELISA เพื่อใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA ..... 69

4.8 ผลการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของ TC-OVA กับ Ab-biotin ด้วยวิธี Ab-captured direct ELISA เพื่อใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Ab- captured direct competitive ELISA ..... 72

4.9 สรุปผลการเปรียบเทียบชุดตรวจสอบ ELISA แบบต่างๆ ..... 75

ตารางที่ หน้า

4.10 ผลของค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ที่ได้จากการทำ Ab-captured diirect competitive ELISA สำหรับสร้างกราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบเททระไซคลินต้นแบบ 76

4.11 ผลการทำปฏิกิริยาข้าม (Cross-reactivity; CR) ของชุดตรวจสอบต้นแบบต่อสารในกลุ่มและนอกกลุ่มเททระไซคลิน81

4.12 ผลการหาค่าความไว (sensitivity) ของชุดตรวจสอบต้นแบบ 82

4.13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของชุดตรวจสอบต้นแบบ 83

4.14 ความถูกต้อง (accuracy) ของการวัดปริมาณเททระไซคลินในตัวอย่างน้ำผึ้งโดยวิธี Ab- captured direct competitive ELISA 84

4.15 ความแม่นยำ (precision) ของการวัดปริมาณเททระไซคลินในตัวอย่างน้ำผึ้งโดยวิธี Ab- captured direct competitive ELISA 85

4.16 สรุปความถูกต้องและความแม่นยำของการวิเคราะห์เททระไซคลินในตัวอย่าง 87

4.17 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำผึ้งด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบและเทคนิค LC-MS-MS 90

4.18 แสดงผลการวิเคราะห์ TC จากน้ำผึ้งที่มีจำหน่ายของไทย 92

ก.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน OVA โดยวิธี BCA 101

ก.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA โดยวิธี BCA 102

ก.3 ความจำเพาะของแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ต่อเททระไซคลินด้วยวิธี Indirect competitive ELISA 103

ก.4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ของการใช้เวลาที่แตกต่างกันในการทำปฏิกิริยาระหว่าง TC- OVA กับ Ab-biotin ด้วยวิธี semi-direct cELISA 104

ก.5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของการใช้ blocking solution ชนิดต่าง 105

ก.6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของ TC ในสารละลาย 0.1% EDTA, 1%EDTA และ 3.35%EDTA เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน TC ใน PBS 106

ตารางที่ หน้า

ก.7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของน้ำผึ้งในสารละลาย PBS, PBST และ PBS ที่เติม 10% เมทานอล เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน TC ใน PBS ..... 107
ก.8 แสดงข้อมูลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำผึ้งด้วย LC-MS-MS ของบริษัท Central lab ..... 108
ก.9 แสดงข้อมูลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำผึ้งด้วย LC-MS-MS ของบริษัท ALS ..... 112
ก.10 แสดงข้อมูลของกราฟมาตรฐาน TC และการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำผึ้ง ด้วย LC-MS-MS ของบริษัท ALS ..... 114

# สารบัญภาพ

รูปที่ หน้า

2.1 สูตรโครงสร้างของยาในกลุ่มเททระไซคลิน 6

2.2 การเกิด enterohepatic cycle ของสารกลุ่ม TCs 9

2.3 การดูดซึมของกลุ่มยา TCs (adsorption) 9

2.4 ชุดตรวจวินิจฉัยสำเร็จรูป 15

2.5 หลักการของ direct ELISA 18

2.6 หลักการของ indirect ELISA 19

2.7 หลักการของ competitive ELISA 21

2.8 โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลิน 23

2.9 ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในหนูทดลอง 26

2.10 ตัวอย่างของ biotin- streptavidin system 30

4.1 โครมาโตแกรมแสดง TC ที่เชื่อมติดกับ OVA โดยวิธี MALDI-TOF MS 55

4.2 โครมาโตแกรมแสดงลำดับส่วน (fraction) และค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ของโปรตีนที่ชะออกมาจากคอลัมน์โปรตีนจี โดยใช้บัฟเฟอร์, pH 2.7 59

4.3 ผลการทำ SDS-PAGE 61

4.4 กราฟแสดงผลการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีบริสุทธิ์ ต่อเททระไซคลินในรูปอิสระด้วยวิธี Indirect competitive ELISA 62

4.5 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีกับเททระไซคลินในรูปอิสระ ด้วยวิธี Ag- captured direct competitive ELISA 64

4.6 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีกับเททระไซคลินในรูปอิสระ ด้วยวิธี Ag- captured direct competitive ELISA ที่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของแพะ ที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูไมซ์(GAM) 67

4.7 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีกับเททระไซคลินในรูปอิสระ ด้วยวิธี Ab- captured indirect competitive ELISA 70

4.8 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีกับเททระไซคลินในรูปอิสระ ด้วยวิธี Ab- captured direct competitive ELISA 73

4.9 กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบค้นแบบ Ab- captured direct competitive ELISA 77

รูปที่ หน้า

4.10 กราฟแสดงผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อเททระไซคลินในรูปอิสระ ที่บ่มด้วยเวลาที่ 1, 1.5 และ 2 ชั่วโมง ด้วยวิธี Ab- captured direct competitive ELISA ..... 78

4.11 กราฟแสดงผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อเททระไซคลินในรูปอิสระ ที่ใช้ blocking solution ต่าง ๆ กันคือ 1%OVA, 1% BSA และ 5% skim milk ด้วยวิธี Ab- captured direct competitive ELISA ..... 79

4.12 กราฟตัวอย่างในสารละลาย PBS, PBST และ PBS ที่เติม 10% เมทานอล เปรียบเทียบกับ กราฟมาตรฐาน TC ใน PBS ..... 80

4.13 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการวิเคราะห์เททระไซคลิน ที่เติมลงในตัวอย่างน้ำผึ้งกับกราฟมาตรฐาน จากชุดตรวจสอบต้นแบบ ..... 87

4.14 แสดงกราฟมาตรฐานของ TC ใช้ตรวจตัวอย่างน้ำผึ้ง ..... 91

ก.1 กราฟของโปรตีนมาตรฐาน (OVA) โดยวิธี BCA ..... 101

ก.2 กราฟของโปรตีนมาตรฐาน (BSA) โดยวิธี BCA ..... 102

ก.3 แสดงโครมาโตแกรม ของ TC ที่ความเข้มข้นที่ 0-500 ppb โดยวิธี LC-MS-MS ของบริษัท Central lab ..... 109

ก.4 แสดงกราฟมาตรฐานของ TC ที่ความเข้มข้นที่ 0-500 ppb โดยวิธี LC-MS-MS ของ บริษัท Central lab ..... 110

ก.5 แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างที่ความเข้มข้นที่ 25 และ 100 ppb โดยวิธี LC-MS-MS ของบริษัท Central lab ..... 111

ก.6 แสดงกราฟมาตรฐานของ TC ที่ความเข้มข้นที่ 5-80 ppb โดยวิธี LC-MS-MS ของบริษัท ALS ..... 113

ก.7 แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่าง ที่มี TC ที่ 25 ppb โดยวิธี LC-MS-MS ของบริษัท ALS ..... 115

ก.8 แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างที่มี TC ที่ 25 ppb โดยวิธี LC-MS-MS ของบริษัท ALS ..... 116

ก.9 แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างที่มี TC ที่ 100 ppb โดยวิธี LC-MS-MS ของบริษัท ALS ..... 117

ก.10 แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่าง ที่มี TC ที่ 100 ppb โดยวิธี LC-MS-MS ของบริษัท ALS ..... 118

# คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

| | |
|---|---|
| Ab | antibody |
| AP | alkaline phosphatase |
| BCA assay | bicinchoninic acid assay |
| BSA | bovine serum albumin |
| CR | cross-reactivity |
| CV | coefficient of variation |
| DMF | dimethylformamide |
| DMSO | dimethyl sulfoxide |
| ELISA | enzyme linked immunosorbent assay |
| FCS | fetal calf serum |
| g | gram |
| HPLC | high performance liquid chromatography |
| HRP | horseradish peroxidase |
| $IC_{50}$ | inhibitory concentration 50% |
| Ig | immunoglobulin |
| LOD | limit of detection |
| LOQ | limit of quantitation |
| kDa | kilodalton |
| M | molar |
| ml | milliliter |
| MRLs | Maximum Residue Limits |
| N | normal |
| ng | nanogram |
| OD | optical density |
| OVA | oval albumin |
| PAGE | poly acrylamide gel electrophoresis |
| PBS | phosphate buffer saline |
| PNP | p-nitrophenyl phosphate |

| | |
|---|---|
| PMP | phenolphthalein monophosphate |
| TC | tetracycline |
| $R_f$ | relative mobility |
| RIA | radioimmunoassay |
| SD | standard deviation |
| SDS | sodium dodecyl sulfate |
| TMB | 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine |
| v | volume |
| w | weight |