การตรวจสอบเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์สำหรับการตรวจวัดสารตกค้างกลุ่มแรคโตพามีนและการประยุกต์

น.ส.พลอยขวัญ พรหมพิทยายุทธ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ไม่สังกัดภาควิชา/เทียบเท่า
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

VALIDATION OF ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR RACTOPAMINE RESIDUES DETECTION AND ITS APPLICATION

Miss Ploykwan Prompittayayut

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology
Common Course
FACULTY OF SCIENCE
Chulalongkorn University
Academic Year 2019

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจสอบเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์สำหรับการตรวจวัดสารตกค้างกลุ่มแรคโตพามีนและการประยุกต์
โดย	น.ส.พลอยขวัญ พรหมพิทยายุทธ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทิกา คงเจริญพร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.สุดเขต ไชโย

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นาตยา งามโรจนวณิชย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทิกา คงเจริญพร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร.สุดเขต ไชโย)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ชมพูนิกข์ กาญจนพังคะ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พอจิต นันทนาวัฒน์)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

พลอยขวัญ พรหมพิทยายุทธ : การตรวจสอบเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์สำหรับการตรวจวัดสารตกค้างกลุ่มแรคโตพามีนและการประยุกต์. (VALIDATION OF ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR RACTOPAMINE RESIDUES DETECTION AND ITS APPLICATION) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ. ดร.นันทิกา คงเจริญพร, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ดร.สุดเขต ไชโย

แรคโตพามีน (Ractopamine) เป็นสารในกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ (Beta-Agonist) ที่ถูกห้ามใช้ในประเทศไทย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องการที่จะพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธี Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) สำหรับตรวจวัดแรคโตพามีนตกค้างในเนื้อสัตว์ เครื่องในสัตว์และอาหารสัตว์ โดยได้เริ่มจากการพัฒนา ELISA 2 รูปแบบคือ indirect competitive ELISA และ direct competitive ELISA จากการทดสอบได้เลือก ELISA รูปแบบ direct competitive ELISA เนื่องจากมีค่าความไวที่สูงกว่าอีกรูปแบบ ค่า IC_{50} LOQ และ LOD เท่ากับ 0.57, 0.06 และ 0.02 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ทำการทดสอบความใช้ได้ของ direct competitive ELISA สำหรับนำไปตรวจวัดปริมาณแรคโตพามีนตกค้างในตัวอย่างกลุ่มเนื้อสัตว์ (เนื้อหมูและเนื้อโค) กลุ่มเครื่องในสัตว์ (ตับหมู ตับโคและไตหมู) และกลุ่มอาหารสัตว์ (อาหารหมูและอาหารโค) ทดสอบความไวของวิธี ELISA ในสารสกัดตัวอย่างต่างๆ พบว่า LOQ ของตัวอย่างอยู่ในช่วง 0.56-1.90 นาโนกรัมต่อกรัม และค่า LOD ของตัวอย่างอยู่ในช่วง 0.32-0.97 นาโนกรัมต่อกรัม ช่วงของการการตรวจวัดแรคโตพามีนในเนื้อหมูและไตหมูอยู่ที่ 0.4-6.25 นาโนกรัมต่อกรัม ในขณะที่ตัวอย่างอื่น ๆ มีช่วงของการตรวจวัดอยู่ที่ 0.8-12.5 นาโนกรัมต่อกรัม นอกจากนี้ได้ทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามพบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ ความถูกต้อง (% recovery) และความแม่นยำ (%CV) มีค่าอยู่ในช่วง 64.06-109.80 % และ 6.26-28.87 % ตามลำดับ ค่าความสามารถในการตรวจวัด (CCβ) มีค่าอยู่ที่ 2 นาโนกรัมต่อกรัมสำหรับเนื้อหมูและไตหมู และ 3 นาโนกรัมต่อกรัมในตัวอย่างอื่นๆ โดยมีค่าความผิดพลาดผิดพลาดจากการตรวจวัดน้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 % จากผลการทดสอบดังกล่าวพบว่าวิธี direct competitive ELISA มีค่าการทดสอบอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ตามเกณฑ์ของคณะกรรมาธิการยุโรป (European Commission 2002/657 / EC) และ AOAC ปี 2016 นอกจากนี้ได้เปรียบเทียบค่าความถูกต้องของการวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA และวิธี LC-MS / MS ในตัวอย่างเนื้อหมู, ตับหมูและอาหารหมู พบว่าค่าสหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) เท่ากับ 0.9948, 0.9991 และ 0.9977 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าค่าความถูกต้องของการวัดด้วยวิธี ELISA สอดคล้องและไปในแนวทางเดียวกันกับวิธี LC-MS/MS จากผลการทดสอบความใช้ได้สามารถสรุปได้ว่าวิธี direct competitive ELISA ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้มีความถูกต้อง แม่นยำ และน่าเชื่อถือสามารถนำไปตรวจวัดแรคโตพามีนตกค้างในเนื้อหมู, เนื้อโค ตับหมู, ตับโค, ไตหมู, อาหารหมู และอาหารโค ได้

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

ปีการศึกษา 2562 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

6071969523 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORD: Ractopamine Monoclonal antibody Validation ELISA

Ploykwan Prompittayayut : VALIDATION OF ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR RACTOPAMINE RESIDUES DETECTION AND ITS APPLICATION. Advisor: Asst. Prof. Nanthika Khongchareonporn, Ph.D. Co-advisor: Sudkate Chaiyo, Ph.D.

Ractopamine (RAC) is a substance in the beta-agonist group and has been prohibited in Thailand. Thus, the aim of this study is to develop and validate the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of RAC residues in muscle, offal and feed. The indirect competitive ELISA and direct competitive ELISA were developed, and the direct competitive ELISA was selected due to high sensitivity with IC_{50} LOQ and LOD at 0.57, 0.06 and 0.02 ng/mL respectively. The validation of this ELISA was investigated for the detection of RAC residue in muscles (swine and cattle) offal (liver, kidney of swine and cattle) and feed (swine and cattle). The sensitivity of ELISA in various matrix showed the LOQ and LOD in the range of 0.56-1.90 ng/g and 0.22-0.97 ng/g, respectively. The linearity of the standard curve for RAC detection in swine muscle and swine kidney were 0.4-6.25 ng/g while other samples were 0.8-12.5 ng/g. In addition, no cross-reactivity with either substance in beta-agonist group. The accuracy (%recovery) and precision (%CV) of samples were 64.06-109.80% and 6.26-28.87%, respectively. The detection capability (CCβ) for swine muscle and swine kidney were 2 ng/g, and for other samples were 3 ng/g, which has an error probability ≤ 5%. From the results of validation were indicated that the direct competitive ELISA of this study is the acceptable value according to the European Commission 2002/657 / EC and AOAC 2016. The LC-MS/MS method was used for the analyzed of muscle, liver and feed of swine and results compare with ELISA. A good correlation between two methods was obtained correlation coefficient (r) = 0.9948, 0.9991 and 0.9977 respectively. Therefore, the validation results indicated that this direct competitive ELISA are accurate and acceptable for detecting RAC residues in swine muscle, cattle muscle, swine liver, cattle liver, swine kidney, swine feed and cattle feed.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Field of Study:	Biotechnology	Student's Signature .....
Academic Year:	2019	Advisor's Signature .....
		Co-advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทิกา คงเจริญพร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ ดร.สุดเขต ไชโย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาและแนะนำงานวิจัยจนเสร็จสมบูรณ์

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นาตยา งามโรจนวณิชย์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร. ชมพูนิกข์ กาญจนพังคะ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พอจิต นันทนาวัฒน์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความเห็นและคำแนะนำด้านวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ทุนอุดหนุนทางการศึกษา “ทุนวิทยบัณฑิต” และทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว) เลขที่สัญญา SRI 6120204

ขอขอบพระคุณ พี่ๆนักวิจัยและเพื่อนๆ ที่ให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือและกำลังใจจนสามารถทำงานวิจัยจนเกิดผลสำเร็จ

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ นักวิจัย และเจ้าหน้าที่ของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกท่าน ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์นการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ บิดามารดาและครอบครัวของข้าพเจ้า ที่ให้กำลังใจและการสนับสนุนที่ดีมาโดยตลอดจนวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

พลอยขวัญ พรหมพิทยายุทธ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ง
กิตติกรรมประกาศ ..... จ
สารบัญ ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ฌ
สารบัญรูปภาพ ..... ฎ
สัญลักษณ์และคำย่อ 13
บทที่ 1 บทนำ 14
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 14
1.2 วัตถุประสงค์ 15
1.3 ขอบเขตและวิธีดำเนินการวิจัย 15
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้ 16
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 17
2.1 แนวคิดและทฤษฎี 17
2.1.1 แรคโตพามีน 17
2.1.2 ผลกระทบจากการใช้แรคโตพามีน 18
2.1.3 มาตรฐานสารตกค้างของแรคโตพามีน 19
2.1.4 การวิเคราะห์แรคโตพามีน 20
2.1.5 วิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ (Enzyme- Linked Immunosorbent Assay, ELISA) 20
2.1.6 องค์ประกอบของวิธี ELISA 24

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.1.7 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ELISA 31
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 36
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย 39
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย 39
3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย 40
3.3 เซลล์ที่เลือกใช้ 41
3.4 ขั้นตอนการวิจัย 41
3.4.1 การเชื่อมติดแรคโตพามีนกับโปรตีนพาหะ 41
3.4.2 การวัดปริมาณโปรตีนที่เชื่อมติดกับแรคโตพามีน โดยวิธี BCA 42
3.4.3 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาเพื่อเพิ่มปริมาณมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อแรคโตพามีน 43
3.4.4 การทำมอนอโคลนอลแอนติบอดี ให้บริสุทธิ์ด้วย protein G affinity chromatography 43
3.4.5. การพัฒนาวิธีทดสอบด้วย ELISA 43
3.4.6. การเตรียมสารสกัดตัวอย่าง 48
3.4.7 การศึกษาผลกระทบของแมทริก 50
3.4.8 การทดสอบความใช้ได้ของวิธี ELISA 51
3.4.9 การเปรียบเทียบผลการทดสอบความถูกต้องระหว่าง LC-MS/MS กับ วิธี ELISA 58
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล 59
4.1 การเชื่อมติดแรคโตพามีนกับโปรตีนพาหะ 59
4.2 การทำมอนอโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ 61
4.3 การเลือกวิธี ELISA 62
4.3.1 การหาค่าความไวของวิธีทดสอบแบบ indirect competitive ELISA 62
4.3.2 การหาค่าความไวของวิธีทดสอบแบบ direct competitive ELISA 65
4.4 การวิเคราะห์ผลความไว 68

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.5 การศึกษาผลกระทบของแมทริก 71
4.6 การทดสอบความใช้ได้ของวิธี ELISA 73
4.6.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน 73
4.6.2 การทดสอบความจำเพาะของวิธี ELISA 77
4.6.3 การทดสอบความถูกต้องและความแม่นยำ 77
4.6.4 การทดสอบความสามารถในการตรวจวัด 88
4.8 การเปรียบเทียบผลการทดสอบความถูกต้องระหว่าง LC-MS/MS กับ ELISA 93
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 95
บรรณานุกรม 97
ภาคผนวก 103
ประวัติผู้เขียน 116

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ปริมาณแรคโตพามีนตกค้างสูงสุดที่อนุญาติให้ตรวจพบได้ 19

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบคุณสมบัติและข้อจำกัดระหว่างพอลิโคลนอลแอนติบอดีและมอนอโคลนอลแอนติบอดี 26

ตารางที่ 3 เอนไซม์และชนิดของสับสเตรทของวิธี ELISA 30

ตารางที่ 4 เกณฑ์การยอมรับได้ของเปอร์เซ็นต์ค่าคืนกลับ 33

ตารางที่ 5 เกณฑ์การยอมรับได้ของค่าความแม่นยำ 34

ตารางที่ 6 การหาอัตราส่วนการเชื่อมติดระหว่างแรคโตพามีน กับ BSA 60

ตารางที่ 7 ค่าการดูดกลืนแสงระหว่าง แรคโตพามีนที่เชื่อมติดกับ BSA และ มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ความเข้มข้นต่างๆ ทดสอบแบบ indirect competitive ELISA 63

ตารางที่ 8 ผลการการทดสอบหาค่าความไวโดยใช้ความเข้มข้นของ แรคโตพามีนเชื่อมติดกับ BSA และ มอนอโคลนอลแอนติบอดี ทั้ง 3 คู่ 65

ตารางที่ 9 ค่าการดูดกลืนแสงระหว่าง แรคโตพามีนที่เชื่อมติดกับ BSA และ มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมติดกับไบโอตินที่ความเข้มข้นต่างๆ ทดสอบแบบ direct competitive ELISA 66

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบหาค่าความไวโดยใช้ความเข้มข้นของ แรคโตพามีนเชื่อมติดกับ BSA และมอนอโคลนอลแอนติบอดีเชื่อมติดกับไบโอติน ทั้ง 4 คู่ 68

ตารางที่ 11 สรุปผลการเปรียบเทียบ ELISA ทั้ง 2 รูปแบบ 69

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบค่าความไวของวิธี ELISA ในงานวิจัยนี้กับงานวิจัยอื่นๆ 70

ตารางที่ 13 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเนื้อหมูและตับหมูที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ 71

ตารางที่ 14 ค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละตัวอย่างที่ไม่เจือจางและเจือจางที่ระดับ 2, 5 และ 10 เท่า 72

ตารางที่ 15 ความไวและช่วงของการตรวจวัดแรคโตพามีนในตัวอย่างเนื้อสัตว์ เครื่องในสัตว์และอาหารสัตว์ 77

ตารางที่ 16 ผลการวิเคราะห์ความถูกต้องและความแม่นยำในตัวอย่างตับหมูโดยใช้เมทานอลที่ 50 เปอร์เซ็นต์ 79
ตารางที่ 17 ผลการวิเคราะห์ความถูกต้องและความแม่นยำในตัวอย่างเนื้อหมู 81
ตารางที่ 18 ผลการวิเคราะห์ความถูกต้องและความแม่นยำในตัวอย่างเนื้อโค 82
ตารางที่ 19 ผลการวิเคราะห์ความถูกต้องและความแม่นยำในตัวอย่างตับหมู 83
ตารางที่ 20 ผลการวิเคราะห์ความถูกต้องและความแม่นยำในตัวอย่างตับโค 84
ตารางที่ 21 ผลการวิเคราะห์ความถูกต้องและความแม่นยำในตัวอย่างไตหมู 85
ตารางที่ 22 ผลการวิเคราะห์ความถูกต้องและความแม่นยำในตัวอย่างอาหารหมู 86
ตารางที่ 23 ผลการวิเคราะห์ความถูกต้องและความแม่นยำในตัวอย่างอาหารโค 87
ตารางที่ 24 ความเข้มข้นแรคโตพามีนที่ตรวจวัดโดย LC-MS/MS และ ELISA 93

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของแรคโตพามีน และสารอื่นๆในกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ 18
รูปที่ 2 หลักการ Indirect competitive ELISA 22
รูปที่ 3 หลักการ Direct competitive ELISA 23
รูปที่ 4 โครงสร้างของแอนติบอดี 25
รูปที่ 5 การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี 27
รูปที่ 6 การผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดี 28
รูปที่ 7 ตำแหน่งของ LOQ และ LOD บน inhibition curve 32
รูปที่ 8 กราฟแสดงค่าความสามารถในการตรวจวัด 35
รูปที่ 9 การเชื่อมต่อ แรคโตพามีน กับ BSA ด้วยวิธี Mannich 42
รูปที่ 10 การทดสอบหาความไวของ ELISA ด้วยวิธี indirect compettitive ELISA 45
รูปที่ 11 การทดสอบหาความไวของ ELISA ด้วยวิธี direct compettitive ELISA 47
รูปที่ 12 IC_{50}, LOQ และ LOD บน inhibition curve 48
รูปที่ 13 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดตัวอย่างก่อนการทดสอบหาแรคโตพามีนด้วยวิธี ELISA 49
รูปที่ 14 ขั้นตอนการศึกษาผลกระทบของแมทริก 50
รูปที่ 15 ขั้นตอนการสร้างกราฟมาตรฐาน 52
รูปที่ 16 ขั้นตอนการวิเคราะห์หาความถูกต้องและความแม่นยำในตัวอย่างเนื้อสัตว์ เครื่องในสัตว์ และอาหารสัตว์ 55
รูปที่ 17 ขั้นตอนการวิเคราะห์ค่าความสามารถในการตรวจวัดด้วยวิธี ELISA ในตัวอย่างเนื้อสัตว์ เครื่องในสัตว์และอาหารสัตว์ 57
รูปที่ 18 UV-Visible spectra ของ แรคโตพามีน, BSA และ แรคโตพามีนที่เชื่อมติดกับ BSA 60
รูปที่ 19 โครมาโตแกรมแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตรของแต่ละแฟรคชั่นที่ชะออกมาจากคอลัมน์โปรตีนจี 61

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 20 ค่าความไวของวิธีทดสอบแบบ indirect competitive ELISA..... 64
รูปที่ 21 ค่าความไวของวิธีทดสอบแบบ direct competitive ELISA..... 67
รูปที่ 22 ค่าความไวของ indirect competitive ELISA (ก) และ direct competitive ELISA (ข) 69
รูปที่ 23 กราฟมาตรฐานสำหรับตรวจวัดแรคโตพามีนกลุ่มเนื้อสัตว์..... 74
รูปที่ 24 กราฟมาตรฐานสำหรับตรวจวัดแรคโตพามีนกลุ่มเครื่องในสัตว์ 75
รูปที่ 25 กราฟมาตรฐานสำหรับตรวจวัดแรคโตพามีนกลุ่มอาหารสัตว์ 76
รูปที่ 26 ค่าความสามารถในการตรวจวัดแรคโตพามีนในกลุ่มเนื้อสัตว์ 90
รูปที่ 27 ค่าความสามารถในการตรวจวัดแรคโตพามีนในกลุ่มเครื่องในสัตว์..... 91
รูปที่ 28 ค่าความสามารถในการตรวจวัดแรคโตพามีนในกลุ่มอาหารสัตว์..... 92
รูปที่ 29 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง LC-MS/MS และ ELISA..... 94

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สัญลักษณ์และคำย่อ

%	percent
%CR	percentage of cross-reactivity
%CV	percentage of coefficient of variation
%Recovery	percentage of recovery
℃	degree celsius
µg	microgram
µl	microlitre
A	absorbance
Ab	antibody
Ag	antigen
BCA assay	bicinchonic acid assay
BSA	bovine serum albumin
DMSO	dimethyl sulfoxide
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	fetal bovine serum
GAM	goat anti-mouse IgG
HRP	horseradish peroxidase
IC_{10}	10% inhibition concentration
IC_{20}	20% inhibition concentration
IC_{50}	50% inhibition concentration
LOD	limit of detection
LOQ	limit of quantitation
M	molar
MAb	monoclonal antibody
PAb	polyclonal antibody
PBS	phosphate buffer saline
PBST	phosphate buffer saline with 0.05% Tween 20
RAC	ractopamine
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แรคโตพามีน (Ractopamine) เป็นสารในกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ (Beta-Agonist) มีชื่อเรียกโดยทั่วไปว่าสารเร่งเนื้อแดง ปัจจุบัน แรคโตพามีน ถูกนำมาใช้มากในด้านการปศุสัตว์โดยนำมาใช้ผสมในอาหารเพื่อเลี้ยงโคและสุกร เนื่องจาก แรคโตพามีน สามารถเร่งให้เกิดกระบวนการสร้างโปรตีน (protein synthesis) สลายไขมัน (lipolysis) และลดกระบวนการสร้างไขมัน (lipogenesis) (Ritter และคณะ, 2017) ทำให้เนื้อที่ได้มีสีแดง ไขมันน้อย ตรงตามความต้องการของผู้บริโภค สำหรับประเทศไทยและอีกกว่า 160 ประเทศเช่น ประเทศในแถบสหภาพยุโรป ไม่อนุญาติให้มีการใช้และนำเข้าเนื้อสัตว์ที่มีการปนเปื้อนแรคโตพามีน เนื่องจากพบว่าแรคโตพามีนที่ตกค้างในเนื้อสัตว์ส่งผลต่อการเกิดโรคทางด้านหัวใจและหลอดเลือด (Zaitseva และคณะ, 2014) โดยประไทยได้ออกประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 269) พ.ศ. 2546 กำหนดให้อาหารทุกชนิดต้องตรวจไม่พบการปนเปื้อนของสารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์และเกลือของสารกลุ่มนี้ รวมถึงสารที่เกิดขึ้นในกระบวนการสร้างและ/หรือสลาย (metabolite) ของสาร นอกจากนี้สารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ยังเป็นสารที่กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ประกาศห้ามใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตและนำเข้าอาหารสัตว์ ตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558 เพื่อป้องกันอันตรายที่อาจเกิดขึ้นกับผู้บริโภค แต่อย่างไรก็ตามมีบางประเทศที่อนุญาตให้ใช้แรคโตพามีนเป็นสารเร่งการเจริญของโคและสุกร เช่น สหรัฐอเมริกา แคนาดา ดังนั้นคณะกรรมาธิการโครงการมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (Codex Alimentarius Commission, Codex) จึงได้กำหนดปริมาณ แรคโตพามีน ตกค้างสูงสุดที่ยอมรับให้มีได้ (Maximum residue limits, MRLs) ในเนื้อและไขมันสัตว์ไม่เกิน 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในตับและไตไม่เกิน 40 และ 90 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม อย่างไรก็ตามในปัจจุบันประเทศไทยได้มีการนำเข้าเนื้อสัตว์จากต่างประเทศ ซึ่งการติดตามเฝ้าระวังการตกค้างของแรคโตพามีนจึงเป็นสิ่งจำเป็น วิธีตรวจหาปริมาณแรคโตพามีนตกค้างสามารถทำได้ทั้งวิธียืนยันผล (confirmation method) ซึ่งเป็นการยืนยันผลทดสอบโดยใช้เครื่องมือ เช่น high-performance liquid chromatography และ liquid chromatography–mass spectrometry (Freire และคณะ, 2009; Montes และคณะ, 2017) โดยเทคนิคเหล่านี้จะให้ผลที่มีความแม่นยำสูง แต่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง และอาศัยบุคลากรที่มีความชำนาญ ส่วนการตรวจด้วยวิธีคัดกรอง (screening method) โดยวิธีทางอิมมูโน (immunoassay) จะใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับสารที่ต้องการตรวจหรือแอนติเจน วิธีนี้เป็นวิธีที่ให้ผล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รวดเร็ว มีความจำเพาะและความไวสูง ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ซับซ้อน ตัวอย่างของวิธีคัดกรองเช่น enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) และ lateral flow immunoassay

วิธี ELISA เป็นวิธีการตรวจที่อาศัยหลักการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีบนพื้นผิวแข็ง และใช้เอนไซม์เพื่อตรวจวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยใส่สารที่เป็นสับสเตรทของเอนไซม์เมื่อเกิดผลิตภัณฑ์จะเปลี่ยนเป็นสารที่มีสี สามารถมองเห็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นได้ด้วยตาเปล่าและวัดความเข้มสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง spectrophotometer วิธี ELISA สามารถให้ผลการทดสอบได้ทั้งในเชิงปริมาณ (quantitative) และเชิงคุณภาพ (qualitative) จึงทำให้ได้รับความนิยมในการใช้ตรวจหาสารตกค้าง (Xu และคณะ, 2007; Zhang และคณะ, 2007; Zhang และคณะ, 2009; Selvi และคณะ, 2011; Peng และคณะ, 2017) ดังนั้นเพื่อให้แน่ใจได้ว่าการตรวจหาแรคโตพามีนตกค้างด้วยวิธี ELISA มีประสิทธิภาพและมีความน่าเชื่อถือตามมาตรฐานสากลจึงต้องมีการทดสอบความใช้ได้ของวิธีดังกล่าว งานวิจัยนี้จึงทดสอบความใช้ได้ตามแนวทางของ คณะกรรมาธิการยุโรป 2002/657/EC (European Commission, 2002) และ AOAC 2016 (George และ Latimer, 2016)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์สำหรับการตรวจแรคโตพามีนตกค้างในกล้ามเนื้อ เครื่องในและอาหารสัตว์

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์สำหรับการตรวจแรคโตพามีนตกค้างในเนื้อสัตว์ เครื่องในสัตว์และอาหารสัตว์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

1.3 ขอบเขตและวิธีดำเนินการวิจัย

1.3.1 ศึกษาค้นคว้าเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.3.2 เตรียมแรคโตพามีนเชื่อมต่อกับ Bovine serum albumin (BSA)

1.3.3 เพิ่มปริมาณมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อแรคโตพามีนและทำให้บริสุทธิ์

1.3.4 พัฒนาวิธี ELISA 2 รูปแบบ

1.3.4.1 Indirect competitive ELISA รูปแบบที่ใช้การตรวจวัดปฏิกิริยาระหว่างแรคโตพามีนและแอนติบอดีปฐมภูมิที่จำเพาะต่อแรคโตพามีนด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ Horseradish peroxidase (HRP)

1.3.4.2 Direct competitive ELISA รูปแบบที่ใช้แอนติบอดีปฐมภูมิที่จำเพาะต่อแรคโตพามีนมาติดฉลากด้วยไบโอติน (biotin) และตรวจวัดปฏิกิริยาด้วย streptavidin ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ Horseradish peroxidase (HRP)

1.3.5 ศึกษาผลกระทบของแมทริก

1.3.6 ประเมินความใช้ได้วิธี ELISA ในการตรวจแรคโตพามีน

1.3.7 วิเคราะห์ผลความถูกต้องของ ELISA เทียบกับ LC/MS-MS

1.3.8 วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผลการทดลอง เผยแพร่ผลงานวิจัยและเขียนวิทยานิพนธ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้

วิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ที่มีความน่าเชื่อถืออยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้สำหรับการตรวจแรคโตพามีนตกค้างในเนื้อสัตว์ เครื่องในสัตว์และอาหารสัตว์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

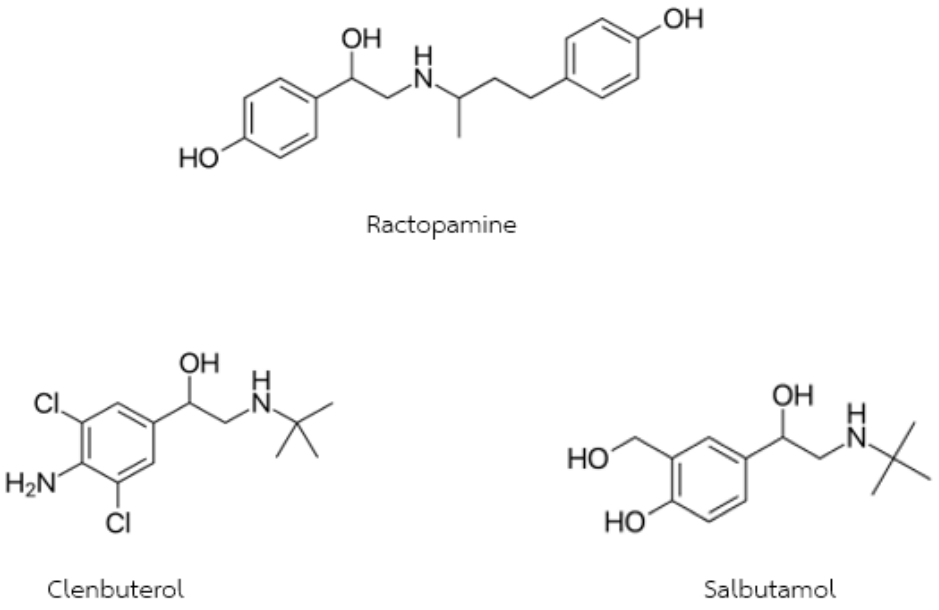
2.1.1 แรคโตพามีน

แรคโตพามีน (แรคโตพามีน) เป็นสารในกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ (Beta-Agonist) มีชื่อทางเคมี คือ 4-(1-Hydroxy-2-((4-(4-hydroxyphenyl)butan-2-yl)amino)ethyl) phenol สูตรโมเลกุล $C_{18}H_{23}NO_3$ มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 337.84 กรัม/โมล ลักษณะทางกายภาพเป็นเป็นผงสีขาวครีม ละลายได้ในตัวทำละลายมีขั้ว แรคโตพามีน สามารถจับกับตัวรับชนิด β1-adrenergic และ β2-adrenergic ที่อยู่บริเวณกล้ามเนื้อโครงร่าง (skeletal muscle) และเซลล์ไขมัน (adipocytes) เร่งกระบวนการสร้างโปรตีน (protein synthesis) สลายไขมัน (lipolysis) และลดกระบวนการสร้างไขมัน (lipogenesis) มีผลทำให้ปริมาณกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้นและปริมาณไขมันลดลง (Ritter และคณะ, 2017) สำหรับประเทศไทยและอีกกว่า 160 ประเทศเช่น จีน รวมถึงประเทศในแถบสหภาพยุโรป ไม่อนุญาตให้ใช้แรคโตพามีนในการเลี้ยงสัตว์และห้ามนำเข้าเนื้อสัตว์ที่มีการปนเปื้อนแรคโตพามีน เนื่องจากการตกค้างของแรคโตพามีนในเนื้อสัตว์อาจส่งผลต่อสุขภาพของผู้บริโภค ดังนั้นหน่วยงานของประเทศไทยที่เกี่ยวข้องกับความปลอดภัยด้านอาหารจึงมีมาตรการเกี่ยวกับการใช้แรคโตพามีน เช่น กระทรวงสาธารณสุขได้ออกประกาศ (ฉบับที่ 269) พ.ศ. 2546 กำหนดให้อาหารทุกชนิดต้องตรวจไม่พบการปนเปื้อนของสารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์และเกลือของสารกลุ่มนี้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ประกาศห้ามใช้สารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์เป็นส่วนผสมในการผลิตและนำเข้าอาหารสัตว์ ตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558 นอกจากนี้ยังพบประกาศในราชกิจจานุเบกษา วันที่ 11 สิงหาคม 2560 เรื่องของหลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขในการรับรองฟาร์มเลี้ยงสัตว์ปลอดสารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ ซึ่งเป็นการส่งเสริมให้เกษตรกรไม่ใช้สารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ในการเลี้ยงสุกรและโค ช่วยลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อนสารดังกล่าวในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ได้

อย่างไรก็ตาม แรคโตพามีน ได้รับอนุญาตให้ใช้เป็นสารเพื่อเร่งการเจริญเติบโตในกว่า 25 ประเทศทั่วโลกเช่น สหรัฐอเมริกา แคนาดา โดยในสหรัฐอเมริกา แรคโตพามีน ได้รับการขึ้นทะเบียนให้ใช้ผสมในอาหารสัตว์โดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาสหรัฐอเมริกา (United State Food and Drug Administration, FDA) ตั้งแต่ปี 2003 ซึ่งกำหนดให้ผสมที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 4.5-

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

9 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมในสุกร และ 8.2-24.6 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมในโค (FDA, 2019) ประเทศแคนาดาอนุญาติให้ใช้ แรคโตพามีน สำหรับเลี้ยงสุกรที่ความเข้มข้น 5-10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 10-30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมในโค (CFIA, 2018)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของแรคโตพามีน และสารอื่นๆในกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์

2.1.2 ผลกระทบจากการใช้แรคโตพามีน

งานวิจัยหลายชิ้นที่ได้ทำการศึกษาผลกระทบของแรคโตพามีน ต่อมนุษย์และสัตว์พบว่าสุกรที่ได้รับแรคโตพามีน จะมีอาการตื่นตัว อัตราการเต้นของหัวใจสูงกว่าปกติซึ่งเป็นผลมาจากระดับฮอร์โมนเอพิเนฟริน (epinephrine) และนอร์เอพิเนฟริน (norepinephrine) ถูกหลั่งออกมามากกว่าปกติ (Marchant และคณะ, 2003) นอกจากนี้สุกรที่ถูกเลี้ยงด้วยแรคโตพามีน จะมีพฤติกรรมที่ดุร้าย เนื่องจากแรคโตพามีน จะไปกระตุ้นสมองให้มีการหลั่ง โดพามีน (dopamine) และ เซโรโทนิน (serotonin) ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทที่จะหลั่งออกมาเมื่อสัตว์มีพฤติกรรมก้าวร้าวและดุร้าย (Poletto และคณะ, 2010) ในโคที่มีการเลี้ยงด้วยอาหารที่มี แรคโตพามีน พบว่ามีอัตราการตายที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อ

เทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ถูกเลี้ยงด้วยแรคโตพามีน (Loneragan และคณะ, 2014) และมีรายงานการวิจัยพบว่าหากผู้บริโภคได้บริโภคเนื้อสัตว์ที่มีการปนเปื้อนแรคโตพามีนจะมีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดโรคทางด้านหัวใจและหลอดเลือด รวมทั้งอาจมีอาการหัวใจเต้นเร็วผิดปกติ กระวนกระวาย (Zaitseva และคณะ, 2014)

2.1.3 มาตรฐานสารตกค้างของแรคโตพามีน

จากปัญหาแรคโตพามีนตกค้างในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ที่ส่งผลต่อสุขภาพของผู้บริโภคทำให้คณะกรรมาธิการโครงการมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (Codex Alimentarius Commission, Codex) ซึ่งเป็นหน่วยงานด้านความปลอดภัยทางอาหารในระดับสากล ได้กำหนดปริมาณแรคโตพามีนตกค้างสูงสุดที่ยอมรับให้มีการตกค้าง (Maximum residue limits, MRLs) ในโคและสุกร ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณแรคโตพามีนตกค้างสูงสุดที่อนุญาติให้ตรวจพบได้

ชนิดสัตว์	เนื้อเยื่อ	MRLs (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)
โค	กล้ามเนื้อ	10
	ตับ	40
	ไต	90
	ไขมัน	10
สุกร	กล้ามเนื้อ	10
	ตับ	40
	ไต	90
	ไขมัน	10

แหล่งที่มา : Codex Alimentarius Commission (CAC), 2015

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.1.4 การวิเคราะห์แรคโตพามีน

เนื่องจากการตกค้างของแรคโตพามีน ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค อีกทั้งยังมีผลกระทบต่อธุรกิจนำเข้าและส่งออกผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ดังนั้นการตรวจหาปริมาณแรคโตพามีนที่ตกค้างจึงมีความสำคัญอย่างมาก โดยทั่วไปแล้ววิธีในการตรวจวิเคราะห์จะแบ่งออกเป็น 2 วิธี ได้แก่ การตรวจด้วยวิธียืนยันผล (confirmation method) และการตรวจด้วยวิธีคัดกรองเบื้องต้น (screening method) โดยใช้วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunological method)

2.1.4.1 การวิเคราะห์แรคพามีนด้วยวิธียืนยันผล

วิธียืนยันผลสามารถตรวจวิเคราะห์ได้หลายเทคนิค เช่น เทคนิค high-performance liquid chromatography (HPLC) และเทคนิค liquid chromatography–mass spectrometry (LC/MS-MS) (Figueiredo และคณะ, 2009; Montes และคณะ, 2017) ซึ่งเทคนิคเหล่านี้เป็นเทคนิคที่มีความไว และความแม่นยำในการวิเคราะห์สูง

2.1.4.2 การวิเคราะห์แรคโตพามีนด้วยวิธีทางอิมมูโนวิทยา

การตรวจวิแคราะห์ด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunological method) สามารถทำได้หลายวิธีเช่น วิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), วิธี lateral flow immunoassay หรือ strip test โดยวิธี ELISA เป็นวิธีการตรวจที่อาศัยหลักการทำปฏิกิริยากันอย่างจำเพาะระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนบนพื้นผิวแข็ง และใช้เอนไซม์เพื่อตรวจวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น โดยใส่สารที่เป็นสับสเตรทของเอนไซม์เมื่อเกิดผลิตภัณฑ์จะเปลี่ยนเป็นสารที่มีสี ซึ่งสามารถมองเห็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นได้ด้วยตาเปล่าและวัดความเข้มสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง spectrophotometer วิธี ELISA สามารถให้ผลการทดสอบได้ทั้งในเชิงปริมาณ (quantitative) และเชิงคุณภาพ (qualitative) อีกทั้งยังสามารถตรวจสอบตัวอย่างหลายตัวอย่างได้ในคราวเดียว (Thorpe S และ Kerr M, 1994)

2.1.5 วิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ (Enzyme- Linked Immunosorbent Assay, ELISA)

ELISA เป็นวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยาที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยวิธีนี้จะอาศัยการทำปฏิกิริยากันอย่างจำเพาะระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี จึงสามารถใช้ตรวจหาแอนติเจนกับแอนติบอดีที่ต้องการได้อย่างแม่นยำ โดยทั่วไปวิธี ELISA จะทำการทดสอบในจานทดสอบซึ่งมีทั้งขนาด 8, 12 และ 96 หลุม และจะบล็อกจานทดสอบเพื่อลดการจับอย่างไม่จำเพาะ (non-specific binding) ก่อน

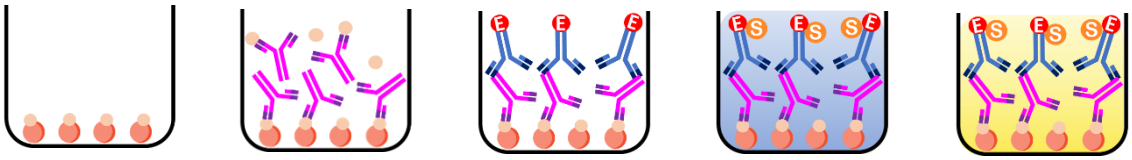
จะเติมสารที่ต้องการทดสอบและ เพื่อที่จะตรวจจับสารเหล่านี้แอนติเจนหรือแอนติบอดีจะถูกติดฉลากด้วยเอนไซม์ เมื่อเติมสับสเตรทลงไปเอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนสับสเตรทให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสี วัดความเข้มสีที่เกิดขึ้นโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร การเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวัดของวิธี ELISA สามารถทำได้โดยเปลี่ยนการติดฉลากด้วยเอนไซม์เป็นสารฟลูออเรสเซนต์ หรือไบโอติน เป็นต้น (Thorpe S และ Kerr M, 1994)

เนื่องจากแรคโตพามีนเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก จึงเลือกใช้วิธี ELISA แบบ competitive ในการทดสอบ โดยวิธี ELISA ที่ใช้ในงานวิจัยนี้แบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ Indirect competitive ELISA และ Direct competitive ELISA

2.1.5.1 Indirect competitive ELISA

วิธีทดสอบเริ่มจากการตรึงแอนติเจนบนจานทดสอบ จากนั้นเติมแอนติเจนที่ต้องการตรวจและแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจนลงไปพร้อมกัน ซึ่งแอนติเจนที่เติมลงไปจะเป็นตัวเดียวกันกับแอนติเจนที่ทำการตรึงบนจานทดสอบ วิธีนี้เป็นรูปแบบของการแย่งกันจับแอนติบอดีระหว่างแอนติเจนที่เติมลงไปและแอนติเจนที่ถูกตรึงบนจานทดสอบ จากนั้นเติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ซึ่งจำเพาะกับแอนติบอดีตัวแรก เติมสับสเตรทของเอนไซม์และหยุดปฏิกิริยา วัดความเข้มสีที่เกิดขึ้น โดยความเข้มของสีที่ได้จะแปรผกผันกับปริมาณของแอนติเจนในตัวอย่าง (รูปที่ 2) (Thorpe S และ Kerr M, 1994)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ตรึงแอนติเจนบนจานทดสอบ | เติมตัวอย่างที่มีแอนติเจนลงไปพร้อมกับแอนติบอดี | เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่เชื่อมต่อกับเอนไซม์ | เติมสับสเตรท | หยุดปฏิกิริยา

รูปที่ 2 หลักการ Indirect competitive ELISA

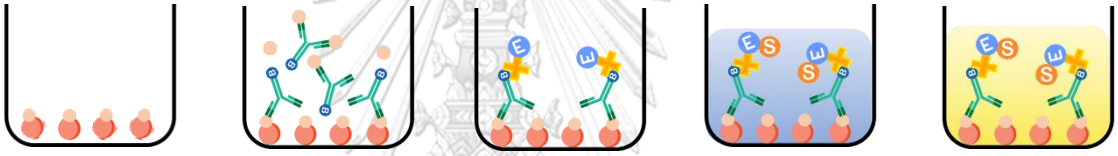
หมายเหตุ = แอนติเจนที่ตรึงบนจานทดสอบ = แอนติบอดี

= แอนติเจน = แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ = สับสเตรท

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.1.5.2 Direct competitive ELISA

วิธีทดสอบเริ่มจากการตรึงแอนติเจนบนจานทดสอบ จากนั้นเติมตัวอย่างที่ต้องการตรวจหาแอนติเจนและเติมแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจนลงไปพร้อมกัน โดยแอนติบอดีที่เติมลงไปได้ติดฉลากด้วยไบโอตินไว้แล้ว วิธีนี้เป็นรูปแบบของการแย่งกันจับแอนติบอดีระหว่างแอนติเจนที่เติมลงไปและแอนติเจนที่ถูกตรึงบนจานทดสอบ จากนั้นใส่ streptavidin ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ streptavidin จะเข้าจับกับไบโอตินที่ติดฉลากไว้บนแอนติบอดี เติมสับสเตรทของเอนไซม์ และวัดความเข้มสีที่เกิดขึ้น โดยความเข้มของสีที่ได้จะแปรผกผันกับปริมาณของแอนติเจนในตัวอย่าง การจับกันระหว่างไบโอตินและ streptavidin เป็นการขยายสัญญาณ เนื่องจาก streptavidin 1 ตัว สามารถจับกับไบโอตินได้ 4 ตัว ทำให้วิธี ELISA รูปแบบนี้มีความไวสูงขึ้น (รูปที่ 3) (Thorpe S และ Kerr M, 1994)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 3 หลักการ Direct competitive ELISA

หมายเหตุ = แอนติเจนที่ตรึงบนจานทดสอบ = แอนติบอดีเชื่อมต่อกับไบโอติน
= แอนติเจน = streptavidin ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์
= สับสเตรท

2.1.6 องค์ประกอบของวิธี ELISA

2.1.6.1 แอนติเจน (Antigen)

แอนติเจนคือสิ่งแปลกปลอมที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายให้สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะกับสิ่งแปลกปลอมนั้น โดยทั่วไปแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยจะไม่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้สร้างแอนติบอดีได้ จึงจำเป็นต้องนำไปเชื่อมติดกับโปรตีนพาหะเพื่อให้มีขนาดใหญ่ขึ้น เรียกแอนติเจนที่ไม่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ว่า เฮปเทน (hapten) (Bhutta, 2006)

คุณสมบัติของแอนติเจน

1. ความแปลกปลอม (Foreignness) สารที่ระบบภูมิคุ้มกันจดจำว่าเป็นสิ่งแปลกปลอมและไม่พบอยู่ในร่างกาย (Non self- antigen)

2. คุณสมบัติพื้นฐานทางเคมี (Chemical nature) โดยทั่วไปโปรตีนมีความเป็นแอนติเจนมากกว่าคาร์โบไฮเดรตหรือไขมัน

3. ขนาดของโมเลกุล (Molecular size) สารที่จะเป็นแอนติเจนได้ดีต้องมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10000 ดาลตัน เนื่องจากแอนติเจนที่มีโมเลกุลใหญ่จะมีอิพิโทป (epitope) ซึ่งเป็นบริเวณที่แอนติบอดีสามารถมาจับกับแอนติเจนได้มากขึ้น

4. โครงสร้างของโมเลกุล (Molecular structure) แอนติเจนที่มีความซับซ้อนทางโครงสร้างมากจะกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าแอนติเจนที่มีความซับซ้อนทางโครงสร้างน้อย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

5. เส้นทางการเข้าสู่ร่างกาย (Route of entry) แอนติเจนที่เข้าสู่ร่างกายผ่านทางกระแสเลือดจะกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าการเข้าสู่ร่างกายโดยการรับประทาน

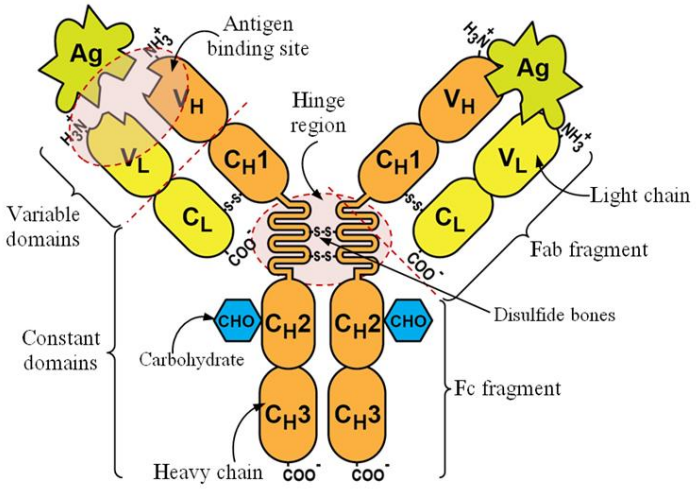
6. ปริมาณการเข้าสู่ร่างกาย (Dose of entry) แอนติเจนที่เข้าสู่ร่างกายในปริมาณที่เหมาะสมจะกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดี หากได้รับในปริมาณที่มากหรือน้อยเกินไปอาจทำให้กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ไม่ดี

2.1.6.2 แอนติบอดี (Antibody)

แอนติบอดีหรืออิมมูโนโกบูลิน (immunoglobulin, Ig) เป็นโปรตีนที่ผลิตโดยบีเซลล์ (B-cell) ซึ่งพบเซลล์ชนิดนี้ได้มากในบริเวณไขกระดูก ต่อมน้ำเหลืองและม้าม แอนติบอดีจะทำหน้าที่ตรวจจับและทำลายสิ่งแปลกปลอม เช่น แบททีเรีย ไวรัส หรือพิษ ที่เข้ามาในร่างกายซึ่งสิ่งแปลกปลอมเหล่านี้เรียกว่า แอนติเจน เมื่อแอนติเจนเข้าสู่ร่างกายบีเซลล์จะได้รับการกระตุ้นและเกิดการแบ่งเซลล์กลายเป็น เซลล์พลาสมา ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการสร้างแอนติบอดี แอนติบอดีที่ถูกสร้างขึ้นจะมีความจำเพาะต่อแอนติเจนโดยแอนติบอดีจะเข้าจับที่บริเวณ อิพิโทป (epitope) ของแอนติเจน

แอนติบอดีมีโครงสร้างเป็นรูปตัววาย (Y shape) (รูปที่ 4) ประกอบด้วยสายพอลิเปปไทด์ (polypeptide) 4 สาย คือ ส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากเรียกว่า heavy chain 2 สายและส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเบาเรียกว่า light chain 2 สาย แต่ละสายเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) บริเวณแขนทั้งสองของแอนติบอดีเป็นบริเวณที่มีความแปรปรวนของกรดอะมิโนสูงมากจึงเรียกบริเวณนี้ว่า variable domain ส่วนบริเวณหางของแอนติบอดีเป็นบริเวณที่ลำดับกรดอะมิโนค่อนข้างคงที่จึงเรียกบริเวณนี้ว่า constant domain หรือ Fc บริเวณที่แอนติบอดีใช้จับแอนติเจน (antigen binding site) เรียกว่า Fab คือบริเวณแขนรูปตัว Y โดยมีข้อพับที่เรียกว่า hinge region อยู่ตรงกลางของ heavy-chain ซึ่ง hinge region จะเป็นบริเวณที่มีการยืดหยุ่น ทำให้แขนทั้งสองข้างของแอนติบอดียืดห่างออกจากกันเพื่อช่วยในการจับแอนติเจนได้ดีขึ้น (Luttmann และคณะ 2006)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4 โครงสร้างของแอนติบอดี

แหล่งที่มา: Luttmann และคณะ 2006

แอนติบอดีแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ พอลิโคลนอลแอนติบอดี (Polyclonal antibody, PAb) และ มอนอโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody, MAb) ซึ่ง พอลิโคลนอลแอนติบอดี คือ แอนติบอดีที่สร้างจากกลุ่มเซลล์พลาสมาที่มาจากบีลิมโฟไซต์หลายโคลนทำให้พอลิโคลนอลแอนติบอดีสามารถจับกับอิพิโทปของแอนติเจนได้หลายอิพิโทป ส่วน มอนอโคลนอลแอนติบอดี นั้น คือ แอนติบอดีที่สร้างจากกลุ่มเซลล์พลาสมาที่มาจากบีลิมโฟไซต์โคลนเดียวกันจึงทำให้ทุกโมเลกุลของมอนอโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะต่ออิพิโทปเดียวของแอนติเจน (Ritter M, 2000) ความแตกต่างระหว่าง พอลิโคลนอลแอนติบอดี และ มอนอโคลนอลแอนติบอดี ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบคุณสมบัติและข้อจำกัดระหว่างพอลิโคลนอลแอนติบอดีและมอนอโคลนอลแอนติบอดี

คุณสมบัติ	พอลิโคลนอลแอนติบอดี	มอนอโคลนอลแอนติบอดี
ความจำเพาะ (Specificity)	ความจำเพาะไม่สูง มักพบปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม	มีความจำเพาะสูง
สัมพรรคภาพ (Affinity)	จับได้หลายอิพิโทปต่อแอนติเจน	จับได้เพียงอิพิโทปเดียว
ปริมาณแอนติบอดีที่ผลิตได้	ประมาณ 100 มิลลิลิตรจากซีรัมกระต่าย	ปริมาณไม่จำกัด
ขั้นตอนในการผลิต	ไม่ยุ่งยาก	มีความยุ่งยาก
ข้อดี	ต้นทุนต่ำ ง่ายต่อการผลิต	มีความจำเพาะสูง ผลิตได้ไม่จำกัด
ข้อเสีย	คุณภาพแอนติบอดีในแต่ละครั้งไม่เหมือนกัน	เสียเวลาในการผลิตมาก ต้นทุนสูง

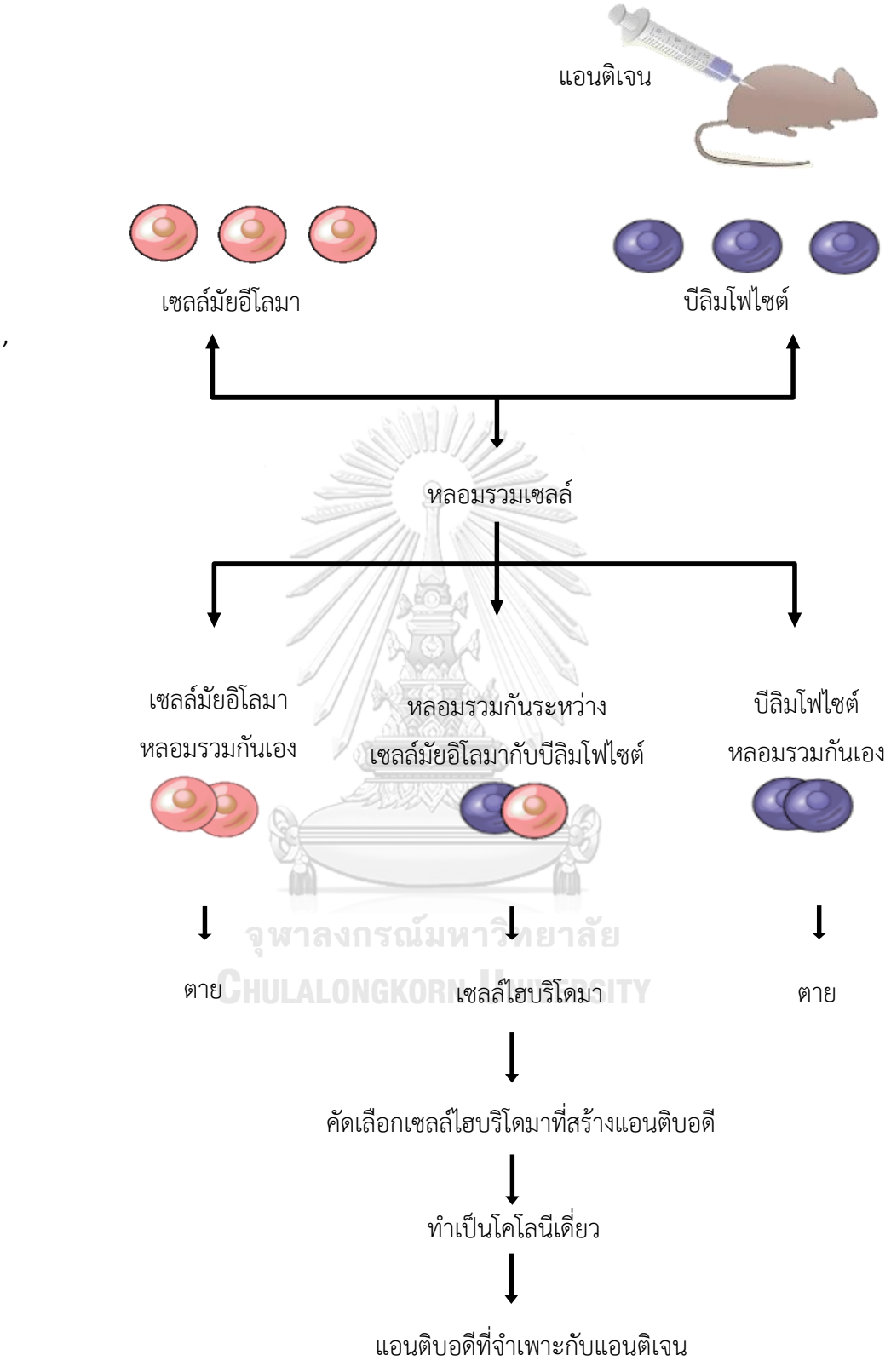
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีเริ่มจากการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองด้วยแอนติเจนที่สนใจเพื่อให้สัตว์สร้างแอนติบอดี หลังจากการฉีดกระตุ้นจะทำการเก็บเลือดซึ่งมีพอลิโคลนอลแอนติบอดีอยู่ในซีรั่ม นำเลือดที่ได้จากสัตว์ไปผ่านการทำให้บริสุทธิ์จะได้พอลิโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่จำเพาะต่อหลายอิพิโทปของแอนติเจน (รูปที่ 5) (Thorpe S และ Kerr M, 1994)

รูปที่ 5 การผลิตโพลิโคลนอลแอนติบอดี

การผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดี เริ่มขึ้นในปี 1975 โดย Kohler และ Milstein ขั้นตอนในการผลิตเริ่มจากการฉีดกระตุ้นหนูด้วยแอนติเจนที่สนใจเพื่อให้บีลิมโฟไซต์สร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนดังกล่าว จากนั้นทำการหลอมรวมเซลล์ (cell fusion) ต้นกำเนิด 2 เซลล์ คือเซลล์บีลิมโฟไซต์ (B-lymphocytes) ของหนูและเซลล์มัยอีโลมา (myeloma cell) ซึ่งเป็นเซลล์ที่สามารถแบ่งตัวได้อย่างไม่จำกัด อาศัยสารที่ทำให้เกิดการรวมตัวของเซลล์ เช่น polyethylene glycol ผลที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์จะทำให้เกิดเซลล์หลายรูปแบบ ได้แก่ บีลิมโฟไซต์ที่หลอมรวมกันเอง, เซลล์มัยอีโลมาที่หลอมรวมกันเองและบีลิมโฟไซต์ที่หลอมหลวมกับเซลล์มัยอีโลมาโดยจะเรียกบีลิมโฟไซต์ที่หลอมหลวมกับเซลล์มัยอีโลมานี้ว่าเซลล์ไฮบริโดมา (hybridoma cell) ซึ่งเซลล์นี้จะสามารถสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะตามคุณสมบัติของบีลิมโฟไซต์และมีอายุที่ยืนยาวตามคุณสมบัติของเซลล์มัยอีโลมา วิธีที่ใช้คัดเลือกเอาเฉพาะเซลล์ไฮบริโดมาคือ การนำเซลล์ที่ได้หลังจากผ่านการหลอมรวมแล้วไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งประกอบไปด้วย hypoxanthin, aminopterin และ thymidine เรียกอาหารเลี้ยงเซลล์นี้ได้ว่า HAT medium ซึ่งอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดนี้จะมีเฉพาะเซลล์ไฮบริโดมาเท่านั้นที่จะมีชีวิตรอดได้ เซลล์ไฮบริโดมาจากโคลนเดียวกันจะสร้างมอนอโคลนอลแอนติบอดี ที่มีความจำเพาะต่ออิพิโทปเดียวของแอนติเจน (รูปที่ 6) (Thorpe S และ Kerr M, 1994)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 6 การผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.1.6.3 เอนไซม์ (Enzyme)

เอนไซม์เป็นสารสำคัญสำหรับใช้ในการตรวจวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นของวิธี ELISA เอนไซม์ที่นิยมนำมาใช้ มี 3 ชนิด ได้แก่ Alkaline phosphatase (ALP), Horseradish peroxidase (HRP) และ β-galactosidase (Thorpe S และ Kerr M, 1994)

ALP เป็นเอนไซม์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 84-150 กิโลดาลตัน ทำหน้าที่เร่งการเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ของ phosphoric monoester บนสับสเตรทให้กลายเป็น alcohol และ phosphate ALP เป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นเบส และสามารถถูกยับยั้งได้จาก EDTA และ L-phenylalanine ALP เป็นเอนไซม์ที่มีความไวสูงและสามารถใช้สับสเตรทได้หลายตัว

HRP เป็นเอนไซม์ที่ได้จากส่วนรากของต้นหัวไชเท้า หรือ horseradish HRP เป็นไกลโคโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 40 กิโลดาลตันและทำหน้าที่เร่งการเกิดปฏิกิริยา oxidation ของสับสเตรท HRP สามารถทำงานได้ตั้งแต่ pH 4.0-7.0 และสามารถถูกยับยั้งได้จาก cyanide, sulfide และ fluoride HRP มีความไวสูงและสามารถใช้สับสเตรทได้หลายตัว

β-galactosidase เป็นเอนไซม์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 540 กิโลดาลตัน ทำหน้าที่เร่งการเกิดปฏิกิริยา oxidation ของ β-galactoside ให้กลายเป็น alcohol และ galactose β-galactosidaseสามารถทำงานได้ตั้งแต่ pH 6.0-8.0 และสามารถถูกยับยั้งได้จาก thiogalactosides และ ไอออนของโลหะหนัก β-galactosidase คือมีความสเถียรน้อยกว่าเอนไซม์อื่นและไม่นิยมนำมาใช้ในการติดฉลากกับแอนติบอดี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.1.6.4 สับสเตรท (Substrate)

วิธี ELISA เป็นเทคนิคการตรวจวัดที่อาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนและวัดผลที่เกิดขึ้นโดยการใช้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสับสเตรท การเลือกใช้สับสเตรทขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ (Thorpe S และ Kerr M, 1994) (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 เอนไซม์และชนิดของสับสเตรทของวิธี ELISA

เอนไซม์	สับเสตรท	สี	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)
Alkaline phosphatase (ALP)	p-Nitrophenyl-phosphate (pNPP)	เหลือง	405
	Phenol-phthalein monophosphate (PMP)	แดง	550
Horseradish peroxidase (HRP)	3’3,5,5’-tetramethylbenzidine (TMB)	เหลือง	450
	2,2’-azino-di-3-ethylbenthiazoline-6-sulfonate (ATBS)	ฟ้า,เขียว	405, 416
	O-Phenylenediamine (OPD)	เหลือง, ส้ม	450
	5-aminosalicylic acid (5-AS)	น้ำตาล	450
	o-dianisidine (ODIA)	เหลือง,ส้ม	405
β-galactosidase	o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (oNPG)	เหลือง	405
	Chlorophenyl red-β-galactoside (CPRG)	แดงเข้ม	574-578

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.1.7 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ELISA

วิธีทดสอบที่ใช้ตรวจหาสารตกค้างนั้นต้องมีคุณลักษณะที่ผ่านเกณฑ์การยอมรับได้ เช่น มีความถูกต้อง แม่นยำ มีความไวและมีความจำเพาะต่อสารที่ทดสอบ การจะทราบคุณลักษณะเหล่านี้ได้จำเป็นจะต้องพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ดังนั้นวิธีทดสอบใดที่ผ่านการพิสูจน์ความใช้ได้และให้ผลในทุกคุณลักษณะผ่านตามเกณฑ์การยอมรับของสากล ก็จะให้ผลทดสอบที่ถูกต้องแม่นยำเชื่อถือได้ ผู้นำผลทดสอบไปใช้มีความมั่นใจต่อผลทดสอบที่ได้ ในงานวิจัยนี้จะใช้เกณฑ์การพิจารณาความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ตามแนวทางของคณะกรรมาธิการยุโรป 2002/657/EC (European Commission, 2002) และ AOAC International (George และ Latimer, 2016) ซึ่งเป็นแนวทางที่ได้รับการยอมรับในระดับสากล คุณลักษณะที่ควรทดสอบเพื่อให้วิธีวิเคราะห์มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ ได้แก่

2.1.7.1 ค่าความไว (sensitivity) หมายถึงค่าที่แสดงให้เห็นว่าวิธีทดสอบสามารถวิเคราะห์หาสารที่สนใจได้ปริมาณต่ำสุดที่เท่าใด วิธีวิเคราะหที่มีค่าความไวสูงจะสามารถตรวจหาสารในปริมาณนอยได ค่าความไวบอกได้จาก

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถวัดได้อย่างถูกต้อง (limit of quantitation, LOQ) ซึ่งสามารถคำนวนได้จาก

1. ค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของตัวอย่างที่ไม่มีสารที่ต้องการตรวจวัด (concentration of blank) + 10SD (Li และคณะ, 2017) โดยที่ SD คือส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นตัวอย่างที่ไม่มีสารที่ต้องการตรวจวัด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

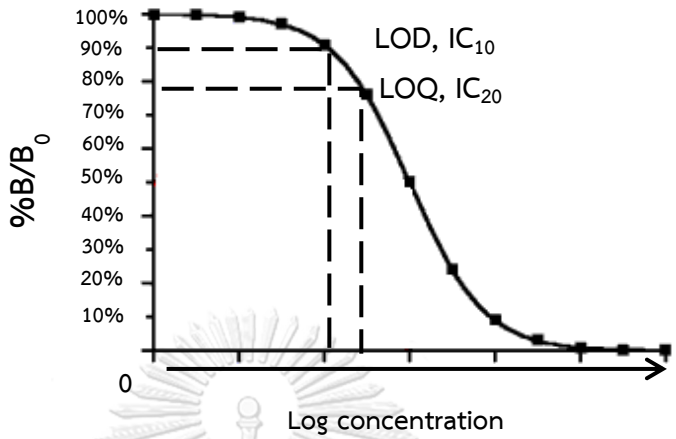
2. ตำแหน่งของค่าความเข้มข้นของสารบน inhibition curve ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง 20 เปอร์เซ็นต์ (the concentration at 20 % inhibitory, IC_{20}) (รูปที่ 7)

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถวัดได้ (limit of detection, LOD) ซึ่งสามารถคำนวนได้จาก

1. ค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของตัวอย่างที่ไม่มีสารที่ต้องการตรวจวัด (concentration of blank) + 3SD (Li และคณะ, 2017)

โดยที่ SD คือส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นตัวอย่างที่ไม่มีสารที่ต้องการตรวจวัด

2. ตำแหน่งของค่าความเข้มข้นของสารบน inhibition curve ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง 10 เปอร์เซ็นต์ (the concentration at 10 % inhibitory, IC_{10}) (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 ตำแหน่งของ LOQ และ LOD บน inhibition curve

2.1.7.2. ค่าความจำเพาะ (specificity) หมายถึง ความสามารถของวิธีทดสอบในการแยกสารที่ต้องการตรวจวัดออกจากสารอื่น ๆ ได้ ซึ่งเป็นคุณลักษณะสำคัญของวิธีการทดสอบ ค่าความจำเพาะบอกได้จากเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้าม (% Cross reactivity, %CR) ซึ่งคำนวณได้จาก (Buakew และคณะ, 2016)

$$\% \text{ CR} = \frac{IC_{50} \text{ ของ RAC}}{IC_{50} \text{ ของสารอื่น}}$$

2.1.7.3. ค่าความถูกต้อง (accuracy) หมายถึง ค่าที่แสดงว่าผลการทดสอบมีค่าเข้าใกล้ค่าจริงหรือค่าอ้างอิงมากน้อยเพียงใด ค่าความถูกต้องบอกได้จากเปอร์เซ็นต์ค่าคืนกลับ (% recovery) ซึ่งคำนวณได้จาก (Buakew และคณะ, 2016)

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ได้}}{\text{ความเข้มข้นของสารที่เติมลงไป}} \text{ x } 100$$

เกณฑ์การยอมรับได้ของเปอร์เซ็นต์ค่าคืนกลับจะขึ้นอยู่กับปริมาณสารที่มีอยู่ในตัวอย่าง ดังตารางที่ 4 (George และ Latimer, 2016)

ตารางที่ 4 เกณฑ์การยอมรับได้ของเปอร์เซ็นต์ค่าคืนกลับ

Analyte, %	Mass fraction (C)	Unit	Mean recovery, %
100	1	100%	
10	10^{-1}	10%	98-102
1	10^{-2}	1%	97-103
0.1	10^{-3}	0.1%	95-105
0.01	10^{-4}	100 ppm (mg/kg)	90-107
0.001	10^{-5}	10 ppm (mg/kg)	
0.0001	10^{-6}	1 ppm (mg/kg)	80-110
0.00001	10^{-7}	100 ppb (µg/kg)	
0.000001	10^{-8}	10 ppb (µg/kg)	60-115
0.0000001	10^{-9}	1 ppb (µg/kg)	40-120

2.1.7.4. ค่าความแม่นยำ (precision) หมายถึง การทดสอบนั้นให้ผลที่ใกล้เคียงกันเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีเดียวกัน ภายใต้สภาวะที่ใกล้เคียงกัน ความแม่นยำไม่ได้บอกถึงความถูกต้องของผลการทดสอบ แต่เป็นการแสดงว่า การทดสอบนั้นมีความสม่ำเสมอในระดับใดเมื่อมีการทดสอบซ้ำ ค่าความแม่นยำบอกได้จากค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, CV) ซึ่งคำนวณได้จาก (Cliquet และคณะ, 2003)

$$\% \text{ CV } = \frac{\text{SD}}{\mu} \text{ x } 100$$

โดยที่ SD คือส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของแต่ละความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้

µ คือค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นแต่ละความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้

เกณฑ์การยอมรับได้ของค่าความแม่นยำจะขึ้นอยู่กับปริมาณสารที่มีอยู่ในตัวอย่างและต้องไม่เกินค่าที่กำหนด ดังตารางที่ 5 (George และ Latimer, 2016)

ตารางที่ 5 เกณฑ์การยอมรับได้ของค่าความแม่นยำ

Analyte, %	Mass fraction (C)	Unit	CV, %
100	1	100%	1.3
10	10^{-1}	10%	1.9
1	10^{-2}	1%	2.7
0.1	10^{-3}	0.1%	3.7
0.01	10^{-4}	100 ppm (mg/kg)	5.3
0.001	10^{-5}	10 ppm (mg/kg)	7.3
0.0001	10^{-6}	1 ppm (mg/kg)	11
0.00001	10^{-7}	100 ppb (µg/kg)	15
0.000001	10^{-8}	10 ppb (µg/kg)	21
0.0000001	10^{-9}	1 ppb (µg/kg)	30

2.1.7.5 ค่าความสามารถในการตรวจวัด (detection capability) หมายถึง ปริมาณสารที่น้อยที่สุดในตัวอย่างที่จะถูกตรวจพบได้ด้วยความคลาดเคลื่อนที่ค่าเบต้า (ค่าความเป็นไปได้ที่ผลทดสอบจะผิดพลาดจากผลไม่สอดคล้องกับเกณฑ์เป็นผลสอดคล้องตามเกณฑ์) โดยเกณฑ์การยอมรับได้ของค่าความคลาดเคลื่อนที่ค่าเบต้าไม่เกิน 5 เปอร์เซ็นต์ ค่าความสามารถในการตรวจวัดบอกได้จากค่า CCβ การหาค่า CCβ ต้องใช้ตัวอย่างในการทดสอบอย่างน้อย 20 ตัวอย่าง ขั้นตอนในการหาค่า CCβ มีดังนี้

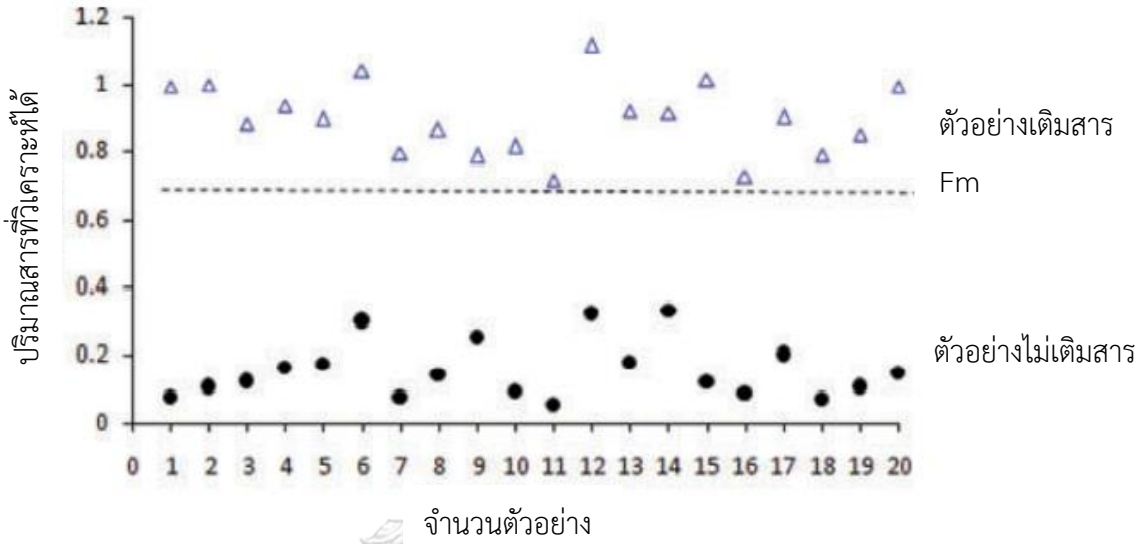
1. นำตัวอย่างไม่เติมสารทั้ง 20 ตัวอย่างมาเติมสารที่สนใจลงไปที่ค่าความเข้มข้นเป้าหมายในการคัดกรอง โดยค่าความเข้มข้นนี้ต้องน้อยกว่าหรือเท่ากับ MRLs

2. นำตัวอย่างไม่เติมสาร 20 ตัวอย่างและตัวอย่างเติมสาร 20 ตัวอย่างไปตรวจวิเคราะห์

3. หาค่าผลการตอบสนองของตัวอย่างไม่เติมสารและตัวอย่างเติมสารแต่ละตัวอย่าง สร้างกราฟโดยให้แกน X เป็นจำนวนตัวอย่าง แกน Y เป็นปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างเติมสาร (รูปที่ 8) จากนั้นคำนวณค่าเฉลี่ย, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่า cut off factor (Fm) ซึ่งเป็นค่าที่ใช้พิจารณาว่าตัวอย่างใดผ่านเกณฑ์การทดสอบและตัวอย่างใดไม่ผ่านเกณฑ์การทดสอบ สามารถคำนวณได้จากสูตร (CRLs, 2010)

Fm = (ค่าเฉลี่ยของตัวอย่างเติมสาร + 1.64) × ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างเติมสาร

หากพบว่ามีมากกว่า 1 ตัวอย่างจาก 20 ตัวอย่างที่มีค่าต่ำกว่าค่า cut off factor นั้นหมายถึงค่าความผิดพลาดสูงกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นวิธีวิเคราะห์นี้จำเป็นที่จะต้องได้รับการแก้ไขโดยอาจเพิ่มจำนวนตัวอย่างที่ใช้ทดสอบให้มากขึ้นหรืออาจเพิ่มค่าความเข้มข้นเป้าหมายในการคัดกรองให้สูงขึ้นแต่ต้องไม่สูงเกินค่า MRLs (สุจิตตรา, 2555 แปลจาก CRLs, 2010)



รูปที่ 8 กราฟแสดงค่าความสามารถในการตรวจวัด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มีรายงานการตรวจสอบความใช้ได้ของเทคนิค ELISA โดยใช้เกณฑ์การประเมินตามแนวทางของคณะกรรมาธิการยุโรป 2002/657/EC ดังนี้

ปี 2008 Vass และคณะได้พัฒนาชุดทดสอบ indirect competitive ELISA และใช้มอนอโคลนอลแอนติบอดีสำหรับการตรวจวัด semicarbazide ซึ่งป็นอนุพันธุ์ของ nitrofurazone ในไข่ไก่ nitrofurazone เป็นยาปฏิชีวนะที่ถูกห้ามใช้ในประเทศกลุ่มสหภาพยุโรปเนื่องจาก nitrofurazone เป็นสารก่อมะเร็งและสารที่อาจทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในมนุษย์ได้ Vass และคณะได้สกัดตัวอย่างไข่ไก่และนำมาทดสอบด้วย ELISA พบว่าค่า IC_{50} และ LOD ของชุดทดสอบอยู่ที่ 0.18 และ 0.13 ppb ตามลำดับ ทดสอบหา % recovery โดยทำการเติม semicarbazide ลงไป 3 ความเข้มข้นคือ 0.3, 1.0 และ 3.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า % recovery อยู่ที่ 78-110 เปอร์เซ็นต์ ทดสอบค่าความแม่นยำของการทดสอบภายในวันเดียวกันและต่างวันกันพบว่าค่า %CV อยู่ที่ 7.4 - 28.2 และ 13.7–18.2 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จากนั้นทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามพบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่มและสารในกลุ่ม (<0.01%) ทดสอบความสามารถในการตรวจวัดโดยทำการทดสอบกับไข่ไก่ทั้ง 20 ตัวอย่าง พบว่าค่าความผิดพลาดไม่เกิด 5 เปอร์เซ็นต์ และค่า CCβ อยู่ที่ 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สุดท้ายได้ทำการทดสอบเปรียบเทียบระหว่างเทคนิค ELISA และ LC–MS/MS พบว่า ผลการวิเคราะห์ที่ได้จากทั้งสองวิธีเป็นไปในแนวทางเดียวกัน

ปี 2010 Jiménez และคณะได้พัฒนาชุดทดสอบ indirect competitive ELISA และใช้พอลีโคลนอลแอนติบอดีสำหรับการตรวจวัด sulfadiazine และ sulfamethazine ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม sulfonamides ในตัวอย่างอาหารสัตว์ sulfadiazine และ sulfamethazine เป็นยาปฏิชีวนะที่ถูกใช้ในสัตว์ซึ่งการตกค้างของสารดังกล่าวเป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภค Jiménez และคณะได้สกัดตัวอย่างอาหารสัตว์และนำมาทดสอบด้วย ELISA พบว่าค่า IC_{50}, LOD ของชุดทดสอบสำหรับ sulfadiazine อยู่ที่ 4.4 และ0.20 ไมโครกรัมต่อกรัมตามลำดับ และ IC_{50}, LOD ของชุดทดสอบสำหรับ sulfamethazine อยู่ที่ 0.54 และ 0.04 ไมโครกรัมต่อกรัมสำหรับ ช่วงของการตรวจวัดสำหรับ sulfadiazine และ sulfamethazine คือ 0.7-28 และ0.11-2.6 ไมโครกรัมต่อกรัมตามลำดับ ทดสอบหา % recovery พบว่า % recovery อยู่ที่ 80-100 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามพบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่ม ทดสอบความสามารถในการตรวจวัดโดยทำการทดสอบกับอาหารสัตว์ทั้ง 20 ตัวอย่าง พบว่าค่าความผิดพลาดที่เกิดจากวิธีทดสอบเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ และค่า CCβ ของ sulfadiazine และ sulfamethazine อยู่ที่ 0.8 และ0.1 ไมโครกรัมต่อกรัม สุดท้ายได้ทำการทดสอบเปรียบเทียบระหว่างเทคนิค ELISA และ LC–MS/MS พบว่า ผลการวิเคราะห์ที่ได้จากทั้งสองวิธีเป็นไปในแนวทางเดียวกัน

ปี 2011 Oplatowska และ Elliott ได้พัฒนาชุดทดสอบ direct competitive ELISA และใช้ พอลิโคลนอลแอนติบอดี สำหรับการตรวจวัด methyl yellow และ rhodamine B ในซอสและเครื่องเทศ methyl yellow และ rhodamine B เป็นสีที่ใช้ในการเติมแต่งอาหารอย่างผิดกฎหมาย เนื่องจากสารทั้งสองมีคุณสมบัติเป็นสารก่อมะเร็ง Oplatowska และ Elliott ได้ทำการฉีดกระตุ้นกระต่ายด้วย methyl yellow และ rhodamine B ที่เชื่อมต่อกับโปรตีนพาหะเพื่อผลิต พอลิโคลนอลแอนติบอดี เมื่อได้ พอลิโคลนอลแอนติบอดี แล้วจึงได้ทำการสร้างกราฟมาตรฐานของ methyl yellow และ rhodamine B ในบัฟเฟอร์พบว่าได้ช่วงของเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.2-23.7 และ 0.1-1.8 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ทดสอบหาค่า IC_{50} ของ methyl yellow และ rhodamine B อยู่ที่ 2.4 และ 0.4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้าม พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารตัวอื่น (<0.1%) หา % recovery โดยทำการเติมสารแต่ละตัวลงไปในซอสทั้งหมด 3 ความเข้มข้นคือ 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า % recovery ของ methyl yellow อยู่ที่ 100.9-112.7 และของ rhodamine B อยู่ที่ 103.6-112.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทดสอบค่า % recovery ในตัวอย่างเครื่องเทศพบว่า % recovery ของ methyl yellow อยู่ที่ 79.8-87.7 เปอร์เซ็นต์ และของ rhodamine B อยู่ที่ 103.1-117.6 เปอร์เซ็นต์ ทดสอบค่าความแม่นยำของ methyl yellow ในซอสและเครื่องเทศพบว่าค่า %CV อยู่ที่ 12.3 – 15.0 และ 18.8-22.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ค่าความแม่นยำของ rhodamine B ในซอสและเครื่องเทศพบว่าค่า %CV อยู่ที่ 14.1 – 19.4 และ 18.7-19.9 เปอร์เซ็นต์ สุดท้ายทำการทดสอบความสามารถในการตรวจวัดโดยทำการทดสอบกับซอสและเครื่องเทศทั้ง 20 ตัวอย่าง พบว่าค่าความผิดพลาดไม่เกิด 5 เปอร์เซ็นต์ และค่า $CC\beta$ ของ methyl yellow ในซอสและเครื่องเทศมีค่า <15 และ <50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่า $CC\beta$ ของ rhodamine B ในซอสและเครื่องเทศมีค่าน้อยกว่า 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมทั้งสองตัวอย่าง

ปี 2012 Dimitrieska-Stojkovic และคณะได้ตรวจสอบชุด ELISA ทางการค้าสำหรับใช้ในการตรวจวัดอนุพันธ์ของสารกลุ่ม nitrofuran ในตัวอย่างตับหมู ไข่ไก่และน้ำผึ้ง สารกลุ่ม nitrofuran เป็นยาต้านจุลชีพที่ถูกห้ามใช้ในประเทศกลุ่มสหภาพยุโรปเนื่องจากเป็นสารที่ทำให้ยีนเกิดความผิดปกติและเป็นสารก่อมะเร็ง Elizabeta และคณะได้สกัดตัวอย่างและนำมาทดสอบด้วยชุด ELISA ทางการค้าพบว่าค่าความไวคือ LOD ของชุดทดสอบมีค่าต่ำกว่า 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ทดสอบหา % recovery โดยทำการเติมสารในกลุ่ม nitrofuran ลงไป 2 ความเข้มข้นคือ 0.5 และ 1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า % recovery อยู่ที่ 80-90 เปอร์เซ็นต์ ทดสอบค่าความแม่นยำของการทดสอบต่างวันกันพบว่าค่า %CV อยู่ที่ 16.20-22.11 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้าม พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มและนอกกลุ่ม (<0.01%) ทดสอบความสามารถในการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตรวจวัดโดยทำการทดสอบกับตัวอย่างแต่ละชนิด ชนิดละ 20 ตัวอย่าง พบว่าค่าความผิดพลาดของการทดสอบน้อยกว่า 5 % และค่า CCβ น้อยกว่า 1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

ปี 2015 Tufa และคณะได้พัฒนาชุดทดสอบ direct competitive ELISA และใช้ พอลิโคลนอลแอนติบอดี สำหรับการตรวจวัดสารในกลุ่ม fluoroquinolones ในอาหารสัตว์ สารกลุ่ม fluoroquinolones เป็นยาต้านแบคทีเรีย ถูกห้ามใช้ในประเทศกลุ่มสหภาพยุโรปเนื่องจาก fluoroquinolones อาจตกค้างในเนื้อเยื่อของสัตว์และเมื่อมนุษย์รับประทานเนื้อสัตว์ที่มีสารตกค้างนี้อาจทำให้เกิดการแพ้และการดื้อยาเกิดขึ้นได้ Tufa และคณะได้สกัดตัวอย่างอาหารสัตว์และนำมาทดสอบด้วย ELISA พบว่าค่าความไวคือ IC_{50} และ LOD ของชุดทดสอบอยู่ที่ 10.5 และ 0.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ทดสอบหา % recovery โดยทำการเติม enrofloxacin ซึ่งเป็นสารตัวหนึ่งในกลุ่ม fluoroquinolones ลงไป 3 ความเข้มข้นคือ 5,10 และ 500 ไมโครกรัมต่อกรัม พบว่า % recovery อยู่ที่ 75-116 เปอร์เซ็นต์ ทดสอบค่าความแม่นยำของการทดสอบภายในวันเดียวกันและต่างวันกันพบว่าค่า %CV ต่ำกว่า 9 และ 21 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จากนั้นทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามพบว่า พอลิโคลนอลแอนติบอดี ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่ม (<5%) ทดสอบความสามารถในการตรจวัดโดยทำการทดสอบกับอาหารสัตว์ทั้ง 20 ตัวอย่าง พบว่าค่าความผิดพลาดของการทดสอบอยู่ที่ 0 เปอร์เซ็นต์ และค่า CCβ อยู่ที่ 20 นาโนกรัมต่อกรัม จากนั้นได้ทำการทดสอบเปรียบเทียบระหว่างเทคนิค ELISA และ LC–MS/MS พบว่า ผลการวิเคราะห์ที่ได้จากทั้งสองวิธีเป็นไปในแนวทางเดียวกัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

วัสดุอุปกรณ์	แหล่งที่มา
1. เครื่องมือ	
กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Inverted microscope) รุ่น TMS	Nikon Corporation, Japan
คอลัมน์ Hitrap Protein G Sepharose	GE Healthcare, Sweden
เครื่องกวนแม่เหล็ก (Hot plate magnetic stirrer)	Corning, USA
เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)	Udono-Rll memmert,Japan
เครื่องชั่ง (Electronic balance) รุ่น PG 4002-s และ รุ่น AG204	Mettle Toledo Co., Ltd., Switzerland
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Multi-detection microplate reader) รุ่น synergy tm HT	BIO-TEK Instrument, Inc, USA
เครื่องวัดความเป็นกรดเบส (pH meter) รุ่น Seveneasy	Mettle Toledo Co., Ltd., Switzerland
เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (Top bench centrifuge) รุ่น MSE minor 35	M.S.E. LTD, England
เครื่อง Affinity Chromatography (AKTA^{TM} Start)	GE Healthcare, Sweden
ตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์	Yamato Scientific Co., Ltd., Japan
ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) ISSCO รุ่น HS-124	International Scientific Supply Co., Ltd., Thailand
ปิเปตอัตโนมัติขนาด 10 200 1,000 และ 10,000 ไมโครลิตร	Eppendorf, Hamburg, Germany
ปิเปตอัตโนมัติมัลติชาแนลขนาด 300 ไมโครลิตร	HLT, Warsaw, Poland

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น WB7	Memmert, Germany
2. อุปกรณ์	
ขวดแก้ว	Boro, Germany
จานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม	Corning, USA
หลอดทดลองขนาด 1.7 มิลลิลิตร	Axygen, USA
หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร	Corning, USA
ทิปขนาด 10, 200, 300, 1000 และ 10000 ไมโครลิตร	Axygen, USA
ถุง Dialysis	CelluSep, USA

3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี	แหล่งที่มา
Acetic acid	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
Albumin, from bovine serum (BSA)	Carpricorn Scientific, USA
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford, Illinois
Biotinylation kit-EZ-link Sulfo-NHS-LC	Thermo Scientific, Rockford, Illinois
Clenbuterol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Merck, Darmstadt, Germany
Di-sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt, Germany
Fetal bovine serum	Biochrom, Berlin, Germany
40% formaldehyde	Carlo Erba, Milan, Italy
Goat anti mouse IgG-Horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP)	Jackson Immuno, West Grove, Pennsylvania
30% Hydrogen peroxide (H_2O_2)	Merck, Darmstadt, Germany
ISF-1 medium	Biochrom, Berlin, Germany
Methanol	Merck, Darmstadt, Germany

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Ractopamine hydrochloride	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
RPMI 1640 medium	Biochrom, Berlin, Germany
Salbutamol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
Sodium acetate	Carlo Erba, Milan, Italy
Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
Sodium carbonate (Na_2CO_3)	Merck, Darmstadt, Germany
Sodium chloride (NaCl)	Merck, Darmstadt, Germany
Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4)	Carlo Erba, Milan, Italy
Sodium hydroxide (NaOH)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
Streptavidin hoseradish peroxidase conjugate	Invitrogen, Carlsbad, California
Sulfuric acid (H_2SO_4)	Merck, Darmstadt, Germany
3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)	Sigma aldrich,USA
Thimerosal	Sigma aldrich,USA
Tween-20	Sigma aldrich,Glenham, UK

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.3 เซลล์ที่เลือกใช้

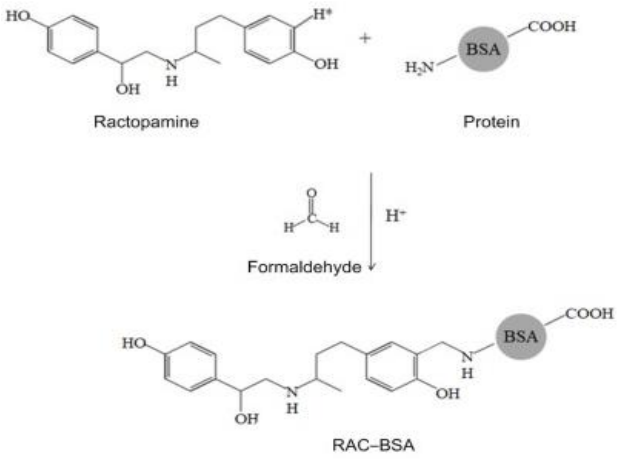
เซลล์ไฮบริโดมารหัสโคลน 10A4 ที่ผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อแรคโตพามีน โดยสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (พรรัตน์, 2551)

3.4 ขั้นตอนการวิจัย

3.4.1 การเชื่อมติดแรคโตพามีนกับโปรตีนพาหะ

การเชื่อมแรคโตพามีนกับ BSA ทำโดยวิธี Mannich วิธีนี้จะนำหมู่อะมิโนของ BSA มาเชื่อมกับ active hydrogen ของแรคโตพามีน การเชื่อมต่อเริ่มจากนำ แรคโตพามีน 2 มิลลิกรัมและ BSA 5 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 3 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตรท (3M, sodium acetate, pH 5.5) ลงไป 0.4 มิลลิลิตร และ 7.5 %(v/v) ฟอลมาดีไฮด์ (formaldehyde) 0.4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาข้ามคืน (รูปที่ 9) จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปทำการไดอะไลซิสใน 0.01 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (phosphate buffer saline, PBS,

ypH 7.4) เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารละลายแรคโตพามีนที่เชื่อมติดกับ BSA ที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี bicinchoninic acid assay (BCA) และหาอัตราส่วนของการเชื่อมติดระหว่างแรคโตพามีน กับ BSA โดยการสแกนช่วงค่าความยาวคลื่นตั้งแต่ 240-400 nm จากนั้นนำสารละลายที่เตรียมได้แบ่งใส่หลอดเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส (Preechakasedkit และคณะ, 2019).



รูปที่ 9 การเชื่อมต่อ แรคโตพามีน กับ BSA ด้วยวิธี Mannich
แหล่งที่มา: Preechakasedkit และคณะ (2019)

3.4.2 การวัดปริมาณโปรตีนที่เชื่อมติดกับแรคโตพามีน โดยวิธี BCA

เตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียม working reagent ด้วยการผสม reagent A กับ reagent B ในอัตราส่วน 50:1 (v/v) จากนั้นเติมสารละลาย BSA แต่ละความเข้มข้นลงในจานทดสอบ หลุมละ 25 ไมโครลิตร ตามด้วย working reagent หลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่าและบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีน BSA มาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยให้แกน X เป็นค่าความเข้มข้นของ BSA และแกน Y เป็นค่าการดูดกลืนแสง นำกราฟมาตรฐานมาคำนวณหาปริมาณโปรตีนของแรคโตพามีนที่เชื่อมติดกับ BSA

3.4.3 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาเพื่อเพิ่มปริมาณมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อแรคโตพามีน

นำเซลล์ไฮบริโดมารหัสโคลน 10A4 ที่ผลิตโมโนคลอนอลแอนติบอดีต่อแรคโตพามีน (พรรัตน์, 2551) มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ที่มี 10 % Fetal bovine serum (FBS) โดยปริมาตร ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon dioxide, CO_2) ที่ 5 % ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่อยๆแทนที่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี FBS ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ไม่มี FBS จากนั้นจึงขยายพื้นที่การเลี้ยงโดยย้ายเซลล์ลงขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 500 มิลลิลิตร เลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 7 วัน จนได้อาหารปริมาตร 500 มิลลิลิตร จึงนำอาหารที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสเพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

3.4.4 การทำมอนอโคลนอลแอนติบอดี ให้บริสุทธิ์ด้วย protein G affinity chromatography

นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี protein G affinity chromatography โดยใช้เครื่อง affinity chromatography (AKTA^{TM} START) และคอลัมน์สำเร็จรูป HiTrap Protein G ขนาด 5 มิลลิลิตรชะคอลัมน์ด้วย 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (20mM, sodium phosphate buffer, pH 7.2) และปรับอัตราการไหลให้เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีมอนอโคลนอลแอนติบอดี ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ลงไปในคอลัมน์ ล้างโปรตีนที่ไม่จับกับโปรตีน G ในคอลัมน์ด้วย 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.2 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร จากนั้นทำการชะโมโนคลอนอลแอนติบอดีที่จับกับโปรตีน G ด้วย 0.1 โมลาร์ ไกลซีนไฮโดรคลอริก บัฟเฟอร์ (0.1M, glycine-HCl buffer, pH 2.7) เก็บสารละลายจากคอลัมน์แฟรคชั่นละ 1 มิลลิลิตร ซึ่งแต่ละแฟรคชั่นมี 1 โมลาร์ ทริส ไฮโดรคลอริก บัฟเฟอร์ (1M, Tris-HCl buffer, pH 9.0) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เพื่อปรับสารละลายที่ถูกชะด้วยกรดให้เป็นกลาง สารละลายแต่ละแฟรคชั่นจะผ่านการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรจากเครื่อง affinity chromatography จากนั้นนำหลอดที่มีโมโนคลอนอลแอนติบอดีมารวมกัน นำไปไดอะไลซิสและหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.4.5. การพัฒนาวิธีทดสอบด้วย ELISA

พิจารณาเลือกวิธี ELISA ที่ให้ค่าความไวดีที่สุด โดยเตรียม ELISA 2 รูปแบบ สำหรับตรวจวัดแรคโตพามีน ได้แก่

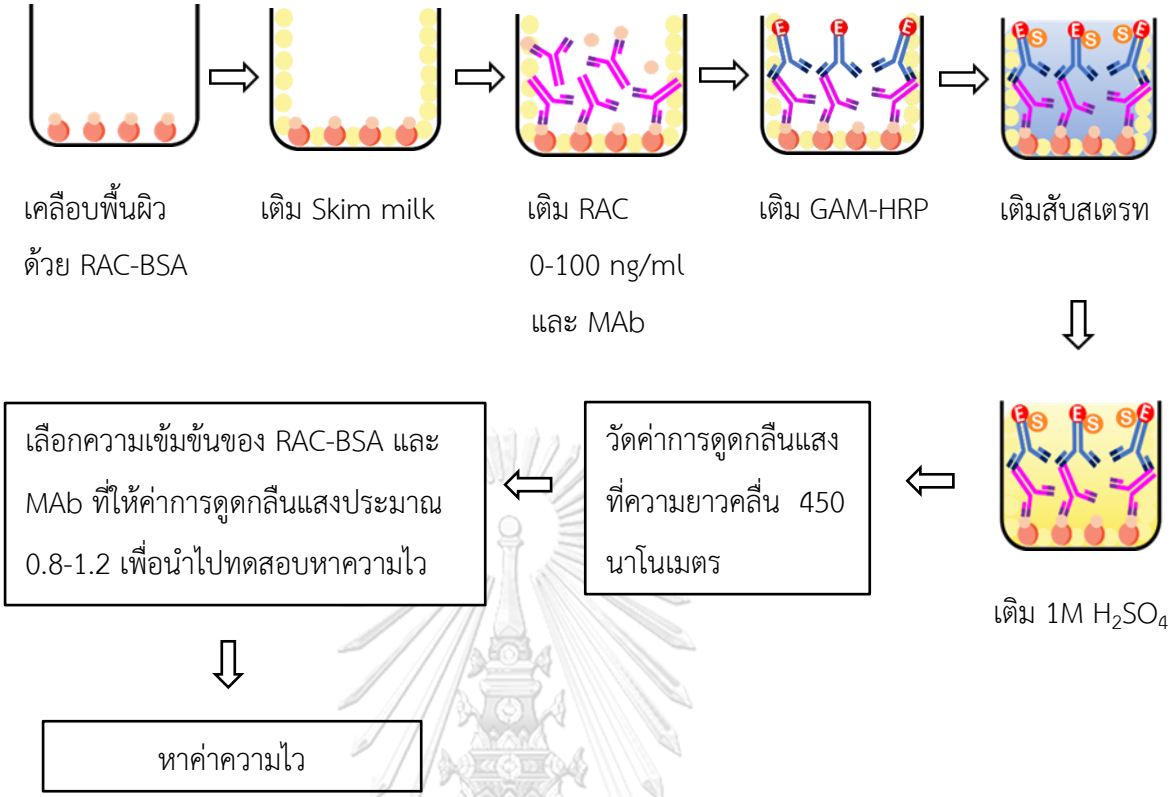
1. Indirect competitive ELISA รูปแบบที่ใช้การตรวจวัดปฏิกิริยาระหว่างแรคโตพามีนและแอนติบอดีปฐมภูมิที่จำเพาะต่อแรคโตพามีนด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ Horseradish peroxidase (HRP)

2. Direct competitive ELISA รูปแบบที่ใช้แอนติบอดีปฐมภูมิที่จำเพาะต่อแรคโตพามีนมาติดฉลากด้วยไบโอติน (biotin) และตรวจวัดปฏิกิริยาด้วย streptavidin ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ Horseradish peroxidase (HRP)

3.4.5.1. การหาค่าความไวของวิธีทดสอบแบบ indirect competitive ELISA

นำแรคโตพามีนที่เชื่อมติดกับ BSA ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาเคลือบหลุมจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ล้างจานทดสอบด้วย PBS ที่มี Tween 20 (PBST) เข้มข้น 0.05 %(v/v) 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5 %(w/v) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างจานทดสอบด้วย PBST เติม PBS ลงไปหลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติมมอนอโคลนอลแอนติบอดี ที่ความเข้มข้น 0.0312, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปหลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำจานทดสอบมาล้างด้วย PBST เติมแอนติบอดีทุติยภูมิ (Goat anti-mouse labelled horseradish peroxidase, GAM-HRP) ในระดับการเจือจาง 1:10,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำจานทดสอบมาล้างด้วย PBST เติมซับสเตรทของเอนไซม์ HRP ซึ่งประกอบไปด้วย 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) และ 0.01% H_2O_2 ละลายอยู่ใน 205 มิลลิโมลาร์ โพแทสเซียม ซิเตรทบัฟเฟอร์ (205mM, Potassium citrate, pH 4.0) บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วย 1 โมลาร์ ซัลฟิวริก (1M, sulfuric) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร (รูปที่ 10) ทำการเลือกคู่ความเข้มข้นของแรคโตพามีนที่เชื่อมติดกับ BSA กับ มอนอโคลนอลแอนติบอดี ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 0.8-1.2 เพื่อนำไปทดสอบหาค่าความไว

ศึกษาความไวโดยแปรความเข้มข้นของสารละลายแรคโตพามีนในรูปอิสระที่ความเข้มข้น 0-100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการทดสอบแบบเดียวกับการทดสอบด้านบน สร้างกราฟโดยให้แกน X เป็นลอการิทึมความเข้มข้นของสารละลายแรคโตพามีน และ แกน Y เป็นเปอร์เซ็นต์อัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่มีแรคโตพามีน (B) และไม่มีแรคโตพามีน (B_0)



รูปที่ 10 การทดสอบหาความไวของ ELISA ด้วยวิธี indirect compettitive ELISA

หมายเหตุ = RAC-BSA = skim milk = RAC ในรูปอิสระ = MAb

= GAM-HRP = สับสเตรท

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.4.5.2. วิธีทดสอบแบบ direct competitive ELISA

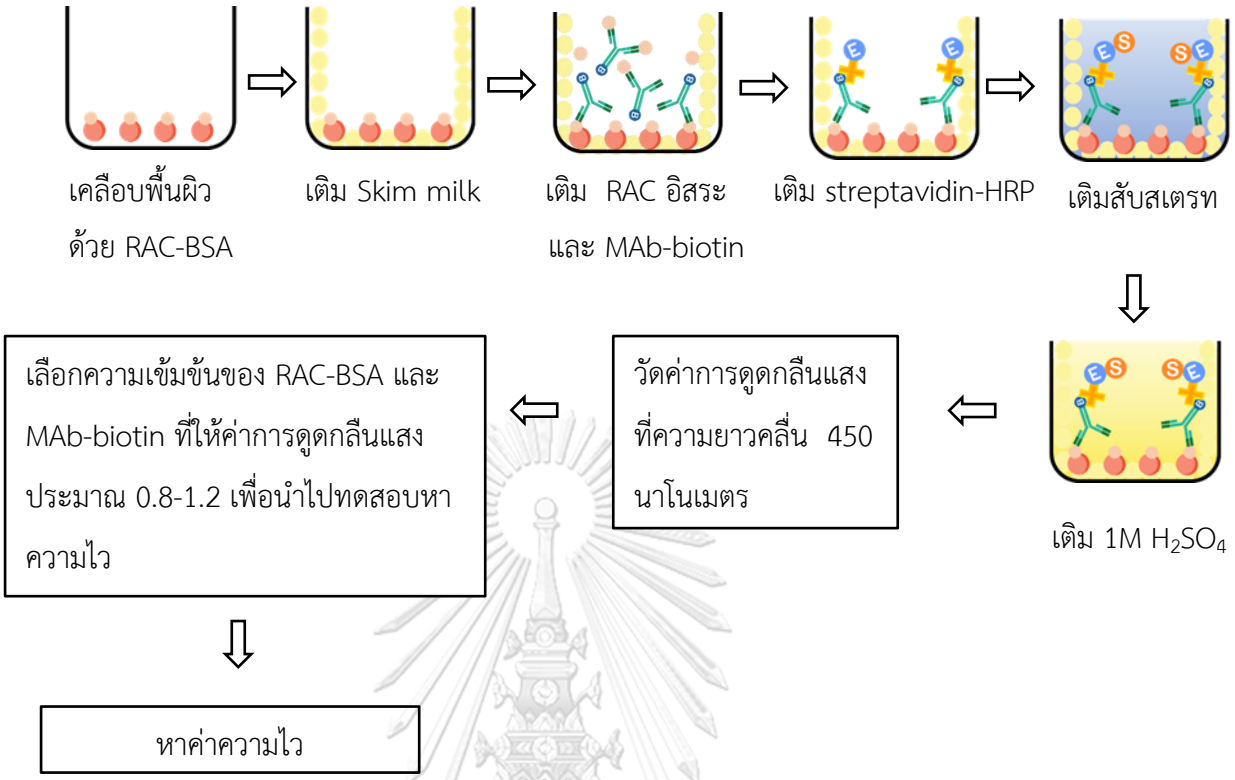
3.4.5.2.1 การเชื่อมมอนอโคลนอลแอนติบอดีกับไบโอติน (MAb-biotin)

การเชื่อมติดทำตาคู่มือในชุด kit ของบริษัท Thermo Scientific (EZ-link Sulfo-NHS-LC-biotinylation kit) ใช้อัตราส่วนคือ มอนอโคลนอลแอนติบอดี เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับไบโอติน เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายผสมไปผ่าน Thermo Scientific Zeba Spin Desalting Column โดยการนำคอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เก็บสารละลายที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์และนำไปตรวจหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA

3.4.5.2.2 การหาค่าความไวของวิธีทดสอบแบบ direct competitive ELISA

นำแรคโตพามีนที่เชื่อมติดกับ BSA ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาเคลือบหลุมจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ล้างจานทดสอบด้วย PBS ที่มี Tween 20 (PBST) เข้มข้น 0.05 %(v/v) 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5 %(w/v) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างจานทดสอบด้วย PBST เติม PBS ลงไปหลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติมมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมติดกับไบโอติน ที่ความเข้มข้น 0.0078, 0.0156, 0.0312, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.50, 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปหลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำจานทดสอบมาล้างด้วย PBST เติม streptavidin ที่เชื่อมติดกับเอนไซม์ HRP ในระดับการเจือจาง 1:10,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำจานทดสอบมาล้างด้วย PBST เติมซับสเตรทของเอนไซม์ HRP ซึ่งประกอบไปด้วย 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) และ 0.01% H_2O_2 ละลายอยู่ใน 205 มิลลิโมลาร์ โพแทสเซียม ซิเตรทบัฟเฟอร์ (205mM, Potassium citrate, pH 4.0) บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วย 1 โมลาร์ ซัลฟิวริก (1M, sulfuric) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร (รูปที่ 11) ทำการเลือกคู่ แรคโตพามีนที่เชื่อมติดกับ BSA กับ มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมติดกับไบโอติน ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 0.8-1.2 เพื่อนำไปทดสอบหาค่าความไว

ศึกษาความไวโดยแปรความเข้มข้นของสารละลายแรคโตพามีนในรูปอิสระที่ความเข้มข้น 0-100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการทดสอบแบบเดียวกับการทดสอบด้านบน สร้างกราฟโดยให้แกน X เป็นลอการิทึมความเข้มข้นของสารละลายแรคโตพามีน และ แกน Y เป็นเปอร์เซ็นต์อัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่มีแรคโตพามีน (B) และไม่มีแรคโตพามีน (B_0)



รูปที่ 11 การทดสอบหาความไวของ ELISA ด้วยวิธี direct competitive ELISA

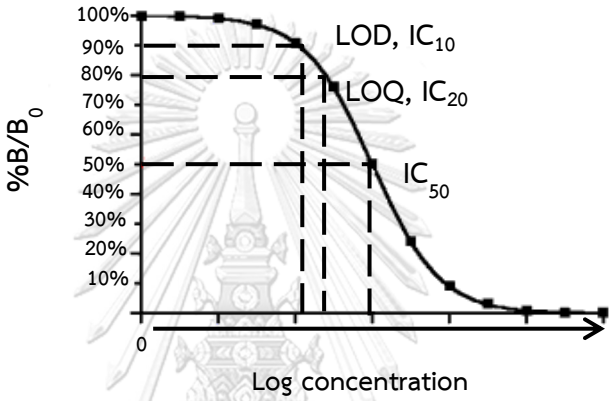
หมายเหตุ = RAC-BSA = skim milk = RAC ในรูปอิสระ

= MAB-biotin = streptavidin-HRP = สับสเตรท

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.4.5.3 การวิเคราะห์ผลความไว

หลังจากหาความไวของวิธี indirect competitive ELISA และ direct competitive ELISA แล้วนั้น เลือก ELISA รูปแบบที่ให้ค่าความไวที่ดีที่สุด โดยพิจารณาจากค่า IC_{50} LOQ และ LOD ของ ELISA ทั้ง 2 รูปแบบ (รูปที่ 12) เลือกรูปแบบที่ให้ค่า IC_{50} LOQ และ LOD ที่ต่ำที่สุด เนื่องจากรูปแบบที่ให้ค่าดังกล่าวต่ำจะมีความไวสูง สามารถตรวจหาแรคโตพามีนในปริมาณต่ำได้ รูปแบบที่ถูกเลือกคือ direct competitive ELISA วิธี ELISA รูปแบบดังกล่าวจะถูกนำไปใช้ในทดสอบความใช้ได้ของการตรวจวัดแรคโตพามีนต่อไป



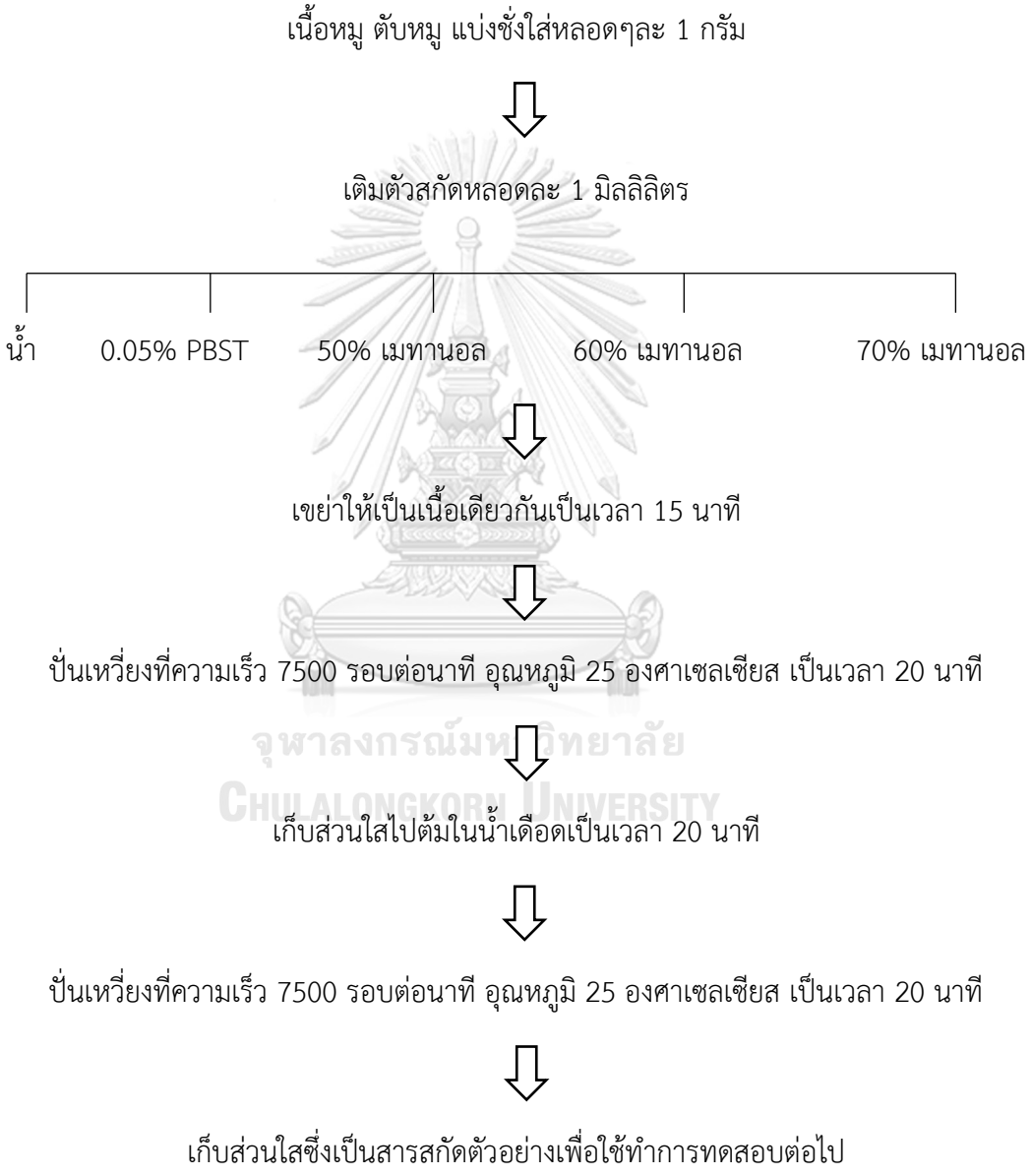
รูปที่ 12 IC_{50}, LOQ และ LOD บน inhibition curve

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.4.6. การเตรียมสารสกัดตัวอย่าง

นำตัวอย่างเนื้อหมูซึ่งเป็นตัวแทนของกลุ่มเนื้อสัตว์ (กลุ่มเนื้อสัตว์ได้แก่เนื้อหมูและเนื้อโค) และตับหมูซึ่งเป็นตัวแทนของกลุ่มเครื่องในสัตว์ (กลุ่มเครื่องในสัตว์ได้แก่ ตับหมู ตับโคและไตหมู) มาบดละเอียดแบ่งชั่งใส่หลอดๆละ 1 กรัม จำนวน 5 หลอด โดยหลอดที่ 1 เติมน้ำ หลอดที่ 2 เติม 0.05 เปอร์เซ็นต์ PBST หลอดที่ 3 4 และ 5 เติมเมทานอลที่ 50, 60 และ 70 เปอร์เซ็นต์ใน 0.05 เปอร์เซ็นต์ PBST ตามลำดับ ปริมาตรหลอดละ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันเป็นเวลา 15 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนใสเพื่อนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 20 นาที เก็บส่วนใสซึ่งเป็นสารสกัดมาทดสอบในขั้นตอนELISA ต่อไป (รูปที่ 13)

กลุ่มตัวอย่างอาหารสัตว์ (อาหารหมูและอาหารโค) ใช้เมทานอลที่ 10 เปอร์เซ็นต์ใน 0.05 เปอร์เซ็นต์ PBST ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ในการสกัดโดยอ้างอิงจากงานวิจัยของ Preechakasedkit และคณะ, 2019 จากนั้นทำการสกัดตามวิธีเช่นเดียวกับกลุ่มเนื้อสัตว์และเครื่องในสัตว์

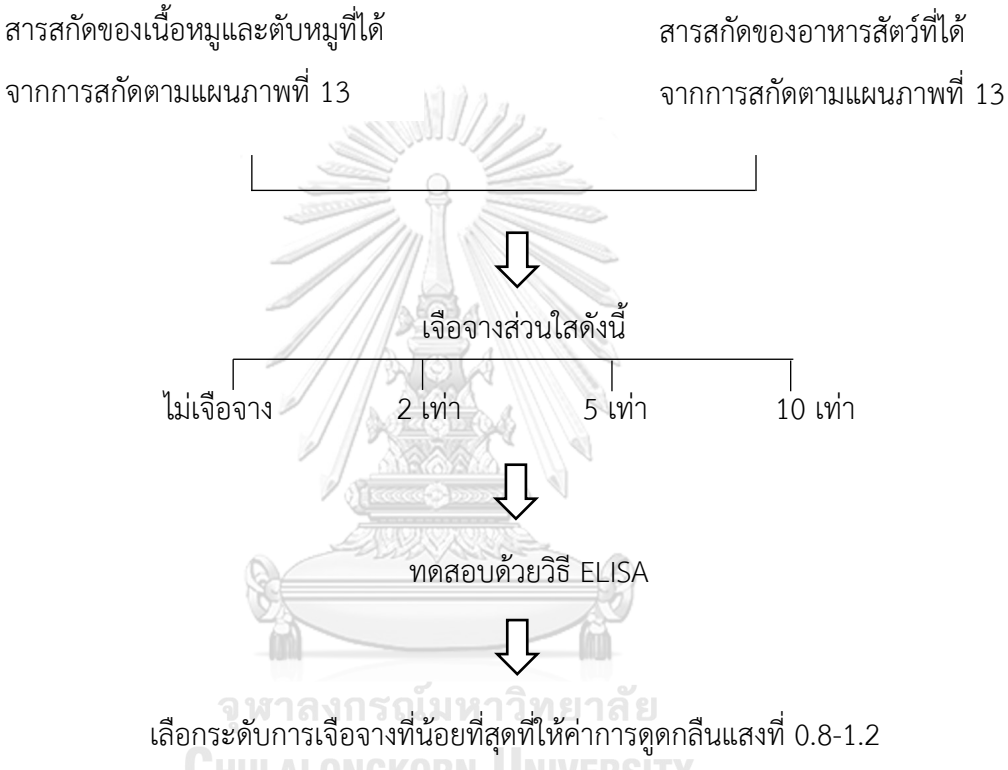


รูปที่ 13 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดตัวอย่างก่อนการทดสอบหาแรคโตพามีนด้วยวิธี ELISA

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.4.7 การศึกษาผลกระทบของแมทริก

สกัดตัวอย่างตามแผนภาพที่ 13 จากนั้นนำสารสกัดมาศึกษาผลกระทบของแมทริกโดยเจือจางสารสกัดของแต่ละตัวอย่างที่ 2, 5, 10 เท่า และไม่เจือจาง ทดสอบด้วย ELISA พิจารณาค่าเปอร์เซ็นต์เมทานอลและและการเจือจางที่น้อยที่สุดที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 0.8-1.2 มาใช้สร้างกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 14)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 14 ขั้นตอนการศึกษาผลกระทบของแมทริก

3.4.8 การทดสอบความใช้ได้ของวิธี ELISA

3.4.8.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน

สกัดตัวอย่างตามแผนภาพที่ 13 จากนั้นนำสารสกัดมาเติมแรคโตพามีนให้มีความเข้มข้นสุดท้ายที่ 0-100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเจือจางที่ระดับการเจือจางที่เลือกไว้ สร้างกราฟโดยให้แกน X เป็นลอการิทึมความเข้มข้นของสารละลายแรคโตพามีน และ แกน Y เป็นเปอร์เซ็นต์อัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่มีแรคโตพามีน (B) และไม่มีแรคโตพามีน (B_0) เลือก $\%B/B_0$ ในช่วง 20-80 % มาสร้างเป็นกราฟเส้นตรงเพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 15) กราฟมาตราฐานที่ได้จะสามารถบอกช่วงของการตรวจวัด (detection range) แรคโตพามีนในตัวอย่างต่างๆได้ และสามารถคำนวณค่า LOQ และ LOD จากสูตร

LOQ = ความเข้มข้นเฉลี่ยตัวอย่างที่ไม่มีแรคโตพามีน (concentration of blank sample) + 10SD
LOD = ความเข้มข้นเฉลี่ยตัวอย่างที่ไม่มีแรคโตพามีน (concentration of blank sample) + 3SD

โดยที่ SD คือส่วนเบี่ยงเบนมาตราฐานของความเข้มข้นตัวอย่างที่ไม่มีแรคโตพามีน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สกัดตัวอย่างตามแผนภาพที่ 13

⇩

เติมแรคโตพามีนให้มีความเข้มข้นสุดท้ายที่ 0-100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

⇩

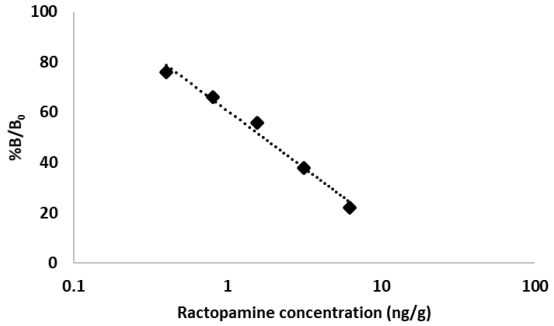
เจือจางที่ระดับการเจือจางที่เลือกไว้

⇩

ทดสอบด้วยวิธี ELISA และนำผลที่ได้ไปสร้างกราฟ

⇩

เลือก %B/B_0 ในช่วง 20-80 % มาสร้างเป็นกราฟเส้นตรงเพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐาน



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 15 ขั้นตอนการสร้างกราฟมาตรฐาน

3.4.8.2 การทดสอบความจำเพาะ

ทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของโมโนคลอนอลแอนติบอดีในสารสกัดเนื้อหมู, ตับหมูและอาหารหมูกับสารในกลุ่มบีต้า-อะโกนิสต์ได้แก่ เคลนบูเทอรอลและซัลบูทามอล โดยเตรียมสารละลายเคลนบูเทอรอลและซัลบูทามอลที่ความเข้มข้น 0, 10, 100, 1,000 และ 10,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดสอบด้วย ELISA จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้าม (% Cross reactivity, %CR) จากสูตร

$$\% \text{ CR} = \frac{IC_{50} \text{ ของ RAC}}{IC_{50} \text{ ของสารอื่น}}$$

3.4.8.3 การทดสอบความถูกต้องและความแม่นยำ

ค่าความถูกต้อง (accuracy) คือการหาปริมาณของสารที่เติมลงไปด้วยวิธีที่ต้องการทดสอบเพื่อบ่งบอกความสามารถที่ให้ผลใกล้เคียงกับค่าจริงหรือค่ามาตรฐาน โดยพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์ค่าคืนกลับ (%recovery) และเกณฑ์การยอมรับได้ของเปอร์เซ็นต์ค่าคืนกลับอ้างอิงตาม AOAC ปี 2016 (George และ Latimer, 2016)

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ได้}}{\text{ความเข้มข้นของสารที่เติมลงไป}} \text{ x } 100$$

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ค่าความแม่นยำ (precision) คือค่าที่บ่งบอกความสามารถที่ให้ผลเหมือนกันเมื่อทดลองหลายๆ ครั้ง โดยพิจารณาจากค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) และเกณฑ์การยอมรับได้ของค่าความแม่นยำอ้างอิงตาม AOAC ปี 2016 (George และ Latimer, 2016)

$$\% \text{ CV} = \frac{\text{SD}}{\mu} \text{ x } 100$$

โดยที่ SD คือส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของแต่ละความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้

μ คือค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นแต่ละความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้

ทำการทดสอบค่าความถูกต้องและแม่นยำดังนี้

Intra-variation assay ทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ ในเวลาเดียวกัน

Inter-variation assay ทำการวิเคราะห์ 3 ครั้ง ในวันที่ต่างกัน

ทดสอบหาค่าความถูกต้องและความแม่นยำโดยนำกลุ่มตัวอย่างแต่ละกลุ่ม (กลุ่มตัวอย่างเนื้อสัตว์ได้แก่ เนื้อหมู,เนื้อโค กลุ่มตัวอย่างเครื่องในสัตว์ได้แก่ตับหมู,ตับโค, ไตหมู กลุ่มตัวอย่างอาหารสัตว์ได้แก่อาหารหมู, อาหารโค) มาบดละเอียดแบ่งชั่งใส่หลอดๆ ละ 1 กรัม จำนวน 5 หลอด แต่ละหลอดเติมแรคโตพามีนให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.4, 0.8, 1.5, 3 และ 6 นาโนกรัมต่อกรัมในเนื้อหมูและไตหมู เติมแรคโตพามีนให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.8, 1.5, 3, 6 และ 12 นาโนกรัมต่อกรัมในเนื้อโค ตับหมู, ตับโค อาหารหมูและอาหารโค ซึ่งความเข้มข้นเหล่านี้อยู่ในช่วงเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของแต่ละตัวอย่าง สกัดตัวอย่างตามแผนภาพที่ 13 เก็บส่วนใสซึ่งเป็นสารสกัดมาเจือจางที่ระดับการเจือจางที่เลือกไว้ จากนั้นตรวจวัดด้วยวิธี ELISA นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณความเข้มข้นของแรคโตพามีนที่ตรวจวัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อคำนวนหาค่าความถูกต้องและความแม่นยำ (รูปที่ 16)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตัวอย่างบดละเอียด แบ่งชั่งใส่หลอดๆละ 1 กรัม จำนวน 5 หลอด

⇩

เติมแรคโตพามีนให้มีความเข้มข้นสุดท้ายที่ 0.4, 0.8, 1.5, 3 และ 6 นาโนกรัมต่อกรัม

ในเนื้อหมู และไตหมู

เติมแรคโตพามีนให้มีความเข้มข้นสุดท้ายที่ 0.8, 1.5, 3, 6 และ 12 นาโนกรัมต่อกรัม

ในเนื้อโค ตับหมู ตับโค อาหารหมูและอาหารโค

⇩

สกัดตัวอย่างตามผนภาพที่ 13

⇩

เจือจางที่ระดับการเจือจางที่เลือกไว้

⇩

ทดสอบด้วยวิธี ELISA

⇩

นำผลที่ได้ไปคำนวณหาค่าความถูกต้องและความแม่นยำ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 16 ขั้นตอนการวิเคราะห์หาความถูกต้องและความแม่นยำในตัวอย่างเนื้อสัตว์ เครื่องในสัตว์ และอาหารสัตว์

3.4.8.4 การทดสอบความสามารถในการตรวจวัด

ค่าความสามารถในการตรวจวัด (detection capability) พิจารณาจากค่า CCβ และเกณฑ์การยอมรับได้ของ CCβ คือค่าความผิดพลาดต้องไม่เกิน 5 % ของค่า cut-off factor (Fm) อ้างอิงตาม Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (Community Reference Laboratories Residues, 2010) ค่า Fm คำนวณได้จาก

Fm = (ค่าเฉลี่ยของตัวอย่างเติมสาร + 1.64) × ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างเติมสาร

ทดสอบค่าความสามารถในการตรวจวัดโดยนำกลุ่มตัวอย่างแต่ละกลุ่ม (กลุ่มตัวอย่างเนื้อสัตว์ ได้แก่ เนื้อหมู,เนื้อโค กลุ่มตัวอย่างเครื่องในสัตว์ได้แก่ตับหมู,ตับโค, ไตหมู กลุ่มตัวอย่างอาหารสัตว์ ได้แก่อาหารหมู, อาหารโค) มาบดละเอียดชนิดละ 20 ตัวอย่าง ชั่งใส่หลอด โดยแต่ละตัวอย่างจะแบ่งใส่หลอดๆละ 1 กรัม จำนวน 2 หลอด โดยให้หลอดที่ 1 เป็น ตัวอย่างไม่เติมสารและหลอดที่ 2 เป็นตัวอย่างเติมสาร เติมแรคโตพามีนลงไปในหลอดที่ 2 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2 นาโนกรัมต่อกรัมในเนื้อหมูและไตหมู และ 3 นาโนกรัมต่อกรัมในเนื้อโค ตับหมู ตับโค อาหารหมูและอาหารโค ซึ่งความเข้มข้นนี้ได้มาจากช่วงกลางของกราฟมาตรฐานของแต่ละตัวอย่าง สกัดตัวอย่างตามแผนภาพที่ 3.5 เก็บสารสกัดมาเจือจางที่ระดับการเจือจางที่เลือกไว้ จากนั้นตรวจวัดด้วยวิธี ELISA นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณความเข้มข้นของแรคโตพามีนที่ตรวจวัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน จากนั้นคำนวณหาค่า Fm เพื่อใช้เป็นเกณฑ์ในการพิจารณาค่าความคลาดเคลื่อนของการตรวจวัดด้วยวิธี ELISA (รูปที่ 17) วิเคราะห์ค่าความสามารถในการตรวจวัดโดยสร้างกราฟกำหนดให้แกน X เป็นปริมาณของแรคโตพามีนที่วิเคราะห์ได้ แกน Y เป็นจำนวนตัวอย่าง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตัวอย่างบดละเอียดชนิดละ 20 ตัวอย่าง

⇩

แบ่งใส่หลอดๆละ 1 กรัม จำนวน 2 หลอด

⇩

หลอดที่ 1 ตัวอย่างไม่เติมสาร หลอดที่ 2 ตัวอย่างเติมสาร

⇩

เติม RAC ให้ได้ 2 นาโนกรัมต่อกรัมในเนื้อหมู และไตหมู

เติม RAC ให้ได้ 3 นาโนกรัมต่อกรัมในเนื้อโค ตับหมู ตับโค

อาหารหมูและอาหารโค

⇩

สกัดตัวอย่างตามแผนภาพที่ 13

⇩

เก็บส่วนใสมาเจือจางที่ระดับการเจือจางที่เลือกไว้

⇩

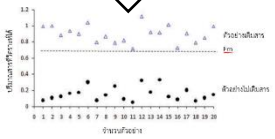
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ทดสอบด้วยวิธี ELISA

⇩

คำนวนหาปริมาณแรคโตพามีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณหาค่า Fm

⇩



รูปที่ 17 ขั้นตอนการวิเคราะห์ค่าความสามารถในการตรวจวัดด้วยวิธี ELISA ในตัวอย่างเนื้อสัตว์ เครื่องในสัตว์และอาหารสัตว์

3.4.9 การเปรียบเทียบผลการทดสอบความถูกต้องระหว่าง LC-MS/MS กับ วิธี ELISA

ส่งตัวอย่างเนื้อหมู ตับหมูและอาหารหมูไปตรวจหาการตกค้างด้วยวิธียืนยันผลโดยใช้เครื่อง LC-MS/MS ณ ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) โดยเติมแรคโตพามีนที่ความเข้มข้น 0.8, 1.5 และ 3 นาโนกรัมต่อกรัมในตัวอย่างเนื้อหมูซึ่งใช้เป็นตัวแทนของตัวอย่างกลุ่มเนื้อสัตว์ และเติมแรคโตพามีนที่ความเข้มข้น 1.5, 3 และ 6 นาโนกรัมต่อกรัมในตัวอย่างตับหมูและอาหารหมูซึ่งใช้เป็นตัวแทนของตัวอย่างกลุ่มเครื่องในสัตว์และอาหารสัตว์ ตรวจวัดตัวอย่างเนื้อหมู ตับหมูและอาหารหมูกลุ่มเดียวกับที่ส่งตรวจด้วย LC-MS/MS ด้วยวิธี ELISA นำผลที่ได้จากวิธี ELISA ไปเปรียบเทียบกับกับผลจากเครื่องมือ LC-MS/MS

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

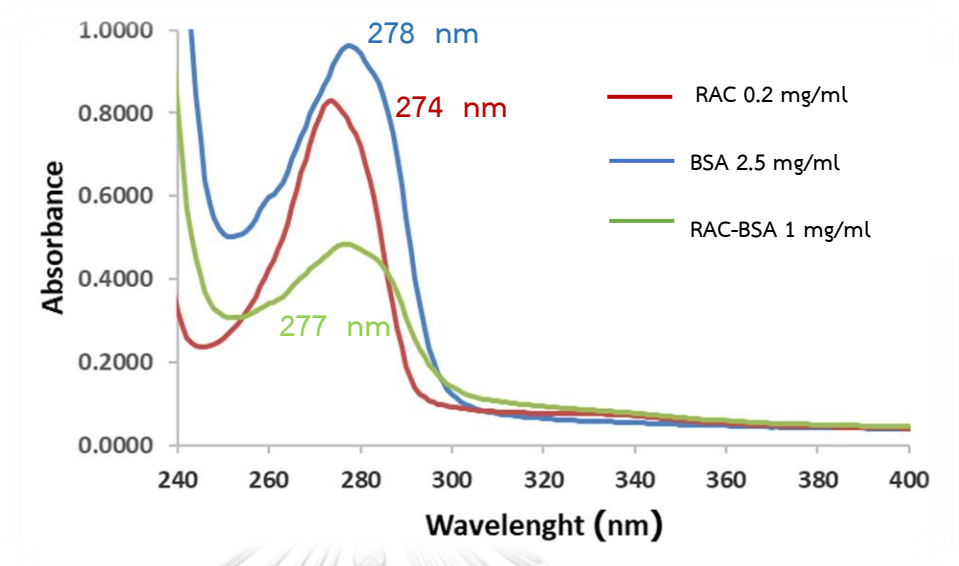
บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

4.1 การเชื่อมติดแรคโตพามีนกับโปรตีนพาหะ

แรคโตพามีนเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 337.84 กรัมต่อโมล ไม่สามารถยึดติดกับพื้นหลุมของจาน ELISA ได้โดยตรง จึงต้องทำการเชื่อมติดกับโปรตีนพาหะ โดยในงานวิจัยนี้ได้ทำการเชื่อมติดระหว่างแรคโตพามีนกับโปรตีน BSA ด้วยวิธี Mannich ซึ่งวิธีนี้จะเกิดการเชื่อมต่อผ่านทางหมู่เอมีนของ BSA และหมู่แอลดีไฮด์ที่มีแอกทีฟไฮโดรเจนที่พร้อมทำปฏิกิริยาของแรคโตพามีน (Preechakasedkit และคณะ, 2019) หลังจากทำการเชื่อมติดโดยทำทั้งหมด 3 ครั้ง ได้หาปริมาณความเข้มข้นของโปรตีน BSA ที่เชื่อมติดกับแรคโตพามีน ด้วยวิธี BCA ทั้ง 3 ครั้งพบว่ามีความเข้มข้นของ BSA เฉลี่ยเท่ากับ 2.89, 3.09 และ 3.11 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

หลังจากเชื่อมติดแรคโตพามีนกับ BSA แล้ว จะทำการหาอัตราส่วนการเชื่อมติดโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 240-400 นาโนเมตร จากการทดลองพบว่าค่าความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ของแรคโตพามีน, BSA และ แรคโตพามีนที่เชื่อมติดกับ BSA คือ 274, 278 และ 277 นาโนเมตรตามลำดับ จะเห็นได้ว่า λ_{max} ก่อนและหลังการเชื่อมติดของแรคโตพามีนมีการเปลี่ยนแปลงไป จากนั้นคำนวนหาอัตราส่วนการเชื่อมติดโดยพบว่าอัตราส่วนการเชื่อมติดระหว่างแรคโตพามีน กับ BSA โดยเฉลี่ยทั้ง 3 ครั้ง เท่ากับ 4.85:1 นั้นหมายถึง แรคโตพามีน โดยประมาณ 5 โมเลกุล เชื่อมติดอยู่กับ BSA 1 โมเลกุล ดังนั้นการเชื่อมติดระหว่างแรคโตพามีนและ BSA ในครั้งนี้ประสบความสำเร็จ (รูปที่ 18 และ ตารางที่ 6) การเชื่อมติดด้วยวิธี Mannich เป็นวิธีที่ง่ายไม่ซับซ้อน สารเคมีที่ใช้ในการเชื่อมติดมีไม่มาก ซึ่งต่างจากวิธีการเชื่อมติดของงานวิจัยอื่น ซึ่งใช้วิธีการที่ยุ่งยาก, สารเคมีหลายตัวและใช้เวลานาน (Preechakasedkit และคณะ, 2019) การคำนวนหาอัตราส่วนการเชื่อมติดโดยวิธี UV-Vis spectroscopy method นี้ เป็นวิธีการทดสอบที่ง่าย รวดเร็ว ไม่ซับซ้อน และเครื่องมือที่ใช้เป็นเครื่องมือพื้นฐานที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีงานวิจัยหลายชิ้นที่ได้ทดสอบการเชื่อมติดด้วยวิธีนี้ (Jiang และคณะ, 2016; Deng และคณะ, 2016; Preechakasedkit และคณะ, 2019)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 18 UV-Visible spectra ของ แรคโตพามีน, BSA และ แรคโตพามีนที่เชื่อมติดกับ BSA

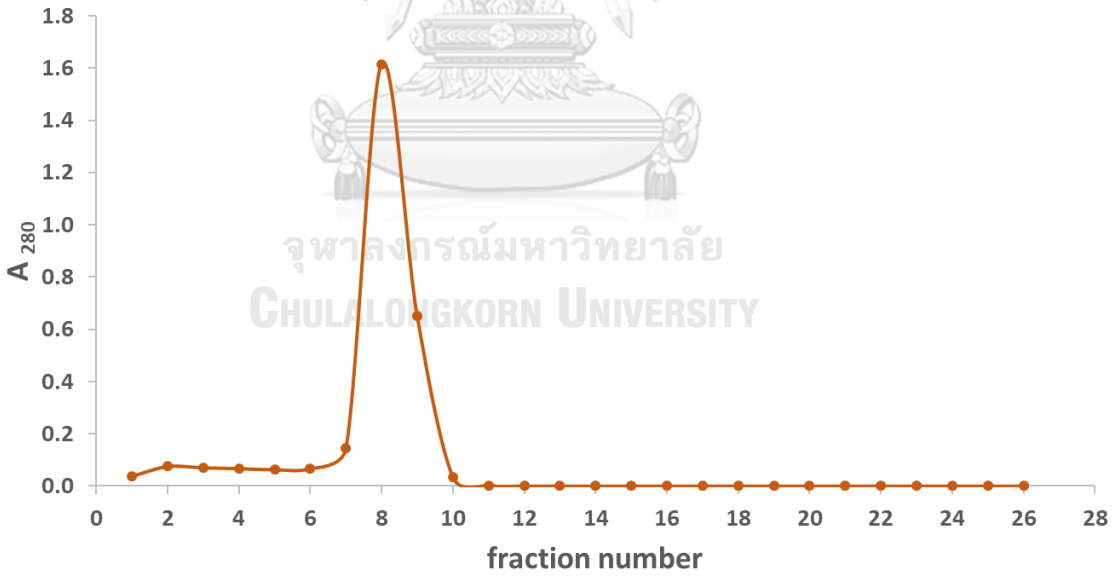
ตารางที่ 6 การหาอัตราส่วนการเชื่อมติดระหว่างแรคโตพามีน กับ BSA

สารประกอบ	มวลโมเลกุล	ความเข้มข้น mg/ml	ความเข้มข้น M	A_{274}	Molar Absorbility	Hapten density
RAC	337.84	0.2	5.919×10^{-4}	0.8298	1401.92	-
BSA	66000	2.5	3.787×10^{-5}	0.9143	24143.12	-
RAC-BSA (1)	66337.84	1	1.508×10^{-5}	0.4516	29946.94	4.14
RAC-BSA (2)	66337.84	1	1.508×10^{-5}	0.4726	31339.52	5.13
RAC-BSA (3)	66337.84	1	1.508×10^{-5}	0.4756	31538.46	5.27
RAC-BSA (เฉลี่ย)						4.85

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.2 การทำมอนอโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

มอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อแรคโตพามีนซึ่งได้มาจากการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมารหัสโคลน 10A4 มีไอโซไทป์ IgG ซึ่งมีความจำเพาะกับโปรตีนจีจึงเลือกใช้ในคอลัมน์โปรตีนจีเซฟาโรส (protein G sapharose) ซึ่งเป็นคอลัมน์โครมาโทกราฟฟีแบบสัมพรรคภาพ (affinity chromatography column) มาทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ เมื่อผ่านอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดีลงในคอลัมน์ โปรตีนจีจะจับกับแอนติบอดีตรงบริเวณของ Fc domain ดังนั้นแอนติบอดีจึงถูกจับไว้ในคอลัมน์ ทำการชะแอนติบอดีด้วย 0.1 โมลาร์ ไกลซีนไฮโดรคลอริก บัฟเฟอร์ pH 2.7 ซึ่งสารดังกล่าวเป็นตัวที่ทำให้ความสามารถในการจับกันของแอนติบอดีและโปรตีนจีลดลงแอนติบอดีจึงหลุดออกจากคอลัมน์ จากโครมาโตแกรมค่าการดูดกลืนแสงพบว่าแฟรคชั่นที่ 7 เริ่มมีแอนติบอดีออกจากคอลัมน์ โดยสังเกตุจากค่าการดูดกลืนแสงที่เริ่มสูงขึ้นและสูงที่สุดในแฟรคชั่นที่ 8 ก่อนจะค่อยๆลดลงในแฟรคชั่นที่ 9 จึงทำการเก็บแฟรคชั่นที่ 7, 8 และ 9 มารวมกันและหาปริมาณโปรตีนของ แอนติบอดี ด้วยวิธี BCA ได้ 2.67 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 19)



รูปที่ 19 โครมาโตแกรมแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตรของแต่ละแฟรคชั่นที่ชะออกมาจากคอลัมน์โปรตีนจี

4.3 การเลือกวิธี ELISA

4.3.1 การหาค่าความไวของวิธีทดสอบแบบ indirect competitive ELISA

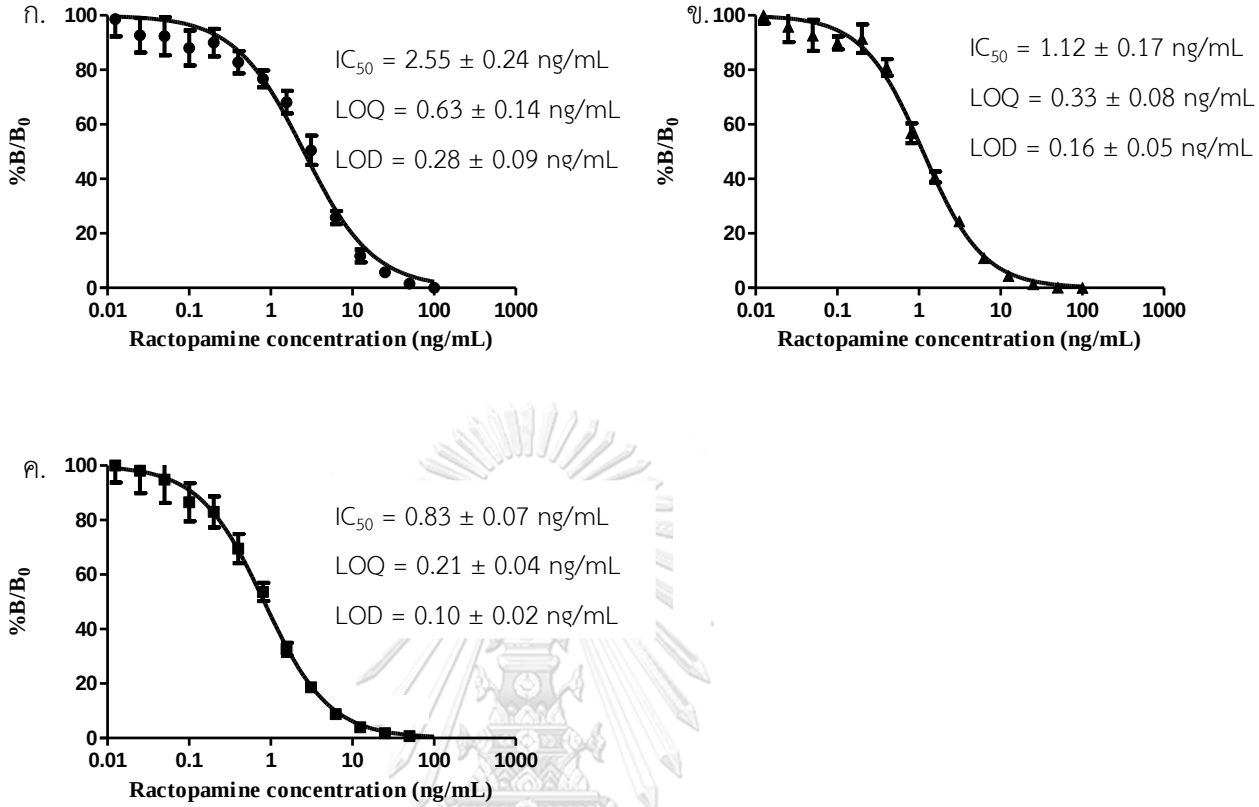
เนื่องจากความเข้มข้นของแรคโตพามีนที่เชื่อมติดกับ BSA ที่เคลือบอยู่ที่พื้นหลุมของจานทดสอบ ELISA กับความเข้มข้นของมอนอโคลนอลแอนติบอดี มีผลต่อความไวของวิธี ELISA โดยพบว่าเมื่อความเข้มข้นของแรคโตพามีนที่เชื่อมติดกับ BSA และความเข้มข้นของแอนติบอดีเปลี่ยนจะทำให้ค่าความไวเปลี่ยนไป นำคู่ความเข้มข้นที่เลือกไว้ทั้ง 3 คู่ ดังตารางที่ 7 มาทดสอบพบว่า เมื่อใช้แรคโตพามีนที่เชื่อมติดกับ BSA ที่ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ความเข้มข้น 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า IC_{50}, LOQ และ LOD ต่ำที่สุด คือ 0.83, 0.21 และ 0.10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงว่าความเข้มข้นดังกล่าวเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้วิธีทดสอบแบบ indirect competitive ELISA มีความไวสูงสุด (รูปที่ 20 และตารางที่ 8)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 7 ค่าการดูดกลืนแสงระหว่าง แรคโตพามีนที่เชื่อมติดกับ BSA และ มอนอโคลนอล แอนติบอดีที่ความเข้มข้นต่างๆ ทดสอบแบบ indirect competitive ELISA

ความเข้มข้นของ มอนอโคลนอลแอนติบอดี (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของ แรคโตพามีนที่เชื่อมติดกับ BSA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)			
	0.5	1	2	4
0.0312	0.1304	0.1909	0.2930	0.3538
0.0625	0.1627	0.2695	0.4709	0.6268
0.125	0.2009	0.4089	0.7314	**1.1583**
0.25	0.2754	0.5565	**1.0471**	1.5345
0.5	0.3630	0.7766	1.4561	1.9874
1	0.4563	**1.0199**	1.8616	2.3878
2	0.5794	1.2533	2.1612	2.7872
4	0.7243	1.4330	2.5640	3.1271

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 20 ค่าความไวของวิธีทดสอบแบบ indirect competitive ELISA

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

โดยที่ ก. คือ แรคโตพามีนที่เชื่อมติดกับ BSA เคลือบพื้นหลุมที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ มอนอโคลนอลแอนติบอดี ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ข. คือ แรคโตพามีนเชื่อมติดกับ BSA เคลือบพื้นหลุมที่ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ มอนอโคลนอลแอนติบอดี ที่ความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ค. คือ แรคโตพามีนเชื่อมติดกับ BSA เคลือบพื้นหลุมที่ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ มอนอโคลนอลแอนติบอดี ที่ความเข้มข้น 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 8 ผลการการทดสอบหาค่าความไวโดยใช้ความเข้มข้นของ แรคโตพามีนเชื่อมติดกับ BSA และ มอนอโคลนอลแอนติบอดี ทั้ง 3 คู่

ความเข้มข้นของแรคโตพามีนเชื่อมติดกับ BSA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของมอนอโคลนอลแอนติบอดี (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	IC_{50} ± SD (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	LOQ ± SD (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	LOD ± SD (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	1	2.55 ± 0.24	0.63 ± 0.14	0.28 ± 0.09
2	0.25	1.12 ± 0.17	0.33 ± 0.08	0.16 ± 0.05
4	0.125	0.83 ± 0.07	0.21 ± 0.04	0.10 ± 0.02

4.3.2 การหาค่าความไวของวิธีทดสอบแบบ direct competitive ELISA

4.3.2.1 การเชื่อมติดระหว่าง มอนอโคลนอลแอนติบอดีกับไบโอติน

ทำการเชื่อมติดมอนอโคลนอลแอนติบอดีกับไบโอติน โดยใช้ชุด kit ของบริษัท Thermo Scientific (EZ-link Sulfo-NHS-LC-biotinylation kit) หลังจากเชื่อมติดแล้วได้หาปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี BCA พบว่ามีความเข้มข้นเท่ากับ 1.84 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำ มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมติดกับไบโอติน (MAb-biotin) ไปใช้ในการทดสอบแบบ direct competitive ELISA

4.3.2.2 การหาค่าความไวของวิธีทดสอบแบบ direct competitive ELISA

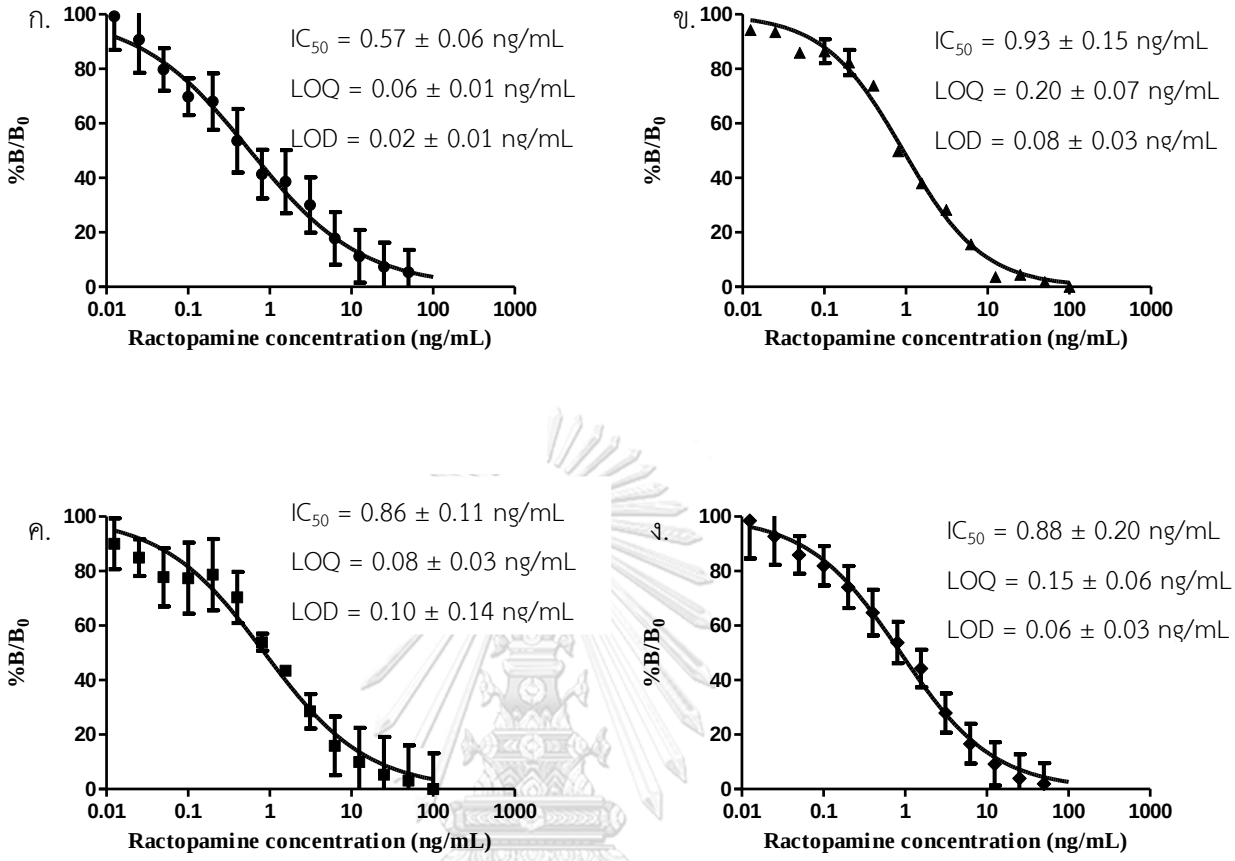
Chulalongkorn University

เนื่องจากความเข้มข้นของแรคโตพามีนที่เชื่อมติดกับ BSA ที่เคลือบอยู่ที่พื้นหลุมของจานทดสอบ ELISA กับความเข้มข้นของมอนอโคลนอลแอนติบอดี มีผลต่อความไวของวิธี ELISA โดยพบว่าเมื่อความเข้มข้นระหว่างแรคโตพามีนที่เชื่อมติดกับ BSA และ มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมติดกับไบโอตินเปลี่ยนจะทำให้ค่าความไวเปลี่ยนไป นำคู่ความเข้มข้นที่เลือกไว้ทั้ง 4 คู่ ดังตารางที่ 9 มาทดสอบพบว่า เมื่อใช้แรคโตพามีนที่เชื่อมติดกับ BSA ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินที่ความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า IC_{50}, LOQ และ LOD ต่ำที่สุด คือ 0.57, 0.06 และ 0.02 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงว่าความเข้มข้นดังกล่าวเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้วิธีทดสอบแบบ direct competitive ELISA มีความไวสูงสุด (รูปที่ 21 และตารางที่ 10)

ตารางที่ 9 ค่าการดูดกลืนแสงระหว่าง แรคโตพามีนที่เชื่อมติดกับ BSA และ มอนอโคลนอล แอนติบอดีที่เชื่อมติดกับไบโอตินที่ความเข้มข้นต่างๆ ทดสอบแบบ direct competitive ELISA

ความเข้มข้นของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมติดกับไบโอติน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของ แรคโตพามีนที่เชื่อมติดกับ BSA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)			
	0.5	1	2	4
0.0078	0.2749	0.2411	0.2158	0.2143
0.0156	0.2892	0.2877	0.2698	0.3015
0.0312	0.3554	0.3757	0.4718	0.5308
0.0625	0.5276	0.4753	**0.9432**	**1.0414**
0.125	0.7717	**1.0847**	1.9006	2.2767
0.25	**0.9984**	1.7683	3.4402	3.8705
0.5	1.8926	2.7419	3.6510	3.6565
1	2.9252	3.5753	3.7997	3.5641

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 21 ค่าความไวของวิธีทดสอบแบบ direct competitive ELISA

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

โดยที่ ก. คือ แรคโตพามีนที่เชื่อมติดกับ BSA เคลือบพื้นหลุมที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน ที่ความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ข. คือ แรคโตพามีนที่เชื่อมติดกับ BSA เคลือบพื้นหลุมที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน ที่ความเข้มข้น 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ค. คือ แรคโตพามีนที่เชื่อมติดกับ BSA เคลือบพื้นหลุมที่ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน ที่ความเข้มข้น 0.0625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

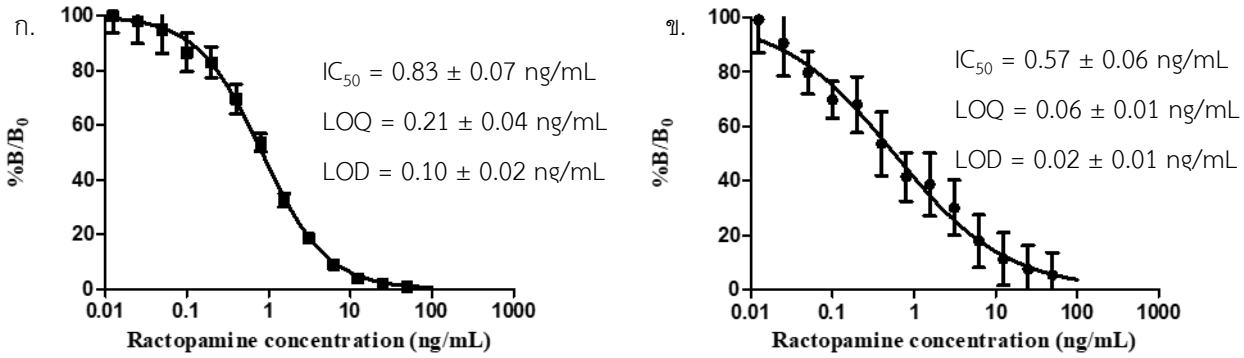
ง. คือ แรคโตพามีนที่เชื่อมติดกับ BSA เคลือบพื้นหลุมที่ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน ที่ความเข้มข้น 0.0625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบหาค่าความไวโดยใช้ความเข้มข้นของ แรคโตพามีนเชื่อมติดกับ BSA และมอนอโคลนอลแอนติบอดีเชื่อมติดกับไบโอติน ทั้ง 4 คู่

ความเข้มข้นของแรคโตพามีน-BSA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของมอนอโคลนอลแอนติบอดีเชื่อมติดกับไบโอติน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	IC_{50} ± SD (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	LOQ ± SD (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	LOD ± SD (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)
0.5	0.25	0.57 ± 0.06	0.06 ± 0.01	0.02 ± 0.01
1	0.125	0.93 ± 0.15	0.20 ± 0.07	0.08 ± 0.03
2	0.0625	0.86 ± 0.11	0.08 ± 0.03	0.10 ± 0.14
4	0.0625	0.88 ± 0.20	0.15 ± 0.06	0.06 ± 0.03

4.4 การวิเคราะห์ผลความไว

เปรียบเทียบความไวของ ELISA ทั้ง 2 รูปแบบ โดยพิจารณาจากค่า IC_{50} LOQ และ LOD พบว่า รูปแบบ indirect competitive ELISA มีค่า IC_{50} LOQ และ LOD เท่ากับ 0.83, 0.21 และ 0.10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ในขณะที่รูปแบบ direct competitive ELISA มีค่า IC_{50} LOQ และ LOD เท่ากับ 0.57, 0.06 และ 0.02 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ จะเห็นได้ว่ารูปแบบ direct competitive ELISA มีค่าความไวสูงกว่ารูปแบบ indirect competitive ELISA เนื่องจากการใช้ streptavidin ทำปฏิกิริยากับไบโอตินที่ติดฉลากไว้บนมอนอโคลนอลแอนติบอดี การจับกันระหว่าง biotin และ streptavidin เป็นการช่วยขยายสัญญาณให้ชุดตรวจสอบมีความไวสูงขึ้น 1-3 เท่า โดยพบว่า streptavidin 1 โมเลกุลสามารถจับกับโมเลกุลของ biotin ได้ถึง 4 โมเลกุล (Feng และ Zhu., 2019) จากผลการทดสอบความไวของ ELISA ทั้ง 2 รูปแบบ (รูปที่ 22 ตารางที่ 11) จึงเลือกใช้รูปแบบ direct competitive ELISA เพื่อทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธี ELISA ในการตรวจวัดแรคโตพามีนตกค้างในเนื้อสัตว์ เครื่องในสัตว์และอาหารสัตว์ต่อไป



รูปที่ 22 ค่าความไวของ indirect competitive ELISA (ก) และ direct competitive ELISA (ข)

ตารางที่ 11 สรุปผลการเปรียบเทียบ ELISA ทั้ง 2 รูปแบบ

รูปแบบของวิธี ELISA	แอนติเจน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	แอนติบอดี (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	IC_{50} (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	LOQ (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	LOD (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)
indirect	4	0.125	0.83 ± 0.07	0.21 ± 0.04	0.10 ± 0.02
direct	0.50	0.25	0.57 ± 0.06	0.06 ± 0.01	0.02 ± 0.01

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เมื่อเปรียบเทียบค่าความไวของวิธี ELISA กับงานวิจัยอื่นๆ พบว่าค่าความไวของ ELISA ในงานวิจัยนี้สูงกว่างานวิจัยของ Zhang และคณะ 2009, Jiang และคณะ 2014 และ Peng และคณะ 2019 แต่มีค่าความไวที่ต่ำกว่าของ Buakeaw และคณะ 2016 ดังแสดงในตารางที่ 12 ซึ่งอาจมาจากวิธีในการเชื่อมติดแรคโตพามีนกับ BSA โดยพบว่า Buakeaw และคณะ ได้ทำการเปลี่ยนแรคโตพามีนให้เป็นแรคโตพามีนเฮมิซักซิเนตซึ่งเป็นรูปแบบที่มีหมู่คาร์บอกซิลที่จะสามารถเกิดพันธะเปปไทด์กับหมู่เอมีนของ BSA ได้ ซึ่งเมื่อนำไปตรวจวัดการเชื่อมติดโดยวิธี MALDI-TOF-MS พบแรคโตพามีน 8 โมเลกุลเชื่อมติดกับ BSA 1 โมเลกุล วิธีการเชื่อมติดดังกล่าวต่างจากการเชื่อมติดที่ใช้ในงานวิจัยนี้ โดยในงานวิจัยนี้ได้ทำการเชื่อมติดระหว่างแรคโตพามีนกับโปรตีน BSA ด้วยวิธี

Mannich ซึ่งอ้างอิงจากงานวิจัยของ Preechakasedkit และคณะ 2019 โดยการเชื่อมติดเกิดผ่านทางหมู่เอมีนของ BSA และหมู่แอลดีไฮด์ที่มีแอกทีฟไฮโดรเจนที่พร้อมทำปฏิกิริยาของแรคโตพามีน วิธีนี้ไม่มีการเปลี่ยนรูปของแรคโตพามีนไปอยู่ในรูปแบบอื่น หาอัตราส่วนการเชื่อมติดโดยวิธี UV-Vis spectroscopy พบว่าอัตราส่วนการเชื่อมติดระหว่าง แรคโตพามีน กับ BSA เท่ากับ 5:1 นั้นหมายถึง แรคโตพามีน 5 โมเลกุล เชื่อมติดอยู่กับ BSA 1 โมเลกุล จะเห็นได้ว่างานวิจัยนี้ได้โมเลกุลแรคโตพามีนที่เชื่อมติดกับ BSA น้อยกว่าของ Buakeaw และคณะ แต่อย่างไรก็ตามการเชื่อมติดที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้มีข้อดีตรงที่เป็นวิธีที่ง่ายไม่ซับซ้อน ใช้เวลาไม่นานรวมทั้งสารเคมีที่ใช้ในการเชื่อมติดมีไม่มาก (Preechakasedkit และคณะ 2019) จึงใช้วิธีดังกล่าวในการเตรียมแอนติเจนสำหรับใช้ในการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ELISA ในงานวิจัยนี้ ผลการทดสอบพบว่าค่า IC_{50} และ LOD ที่ได้ยังคงต่ำกว่าค่า MRLs ของแรคโตพามีนที่ Codex กำหนดไว้ที่ 10-90 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบค่าความไวของวิธี ELISA ในงานวิจัยนี้กับงานวิจัยอื่นๆ

รูปแบบ ELISA	IC_{50} (ng/mL)	LOD (ng/mL)	ตัวอย่าง	อ้างอิง
Direct competitive	0.6	0.04	เนื้อหมู	Zhang และคณะ 2009
Indirect competitive	3	0.50	ปัสสาวะหมู	Jiang และคณะ 2014
Direct competitive	0.3	0.07	เนื้อหมู	Buakeaw และคณะ 2016
Indirect competitive	1.15	0.35	ปัสสาวะหมู	Peng และคณะ 2019
Direct competitive	0.57	0.02	บัฟเฟอร์	งานวิจัยนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.5 การศึกษาผลกระทบของแมทริก

แมทริกเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA เนื่องจากตัวอย่างที่นำมาทดสอบประกอบไปด้วย เนื้อ เครื่องใน อาหารของหมูและโค ซึ่งมีองค์ประกอบ เช่น โปรตีน ไขมัน รวมทั้งตัวทำละลายที่ใช้สกัดสารออกจากเนื้อเยื่อ ที่อาจส่งผลต่อการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ดังนั้นการเตรียมสารสกัดจากเนื้อหมูและตับหมูซึ่งเป็นตัวแทนของตัวอย่างกลุ่มเนื้อสัตว์และเครื่องในสัตว์ด้วย น้ำ, 0.05 เปอร์เซ็นต์ PBST และเมทานอลที่ 50, 60 และ 70 เปอร์เซ็นต์ใน 0.05 เปอร์เซ็นต์ PBST หลังจากได้สารสกัดจึงนำไปเจือจางที่ 2, 5, 10 เท่า ด้วย PBST และไม่เจือจาง ก่อนนำไปทดสอบด้วย ELISA เลือกเปอร์เซ็นต์เมทานอลและระดับการเจือจางที่น้อยที่สุดที่ให้ค่าการดูดกลืนสงในช่วง 0.8-1.2 จากผลการทดลองจะเห็นว่าเมทานอลที่ 50 เปอร์เซ็นต์และการเจือจางที่ 2 เท่า เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้สกัดตัวอย่างกลุ่มเนื้อสัตว์และเครื่องในสัตว์ (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเนื้อหมูและตับหมูที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

ตัวทำละลาย	ไม่เจือจาง		เจือจาง 2 เท่า		เจือจาง 5 เท่า		เจือจาง 10 เท่า	
	เนื้อหมู	ตับหมู	เนื้อหมู	ตับหมู	เนื้อหมู	ตับหมู	เนื้อหมู	ตับหมู
0.05% PBST	2.3098	1.6602	1.8551	1.2856	1.6969	1.0779	1.5347	1.0439
น้ำ	2.8056	2.5160	2.2253	1.3618	1.8870	1.1278	1.6681	1.0726
50% เมทานอล	0.7477	1.8171	**0.8745**	**1.1659**	0.8814	1.0439	0.9476	1.0050
60% เมทานอล	0.7750	1.2895	0.8660	1.1100	0.8491	1.0840	0.9343	1.0225
70% เมทานอล	0.7831	1.3268	0.8523	1.0069	0.8085	0.9629	0.8401	0.9703

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เมื่อได้สารสกัดจากแต่ละตัวอย่างได้ทำการเจือจางที่ 2 เท่า ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดเนื้อหมู เนื้อโค ตับหมู ไตหมู อาหารหมูและอาหารโค ได้ค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 0.8-1.2 ในขณะที่สารสกัดตับโคได้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูงเกินกว่าช่วงที่ยอมรับได้ ดังนั้นจึงนำสารสกัดดังกล่าวไปเจือจางที่ 5 เท่า และวัดค่าการดูดกลืนแสงพบว่าได้ค่าอยู่ในช่วง 0.8-1.2 ซึ่งเป็นช่วงที่สามารถยอมรับได้ ดังนั้นจึงเจือจางตัวอย่างตับโคที่ 5 เท่า และตัวอย่างอื่นๆที่ 2 เท่า ไปใช้สำหรับการทดสอบต่อไป (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 ค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละตัวอย่างที่ไม่เจือจางและเจือจางที่ระดับ 2, 5 และ 10 เท่า

ตัวอย่าง	ไม่เจือจาง	เจือจาง 2 เท่า	เจือจาง 5 เท่า	เจือจาง 10 เท่า	PBST
เนื้อหมู	0.7722	**0.9302**	0.9287	0.9476	1.0914
เนื้อโค	1.3676	**0.8646**	0.8378	0.8864	0.9322
ตับหมู	1.2689	**1.0536**	0.9909	1.0334	0.9500
ตับโค	3.5274	2.1730	**1.1126**	1.0849	1.0623
ไตหมู	0.7503	**0.8414**	0.9016	0.9839	0.9945
อาหารหมู	0.6863	**0.8390**	0.8529	0.8942	0.9352
อาหารโค	0.6030	**0.8640**	0.8315	0.8376	0.8543

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ขั้นตอนการสกัดเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการทดสอบ ELISA จากการศึกษาพบว่า แรคโตพามีนที่สัตว์ได้รับจะผ่านกระบวนการเมทาบอลิซึมต่างๆภายในร่างกาย และมีการติดค้างอยู่ในส่วนของเนื้อเยื่อและชั้นไขมัน การใช้น้ำและบัฟเฟอร์อาจไม่สามารถสกัดแรคโตพามีนออกมาได้ดีพอ ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องใช้ตัวทำละลายทางเคมีในการสกัดแรคโตพามีนออกมาจากเนื่อเยื่อและไขมันของสัตว์ จากงานวิจัยก่อนหน้าพบว่า Jiang และคณะ 2010 ใช้อะซิโตไนไตรล์ร่วมกับเฮกเซนในการสกัดเนื้อหมูและเนื้อโค Pleadin และคณะ 2012 ใช้อะซิโตไนไตรล์ เอทิลอะซิเตท และเฮกเซน ในการสกัดเนื้อ ตับ ไต หัวใจและสมองหมู Buakeaw และคณะ 2016 ใช้เมทานอลในการสกัดเนื้อหมู สำหรับงานวิจัยนี้ใช้เมทานอลในการสกัดตัวอย่างเนื้อ เครื่องใน อาหารของหมูและโค จากการศึกษาขั้นตอนการสกัดในงานวิจัยพบว่าสารเคมีที่ใช้ในการสกัดอาจรบกวนระบบของ ELISA จึงต้องกำจัดออกก่อนการทดสอบ ซึ่งงานวิจัยของ Jiang และคณะ 2010; Pleadin และคณะ 2012 และ Buakeaw และคณะ 2016 ได้ใช้วิธีการระเหยด้วยเครื่อง Evaporator ซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีความยุ่งยากในการใช้งาน

เมื่อเปรียบเทียบกับการระเหยด้วยวิธีการต้มที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าวิธีการสกัดในงานวิจัยนี้ไม่ได้ใช้สารเคมีและอุปกรณ์ที่มีความยุ่งยากซับซ้อนเมื่อเทียบกับงานวิจัยอื่นๆ

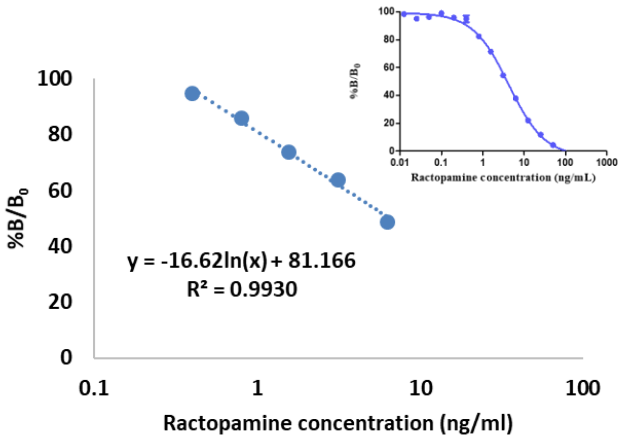
4.6 การทดสอบความใช้ได้ของวิธี ELISA

4.6.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน

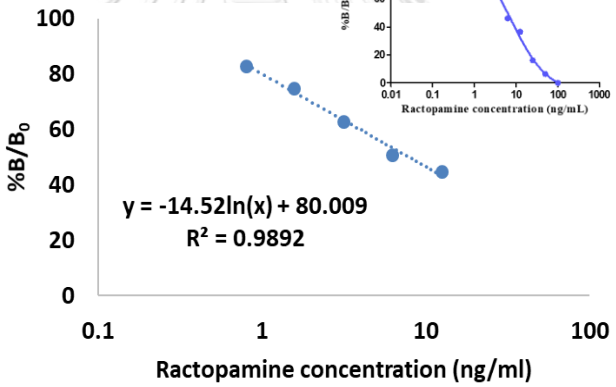
ผลการทดลองจากการสร้างกราฟมาตรฐานในสารสกัดของแต่ละตัวอย่างพบว่าช่วงการตรวจวัดของตัวอย่างเนื้อหมูและไตหมูอยู่ที่ 0.4-6.25 นาโนกรัมต่อกรัม ในขณะที่ตัวอย่างเนื้อโค, ตับหมู, ตับโค, อาหารหมูและอาหารโคมีช่วงการตรวจวัดอยู่ที่ 0.8-12.5 นาโนกรัมต่อกรัม ค่าความเชื่อมั่นของกราฟมาตรฐานอยู่ในช่วง 0.96 - 0.99 ค่า LOQ ของตัวอย่างเนื้อหมู เนื้อโค ตับหมู ตับโค ไตหมู อาหารหมูและอาหารโคอยู่ที่ 0.88, 0.85, 1.89, 1.64, 1.90, 0.56 และ 0.60 นาโนกรัมต่อกรัมตามลำดับ ค่า LOD ของตัวอย่างเนื้อหมู เนื้อโค ตับหมู ตับโค ไตหมู อาหารหมูและอาหารโคอยู่ที่ 0.52, 0.47, 0.72, 0.97, 0.76, 0.46 และ 0.32 นาโนกรัมต่อกรัมตามลำดับ ค่า LOQ และ LOD ที่ได้จากทุกตัวอย่างเป็นค่าที่ต่ำกว่า ค่า MRLs ที่กำหนดโดย Codex ซึ่งเป็นหน่วยงานด้านความปลอดภัยทางอาหารในระดับสากล ดังนั้นการตรวจวัดแรคโตพามีนตกค้างในตัวอย่างเนื้อสัตว์ เครื่องในสัตว์และอาหารสัตว์ด้วยวิธี direct competitive ELISA ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ได้จริง (รูปที่ 23 – 25, ตารางที่ 15)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ก.



ข

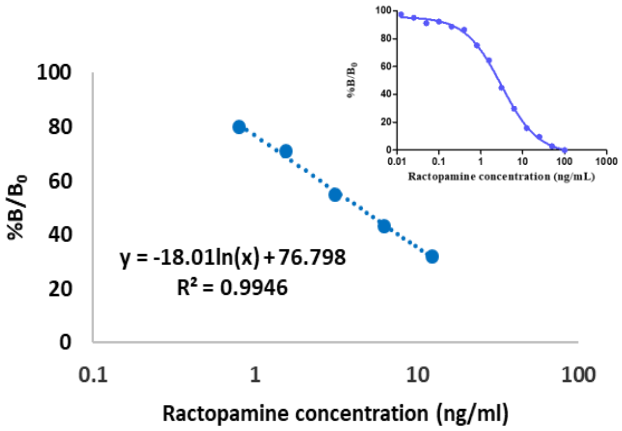


CHULALONGKORN UNIVERSITY

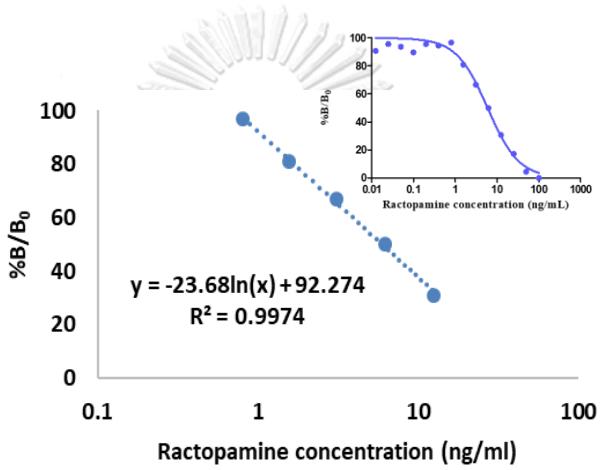
รูปที่ 23 กราฟมาตรฐานสำหรับตรวจวัดแรคโตพามีนกลุ่มเนื้อสัตว์

โดยที่ ก. คือ กราฟมาตรฐานของตัวอย่างเนื้อหมู และ ข. คือกราฟมาตรฐานของตัวอย่างเนื้อโค

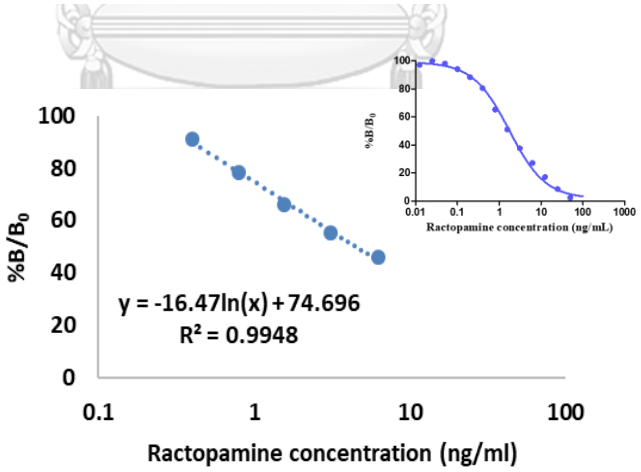
ก.



ข.

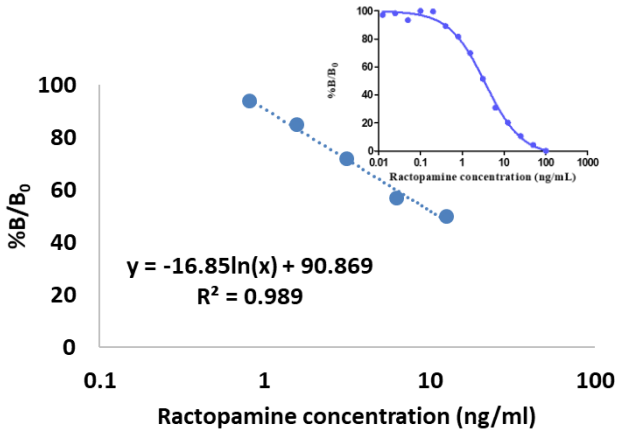


ค.

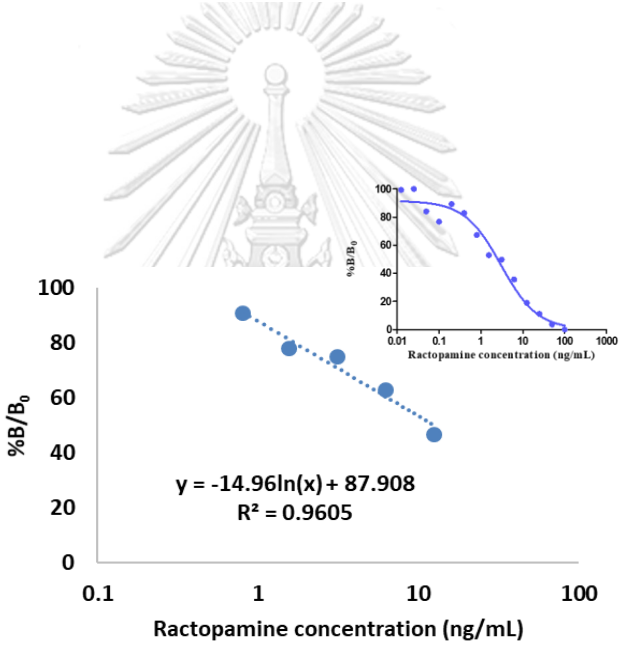


รูปที่ 24 กราฟมาตรฐานสำหรับตรวจวัดแรคโตพามีนกลุ่มเครื่องในสัตว์
โดยที่ ก. คือ กราฟมาตรฐานของตัวอย่างเนื้อหมู ข. คือกราฟมาตรฐานของตัวอย่างเนื้อโค
และ ค. คือกราฟมาตรฐานของตัวอย่างตับหมู

ก



ข



CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 25 กราฟมาตรฐานสำหรับตรวจวัดแรคโตพามีนกลุ่มอาหารสัตว์

โดยที่ ก. คือ กราฟมาตรฐานของตัวอย่างอาหารหมู และ ข. คือกราฟมาตรฐานของตัวอย่างอาหารโค

ตารางที่ 15 ความไวและช่วงของการตรวจวัดแรคโตพามีนในตัวอย่างเนื้อสัตว์ เครื่องในสัตว์และอาหารสัตว์

กลุ่มตัวอย่าง	ตัวอย่าง	LOQ (นาโนกรัมต่อกรัม)	LOD (นาโนกรัมต่อกรัม)	ช่วงการตรวจวัด (นาโนกรัมต่อกรัม)	ค่าความเชื่อมั่น (R^2)
เนื้อสัตว์	เนื้อหมู	1.04	0.49	0.4-6.25	0.9930
	เนื้อโค	1.39	0.60	0.8-12.5	0.9892
เครื่องในสัตว์	ตับหมู	0.59	0.25	0.8-12.5	0.9946
	ตับโค	1.81	0.90	0.8-12.5	0.9974
	ไตหมู	0.38	0.16	0.4-6.25	0.9948
อาหารสัตว์	อาหารหมู	0.80	0.39	0.8-12.5	0.9890
	อาหารโค	0.33	0.11	0.8-12.5	0.9605

4.6.2 การทดสอบความจำเพาะของวิธี ELISA

ทดสอบความจำเพาะในตัวอย่างสารสกัดเนื้อหมู ตับหมูและอาหารหมู โดยทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มเบต้า-อะโกนิสต์ ได้แก่ เคลนบูเทอรอลและซัลบูทามอล เตรียมสารละลายเคลนบูเทอรอลและซัลบูทามอลที่ความเข้มข้น 0, 10, 100, 1,000 และ 10,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในสารสกัดเนื้อหมู ตับหมูและอาหารหมู เจือจางสารสกัดที่ระดับการเจือจาง 2 เท่า วิเคราะห์ผลด้วย ELISA ผลการทดสอบพบว่าเมื่อความเข้มข้นของเคลนบูเทอรอลและซัลบูทามอลเพิ่มสูงขึ้น ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไม่ลดลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีไม่จับกับสารละลายแคลนบูเทอรอลและซัลบูทามอล เมื่อนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามพบว่าได้เท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธี ELISA มีความจำเพาะกับแรคโตพามีนและไม่เกิดปฏิกริยาข้าม

4.6.3 การทดสอบความถูกต้องและความแม่นยำ

ค่าความถูกต้อง หมายถึง ค่าที่แสดงว่าผลการทดสอบมีค่าเข้าใกล้ค่าจริงหรือค่าอ้างอิงมากน้อยเพียงใด ค่าความถูกต้องสามารถบอกได้จากเปอร์เซ็นต์ค่าคืนกลับ (%recovery) โดยในงานวิจัยนี้ได้อ้างอิงเกณฑ์การยอมรับได้ของเปอร์เซ็นต์ค่าคืนกลับตาม AOAC ปี 2016 ซึ่งเกณฑ์ดังกล่าวจะพิจารณาค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับตามปริมาณสารที่มีอยู่ในตัวอย่าง งานวิจัยนี้ได้

ทดสอบค่าความถูกต้องในตัวอย่างกลุ่มเนื้อสัตว์ (เนื้อหมู, เนื้อโค) กลุ่มเครื่องในสัตว์ (ตับหมู, ตับโค, ไตหมู) และกลุ่มอาหารสัตว์ (อาหารหมู, อาหารโค) โดยเติมแรคโตพามีนลงไปที่ช่วงความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 1 นาโนกรัมต่อกรัม ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ค่าคืนกลับที่ยอมรับได้อยู่ในช่วง 40-120 เปอร์เซ็นต์ และช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 1 -10 นาโนกรัมต่อกรัม มีเปอร์เซ็นต์ค่าคืนกลับที่ยอมรับได้อยู่ในช่วง 60-115 เปอร์เซ็นต์

จากผลการทดสอบตัวอย่างกลุ่มเนื้อสัตว์ที่เติมแรคโตพามีนและสกัดด้วยเมทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ พบว่าตัวอย่างเนื้อหมูมีเปอร์เซ็นต์ค่าคืนกลับอยู่ในช่วง 72.50 - 90.50 เปอร์เซ็นต์ และตัวอย่างเนื้อโคมีเปอร์เซ็นต์ค่าคืนกลับอยู่ในช่วง 70.79 - 103.80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเปอร์เซ็นต์ค่าคืนกลับที่ได้จากตัวอย่างกลุ่มเนื้อสัตว์อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ (ตารางที่ 17-18)

แต่เมื่อเติมแรคโตพามีนลงไปในตัวอย่างตับหมูซึ่งเป็นตัวแทนของกลุ่มเครื่องในสัตว์และสกัดด้วยเมทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเปอร์เซ็นต์ค่าคืนกลับอยู่ในช่วง 51.08 - 79.87 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งค่าที่ได้ไม่อยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ของ AOAC ปี 2016 (ตารางที่ 16) จึงได้เปลี่ยนเปอร์เซ็นต์เมทานอลที่ใช้ในการสกัดตับหมูเป็น 60 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อคำนวนค่าเปอร์เซ็นการคืนกลับพบว่าตัวอย่างตับหมูมีเปอร์เซ็นต์ค่าคืนกลับอยู่ในช่วง 70.29 - 109.80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งค่าดังกล่าวอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ของ AOAC ปี 2016 จึงได้ใช้เมทานอลที่ 60 เปอร์เซ็นต์ ในการสกัดตัวอย่างอื่นๆ ในกลุ่มเครื่องในสัตว์ และพบว่า ตัวอย่างตับโคมีเปอร์เซ็นต์ค่าคืนกลับอยู่ในช่วง 72.72 - 101.00 เปอร์เซ็นต์, ตัวอย่างไตหมูมีเปอร์เซ็นต์ค่าคืนกลับอยู่ในช่วง 74.87 - 104.50 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นการสกัดตัวอย่างกลุ่มเครื่องในสัตว์ด้วยเมทานอลที่ 60 เปอร์เซ็นต์ สามารถให้เปอร์เซ็นต์ค่าคืนกลับที่ยอมรับได้ตามเกณฑ์ (ตารางที่ 19-21)

ตัวอย่างกลุ่มอาหารสัตว์ที่สกัดด้วยเมทานอลที่ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ตัวอย่างอาหารหมูมีเปอร์เซ็นต์ค่าคืนกลับอยู่ในช่วง 64.06 - 85.16 เปอร์เซ็นต์ และตัวอย่างอาหารโคมีเปอร์เซ็นต์ค่าคืนกลับอยู่ในช่วง 69.50 - 82.78 เปอร์เซ็นต์ โดยเปอร์เซ็นต์การคืนกลับอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ (ตารางที่ 22-23)

ตารางที่ 16 ผลการวิเคราะห์ความถูกต้องและความแม่นยำในตัวอย่างตับหมูโดยใช้เมทานอลที่ 50 เปอร์เซ็นต์

ปริมาณแรคโตพามีน (นาโนกรัมต่อกรัม)	ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัมต่อกรัม)	Recovery (%)	CV (%)
0.8	0.55	68.32	20.32
1.5	1.20	79.87	13.27
3	1.62	53.86	8.04
6	3.14	52.37	10.30
12	6.13	51.08	9.23

ค่าความแม่นยำ หมายถึง การทดสอบนั้นให้ผลที่ใกล้เคียงกันมากน้อยเพียงใดเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีเดียวกัน ภายใต้สภาวะที่ใกล้เคียงกัน ค่าความแม่นยำบอกได้จากค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, CV) โดยในงานวิจัยนี้ได้อ้างอิงเกณฑ์การยอมรับได้ของค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน ตาม AOAC ปี 2016 ซึ่งเกณฑ์ดังกล่าวจะพิจารณาค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนตามปริมาณสารที่มีอยู่ในตัวอย่าง ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบความแม่นยำของวิธี ELISA ในงานวิจัยนี้คือความเข้มข้นน้อยกว่า 1 นาโนกรัมต่อกรัม ซึ่งร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนที่ยอมรับได้ของความเข้มข้นนี้อยู่ในช่วงน้อยกว่าหรือเท่ากับ 30 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นตั้งแต่ 1 - 10 นาโนกรัมต่อกรัม ซึ่งร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนที่ยอมรับได้ของความเข้มข้นนี้อยู่ในช่วงน้อยกว่าหรือเท่ากับ 21 เปอร์เซ็นต์

การหาความแม่นยำของวิธี ELISA ในงานวิจัยนี้จะทดสอบด้วยการทำ intra-variation assay และ inter-variation assay ซึ่งทำการทดสอบความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ เป็นเวลา 3 วัน จากผลการทดสอบพบว่าการทำ intra-variation assay ของตัวอย่างกลุ่มเนื้อสัตว์ พบว่า เนื้อหมูและเนื้อโคมีร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนอยู่ในช่วง 12.52 – 24.25 และ 14.69 – 21.19 ตัวอย่างกลุ่มเครื่องในสัตว์ พบว่า ตับหมู ตับโค และไตหมู มีร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนอยู่ในช่วง 7.68 – 11.61, 6.26 – 24.60 และ 12.74 – 20.58 ตัวอย่างกลุ่มอาหารสัตว์ พบว่า อาหารหมูและอาหารโคมีร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนอยู่ในช่วง 13.23 – 24.01 และ 16.01 – 28.40 ผลการทดสอบ inter- variation assay ของตัวอย่างกลุ่มเนื้อสัตว์ พบว่า เนื้อหมูและเนื้อโคมีร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนอยู่ในช่วง 16.15 – 22.32 และ 14.02 – 25.37 ตัวอย่างกลุ่มเครื่องในสัตว์ พบว่า ตับหมู ตับโค และไตหมู มีร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนอยู่ในช่วง 9.17 – 16.42, 12.61 – 28.87 และ 14.30 – 18.24 ตัวอย่างกลุ่มอาหารสัตว์ พบว่า อาหารหมูและอาหาร

โคมีร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนอยู่ในช่วง 14.82 – 26.92 และ 18.13 – 27.00 (ตารางที่ 17 – 23) ซึ่งร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนที่ได้ของทุกตัวอย่างอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ตามเกณฑ์มาตราฐานของ AOAC

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 17 ผลการวิเคราะห์ความถูกต้องและความแม่นยำในตัวอย่างเนื้อหมู

แรคโตพามีนที่เติม (นาโนกรัมต่อกรัม)	ระดับการเจือจาง	แรคโตพามีน (นาโนกรัมต่อกรัม)	Intra-variation assay (n = 6)			Inter-variation assay (N=3)		
			ปริมาณที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัมต่อกรัม)	%Recovery	%CV	ปริมาณที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัมต่อกรัม)	%Recovery	%CV
0.8	2	0.4	0.3 ± 0.07	72.50	24.25	0.3 ± 0.07	79.33	22.32
1.6	2	0.8	0.7 ± 0.09	90.50	12.52	0.7 ± 0.11	84.67	16.15
3.0	2	1.5	1.1 ± 0.21	73.67	19.26	1.2 ± 0.21	82.33	17.28
6.0	2	3	2.5 ± 0.49	81.67	19.81	2.3 ± 0.48	77.94	20.80
12.0	2	6	5.0 ± 0.86	83.83	17.20	4.9 ± 0.91	82.00	18.55

ตารางที่ 18 ผลการวิเคราะห์ความถูกต้องและความแม่นยำในตัวอย่างเนื้อโค

แรคโตพามีนที่เติม (นาโนกรัมต่อกรัม)	ระดับการเจือจาง	แรคโตพามีน (นาโนกรัมต่อกรัม)	Intra-variation assay (n = 6)			Inter-variation assay (N=3)		
			ปริมาณที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัมต่อกรัม)	%Recovery	%CV	ปริมาณที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัมต่อกรัม)	%Recovery	%CV
1.6	2	0.8	0.6 ± 0.13	75.37	21.19	0.6 ± 0.14	70.79	25.37
3.0	2	1.5	1.2 ± 0.19	83.05	14.97	1.3 ± 0.18	86.27	14.02
6	2	3	2.4 ± 0.35	79.55	14.79	2.5 ± 0.41	84.04	16.13
12	2	6	5.2 ± 1.08	87.23	20.73	5.1 ± 0.98	85.62	19.15
24	2	12	12.5 ± 1.83	103.80	14.69	11.5 ± 1.86	95.74	16.23

ตารางที่ 19 ผลการวิเคราะห์ความถูกต้องและความแม่นยำในตัวอย่างตับหมู

แรคโตพามีนที่เติม (นาโนกรัมต่อกรัม)	ระดับการเจือจาง	แรคโตพามีน (นาโนกรัมต่อกรัม)	Intra-variation assay (n = 6)			Inter-variation assay (N=3)		
			ปริมาณที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัมต่อกรัม)	%Recovery	%CV	ปริมาณที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัมต่อกรัม)	%Recovery	%CV
1.6	2	0.8	0.9 ± 0.07	109.80	7.87	0.8 ± 0.10	102.93	12.68
3.0	2	1.5	1.3 ± 0.14	87.26	10.82	1.4 ± 0.20	94.01	14.29
6	2	3	2.2 ± 0.23	71.84	10.81	2.6 ± 0.42	85.01	16.42
12	2	6	4.6 ± 0.53	76.30	11.61	4.3 ± 0.54	70.96	12.60
24	2	12	9.01 ± 0.69	75.03	7.68	8.4 ± 0.77	70.29	9.17

ตารางที่ 20 ผลการวิเคราะห์ความถูกต้องและความแม่นยำในตัวอย่างตับโค

แรคโตพามีนที่เติม (นาโนกรัมต่อกรัม)	ระดับการเจือจาง	แรคโตพามีน (นาโนกรัมต่อกรัม)	Intra-variation assay (n = 6)			Inter-variation assay (N=3)		
			ปริมาณที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัมต่อกรัม)	%Recovery	%CV	ปริมาณที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัมต่อกรัม)	%Recovery	%CV
4.0	5	0.8	0.6 ± 0.15	75.83	24.60	0.6 ± 0.18	77.11	28.87
7.5	5	1.5	1.5 ± 0.10	101.00	6.26	1.4 ± 0.21	91.28	15.26
15	5	3	2.4 ± 0.40	78.33	17.11	2.2 ± 0.31	74.06	13.78
30	5	6	5.7 ± 0.84	95.67	14.61	4.9 ± 0.89	81.72	18.09
60	5	12	8.8 ± 1.34	73.67	15.15	8.7 ± 1.10	72.72	12.61

ตารางที่ 21 ผลการวิเคราะห์ความถูกต้องและความแม่นยำในตัวอย่างไตหมู

แรคโตพามีนที่เติม (นาโนกรัมต่อกรัม)	ระดับการเจือจาง	แรคโตพามีน (นาโนกรัมต่อกรัม)	Intra-variation assay (n = 6)			Inter-variation assay (N=3)		
			ปริมาณที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัมต่อกรัม)	%Recovery	%CV	ปริมาณที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัมต่อกรัม)	%Recovery	%CV
0.8	2	0.4	0.4 ± 0.08	104.50	18.17	0.4 ± 0.06	103.46	14.56
1.6	2	0.8	0.6 ± 0.10	79.01	16.28	0.6 ± 0.12	79.29	18.24
3.0	2	1.5	1.6 ± 0.20	104.44	12.74	1.5 ± 0.21	98.23	14.30
6.0	2	3	2.6 ± 0.53	74.87	20.58	2.9 ± 0.44	95.97	15.15
12.0	2	6	6.0 ± 1.17	98.96	19.80	5.9 ± 0.88	97.74	15.00

ตารางที่ 22 ผลการวิเคราะห์ความถูกต้องและความแม่นยำในตัวอย่างอาหารหมู

แรคโตพามีนที่เติม (นาโนกรัมต่อกรัม)	ระดับการเจือจาง	แรคโตพามีน (นาโนกรัมต่อกรัม)	Intra-variation assay (n = 6)			Inter-variation assay (N=3)		
			ปริมาณที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัมต่อกรัม)	%Recovery	%CV	ปริมาณที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัมต่อกรัม)	%Recovery	%CV
1.6	2	0.8	0.5 ± 0.12	64.06	24.01	0.5 ± 0.14	64.14	26.92
3.0	2	1.5	1.1 ± 0.15	70.98	14.27	1.2 ± 0.25	82.13	19.93
6	2	3	2.2 ± 0.29	74.15	13.23	2.2 ± 0.33	73.53	14.82
12	2	6	5.1 ± 0.90	85.10	17.63	4.9 ± 0.77	82.43	15.49
24	2	12	10.2 ± 1.96	85.16	19.20	10.0 ± 1.52	83.62	15.12

ตารางที่ 23 ผลการวิเคราะห์ความถูกต้องและความแม่นยำในตัวอย่างอาหารโค

แรคโตพามีนที่เติม (นาโนกรัมต่อกรัม)	ระดับการเจือจาง	แรคโตพามีน (นาโนกรัมต่อกรัม)	Intra-variation assay (n = 6)			Inter-variation assay (N=3)		
			ปริมาณที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัมต่อกรัม)	%Recovery	%CV	ปริมาณที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัมต่อกรัม)	%Recovery	%CV
1.6	2	0.8	0.6 ± 0.17	70.83	28.40	0.7 ± 0.18	81.83	27.00
3.0	2	1.5	1.2 ± 0.23	81.83	18.92	1.2 ± 0.23	80.83	19.33
6	2	3	2.3 ± 0.45	75.17	19.78	2.5 ± 0.51	82.78	20.59
12	2	6	4.3 ± 0.69	71.50	16.01	4.5 ± 0.81	74.61	18.13
24	2	12	8.4 ± 1.73	69.50	20.75	9.6 ± 1.96	80.00	20.41

4.6.4 การทดสอบความสามารถในการตรวจวัด

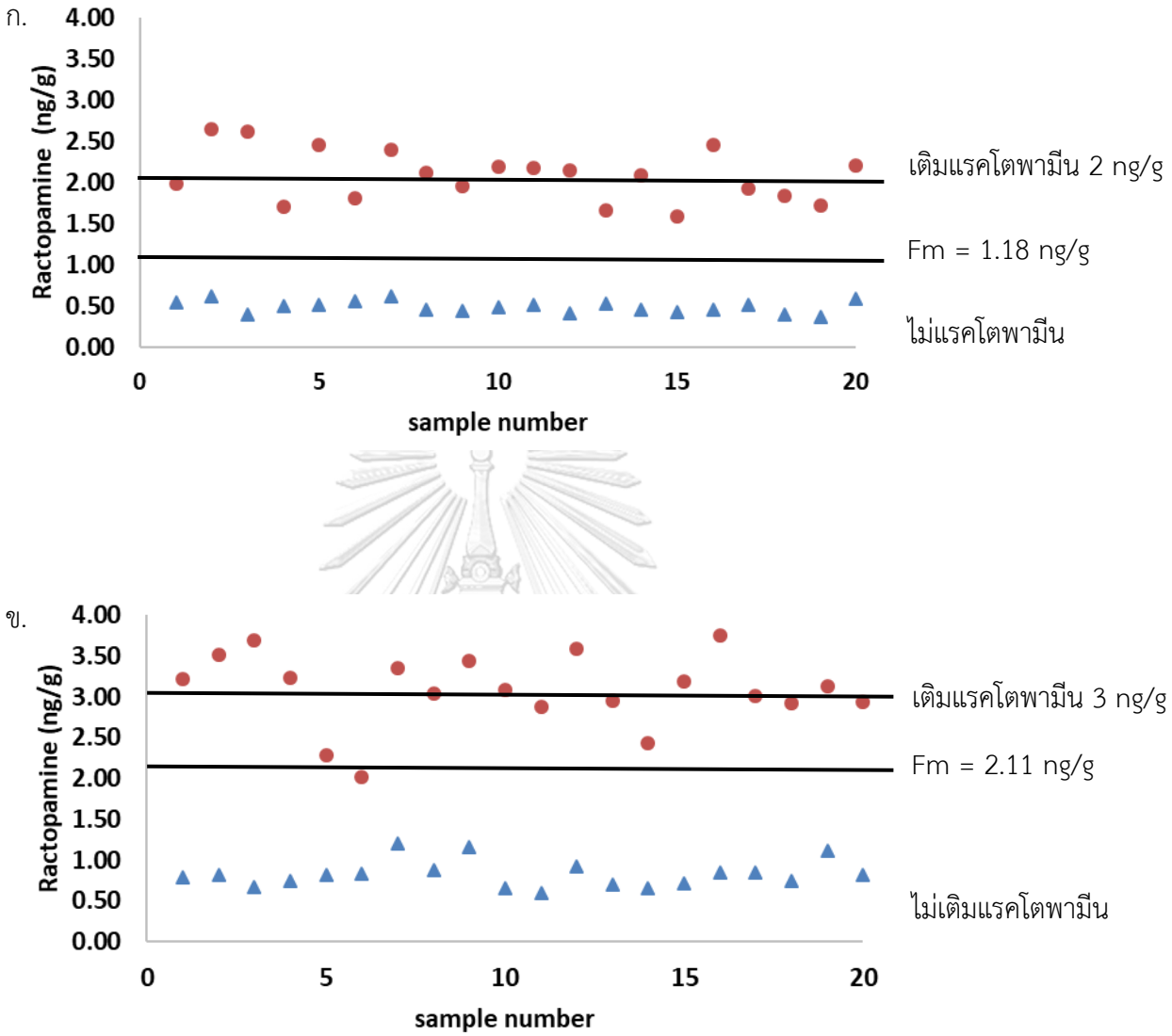
จากการหาค่าความสามารถในการตรวจวัดโดยนำตัวอย่างกลุ่มเนื้อสัตว์ (เนื้อหมู, เนื้อโค) กลุ่มเครื่องในสัตว์ (ตับหมู, ตับโค, ไตหมู) และกลุ่มอาหารสัตว์ (อาหารหมู, อาหารโค) มาทดสอบโดยแบ่งแต่ละตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ไม่มีการเติมแรคโตพามีน เรียกตัวอย่างกลุ่มนี้ว่าตัวอย่างไม่เติมสาร และกลุ่มที่มีการเติมแรคโตพามีนลงไปที่ความเข้มข้น 2 นาโนกรัมต่อกรัมในตัวอย่างเนื้อหมูและไตหมู และเติมแรคโตพามีนลงไปที่ 3 นาโนกรัมต่อกรัมในตัวอย่างเนื้อโค, ตับหมู, ตับโค, อาหารหมูและอาหารโค เรียกตัวอย่างกลุ่มนี้ว่าตัวอย่างเติมสาร ความเข้มข้นของแรคโตพามีนที่เติมลงไปได้มาจากค่ากึ่งกลางของกราฟมาตรฐานของตัวอย่างแต่ละชนิดและเป็นค่าความเข้มข้นที่ต่ำกว่า MRLs ของแต่ละตัวอย่าง นำสารสกัดทั้งหมดไปทดสอบด้วย ELISA เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณแรคโตพามีน จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่า Cut off factor (Fm) ซึ่งเป็นค่าที่ใช้ในการจำแนกว่าตัวอย่างใดผ่านเกณฑ์หรือไม่ผ่านเกณฑ์การตรวจสอบ โดยตัวอย่างที่ผ่านเกณฑ์การตรวจสอบคือตัวอย่างที่มีปริมาณแรคโตพามีนต่ำกว่าค่า Fm และตัวอย่างที่ไม่ผ่านเกณฑ์การตรวจสอบคือตัวอย่างที่มีปริมาณแรคโตพามีนสูงกว่าค่า Fm นอกจากนี้ค่า Fm ยังสามารถประเมินความผิดพลาดเชิงลบ (false negative) จากการตรวจวัดด้วยวิธี ELISA โดยพิจารณาจากตัวอย่างเติมสารทั้ง 20 ตัวอย่าง หากตัวอย่างเติมสารทั้ง 20 ตัวอย่าง มีปริมาณแรคโตพามีนที่ได้จากการตรวจวัดสูงกว่าค่า Fm นั้นหมายถึงวิธี ELISA สามารถแยกตัวอย่างเติมสารและไม่เติมสารออกจากกันได้อย่างถูกต้อง ความผิดพลาดเชิงลบเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ แต่หากมีค่าความผิดพลาดเชิงลบเกิดขึ้นจะอนุญาตให้มีได้เพียงแค่ 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเท่ากับ 1 ตัวอย่างจาก 20 ตัวอย่าง เกณฑ์ความผิดพลาดของการตรวจวัดนี้อ้างอิงจาก European Commission ซึ่งได้จัดทำเอกสารจากการประชุมข้อตกลง community reference laboratory residure ปี 2010 (คู่มือการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ, 2555 แปลจาก community reference laboratory residues, 2010) หากความผิดพลาดของตรวจวัดอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดค่า CCβ จะเท่ากับปริมาณของสารที่เติมลงไปในตัวอย่าง

ผลการทดสอบค่าความสามารถในการตรวจวัดพบว่าตัวอย่างเติมสารของเนื้อหมูและไตหมูทั้ง 20 ตัวอย่างไม่มีตัวอย่างใดที่มีค่าต่ำกว่าค่า Fm แสดงว่าวิธี ELISA นี้สามารถตรวจวัดตัวอย่างเติมสารได้โดยไม่เกิดผลผิดพลาดเชิงลบ ดังนั้นค่าความผิดพลาดในการตรวจวัดแรคโตพามีนด้วยวิธี ELISA มีค่าเป็น 0 เปอร์เซ็นต์ เป็นค่าความผิดพลาดที่สามารถยอมรับได้ตามเกณฑ์ของกลุ่มสหภาพยุโรป ดังนั้นค่า CCβ จึงเท่ากับ 2 นาโนกรัมต่อกรัม ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าค่าความสามารถในการ

ตรวจวัดแรคโตพามีนในเนื้อหมูและไตหมูเพื่อแยกตัวอย่างที่ผ่านเกณฑ์และไม่ผ่านเกณฑ์การตรวจสอบออกจากกันโดยมีความผิดพลาดที่ 0 เปอร์เซ็นต์ อยู่ที่ 2 นาโนกรัมต่อกรัม (รูปที่ 26, 27)

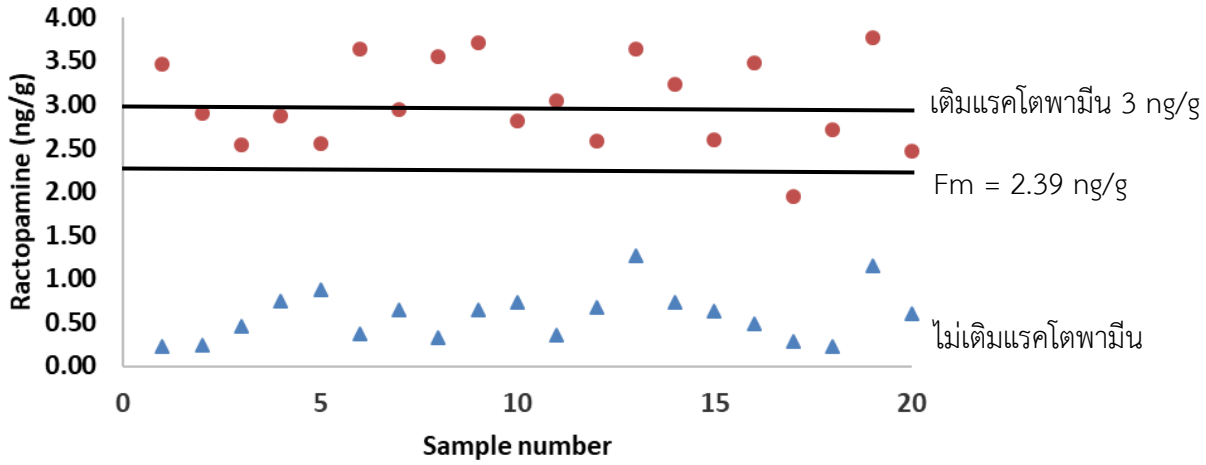
ผลการทดสอบค่าความสามารถในการตรวจวัดของตัวอย่างเนื้อโค, ตับหมู, ตับโค, อาหารหมูและอาหารโค พบว่าตัวอย่างเติมสารของตัวอย่างแต่ละชนิดทั้ง 20 ตัวอย่าง มี 1 ตัวอย่างที่มีค่าต่ำกว่าค่า Fm แสดงว่าวิธี ELISA นี้ตรวจวัดโดยเกิดผลผิดพลาดเชิงลบ ซึ่งค่าความผิดพลาดในการตรวจวัดแรคโตพามีนด้วยวิธี ELISA มีค่าเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นค่าความผิดพลาดที่สามารถยอมรับได้ตามเกณฑ์ของกลุ่มสหภาพยุโรป ดังนั้นค่า CCβ จึงเท่ากับ 3 นาโนกรัมต่อกรัม ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าค่าความสามารถในการตรวจวัดแรคโตพามีนในเนื้อโค, ตับหมู, ตับโค, อาหารหมูและอาหารโค เพื่อแยกตัวอย่างที่ผ่านเกณฑ์และไม่ผ่านเกณฑ์การตรวจสอบออกจากกันโดยมีความผิดพลาดที่ 5 เปอร์เซ็นต์ อยู่ที่ 3 นาโนกรัมต่อกรัม (รูปที่ 26-28)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

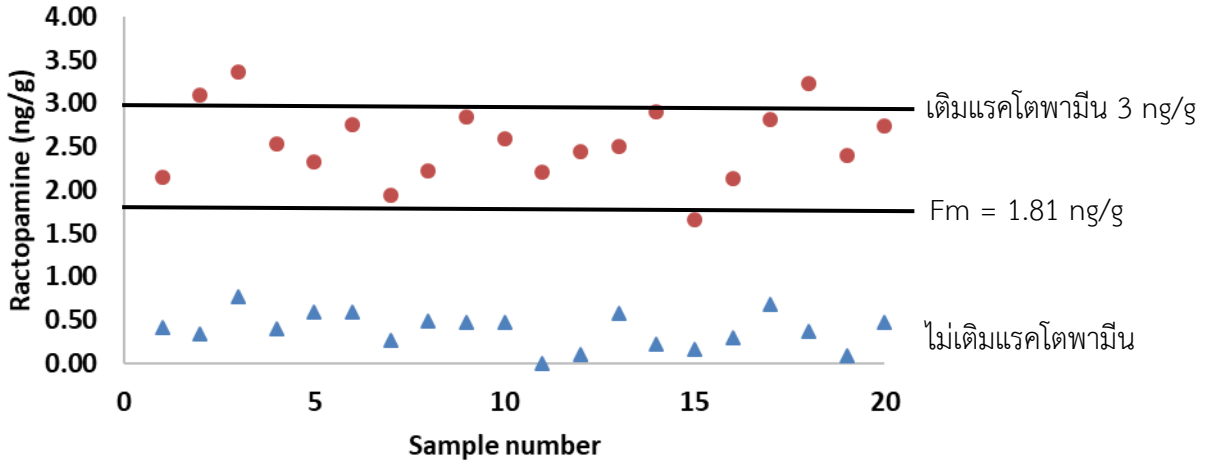


รูปที่ 26 ค่าความสามารถในการตรวจวัดแรคโตพามีนในกลุ่มเนื้อสัตว์ โดยที่โดยที่ ก. คือตัวอย่างกลุ่มเนื้อหมู และ ข. คือตัวอย่างกลุ่มเนื้อโค

ก.

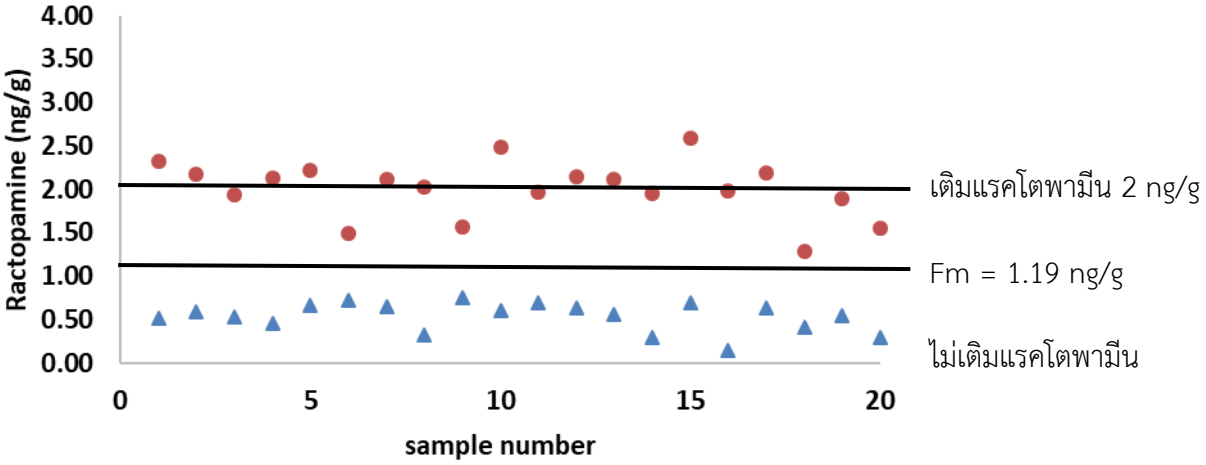


ข.



ค.

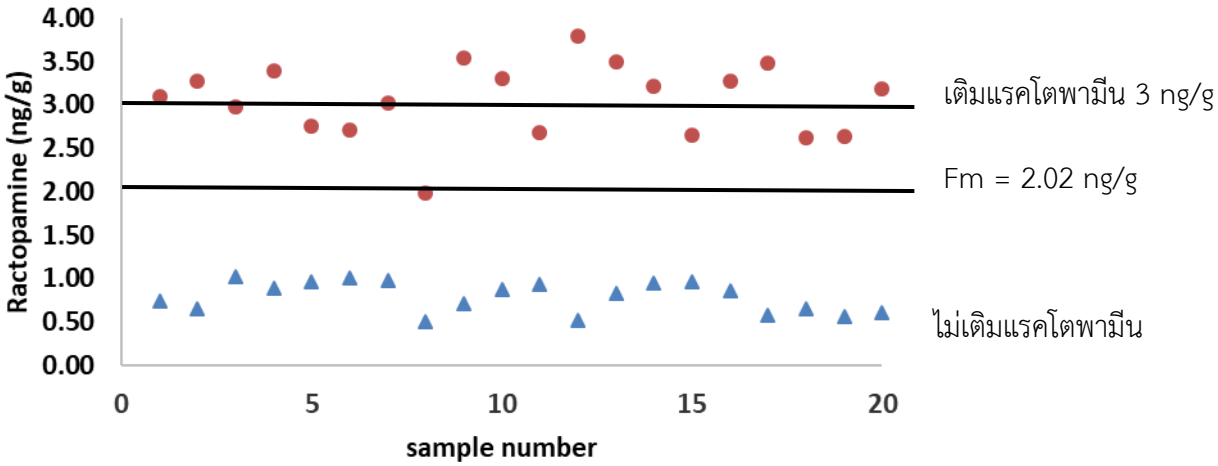
.



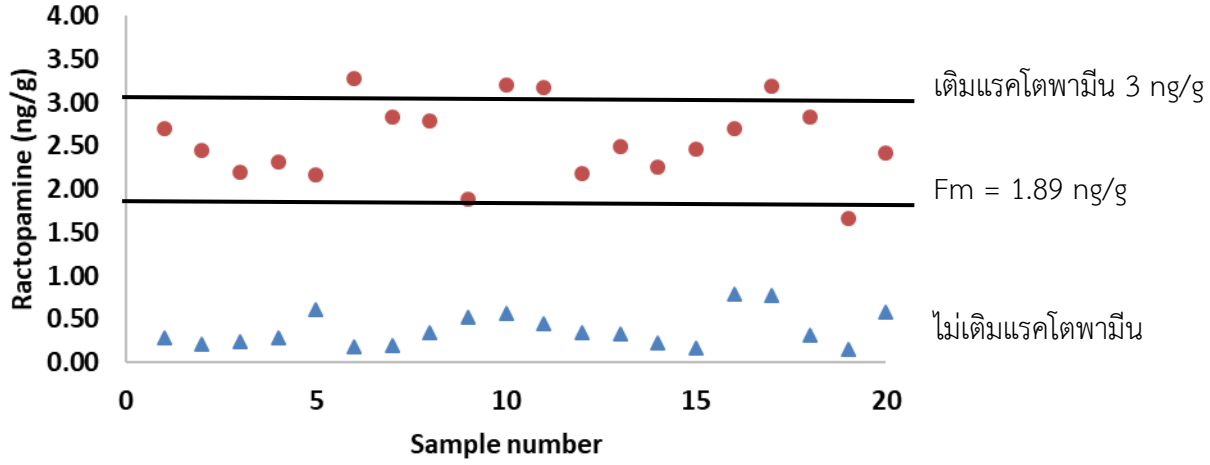
รูปที่ 27 ค่าความสามารถในการตรวจวัดแรคโตพามีนในกลุ่มเครื่องในสัตว์

โดยที่โดยที่ ก. คือตัวอย่างกลุ่มตับหมู ข. คือตัวอย่างกลุ่มตับโค และ ค.คือตัวอย่างกลุ่มไตหมู

ก.



ข.



รูปที่ 28 ค่าความสามารถในการตรวจวัดแรคโตพามีนในกลุ่มอาหารสัตว์

โดยที่โดยที่ ก. คือตัวอย่างกลุ่มอาหารหมู และ ข. คือตัวอย่างกลุ่มอาหารโค

4.8 การเปรียบเทียบผลการทดสอบความถูกต้องระหว่าง LC-MS/MS กับ ELISA

LC-MS/MS เป็นวิธียืนยันผลที่มีความถูกต้องและแม่นยำสูง จึงทำการเปรียบเทียบผลการตรวจวัดแรคโตพามีนระหว่างวิธี LC-MS/MS กับ วิธี ELISA

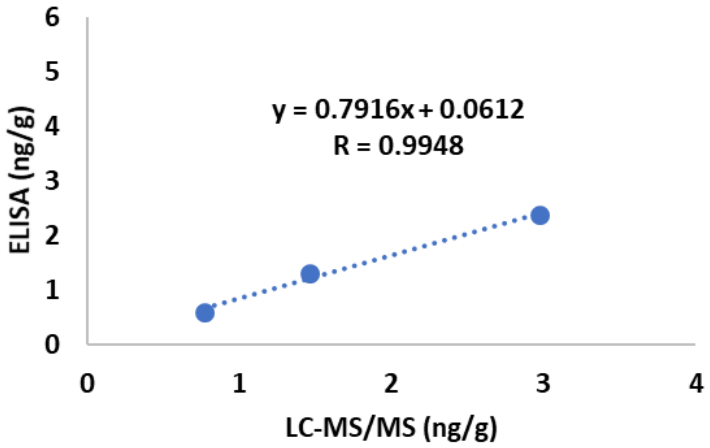
จากการเปรียบเทียบระหว่างวิธีทั้งสองในตัวอย่างเนื้อหมู ตับหมูและอาหารหมูพบว่าค่าสหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) ในตัวอย่างเนื้อหมู ตับหมูและอาหารหมูมีค่าเท่ากับ 0.9948, 0.9991 และ 0.9977 ตามลำดับ ซึ่งค่าสหสัมพันธ์ที่ได้จากทั้ง 3 ตัวอย่าง มีค่าเข้าใกล้ 1 หมายความว่าทั้ง 2 วิธีให้ผลที่สอดคล้องและไปในทิศทางเดียวกัน (Bewick และคณะ, 2003) แสดงให้เห็นว่าการตรวจวัดแรคโตพามีนตกค้างด้วยวิธี ELISA จึงมีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ

ตารางที่ 24 ความเข้มข้นแรคโตพามีนที่ตรวจวัดโดย LC-MS/MS และ ELISA

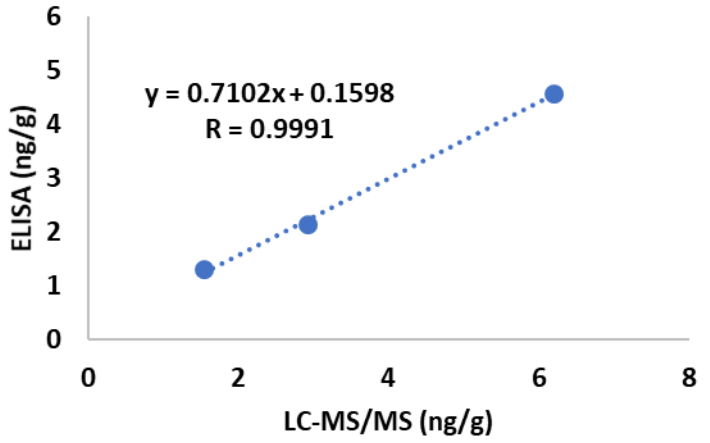
ตัวอย่าง	ความเข้มข้นแรคโตพามีนที่เติมลงไป (นาโนกรัมต่อกรัม)	ความเข้มข้นแรคโตพามีนวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS (นาโนกรัมต่อกรัม)	ความเข้มข้นแรคโตพามีนวิเคราะห์ด้วย ELISA (นาโนกรัมต่อกรัม)
เนื้อหมู	0.8	0.77	0.60
	1.5	1.46	1.32
	3	2.97	2.38
ตับหมู	1.5	1.54	1.31
	3	2.93	2.16
	6	6.19	4.58
อาหารหมู	1.5	1.51	1.22
	3	2.94	2.16
	6	6.00	4.89

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ก.

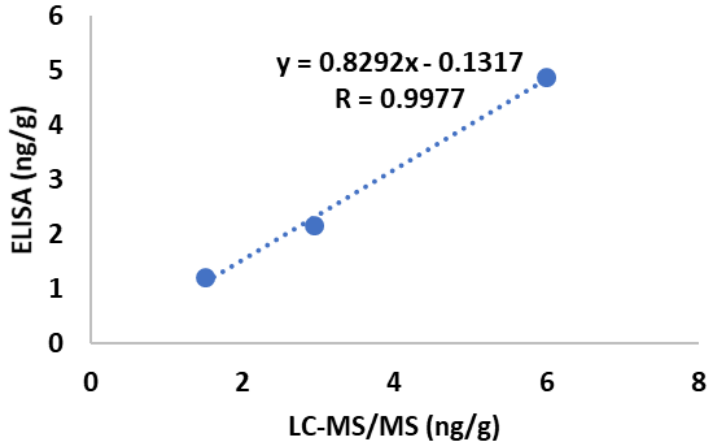


ข.



ค

.



รูปที่ 29 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง LC-MS/MS และ ELISA

โดยที่ ก. คือเนื้อหมู ข.คือตับหมู และ ค. คืออาหารหมู

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยชิ้นนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์สำหรับการตรวจแรคโตพามีนตกค้างในเนื้อสัตว์ เครื่องในสัตว์และอาหารสัตว์

งานวิจัยเริ่มจากการทดสอบความไวระหว่าง ELISA 2 รูปแบบรูปแบบแรกคือ indirect competitive ELISA และรูปแบบที่สองคือ direct competitive ELISA จากการทดสอบ พบว่า ELISA รูปแบบ direct competitive ELISA มีความไวสูงกว่ารูปแบบ indirect competitive ELISA ค่า IC_{50} LOQ และ LOD เท่ากับ 0.57, 0.06 และ 0.02 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกวิธี ELISA รูปแบบ direct competitive ELISA ไปทดสอบความใช้ได้ของการตรวจวัดปริมาณแรคโตพามีนตกค้างในกลุ่มเนื้อสัตว์ (เนื้อหมู, เนื้อโค) กลุ่มเครื่องในสัตว์ (ตับหมู, ตับโค, ไตหมู) และกลุ่มอาหารสัตว์ (อาหารหมู, อาหารโค)

แมทริกเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA เนื่องจากตัวอย่างที่นำมาทดสอบประกอบไปด้วย เนื้อ เครื่องใน อาหารของหมูและโค ซึ่งมีองค์ประกอบ เช่น โปรตีน ไขมัน รวมทั้งตัวทำละลายที่ใช้สกัดสารออกจากเนื้อเยื่อ ที่อาจส่งผลต่อการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ดังนั้นขั้นตอนการสกัดจึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการทดสอบ ELISA จากผลการทดลองจะเห็นว่าการสกัดเนื้อสัตว์ด้วยเมทานอลที่ 50 เปอร์เซ็นต์, สกัดเครื่องในสัตว์ด้วยเมทานอลที่ 60 เปอร์เซ็นต์ และสกัดอาหารสัตว์ด้วยเมทานอลที่ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเปอร์เซ็นต์เมทานอลที่น้อยที่สุดที่สามารถสกัดแรคโตพามีนออกจากกลุ่มตัวอย่างได้ เมื่อได้สารสกัดจากแต่ละตัวอย่างจึงได้ทำการเจือจางเพื่อหาระดับการเจือจางที่น้อยที่สุดที่สามารถให้ค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 0.8-1.2 และพบว่าสารสกัดจากตับโคต้องเจือจางที่ 5 เท่า ในขณะที่สารสกัดจากตัวอย่างอื่นๆต้องเจือจางที่ 2 เท่า นำสารสกัดจากแต่ละตัวอย่างไปสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อหาค่าความไวของวิธีทดสอบและใช้สำหรับคำนวณปริมาณแรคโตพามีนในตัวอย่างแต่ละชนิด ผลการทดสอบพบว่า LOQ ของตัวอย่างเนื้อหมู เนื้อโค ตับหมู ตับโค ไตหมู อาหารหมูและอาหารโคอยู่ที่ 0.88, 0.85, 1.89, 1.64, 1.90, 0.56 และ 0.60 นาโนกรัมต่อกรัมตามลำดับ และค่า LOD ของตัวอย่างเนื้อหมู เนื้อโค ตับหมู ตับโค ไตหมู อาหารหมูและอาหารโคอยู่ที่ 0.52, 0.47, 0.72, 0.97, 0.76, 0.46 และ 0.32 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ช่วงของการตรวจวัดแรคโตพามีนในเนื้อหมูและไตหมูอยู่ที่ 0.4-6.25 นาโนกรัมต่อกรัม ในขณะที่ตัวอย่างอื่น ๆ มีช่วงของการตรวจวัดอยู่ที่ 0.8-12.5 นาโนกรัมต่อกรัม ค่า LOQ และ LOD

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ที่ได้จากทุกตัวอย่างยังคงต่ำกว่า ค่า MRLs ของแรคโตพามีนที่ Codex กำหนดไว้ที่ 10-90 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ดังนั้นการตรวจวัดแรคโตพามีนตกค้างในตัวอย่างเนื้อสัตว์ เครื่องในสัตว์และอาหารสัตว์ด้วยวิธี direct competitive ELISA ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ได้จริง นอกจากนี้ได้ทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ ได้แก่ ซัลบูทามอลและเคลนบูทารอลในสารสกัดเนื้อหมู ตับหมูและอาหารหมูพบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารทั้งสองตัว

การหาค่าความถูกต้องและแม่นยำของวิธีทดสอบในตัวอย่างเนื้อหมู เนื้อโค ตับหมู ตับโค ไตหมู อาหารหมูและอาหารโค อ้างอิงตามเกณฑ์ของ AOAC 2016 ซึ่งเป็นเกณฑ์ที่กำหนดค่าการยอมรับได้ตามความเข้มข้นของสารที่มีอยู่ในตัวอย่าง จากเกณฑ์พบว่าที่ความเข้มข้นต่ำกว่าหรือเท่ากับ 1 นาโนกรัมต่อกรัม เปอร์เซ็นต์ค่าการคืนกลับที่ยอมรับได้อยู่ในช่วง 40-120% และ ร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนที่ยอมรับได้อยู่ในช่วงน้อยกว่าหรือเท่ากับ 30 ที่ความเข้มข้น 1 - 10 นาโนกรัมต่อกรัม เปอร์เซ็นต์ค่าการคืนกลับที่ยอมรับได้อยู่ในช่วง 60-115% และร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนที่ยอมรับได้อยู่ในช่วงน้อยกว่าหรือเท่ากับ 21 โดยการทดลองนี้ได้เติมแรคโตพามีนลงไปในตัวอย่างต่างๆที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.4-12 นาโนกรัมต่อกรัม ซึ่งค่าความถูกต้องและความแม่นยำของทุกตัวอย่างอยู่ในค่าที่ยอมรับได้ตามเกณฑ์

จากการทดสอบค่าความสามารถในการตรวจวัด พบว่าค่าความผิดพลาดในการตรวจวัดของทุกตัวอย่างมีค่าความผิดพลาดไม่เกิน 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นค่าที่สามารถยอมรับได้ตามเกณฑ์ของกลุ่มสหภาพยุโรป นอกจากนี้ได้ทำการเปรียบเทียบค่าความถูกต้องของการตรวจวัดแรคโตพามีนด้วยวิธี ELISA เทียบกับวิธี LC-MS/MS ในตัวอย่างเนื้อหมู ตับหมูและอาหารหมู พบว่าค่าสหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9948, 0.9991 และ 0.9977 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าค่าความถูกต้องของการวัดด้วยวิธี ELISA สอดคล้องและไปในแนวทางเดียวกันกับวิธี LC-MS/MS

ดังนั้นวิธี direct competitive ELISA ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ สามารถตรวจวัดแรคโตพามีน ที่ตกค้างในส่วนต่างๆของสัตว์และอาหารสัตว์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่อย่างไรก็ตามการทดสอบความใช้ได้ของวิธี direct competitive ELISA ยังเป็นเพียงการทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการ หากต้องการทดสอบความใช้ได้เพื่อนำไปใช้ในเชิงพาณิชย์จำเป็นจะต้องมีการเพิ่มจำนวนตัวอย่าง, จำนวนวันและจำนวนผู้วิเคราะห์ให้มากขึ้น เพื่อให้วิธีทดสอบมีความถูกต้องและน่าเชื่อถือสามารถนำไปใช้ทดสอบในเชิงพาณิชย์ได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บรรณานุกรม

Bewick, V., Cheek, L., & Ball, J. (2003). Statistics review 7: Correlation and regression. Journal of Critical Care 7(6), 451-459.

Bhutta, R. (2006). the Elementary Immunology book. https://www.labpedia.net/category/elementary-immunology/.

Buakeaw, A., Puthong, S., Kongkavitoon, P., Khongarsa, K., Komolpis, K., & Khongchareonporn, N. (2016). Production of monoclonal antibodies for ractopamine residue detection in pork. Maejo International Journal of Science and Technology, 10, 175-186.

CFIA. (2018). Ractopamine hydrochloride (RAC) – medicating ingredient brochure. guidance document repository. https://www.inspection.gc.ca/animal-health/livestock-feeds/medicating-ingredients/mib/ractopamine-hydrochloride-rac-/eng/1331129686310/1331129741124

Cliquet, P., Cox, E., Haasnoot, W., Schacht, E., & Goddeeris, M. (2003). Extraction procedure for sulfachloropyridazine in porcine tissues and detection in a sulfonamide-specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Journal of Analytica Chimica Acta, 494(1), 21-28.

Codex Alimentarius Commission. (2015). Maximum residue limit (MRLs) for residues of veterinary drugs in foods. http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/shproxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXM%2B2%252FMRL2e.pdf

Community Reference Laboratories Residues. (2010). Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer). https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs_vet-med-residues_guideline_validation_screening_en.pdf

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Deng, A., Zhao, Y., Jiang, D., Wu, K., Yang, H., Du, H., & Zhao, K. (2016). Development of a sensitive monoclonal antibody-based ELISA for the determination of a β-adrenergic agonist brombuterol in swine meat, liver and feed samples. Journal of Analytical Methods, 8 (38).

Dimitrieska-Stojkovic, E., Ilievska, G., Hajrulai, Z., Stojanovska-Dimzoska, B., Uzunov, R., Aleksandra, T., & Goran, S. (2013). In-house validation and quality control of commercial enzyme-linked immunosorbnet assays for screening of nitrofuran metabolites in food of animal origin. Journal of Macedonian Veterinary Review, 35, 13-21.

European Commission. (2002). Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing council directive 95/23/EC: concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. https://eurlex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002D0657&from=EN

FDA. (2019). New animal drugs; ractopamine. https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=558.500

Freire, E., Borges, K., Tanimoto, H., Nogueira, R., Bertolini, L., & Gaitani, C. (2009). Development and validation of a simple method for routine analysis of ractopamine hydrochloride in raw material and feed additives by HPLC. Journal of AOAC International, 92, 757-764.

George W, & Latimer, J. (2016). Guidelines for standard method performance requirements. http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf

Jiang, D., Cao, B., Wang, M., Yang, H., Zhao, K., Li, M., Sun, L., & Deng, A. (2016, 06/01). Development of a highly sensitive and specific monoclonal antibody based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of a new β-agonist phenylethanolamine A in food samples. Journal of the Science of Food

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

and Agriculture, 97.

Jiang, Jinqing., Zhang, H., Li, R., Ma, J., & Ziliang, W. (2010). Preparation of anti-ractopamine polyclonal antibody and the development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay [Paper presentation]. International Conference on Biology, Environment and Chemistry, Singapore.

Jiménez, V., Adrian, J., Guiteras, J., Marco, M.-P., & Companyó, R. (2010). Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detecting sulfonamides in feed resources. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(13), 7526-7531.

Li, Z., Wang, Y., Li, D., Chen, X., Li, Z., Gao, H., Cao, L., Li, S., & Hou, Y. (2017). Development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for screening ethopabate residue in chicken muscle and liver. Journal of RSC Advances, 7(57), 36072-36080.

Loneragan, H., Thomson, U., & Scott, M. (2014). Increased mortality in groups of cattle administered the β-adrenergic agonists ractopamine hydrochloride and zilpaterol hydrochloride. https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0091177&type=printable

Luttmann, W., Bratke, K., Kupper, M., & Myrtek, D. (2006). Immunology (1 ed). Library of Congress Cataloging.

Marchant-Forde, J., Lay, C., Pajor, A., Richert, T., & Schinckel, A. (2003). The effects of ractopamine on the behavior and physiology of finishing pigs. Journal of Animal Science, 81, 416-422.

Montes Nino, M., Granja, R., Reche, G., Giannotti, M., de Souza, G., Ferrari, G., Dos Santos, D., Wanschel, A., & Salerno, G. (2017). Laboratory validation of an LC-MS/MS method for the detection of ractopamine, clenbuterol and salbutamol in bovine and swine muscle at sub-μg kg(-1) regulatory limits. Journal of Food Additive and Contaminants Part A 34(5), 785-792.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Oplatowska-Stachowiak, M., & Elliott, C. (2011). Development and validation of rapid disequilibrium enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of Methyl Yellow and Rhodamine B dyes in foods. Journal of The Analyst, 136, 2403-2410.

Peng, D., Zhang, L., Situ, C., Pan, Y., Tao, Y., Wang, Y., & Yuan, Z. (2017). Development of monoclonal antibodies and indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay kits for the detection of clenbuterol and salbutamol in the tissues and products of food-producing animals. Journal of Food Analytical Methods, 1-11.

Peng, D., Zhao, L., Zhang, L., Pan, Y., Tao, Y., Wang, Y., Sheng, F., & Yuan, Z. (2019). A Novel Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Format for the Simultaneous Determination of Ractopamine and Phenylethanolamine A Residues in Swine Urine. Journal of Food Analytical Methods, 12(5), 1077-1085.

Pleadin, J., Perši, N., Vulić, A., Milić, D., & Vahčić, N. (2012). Determination of residual ractopamine concentrations by enzyme immunoassay in treated pig's tissues on days after withdrawal. Journal of Meat Science, 90(3), 755-758.

Poletto, R., Cheng, H., Meisel, R., Garner, J., Richert, B., & Marchant-Forde, J. (2010). Aggressiveness and brain amine concentration in dominant and subordinate finishing pigs fed the beta-adrenoreceptor agonist ractopamine. Journal of Animal Science, 88(9), 3107-3120.

Preechakasedkit, P., Ngamrojanavanich, N., Khongchareonporn, N., & Chailapakul, O. (2019). Novel ractopamine-protein carrier conjugation and its application to the lateral flow strip test for ractopamine detection in animal feed. Journal of Zhejiang University. Science. B, 20(2), 193-204.

Ritter, M. (2000). Polyclonal and monoclonal antibodies. Journal of Methods in Molecular Medicine, 40, 23-34.

Ritter, M., Johnson, A., Benjamin, M., Carr, S., Ellis, M., Faucitano, L., Grandin, T., Salak-Johnson, J., Thomson, D., Goldhawk, C., & Calvo-Lorenzo, M. (2017). Review:

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Effects of ractopamine hydrochloride (paylean) on welfare indicators for market weight pigs1. Journal of Translational Animal Science, 1(4), 533-558.

Selvi, A., Sreenivasa, M., & Manonmani, H. (2011). Enzyme-linked immunoassay for the detection of glyphosate in food samples using avian antibodies. Journal of Food and Agricultural Immunology, 22(3), 217-228.

Thorpe, S., & Kerr, M. (1994). Immunochemistry Labfax (1 ed). Academic Press.

Tufa, R., Pinacho, D., Pascual, N., Granados, M., Companyó, R., & Marco, M. P. (2015). Development and validation of an enzyme linked immunosorbent assay for fluoroquinolones in animal feeds. Journal of Food Control, 57, 195-201.

Vass, M., Smržová, Z., Cernoch, I., & Fránek, M. (2008). ELISA for semicarbazide and its application for screening in food contamination. Journal of Analytica Chimica Acta, 608, 86-94.

Xu, T., Wang, B., Sheng, W., Li, Q., Shao, X., & Li, J. (2007). Application of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of clenbuterol residues in swine urine and feeds. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 42(2), 173-177.

Zaitseva, N., Shur, P., Atiskova, N., Kiryanov, D., & Kamaltdinov, M. (2014). Health risk assessment of exposure to ractopamine through consumption of meat products. International Journal of Advanced Research, 2, 538-545.

Zhang, Y., Lu, S., Liu, W., Zhao, C., & Xi, R. (2007). Preparation of anti-tetracycline antibodies and development of an indirect heterologous competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residues of tetracycline in milk. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(2), 211-218.

Zhang, Y., Wang, F., Fang, L., Wang, S., & Fang, G. (2009). Rapid determination of ractopamine residues in edible animal products by enzyme-linked immunosorbent assay: development and investigation of matrix effects. Journal

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

of biomedicine & biotechnology, 2009, 1-9.

พรรัตน์ คงคาวิฑูร. (2551). การผลิตและลักษณะสมบัติของมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อแรคโตพามีน [วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต]. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุจิตตรา พงศ์วิวัฒน์. (2555). คู่มือการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบตามแนวมติคณะกรรมาธิการยุโรป 2002/657/EC สำหรับห้องปฏิบัติการทดสอบด้านสารตกค้างยาสัตว์. สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก

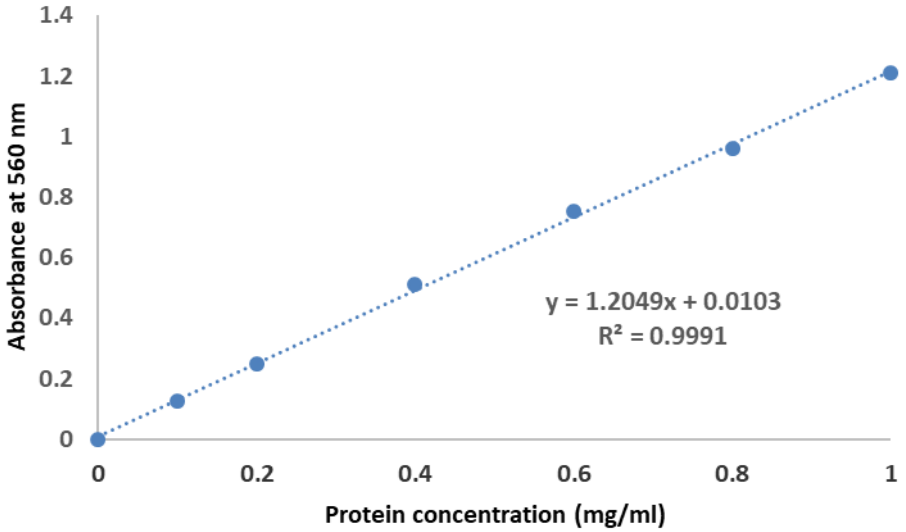
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก

กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA assay

ตารางที่ ก. 1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรของสารละลาย BSA มาตรฐานด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของ แรคโตพามีน-BSA

ความเข้มข้นของสารละลาย BSA มาตราฐาน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโมเมตร
0	0.0000
0.1	0.1269
0.2	0.2489
0.4	0.5110
0.6	0.7514
0.8	0.9598
1	1.2092



รูปที่ ก. 1 กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA ด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของแรคโตพามีนเชื่อมติดกับ BSA

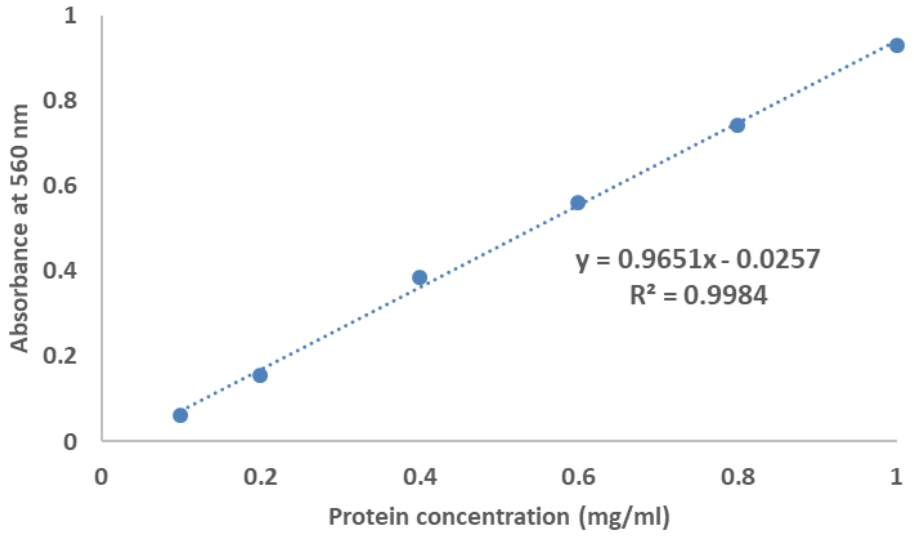
ตารางที่ ก. 2 ปริมาณโปรตีนของแรคโตพามีนเชื่อมติดกับ BSA ด้วยวิธี BCA

ระดับการเจือจาง RAC-BSA	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร	ความเข้มข้นของ RAC-BSA (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
1:5	0.7309	2.99
1:10	0.3955	3.20
1:20	0.1963	3.09
ค่าเฉลี่ย ± SD		3.09 ± 0.10

ตารางที่ ก. 3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรของสารละลาย BSA มาตรฐาน ด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของมอนอโคลนอลแอนติบอดี

ความเข้มข้นของสารละลาย BSA มาตราฐาน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโมเมตร
0	0.0000
0.1	0.0628
0.2	0.1559
0.4	0.3846
0.6	0.5595
0.8	0.7437
1.0	0.9314

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ ก. 2 กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA ด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของมอนอโคลนอลแอนติบอดี

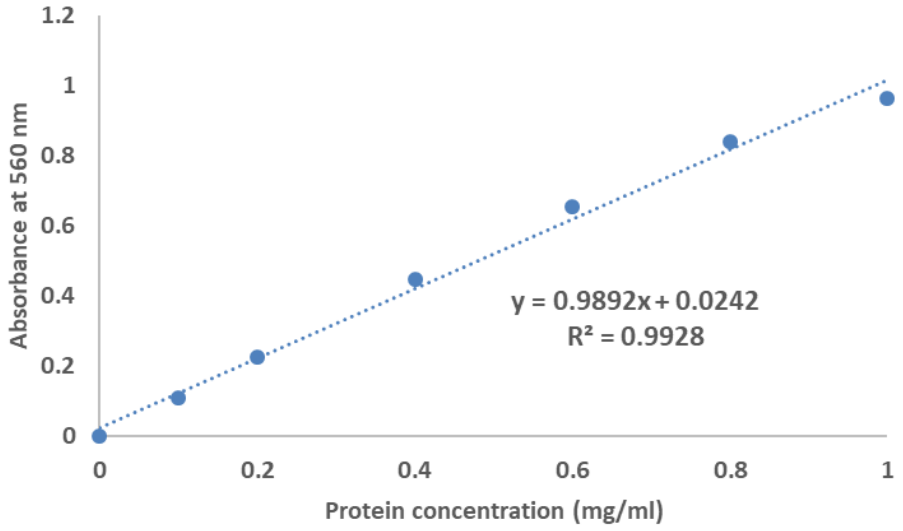
ตารางที่ ก. 4 ปริมาณโปรตีนของแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์

ระดับการเจือจางของแอนติบอดี	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร	ความเข้มข้นของ MAb (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
1:4	0.6056	2.62
1:8	0.3033	2.73
ค่าเฉลี่ย ± SD		2.67 ± 0.08

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ก. 5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรของสารละลาย BSA มาตรฐาน ด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมติดกับไบโอติน

ความเข้มข้นของสารละลาย BSA มาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโมเมตร
0	0.0000
0.1	0.1081
0.2	0.2259
0.4	0.4463
0.6	0.6529
0.8	0.8401
1.0	0.9630



รูปที่ ก. 3 กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA ด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมติดกับไบโอติน

ตารางที่ ก. 6 ปริมาณโปรตีนของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมติดกับไบโอตินด้วยวิธี BCA

ระดับการเจือจาง MAb-biotin	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร	ปริมาณโปรตีนของ MAb-biotin (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
1:5	0.3909	1.85
1:10	0.2044	1.82
ค่าเฉลี่ย ± SD		1.84 ± 0.02

ตารางที่ ก. 7 การหาอัตราส่วนการเชื่อมติดระหว่างแรคโตพามีนกับ BSA

สารประกอบ	มวลโมเลกุล	ความเข้มข้น		A_{274}	Molar Absorbility	Hapten density
		mg/ml	M			
RAC	337.84	0.2	5.919×10^{-4}	0.8298	1401.92	-
BSA	66000	2.5	3.787×10^{-5}	0.9143	24143.12	-
RAC-BSA (1)	66337.84	1	1.508×10^{-5}	0.4516	29946.94	4.14
RAC-BSA (2)	66337.84	1	1.508×10^{-5}	0.4726	31339.52	5.13
RAC-BSA (3)	66337.84	1	1.508×10^{-5}	0.4756	31538.46	5.27

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การคำนวณหา Hapten density ดังนี้

จากสูตร Hapten density = $\frac{\varepsilon_{conjugate} - \varepsilon_{protein}}{\varepsilon_{hapten}}$ โดย Beer-Lambert law: $\varepsilon = \frac{A}{c \cdot l}$

เมื่อหา Hapten density = $\frac{31,339.52 - 24,143.12}{1,401.92}$ = 5.13

ดังนั้นอัตราส่วนการเชื่อมติดระหว่าง RAC-BSA โดยวิธี UV-Vis spectroscopy พบว่าอัตราส่วนการเชื่อมต่อระหว่าง RAC กับ BSA โดยเฉลี่ยเท่ากับเท่ากับ 5 : 1 นั้นหมายถึง BSA 1 โมเลกุล มี RAC ประมาณ 5 โมเลกุล

การตรวจสอบตัวอย่างด้วย LC-MS/MS

บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด
Central Laboratory (Thailand) Co.,Ltd.
สาขากรุงเทพฯ : 80 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
Bangkok Branch : 80 Phaholyothin Rd., Ladyao, Jatujak, Bangkok 10900 Thailand
Tel : (662) 561 4387-8, (662) 940 6861-3 Ext. 164, 218 Fax : (662) 579 4895, (662) 940 6861-3 Ext. 209
http://www.centrallabthai.com

Central Lab

รายงานผลการทดสอบ

วันที่ออกรายงาน 18 กันยายน 2562
เลขที่รายงาน TRBK62/28148
หน้า 01/01

ชื่อและที่อยู่ลูกค้า สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
254 อาคารสถาบัน 3 ชั้น 5 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330

รายละเอียดตัวอย่าง B 1
(ข้อมูลจากลูกค้า)

รหัสตัวอย่าง BK62/15496-004
ลักษณะและสภาพตัวอย่าง ประเภทตัวอย่าง : เนื้อวัว
ภาชนะบรรจุ : ถุงพลาสติก ปิดสนิท, จำนวน : 1 ถุง, น้ำหนัก/ปริมาตร : 40 กรัม.
อุณหภูมิ : แช่เย็น, สภาพตัวอย่างปกติ

วันที่รับตัวอย่าง 23 สิงหาคม 2562
วันที่ทดสอบ 29 สิงหาคม 2562 - 18 กันยายน 2562

ผลการทดสอบ

รายการทดสอบ	ผลการทดสอบ	หน่วย	LOD	วิธีทดสอบอ้างอิง
Beta - agonist				
Salbutamol	Not Detected	µg/kg	0.05	In-house method TE-CH-044 based on Journal of Chromatography B, 813 (2004) p. 35-45 by LC-MS/MS
Clenbuterol	Not Detected	µg/kg	0.05	
Ractopamine	Not Detected	µg/kg	0.05	

-End of Report-

อนุมัติโดย

(นางสาวนิภาพร ยงประพันธ์กุล)
ผู้มีอำนาจลงนาม
บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด สาขากรุงเทพฯ
CERTIFIED

บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด
Central Laboratory (Thailand) Co.,Ltd.
สาขากรุงเทพฯ : 50 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
Bangkok Branch : 50 Phaholyothin Rd., Ladyao, Jatujak, Bangkok 10900 Thailand
Tel : (662) 561 4367-8, (662) 940 6861-3 Ext. 164, 218 Fax : (662) 579 4855, (662) 940 6861-3 Ext. 209
http://www.centrallabthai.com

Central Lab

รายงานผลการทดสอบ

วันที่ออกรายงาน 20 กรกฎาคม 2563
เลขที่รายงาน TRBK63/24862
หน้า 01/01

ชื่อและที่อยู่ลูกค้า จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย CU_GR_62_80_61_03
(ข้อมูลจากลูกค้า) 254 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330
รายละเอียดตัวอย่าง ตับหมู
(ข้อมูลจากลูกค้า)
รหัสตัวอย่าง BK63/11504-001
ลักษณะและสภาพตัวอย่าง ประเภทตัวอย่าง : ตับหมู
ภาชนะบรรจุ : ถุงพลาสติก (ถุงซิป), จำนวน : 1 ถุง, น้ำหนัก/ปริมาตร : 30 กรัม.
อุณหภูมิ : แช่เย็น, สภาพตัวอย่างปกติ
วันที่รับตัวอย่าง 14 กรกฎาคม 2563
วันที่ทดสอบ 16 กรกฎาคม 2563 - 20 กรกฎาคม 2563

ผลการทดสอบ

รายการทดสอบ	ผลการทดสอบ	หน่วย	LOD	วิธีทดสอบอ้างอิง
Beta - agonist				
Salbutamol	Not Detected	µg/kg	0.05	In-house method TE-CH-044 based on Journal of Chromatography B, 813 (2004) p. 35-45 by LC-MS/MS
Clenbuterol	Not Detected	µg/kg	0.05	
Ractopamine	Not Detected	µg/kg	0.05	

~End of Report~

(ปิยพร ประพันธ์กุล)
ผู้มีอำนาจลงนาม
บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด สาขากรุงเทพ

บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด
Central Laboratory (Thailand) Co.,Ltd.
สาขากรุงเทพฯ : 50 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
Bangkok Branch : 50 Phahonyothin Rd., Ladyao, Jatujak, Bangkok 10900 Thailand
Tel : (662) 561 4367-8, (662) 940 6881-3 Ext. 164, 218 Fax : (662) 579 4995, (662) 940 6881-3 Ext. 209
http://www.centrallabthai.com

Central Lab
One Stop Food Services

รายงานผลการทดสอบ

วันที่ออกรายงาน 20 กรกฎาคม 2563
เอกสารรายงาน TRBK63/24863
หน้า 01/01

ชื่อและที่อยู่ลูกค้า จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย CU_GR_62_80_61_03
(ข้อมูลจากลูกค้า) 254 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330
รายละเอียดตัวอย่าง ไตหมู
(ข้อมูลจากลูกค้า)
รหัสตัวอย่าง BK63/11504-002
ลักษณะและสภาพตัวอย่าง ประเภทตัวอย่าง : ไตหมู
ภาชนะบรรจุ : ถุงพลาสติก (ถุงซิป), จำนวน : 1 ถุง, น้ำหนัก/ปริมาตร : 40 กรัม.
อุณหภูมิ : แช่เย็น, สภาพตัวอย่างปกติ
วันที่รับตัวอย่าง 14 กรกฎาคม 2563
วันที่ทดสอบ 16 กรกฎาคม 2563 - 20 กรกฎาคม 2563

ผลการทดสอบ

รายการทดสอบ	ผลการทดสอบ	หน่วย	LOD	วิธีทดสอบอ้างอิง
Beta - agonist				
Salbutamol	Not Detected	µg/kg	0.05	In-house method TE-CH-044 based on Journal of Chromatography B, 813 (2004) p. 35-45 by LC-MS/MS
Clenbuterol	Not Detected	µg/kg	0.05	
Ractopamine	Not Detected	µg/kg	0.05	

~End of Report~

(นางสาวพิมพร ยงประพันธ์กุล)
ผู้มีอำนาจลงนาม
บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด สาขากรุงเทพ

บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด
Central Laboratory (Thailand) Co.,Ltd.
สาขากรุงเทพฯ : 60 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
Bangkok Branch : 60 Phaholyothin Rd., Ladyao, Jatujak, Bangkok 10900 Thailand
Tel : (662) 561 4387-8, (662) 940 6881-3 Ext. 164, 216 Fax : (662) 579 4815, (662) 940 6881-3 Ext. 209
http://www.centrallabthai.com

Central Lab
One Stop Lab Service

รายงานผลการทดสอบ

วันที่ออกรายงาน 03 กรกฎาคม 2563
เลขที่รายงาน TRBK63/23157
หน้า 01/01

ชื่อและที่อยู่ลูกค้า จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย CU_GR_62_80_61_03
254 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330

รายละเอียดตัวอย่าง ดับวิว
(ข้อมูลจากลูกค้า)

รหัสตัวอย่าง BK63/09381-010

ลักษณะและสภาพตัวอย่าง ประเภทตัวอย่าง : ดับวิว
ภาชนะบรรจุ : ถุงพลาสติก (ถุงซิป), จำนวน : 1 ถุง, น้ำหนัก/ปริมาตร : 5 กรัม.
อุณหภูมิ : แช่เย็น, สภาพตัวอย่างปกติ

วันที่รับตัวอย่าง 09 มิถุนายน 2563
วันที่ทดสอบ 18 มิถุนายน 2563 - 03 กรกฎาคม 2563

ผลการทดสอบ

รายการทดสอบ	ผลการทดสอบ	หน่วย	LOD	วิธีทดสอบอ้างอิง
Beta - agonist				
Salbutamol	19.40	µg/kg	-	In-house method TE-CH-044 based on Journal of Chromatography B, 813 (2004) p. 35-45 by LC-MS/MS
Clenbuterol	Not Detected	µg/kg	0.05	
Ractopamine	Not Detected	µg/kg	0.05	

~End of Report~

(นางสาวนิสาพร ยงประพันธ์กุล)
ผู้มีอำนาจลงนาม
บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด สาขากรุงเทพ
CERTIFIED

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา

RPMI 1640	10.4	กรัม
$NaHCO_3$	2	กรัม
L-glutamin	0.1	กรัม
Glucose	2	กรัม
Pyruvic acid	0.11	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายสารทุกอย่างในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง แบ่งใส่ขวดแก้วปริมาตรขวดละ 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2 การเตรียมสารละลายสำหรับการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

2.1) 20 mM Sodium Phosphate pH 7.0

$Na_2HPO_4.\ 12H_2O$	2.77	กรัม
$NaH_2PO_4.\ H_2O$	1.69	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ไทเทรต $Na_2HPO_4.\ 12H_2O$ ด้วย $NaH_2PO_4.\ H_2O$ จนได้ pH 7.0 แล้วนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

2.2) 0.1 M Glycine-HCl buffer pH 2.7

Glycine-HCl	7.5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ไทเทรต Glycine-HCl ด้วย 6M HCl จนได้ pH 7.0 แล้วนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

2.3) 1M Tris HCl buffer pH 9.0

Trisma base	121.14	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ไทเทรต Trisma base ด้วย6M HCl จนได้ pH 9.0 แล้วนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

3 การเตรียมสารละลายสาหรับการเชื่อม แรคโตพามีน กับโปรตีนพาหะ

3.1) 0.1 M MES, pH 4.7 ที่มี 0.15 M NaCl

MES monohydrate	21.33	กรัม
NaCl	8.77	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 4.7 ด้วย 1 M HCl

3.2) 37% (v/v) Formaldehyde

40 % Formaldehyde	9.25	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรน้ำกลั่นให้เป็น 0.75 มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4 การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในวิธี ELISA

4.1) 0.01 M Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7.4

PB stock	1	ลิตร
NaCl	175	กรัม
น้ำกลั่น	18	ลิตร

4.2) 0.05% Tween 20 ใน PBS (PBS-T)

Tween 20	500	ไมโครลิตร
PBS	1000	มิลลิลิตร

4.3) 5% นมพร่องมันเนย (เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง)

นมพร่องมันเนย	5	กรัม
PBS	100	มิลลิลิตร

4.4) 0.2 M Citrate buffer pH 4.0

Potassium citrate	33.2	กรัม
Citric acid	21.54	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับ pH ด้วย Citric acid ให้ได้ pH 4.0

4.5) Substrate solution

3,3' ,5,5'- Tetramethylbenzidine (TMB)	3.0	มิลลิลิกรัม
DMSO	300	มิลลิลิตร
0.2 M Citrate buffer	10	มิลลิลิตร
30% H_2O_2	3.4	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันในขวดสีชา (เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.6) 1 M H_2SO_4 (Stopping reagent)

H_2SO_4 (96%)	98	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	902	มิลลิลิตร

ค่อยๆ เทกรดลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน

ควรนำขวดไปแช่ในน้ำที่อุณหภูมิห้องขณะเทกรด เนื่องจากจะเกิดความร้อน

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	พลอยขวัญ พรหมพิทยายุทธ
วัน เดือน ปี เกิด	27 มิถุนายน 2534
สถานที่เกิด	นครราชสีมา
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีวเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ปัจจุบัน	229/24 ถนนสมเด็จพระปิ่นเกล้า แขวงบางยี่ขัน เขตบางพลัด กทม
ผลงานตีพิมพ์	Optimization and Validation of Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Ractopamine Residues Detection in Meat at International Conference on Food and Applied Bioscience (FAB2020) February 6-7, 2020 at Chiangmai Grandview Hotel & Convention Center

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University