

การพัฒนาอิมมูโนโครมาโทกราฟีสำหรับตรวจวัดเทตราไซคลินในน้ำผึ้ง



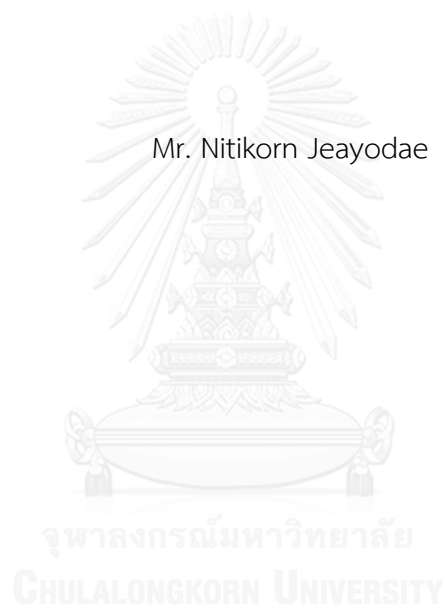
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)  
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2559  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF IMMUNOCHROMATOGRAPHY FOR TETRACYCLINE DETECTION IN  
HONEY

Mr. Nitikorn Jeayodae



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาอิมมูโนโครมาโทกราฟีสำหรับตรวจวัดเทตราไฮคลินในน้ำผึ้ง
โดย	นายนิติกร ใจะยอด
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทิกา คงเจริญพร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.นัตยา งามโรจนวณิชย์)

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

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส)

.....กรรมการ  
(อาจารย์ ดร.ยุพิน จินตภากร)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์)

นิติกร เจ๊ะยอเด : การพัฒนาอิมมูโนโครมาโทกราฟีสำหรับตรวจวัดเตตราไซคลินในน้ำผึ้ง (DEVELOPMENT OF IMMUNOCHROMATOGRAPHY FOR TETRACYCLINE DETECTION IN HONEY) อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.นันทิกา คงเจริญพร, อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส, 94 หน้า.

เตตราไซคลิน (TC) เป็นยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์กว้าง จึงทำให้ TC ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ และอุตสาหกรรมการเลี้ยงผึ้ง แต่อย่างไรก็ตามการใช้ยา TC เป็นเวลานานและใช้อย่างไม่ถูกต้อง เป็นสาเหตุให้เกิดปัญหาสารตกค้างในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค ทำให้ในหลายประเทศมีการกำหนดระดับยา TC สูงสุดที่อนุญาตให้ตรวจพบได้ในอาหาร (MRLs) ในปัจจุบัน วิธีอิมมูโนโครมาโทกราฟีแอสเสย์ (ICA) หรือ แลบทดสอบ เป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้ตรวจกันคัดกรองเบื้องต้น เนื่องจากใช้เวลาในการวิเคราะห์ผลน้อย ประเมินผลได้ด้วยสายตา และสามารถนำไปตรวจในภาคสนามหรือในสำนักงานนั้นได้ นอกจากนี้แลบทดสอบยังมีประโยชน์อย่างมากในการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพหรือกึ่งปริมาณ ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาอิมมูโนโครมาโทกราฟีสำหรับตรวจวัดเตตราไซคลินตกค้างในน้ำผึ้ง โดยมีวิธีการเตรียมแลบทดสอบ 2 แบบ คือวิธีการทำด้วยมือ (handmade method) และวิธีการใช้เครื่องจ่ายสารระดับไมโครลิตร โดยทำการเชื่อมโคโนโคลนอลแอนติบอดี กับอนุภาคทองขนาด 40 นาโนเมตร และ TC เชื่อมกับ bovine serum albumin จากวิธีการทำแลบทดสอบด้วยมือ พบว่าแลบทดสอบมีค่าขีดจำกัดของการวัด TC ด้วยสายตา เท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีช่วงการวัดของแลบทดสอบ TC อยู่ในช่วง 1–100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามการเตรียมแลบทดสอบด้วยมือมีข้อจำกัดหลายอย่างเช่น ความสม่ำเสมอหรือความสามารถในการทำซ้ำ ส่งผลถึงความเข้มสีและความกว้างของแถบเส้นทดสอบ รวมทั้งการเตรียมในปริมาณมากทำได้ยากเนื่องจากข้อจำกัดของเครื่องมือที่ใช้ เมื่อทำการเตรียมแลบทดสอบโดยใช้เครื่องจ่ายสารระดับไมโครลิตร และหาค่าความไวของแลบทดสอบ TC โดยการประเมินด้วยสายตา ร่วมกับโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ รุ่น 1.47m พบว่าแลบทดสอบมีค่าขีดจำกัดของการวัด TC เท่ากับ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และมีช่วงการวัดของแลบทดสอบ TC อยู่ในช่วง 10–40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำแลบทดสอบ TC ทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารปฏิชีวนะในและนอกกลุ่ม TCs พบว่าแลบทดสอบไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารปฏิชีวนะในและนอกกลุ่ม TCs จากนั้นนำแลบทดสอบ TC มาตรวจหา TC ตกค้างในตัวอย่างน้ำผึ้งพบว่า ให้ค่าความถูกต้องของการตรวจวัดในรูปของค่าอัตราการคืนกลับในช่วงยอมรับได้ที่ 93–116 % และมีค่าความแม่นยำในการตรวจวัดในรูปของค่าความแปรปรวนอยู่ในช่วงยอมรับได้ที่ 1.0–8.6 % ซึ่งแสดงให้เห็นว่า จากการทดลองทั้งหมดสรุปได้ว่าแลบทดสอบ TC ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ตรวจ TC ได้อย่างน่าเชื่อถือ

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ลายมือชื่อนิสิต .....

ปีการศึกษา 2559

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาหลัก .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาร่วม .....

# # 5772236723 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS: TETRACYCLINE / IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ASSAY / TEST STRIP

NITIKORN JEAYODAE: DEVELOPMENT OF IMMUNOCHROMATOGRAPHY FOR TETRACYCLINE DETECTION IN HONEY. ADVISOR: ASST. PROF. NANTHIKA KHONGCHAREONPORN, Ph.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. KITTINAN KOMOLPIS, Ph.D., 94 pp.

Tetracycline (TC) is a broad spectrum antibiotic. It is widely used for prevention and treatment of infectious diseases in animal husbandry and apiculture. However, long term use and misuse of TC can cause the problem of drug residue in animal products. To ensure food safety for the consumers, several countries have set maximum residue limits (MRLs) for TCs in food products. Immunochromatographic assay (ICA) or test strip is currently the most popular screening method due to its short analysis time, easy result observation and on-site detection. In addition, test strip is very useful for qualitative and semi-quantitative analysis. The objective of this study was to develop an immunochromatographic assay for TC residues detection in honey. The prepared of the test strip divided into two methods : handmade method and microliter dispenser method. Colloidal gold 40 nm was conjugated with monoclonal antibody and TC was conjugated with bovine serum albumin. Visual limit of detection (VLOD) and visual detection range of TC were found to be  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  and  $1\text{--}100 \mu\text{g mL}^{-1}$  for test strips prepared by handmade method. However, this handmade method has many limitations such as consistency or repeatability that affect color intensity and band width of the test line. In addition, strip preparation in a large quantity was difficult due to the limitation of the instruments. The test strip prepared by the microliter dispenser method was also studies for limit of detection and detection range. The color intensity of the test line was evaluated by both visual detection and scanning detection using ImageJ v.1.42m software. It was found that the VLOD was  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  and the detection was in a range of  $10\text{--}40 \text{ ng mL}^{-1}$ . The test strips were tested for cross-reactivity with other antibiotics in the TCs group and other antibiotics. It was found that the strips showed no cross-reactivity with any antibiotics. The test strips was also employed to detect TC residue in honey samples. The accuracy of the test in term of % recovery was found in the acceptable range of 93–116 % and the precision in term of the % coefficient of variation was found in the acceptable range of 1.0–8.6 %. From all results, it cloud be concluded that the developed test strips can be used in TC detection with confidence.

Field of Study: Biotechnology

Academic Year: 2016

Student's Signature .....

Advisor's Signature .....

Co-Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทิกา คงเจริญพร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำแนวทางทำการวิจัย ตลอดจนให้ความเห็นในการปรับปรุงงานวิจัยให้สำเร็จโดยสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นาดยา งามโรจนวิชัย ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร. ยุพิน จินตภากร รองศาสตราจารย์ ดร. จันทรพีญ จันทรเจ้า และรองศาสตราจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความเห็นและคำแนะนำในการจัดทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ผู้บริหาร คณาจารย์ นักวิจัย และเจ้าหน้าที่ของสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกท่าน ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์ในการทำวิจัย คำแนะนำพร้อมทั้งการช่วยเหลือ

ขอขอบพระคุณ ผู้บริหาร คณาจารย์ และเจ้าหน้าที่หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ จนทำให้งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์ได้

ขอขอบคุณ คุณอนุมาศ บัวเขียว คุณทรงจันทร์ ภูทอง และ คุณอุมาพร พิมพิทักษ์ รวมทั้งพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ในห้องปฏิบัติการ 803 สำหรับความช่วยเหลือ รวมถึงคำแนะนำและกำลังใจที่มีให้ตลอด ตั้งแต่เริ่มดำเนินการวิจัยจนเสร็จสิ้น รวมทั้งเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพทุกคน ที่ให้คำแนะนำ การช่วยเหลือ และกำลังใจที่ดีเสมอมา

ขอขอบคุณกลุ่มวิจัยการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์และการประยุกต์ใช้ และ ทุนสนับสนุนงานวิจัยบางส่วนจากทุนงบประมาณแผ่นดิน พ.ศ. 2559 (GRB\_APS\_57\_59\_61\_02)

และที่สำคัญที่สุดขอขอบพระคุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัว ที่ให้คำปรึกษา ให้กำลังใจ และการสนับสนุนการศึกษามาโดยตลอด

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ .....	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ .....	ด
บทที่ 1 บทนำ .....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	4
2.1 แนวคิดและทฤษฎี.....	4
2.1.1 อุตสาหกรรมการเลี้ยงผึ้งในประเทศไทย .....	4
2.1.2 ยาปฏิชีวนะเตตราไซคลิน (Tetracycline; TC).....	5
2.1.3 สมบัติทางเคมีของสารกลุ่ม TCs .....	6
2.1.4 กลไกการออกฤทธิ์ของสารกลุ่มTCs .....	8
2.1.5 อันตรายของสารตกค้าง TC.....	8
2.1.6 มาตรฐานสารตกค้าง TCs.....	8
2.2 วิธีการตรวจวิเคราะห์สารตกค้าง TC .....	9
2.2.1 วิธีทางเคมี .....	9

2.2.2 วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา.....	10
2.3 แอนติเจน (Antigen; Ag).....	10
2.4 แอนติบอดี (Antibody; Ab).....	11
2.5 หลักการของแถบทดสอบ รูปแบบการไหลในแนวระนาบ (Lateral Flow Immunochromatographic Assay; LFIA) .....	13
2.5.1 รูปแบบของแถบทดสอบ .....	15
2.5.1.1 รูปแบบแข่งขัน (Competitive assay format).....	16
2.5.1.2 รูปแบบแซนด์วิช (Sandwich assay format) .....	18
2.6 วัสดุเมมเบรนสำหรับแถบทดสอบ (Membrane materials).....	20
2.7 อนุภาคทอง (Colloidal gold).....	21
2.8 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	22
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย .....	24
3.1 เซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	24
3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	24
3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย .....	26
3.3 วัสดุสำหรับทำแถบทดสอบ .....	28
3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย.....	29
3.4.1 การเชื่อม TC กับโปรตีนพาหะ (BSA และ OVA).....	29
3.4.1.1 การเตรียม TC เชื่อมกับโปรตีนพาหะ (TC–BSA และ TC–OVA) โดยใช้ ปฏิกิริยา Mannich (ภาพที่ 3.1).....	29
3.4.1.2 การหาอัตราส่วนโมเลกุลการเชื่อมติด (molar ratio) ของ TC ที่เชื่อมต่อ กับ BSA และ OVA.....	30
3.4.1.3 การวัดปริมาณโปรตีน.....	30
3.4.2 การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb).....	31



3.4.2.1 การเพิ่มปริมาณ MAb .....	31
3.4.2.2 การทำ MAb ให้บริสุทธิ์ .....	31
3.4.2.3 การเก็บเซลล์ไฮบริโดมาในไนโตรเจนเหลว และการทดสอบการสร้าง MAb ที่จำเพาะต่อ TC หลังการทำให้บริสุทธิ์ .....	32
3.4.3 การเตรียม MAb เชื่อมติดกับอนุภาคทอง (Colloidal gold) ขนาด 20 และ 40 นา โนเมตร (MAb-Colloidal gold).....	33
3.4.3.1 การหาความเข้มข้นของ MAb ที่เหมาะสมในการเชื่อมติดกับ Colloidal gold .....	33
3.4.3.2 การเชื่อมติด MAb กับอนุภาคทอง (MAb-Colloidal gold) .....	33
3.4.4 การเตรียมส่วนประกอบของแถบทดสอบ (Immunochromatographic Assay; ICA).....	34
3.4.4.1 การเตรียม Sample pad และ Absorbent pad .....	35
3.4.4.2 การเตรียม Conjugate pad .....	35
3.4.4.3 การเตรียม Analytical pad.....	35
3.4.4.4 การประกอบแถบทดสอบ TC.....	35
3.4.5 การหาสถานะที่เหมาะสมของแถบทดสอบ TC.....	37
3.4.5.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ TC-BSA และ TC-OVA ในการตรึงลง บนบริเวณ T-line ด้วยวิธีการทำด้วยมือ .....	37
3.4.5.2 การหาระดับการเจือจางที่เหมาะสมของ MAb-Colloidal gold .....	38
3.4.6 วิธีการทดสอบและการแปรผลของแถบทดสอบ .....	38
3.4.6.1 การหาค่าความไว (Sensitivity) .....	39
3.4.7 การหาสถานะที่เหมาะสมของแถบทดสอบด้วยเครื่องมือ (บริษัท เซิร์ฟ ไฮเอนซ์ จำกัด) .....	39
3.4.7.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ TC-BSA ในการตรึงลงบนบริเวณ T- line โดยใช้เครื่องฟอสฟอรัสระดับไมโครลิตร.....	39

3.4.7.2 การหาระดับการเจือจางที่เหมาะสมของ MAb–Colloidal gold ในการ หยดลงบน Conjugate pad.....	40
3.4.7.3 การหาค่าความไว (Sensitivity) .....	40
3.4.7.4 การหาค่าความจำเพาะ (Specificity).....	41
3.4.8 การประเมินการใช้แถบทดสอบ TC กับตัวอย่างน้ำฝิ่ง.....	41
3.4.8.1 ศึกษาผลของเมทริกซ์ (Matrix effect) ในตัวอย่างน้ำฝิ่ง .....	42
3.4.8.2 การหาค่าความไว (Sensitivity) ในตัวอย่างน้ำฝิ่ง .....	42
3.4.9 การวิเคราะห์ TC ในน้ำฝิ่งที่มีจำหน่ายในไทย.....	43
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง .....	44
4.1 การเชื่อม TC กับโปรตีนพาหะ BSA (TC–BSA) และ OVA (TC–OVA) .....	44
4.2 การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb) ให้บริสุทธิ์ .....	46
4.3 การเตรียม MAb เชื่อมติดกับอนุภาคทอง (Colloidal gold) ขนาด 20 และ 40 นาโน เมตร.....	47
4.3.1 การเลือกขนาดอนุภาคทองที่เหมาะสมในการเชื่อมติดกับ MAb .....	47
4.3.2 การเชื่อมติด MAb กับอนุภาคทอง (MAb–Colloidal gold).....	49
4.4 การเตรียมส่วนประกอบของแถบทดสอบ TC .....	50
4.4.1 การหาความเข้มข้นของ TC–BSA หรือ TC–OVA ที่เหมาะสมในการตรึงลง T–line ด้วยวิธีการทำด้วยมือ.....	50
4.4.2 การหาค่าความไว (Sensitivity) ของแถบทดสอบ .....	51
4.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมของแถบทดสอบด้วยเครื่องมือ (บริษัท เซิร์ฟ ไซเอนซ์ จำกัด) .....	53
4.5.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ TC–BSA ในการพ่นลงบน T–line โดยใช้ เครื่องจ่ายสารระดับไมโครลิตร.....	53
4.5.2 การหาระดับการเจือจางที่เหมาะสมของ MAb–Colloidal gold.....	55
4.5.3 การหาค่าความไว (Sensitivity) ของแถบทดสอบ.....	57

4.5.4 การหาค่าความจำเพาะ (Specificity) ของแถบทดสอบ .....	59
4.6 การประเมินประสิทธิภาพของแถบทดสอบ TC ในตัวอย่างน้ำฝิ่ง.....	61
4.6.1 ผลการศึกษาเมทริกซ์ (Matrix effect) ในตัวอย่างน้ำฝิ่ง.....	61
4.6.2 การหาค่าความไว (Sensitivity) ของแถบทดสอบในตัวอย่างน้ำฝิ่ง .....	62
4.6.3 การหาค่าความถูกต้อง (Accuracy) และความแม่นยำ (Precision) ของแถบ ทดสอบ .....	65
4.6.4 การวิเคราะห์ TC ในน้ำฝิ่งที่มีจำหน่ายในไทย.....	70
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....	73
รายการอ้างอิง .....	75
ภาคผนวก ก.....	81
ภาคผนวก ข.....	86
ภาคผนวก ค.....	90
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	94

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 โครงสร้างของสารกลุ่ม TCs .....	7
ตารางที่ 2.2 ระดับสารปฏิชีวนะกลุ่ม TCs สูงสุดที่อนุญาตให้ตรวจพบได้ในอาหาร (Maximum Residue Limits; MRLs).....	9
ตารางที่ 2.3 วิธีการตรวจวิเคราะห์สารตกค้าง TC ด้วยวิธีทางเคมี.....	10
ตารางที่ 2.4 คุณสมบัติและข้อจำกัดในการผลิตระหว่าง PAb และ MAb.....	12
ตารางที่ 2.5 สมบัติของไนโตรเซลลูโลสที่ใช้สำหรับแถบทดสอบ.....	21
ตารางที่ 4.1 แสดง % ความเข้มข้น และการลดลงของความเข้มข้น ที่ความเข้มข้น TC ต่างกันใน 0.1% PB-T.....	58
ตารางที่ 4.2 แสดง % ความเข้มข้น และการลดลงของความเข้มข้น ที่ความเข้มข้น TC ต่างกันใน สารละลายน้ำผึ้ง .....	64
ตารางที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์ intra-variation assay ในตัวอย่างน้ำผึ้งครั้งที่ 1 .....	67
ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์ intra-variation assay ในตัวอย่างน้ำผึ้งครั้งที่ 2 .....	68
ตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์ intra-variation assay ในตัวอย่างน้ำผึ้งครั้งที่ 3 .....	69
ตารางที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์ inter-variation assay ในตัวอย่างน้ำผึ้ง.....	70
ตารางที่ ก.1 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานโปรตีน ด้วยวิธี BCA Protein assay kit.....	81
ตารางที่ ก.2 ปริมาณโปรตีนของสาร TC–BSA และTC–OVA โดยวิธี BCA Protein Assay kit .....	82
ตารางที่ ก.3 ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง ( $\epsilon$ ) ของสาร.....	82
ตารางที่ ก.4 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานโปรตีน IgG ด้วยวิธี BCA Protein assay kit.....	83
ตารางที่ ก.5 ปริมาณโปรตีนของอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อน และหลังการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี BCA Protein Assay kit.....	84

ตารางที่ ก.6 ค่าดูดกลืนแสงของ MAb ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการเชื่อมติดกับอนุภาคทองขนาด  
 20 และ 40 นาโนเมตร..... 84

ตารางที่ ก.7 % ค่าความเข้มสีของแถบทดสอบสารละลายมาตรฐาน TC ที่อ่านด้วยโปรแกรม  
 ImageJ รุ่น 1.47m..... 85



## สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของแอนติบอดี (ดัดแปลงมาจาก [22]).....	11
ภาพที่ 2.2 แสดงข้อเด่นและข้อด้อยของแถบทดสอบ (ดัดแปลงมาจาก [25]).....	14
ภาพที่ 2.3 แสดงส่วนประกอบของแถบทดสอบ .....	15
ภาพที่ 2.4 (ก) ส่วนประกอบของแถบทดสอบรูปแบบแข่งขัน (ข) หลักการทำงาน และ (ค) รูปแบบการแปรผลของรูปแบบแข่งขัน.....	17
ภาพที่ 2.5 (ก) ส่วนประกอบของแถบทดสอบรูปแบบแซนด์วิช (ข) หลักการทำงาน และ (ค) รูปแบบการแปรผลของรูปแบบแซนด์วิช.....	19
ภาพที่ 2.6 แสดงการเชื่อมต่วิธีการเชื่อมติดบนพื้นผิวอนุภาคทองกับแอนติบอดีด้วยวิธีทางกายภาพ (ก) การเชื่อมติดด้วยประจุ (ionic attraction) (ข) การเชื่อมติดด้วยแรงไฮโดรโฟบิก(hydrophobic attraction) และ (ค) การเชื่อมติดด้วยแรงเดทิฟ (dative binding ) [30].....	22
ภาพที่ 3.1 การเชื่อม TC กับโปรตีนพาหะ BSA และ OVA โดยใช้ปฏิกิริยา Mannich [35].....	29
ภาพที่ 3.2 แสดงส่วนประกอบทั่วไปของแถบทดสอบ (1) แผ่นรับตัวอย่าง (Sample pad) (2) แผ่นตรึง MAb–Colloidal gold (Conjugate pad) (3) แผ่นวิเคราะห์ตัวอย่าง (Analytical pad) ประกอบด้วย เส้นทดสอบ (Test (T)–line) และ เส้นควบคุม (Control (C)–line) และ (4) แผ่นดูดซับตัวอย่าง (Absorbent pad).....	34
ภาพที่ 3.3 (ก) การประกอบแถบทดสอบบนแผ่นรองพลาสติก (Plastic backing card) (ข) แถบทดสอบที่ประกอบเสร็จแล้ว ในตลับพลาสติก (Plastic cassette) .....	36
ภาพที่ 3.4 การตรึง T–line และ C–line บน Analytical pad ด้วยการประทับโดยใช้กระจกสไลด์.....	37
ภาพที่ 3.5 รูปแบบการแปรผล .....	39
ภาพที่ 4.1 (ก) โคโรมาโตแกรมของ TC 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (—) BSA 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (—) TC–BSA 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (—) (ข) โคโรมาโตแกรมของ TC	

0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (—) OVA 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (—) และ TC-OVA 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (—).....	45
ภาพที่ 4.2 โครมาโตแกรมของ MAb ที่ชะออกมาจากคอลัมน์ HiTrap Protein G HP ที่ค่าดูดกลืนแสง 280 นาโนเมตร (—◆—) และ โครมาโตแกรมของ MAb ที่ได้จาก iELISA ที่ค่าดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร (—●—).....	47
ภาพที่ 4.3 ความเข้มข้นของ MAb ที่เหมาะสมในการเชื่อมติดกับ Colloidal gold ขนาด 20 นาโนเมตร เท่ากับ 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (—▲—) และกับ Colloidal gold ขนาด 40 นาโนเมตร เท่ากับ 62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (—●—).....	48
ภาพที่ 4.4 โครมาโตแกรมของ Colloidal gold ขนาด 40 นาโนเมตร (—) และ MAb-Colloidal gold 40 นาโนเมตร (—).....	49
ภาพที่ 4.5 (ก) แถบทดสอบที่ตรงด้วยความเข้มข้นของ TC-BSA 0.25–2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ (ข) แถบทดสอบที่ตรงด้วยความเข้มข้นของ TC-OVA 1.0–3.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรบน T-line ที่ทดสอบด้วย 0.1 % PB-T.....	51
ภาพที่ 4.6 แถบทดสอบที่ทดสอบด้วยสารละลายมาตรฐาน TC ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรใน 0.1% PB-T เพื่อหาค่าความไวของแถบ.....	52
ภาพที่ 4.7 (ก) แถบทดสอบที่พ่นด้วย TC-BSA ความเข้มข้น 0.25–1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บริเวณ T-line และ (ข) แสดงค่าความเข้มสีของ T-line ที่พ่นด้วย TC-BSA ความเข้มข้น 0.25–1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ C-line จากโปรแกรม imageJ รุ่น 1.47m.....	54
ภาพที่ 4.8 (ก) แถบทดสอบที่ใช้ MAb-Colloidal gold ที่ระดับการเจือจาง 1/1–1/4 ในการหยดลงบนแผ่นใยแก้ว GF 33 (ข) แสดงค่าความเข้มสีของ T-line และ C-line ที่ใช้ MAb-Colloidal gold ที่ระดับการเจือจาง 1/1–1/4 จากโปรแกรม imageJ รุ่น 1.47m.....	56
ภาพที่ 4.9 (ก) แถบทดสอบที่ทดสอบด้วยสารละลายมาตรฐาน TC ความเข้มข้น 0–80 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรใน 0.1% PB-T เพื่อหาค่าความไวของแถบทดสอบ และ (ข) แสดงค่า % ความเข้มสีของ T-line ที่อ่านด้วยโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ รุ่น 1.47m.....	58
ภาพที่ 4.10 แถบทดสอบที่ทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารปฏิชีวนะในกลุ่ม TCs (OTC, CTC และ DOX) ความเข้มข้น 0–80 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลาย 0.1 % PB-T .....	60

ภาพที่ 4.11 แลบทดสอบที่ทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารปฏิชีวนะนอกกลุ่ม ( Chloramphenicol Norfloxacin และ Gentamycin) ความเข้มข้น 0-80 นาโนกรัมต่อมิลลิเมตรในสารละลาย 0.1 % PB-T .....	61
ภาพที่ 4.12 แลบทดสอบที่ทดสอบด้วยตัวอย่างน้ำผึ้งในที่ระดับการเจือจาง 1/2, 1/5 และ 1/10...	62
ภาพที่ 4.13 (ก) แลบทดสอบที่ทดสอบด้วยสารละลายมาตรฐาน TC ความเข้มข้น 0-100 นาโนกรัมต่อมิลลิเมตรในสารละลายน้ำผึ้ง เพื่อหาค่าความไวของแลบทดสอบ และ (ข) แสดงค่า % ความเข้มสีของ T-line ที่อ่านด้วยโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ รุ่น 1.47m .....	64
ภาพที่ 4.14 กราฟมาตรฐานของ TC ในสารละลายน้ำผึ้งที่ทดสอบด้วยแลบทดสอบ โดยอ่านค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ รุ่น 1.47m .....	66
ภาพที่ 4.15 การทดสอบ TC ในตัวอย่างน้ำผึ้ง ด้วยแลบทดสอบครั้งที่ 1 .....	67
ภาพที่ 4.16 การทดสอบ TC ในตัวอย่างน้ำผึ้ง ด้วยแลบทดสอบครั้งที่ 2 .....	68
ภาพที่ 4.17 การทดสอบ TC ในตัวอย่างน้ำผึ้ง ด้วยแลบทดสอบครั้งที่ 3 .....	69
ภาพที่ 4.18 ตัวอย่างน้ำผึ้งที่ทดสอบด้วยแลบทดสอบ TC ประเมินความเข้มสีแลบทดสอบโดยใช้สายตา.....	71
ภาพที่ ก.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน BSA ด้วยวิธี BCA .....	81
ภาพที่ ก.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน IgG ด้วยวิธี BCA.....	83
ภาพที่ ค.1 ใบรับรองการวิเคราะห์อนุภาคทองขนาด 20 นาโนเมตร .....	90
ภาพที่ ค.2 โครมาโตแกรมของอนุภาคทองขนาด 0 นาโนเมตร .....	91
ภาพที่ ค.3 ใบรับรองการวิเคราะห์อนุภาคทองขนาด 40 นาโนเมตร .....	92
ภาพที่ ค.4 โครมาโตแกรมของอนุภาคทองขนาด 40 นาโนเมตร.....	93



## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

%	percent
% CV	percentage of coefficient of variation
% R	percentage of recovery
A	absorbance
Ab	antibody
Ag	antigen
BCA assay	bicinchonic acid assay
BSA	bovine serum albumin
C	control line
C <sub>H</sub>	constance region of heavy chain
C <sub>L</sub>	constance region of light chain
C-line	control line
CTC	chlortetracycline
DMC	Demechlocycline
DMF	dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
DOX	doxycycline
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	fetal calf serum
GAM	goat anti mouse IgG
HPLC	High performance liquid chromatography
HRP	horseradish peroxidase
IC <sub>50</sub>	50% inhibition concentration
ICA	immunochromatographic assay
iELISA	indirect ELISA
LC-MS	Liquid chromatography/mass spectrometry
M	molar
MAb	monoclonal antibody

MC	Methacycline
MES	2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid
MRLs	maximum residue limits
nm	nanometre
OTC	oxytetracycline
OVA	ovalbumin
PAb	polyclonal antibody
PB	phosphate buffer
PBS	phosphate buffer saline
PBS-T	phosphate buffer saline ที่มี 0.05 % Tween 20
PB-T	phosphate buffer ที่มี 0.1 % Tween 20
ppb	Part per billion
RTC	Rolitetracycline
SD	standard deviation
T	test line
TC	tetracycline
TCs	Tetracyclines
T-line	test line
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
v/v	volume by volume
V <sub>H</sub>	variable region of heavy chain
V <sub>L</sub>	variable region of light chain
VLOD	visual limit of detection
w/v	weight by volume

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

น้ำผึ้ง คือน้ำหวานที่ผึ้งเก็บจากต่อมน้ำหวานของดอกไม้ หรือต้นไม้ ที่ผ่านขบวนการย่อยภายในตัวผึ้ง แปรสภาพน้ำหวานให้กลายเป็นน้ำผึ้งขณะกำลังบินกลับรังแล้วคายออกมาเก็บไว้ในหลอดรวง ผ่านการระเหยน้ำโดยผึ้งช่วยกันกระพือปีกไล่ความชื้น จนน้ำผึ้งในหลอดรวงนั้นมีความชื้นน้อยกว่า 20 % จึงปิดฝาหลอดรวง จัดเป็นน้ำผึ้งที่มีคุณภาพตามเกณฑ์มาตรฐาน คุณประโยชน์ของน้ำผึ้งพบว่า ในน้ำผึ้งมีสารต้านอนุมูลอิสระ เช่นเดียวกับที่มีในผักใบเขียว และยังมีวิตามินบี ซี ฟอสฟอรัส แคลเซียม เหล็ก และกรดอะมิโน จึงถูกนำมาใช้ประโยชน์ทั้งในรูปแบบของการบริโภคสดโดยไม่ผ่านแปรรูป หรือนำมาเป็นส่วนประกอบของสินค้าในอุตสาหกรรมประเภทต่าง ๆ เช่นยาแผนโบราณ เครื่องสำอาง เครื่องดื่ม รวมทั้งการนำมาใช้สมานแผลในวงการแพทย์ปัจจุบัน เนื่องจากน้ำผึ้งมีความสามารถในการทำลายหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้เป็นอย่างดี [1] ประเทศไทยมีการเลี้ยงผึ้งอยู่ทั่วประเทศ แต่แหล่งเลี้ยงผึ้งที่สำคัญจะอยู่ในภาคเหนือ น้ำผึ้งเป็นผลผลิตหลักจากอุตสาหกรรมเลี้ยงผึ้งสามารถผลิตได้มากกว่า 10,000 ตันต่อปี นอกจากนี้ยังมีผลิตภัณฑ์จากผึ้งอื่นๆ อีกได้แก่ เกสรผึ้ง (Bee Pollen) พรอพอลิส (Propolis) นมผึ้ง (Royal jelly) และ ไขผึ้ง (Beeswax) ถึงแม้ว่าประเทศไทยจะมีกำลังการผลิตน้ำผึ้งสูง แต่อย่างไรก็ตามน้ำผึ้งที่เกษตรกรผู้เลี้ยงผึ้งของประเทศไทยผลิตนั้นยังมีปัญหา การขาดมาตรฐานการควบคุม โดยเฉพาะด้านคุณภาพ สุขอนามัย และการสร้างความปลอดภัยของผู้บริโภค เนื่องจากปัญหามีอยู่ว่าเกษตรกรมักใช้สารเคมีฉีดพ่นต้นไม้เพื่อกำจัดศัตรูพืช ฉีดสารเคมีในรังผึ้งเพื่อกำจัดไรศัตรูผึ้ง หรือใช้ยาปฏิชีวนะกับผึ้งเพื่อป้องกันผึ้งไม่ให้ เป็นโรคที่เกิดจากไรศัตรูผึ้ง ซึ่งสิ่งเหล่านี้ก่อให้เกิดสารเคมีหรือยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำผึ้งได้ [2, 3]

тетрациклины (TC) เป็นยาปฏิชีวนะที่อยู่ในกลุ่มยาปฏิชีวนะтетрациклины (Tetracyclines; TCs) ออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ รวมถึงไวรัสบางชนิดและพวกริเกตเซีย จึงจัดอยู่ในกลุ่มยาที่มีขอบเขตในการออกฤทธิ์กว้าง ทำให้มีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อในสัตว์รวมถึงอุตสาหกรรมการเลี้ยงผึ้ง โดยกลไกการออกฤทธิ์จะไปขัดขวางการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย โดยซึมผ่านเข้าไปในไซโทพลาซึม และมีการรวมตัวกับตัวรับพันที่

โดยรวมตัวกับส่วน 30S ของไรโบโซมของแบคทีเรีย ทำให้ขั้นตอนต่างๆ ในการกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์แบคทีเรียหยุดชะงักลง อย่างไรก็ตามการใช้อย่างไม่ถูกต้องและต่อเนื่องเป็นเวลานานก่อให้เกิดผลกระทบเป็นวงกว้างทั้งต่อตัวสัตว์ ผู้เลี้ยง ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม ซึ่งปัญหาที่เกิดขึ้นคือ สารปฏิชีวนะตกค้างในเนื้อสัตว์หรือผลิตภัณฑ์จากสัตว์และปัญหาเชื้อดื้อยา การเกิดการตกค้างของสาร TCs ในผลิตภัณฑ์อาหารในระดับน้อยๆ จะไม่เกิดผลเฉียบพลันต่อผู้บริโภค แต่อาจทำให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้ในระยะยาว ก่อให้เกิดความเสียหายในเชิงสุขภาพและเศรษฐกิจ จากปัญหาดังกล่าวทำให้ในหลายประเทศรวมถึงประเทศไทย ตระหนักถึงมาตรฐานและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์อาหาร จึงได้มีการกำหนดระดับสารปฏิชีวนะ TC สูงสุดที่อนุญาตให้ตรวจพบได้ในอาหาร (Maximum Residue Limits; MRLs) โครงการมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (Codex Alimentarius) มีการกำหนดค่า MRLs สำหรับ TCs ปริมาณสารตกค้าง TC สูงสุดในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ได้แก่ กล้ามเนื้อ ตับ ไต ไข่ และน้ำมัน ไม่เกิน 200, 600 1,200 400 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับประเทศไทยตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข มีการกำหนดค่า MRLs สำหรับ TCs เช่นเดียวกับ Codex Alimentarius [4] และไม่อนุญาตให้ตรวจพบยาสัตว์ตกค้างในน้ำผึ้ง [5] แต่ในสหภาพยุโรป ค่า MRLs สำหรับ TCs ในกล้ามเนื้อ ตับ ไต ไข่และน้ำมันเป็น 100, 300, 600, 200 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ การตรวจสอบสารปฏิชีวนะตกค้าง TC ในผลิตภัณฑ์อาหารมีหลายวิธี เช่น วิธีทางเคมีด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และ Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS) เป็นต้น ซึ่งสามารถวิเคราะห์ปริมาณสารตกค้างได้อย่างถูกต้องและแม่นยำสูง แต่ใช้เวลาในการเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์นาน นอกจากนี้เครื่องมือและอุปกรณ์มีราคาแพง รวมถึงต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์

วิธีการทดสอบทางภูมิคุ้มกันวิทยาเป็นอีกหนึ่งวิธีที่นิยมนำมาตรวจวิเคราะห์สารตกค้างปฏิชีวนะ เช่น Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) โดยอาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีบนพื้นผิวของแข็ง เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง ถึงแม้ว่า ELISA จะเป็นเทคนิคที่ง่ายกว่าการตรวจด้วยวิธีทางเคมี แต่ก็มีข้อจำกัดในการนำไปใช้ในการตรวจภาคสนาม อีกหนึ่งเทคนิคที่ในปัจจุบันนิยมใช้ คือ Immunochromatographic Assay (ICA) อาศัยหลักการเดียวกับเทคนิค ELISA แต่ปฏิกิริยาจะเกิดบนเมมเบรน เป็นเทคนิคที่ใช้เครื่องมือไม่ซับซ้อน ขั้นตอนไม่ยุ่งยาก นิยมใช้ตรวจคัดกรองตัวอย่างเบื้องต้นหรือติดตามการตกค้างของสารปฏิชีวนะในผลิตภัณฑ์

อาหาร เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ใช้เวลาอ่านผลได้รวดเร็ว ให้ผลในลักษณะเชิงคุณภาพหรือกึ่งปริมาณ ไม่ต้องใช้อุปกรณ์พิเศษ ไม่ต้องอาศัยความชำนาญ เกษตรกรหรือผู้ประกอบการสามารถนำไปใช้ได้เอง เพื่อตรวจคัดกรองเบื้องต้นรวมทั้งราคาของชุดทดสอบไม่แพง ทั้งนี้สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเทตราไซคลินจากเซลล์ไฮบริมาเป็นผลสำเร็จ [6] ดังนั้นในงานวิทยานิพนธ์นี้จะนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ TC มาพัฒนาต่อเป็นแถบทดสอบสำหรับการตรวจหา TC ตกค้างในผลิตภัณฑ์อาหาร โดยเฉพาะน้ำผึ้ง ด้วยเทคนิค ICA แบบการไหลในแนวระนาบ (Lateral Flow Immunochromatographic Assay; LFIA) อาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยาแบบแข่งขัน เนื่องจาก TC เป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมแถบทดสอบเทตราไซคลิน
2. เพื่อประเมินประสิทธิภาพของแถบทดสอบที่ได้ในการตรวจวัดเทตราไซคลินในผลิตภัณฑ์น้ำผึ้ง

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. ศึกษาและค้นคว้าข้อมูลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
2. การเพิ่มปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีและทำให้บริสุทธิ์
3. การหาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมแถบทดสอบเทตราไซคลิน
4. การประเมินประสิทธิภาพของแถบทดสอบที่ได้กับตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำผึ้ง
5. วิเคราะห์ และสรุปผลการทดลอง เผยแพร่ผลงานวิจัย และเขียนวิทยานิพนธ์

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้แถบทดสอบต้นแบบที่สามารถตรวจสอบเทตราไซคลินตกค้างในตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำผึ้ง และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารอื่นๆ เช่น นมหรือน้ำผึ้งสัตว์ได้

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 แนวคิดและทฤษฎี

##### 2.1.1 อุตสาหกรรมการเลี้ยงผึ้งในประเทศไทย

การเลี้ยงผึ้ง นับวันจะมีความสำคัญมากยิ่งขึ้นเนื่องจากผึ้งได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ทั้งทางตรงและทางอ้อม ซึ่งเกษตรกรสามารถนำมาประกอบเป็นอาชีพเพิ่มรายได้ให้กับครอบครัว เป็นประโยชน์ต่อการเพิ่มผลผลิตพืชในทางการเกษตร เป็นผลิตภัณฑ์บำรุงสุขภาพร่างกาย ผลิตภัณฑ์หลายชนิดถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ และเกิดผลิตภัณฑ์ต่อเนื่อง ตลอดจนมีการส่งออกนำรายได้เข้าประเทศจำนวนมาก ในประเทศไทยมีการเลี้ยงอยู่ทั่วไปทุกภาค ในปี 2554 มีฟาร์มเลี้ยงผึ้งจำนวน 1,100 ฟาร์ม ได้ผลผลิตน้ำผึ้งมากกว่า 10,000 ตัน นมผึ้ง (รอยัล เยลลี่) มากกว่า 200 ตัน และเกสรผึ้ง 100 ตัน ก่อให้เกิดอุตสาหกรรมที่ต่อเนื่อง คือ อุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์ผึ้ง ซึ่งใช้บริโภคภายในและสามารถส่งออกไปต่างประเทศสร้างรายได้ให้กับผู้ประกอบการเลี้ยงผึ้ง โดยเฉพาะน้ำผึ้ง จากเดิมที่ประเทศไทยไม่มีการส่งออก จนในปัจจุบัน ปี 2554 มีการส่งออกมากกว่า 8,000 ตัน [7]

น้ำผึ้ง คือน้ำหวานที่ผึ้งเก็บจากต่อมน้ำหวานของดอกไม้ หรือต้นไม้ ที่ผ่านกระบวนการย่อยภายในตัวผึ้ง แปรสภาพน้ำหวานให้กลายเป็นน้ำผึ้งขณะกำลังบินกลับรังแล้วคายออกมาเก็บไว้ในหลอดรวง ผ่านการระเหยน้ำโดยผึ้งช่วยกันกระพือปีกไล่ความชื้น จนน้ำผึ้งในหลอดรวงนั้นมีความชื้นน้อยกว่า 20 % จึงปิดฝาหลอดรวง จัดเป็นน้ำผึ้งที่มีคุณภาพตามเกณฑ์มาตรฐาน คุณสมบัติของน้ำผึ้งพบว่า ในน้ำผึ้งมีสารต้านอนุมูลอิสระ เช่นเดียวกับที่มีในผักใบเขียว และยังมีวิตามินบี ซี ฟอสฟอรัส แคลเซียม เหล็ก และกรดอะมิโน จึงถูกนำมาใช้ประโยชน์ทั้งในรูปแบบของการบริโภคสดโดยไม่ผ่านการแปรรูป หรือนำมาเป็นส่วนประกอบของสินค้าในอุตสาหกรรมประเภทต่าง ๆ เช่น ยาแผนโบราณ เครื่องสำอาง เครื่องดื่ม รวมทั้งการนำมาใช้สมานแผลในวงการแพทย์ปัจจุบัน เนื่องจากน้ำผึ้งมีความสามารถในการทำลายหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังมีผลิตภัณฑ์จากผึ้งอื่น ๆ อีกได้แก่ เกสรผึ้ง (Bee Pollen) พรอพอลิส (Propolis) นมผึ้ง

(Royal jelly) และ ไช้ผึ้ง (Beeswax) [1]

อุตสาหกรรมการเลี้ยงผึ้งมักประสบปัญหา โรคผึ้ง โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย เช่น โรคหนองเน่าอเมริกัน (American Foulbrood Disease, AFB) และโรคหนองเน่ายุโรป (European Foulbrood Disease, EFB) เนื่องจากโรคเหล่านี้ก่อให้เกิดความเสียหายทำให้ตัวอ่อนผึ้งตาย อีกทั้งยังมีการแพร่ระบาดง่ายและรวดเร็วหากไม่มีการป้องกัน การแก้ไขปัญหาค่าการระบาดของโรคจะใช้วิธีบำบัดและควบคุมโรคในผึ้งที่เกิดจากจุลินทรีย์โดยใช้สารปฏิชีวนะเช่น TC ทำให้มีสารตกค้างอยู่ในน้ำผึ้ง ก่อให้เกิดปัญหาการกีดกันทางการค้า กระแสการต่อต้านการใช้สารปฏิชีวนะในการบำบัดและป้องกันโรคที่เกิดจากแบคทีเรียจึงเกิดขึ้น ขณะนี้ในประเทศไทยผู้ซื้อผลิตภัณฑ์จากผึ้งยังได้ตื่นตัวตรวจสอบสารดังกล่าวในน้ำผึ้งทั้งหมดที่นำเข้ามาจากประเทศต่างๆรวมทั้งประเทศไทย [8]

การเลี้ยงผึ้งเพื่อเก็บน้ำผึ้งโดยทั่วไปเกษตรกรจะเลี้ยงผึ้งในรังผึ้งที่เตรียมไว้สำหรับเลี้ยงผึ้งเพื่อโดยเฉพาะ วิธีเลี้ยงเพียงแค่นำรังผึ้งไปวางไว้ในที่ต่างๆ ที่มีพืชสำหรับให้ผึ้งเก็บน้ำหวานมาสะสมในรัง เช่น สวนลำไย เป็นต้น แต่ปัญหามืออยู่ว่าเกษตรกรมักใช้สารเคมีฉีดพ่นต้นไม้เพื่อกำจัดศัตรูพืช ฉีดสารเคมีในรังผึ้งเพื่อกำจัดไรศัตรูผึ้ง หรือใช้ยาปฏิชีวนะกับผึ้งเพื่อป้องกันผึ้งไม่ให้เป็นโรคที่เกิดจากไรศัตรูผึ้ง ซึ่งสิ่งเหล่านี้ก่อให้เกิดสารเคมีหรือยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำผึ้งได้ ในปี 2551 มีการศึกษาปริมาณยาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล และ TC ตกค้างในน้ำผึ้ง พบว่ามีการตกค้างของยาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล น้อยมากเพียง 3 ตัวอย่าง จาก 2,003 ตัวอย่าง ในขณะที่การตกค้างของยาปฏิชีวนะ TC มีมากถึง 195 ตัวอย่าง จาก 3,921 ตัวอย่าง [2, 3]

### 2.1.2 ยาปฏิชีวนะเตตราไซคลิน (Tetracycline; TC)

ยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราไซคลิน (Tetracyclines; TCs) ถูกใช้กันอย่างแพร่หลายในสัตว์ได้แก่ ยาคลอเตตราไซคลิน (Chlortetracycline; CTC) ซึ่งเป็นยาตัวแรกในกลุ่มเตตราไซคลินที่ถูกค้นพบในปี พ.ศ. 2491 ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces aureofaciens* และยาตัวต่อมาที่ถูกค้นพบคือ ออกซีเตตราไซคลิน (Oxytetracycline; OTC) ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces rimosus* ในปี พ.ศ. 2493 และในปี พ.ศ. 2495 ยาเตตราไซคลิน (Tetracycline; TC) ถูกผลิตขึ้นในรูปยาแก้มัถสเคราะห์ซึ่งเตรียมได้จากยาคลอเตตราไซคลิน ในปัจจุบันได้มีการผลิตยาในกลุ่มนี้ตัวใหม่ขึ้นมาใช้อีกหลายตัว ได้แก่ ดอกซีไซคลิน (Doxycycline; DOX) ดีเมคโคลไซคลิน (Demeclocycline; DMC) เมธาไซคลิน (Methacycline; MC) และโรลิตเตตราไซคลิน (Rolitetracycline; RTC)

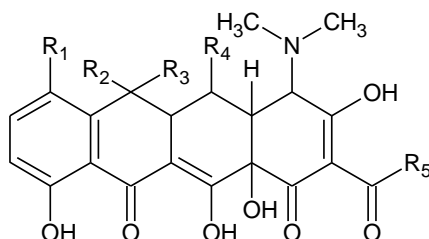
สารกลุ่ม TCs นิยมใช้รักษาโรคติดเชื้อในสัตว์ เพราะเป็นยาที่มีราคาถูก มีขอบเขตในการออกฤทธิ์กว้างทำให้นิยมใช้ในกรณีติดเชื้อหลายๆตัวพร้อมกัน อีกทั้งวิธีในการให้ยาไม่ยุ่งยากและให้ผลดี ในการรักษา สารกลุ่ม TCs ใช้ได้ผลดีกับแบคทีเรียพวก *beta hemolytic Streptococci*, *nonhemohemolytic Streptococci*, *Clostridia*, *Brucella hemophilus* และ *Klebsiella* นอกจากนี้ยังให้ผลดีปานกลางกับแบคทีเรียพวก *Corynebacterium*, *E. coli*, *Salmonella* และ *Bacillus antracis* [9]

### 2.1.3 สมบัติทางเคมีของสารกลุ่ม TCs

สารกลุ่ม TCs มีสูตรโครงสร้างหลักดังแสดงในตารางที่ 2.1 ซึ่งลักษณะของสารกลุ่ม TCs เป็นผลึกสีเหลือง รสขม และละลายน้ำได้จำกัดที่ pH เท่ากับ 7 ยากลุ่มนี้มีฤทธิ์สูงที่ pH 5.5-6 ภายใต้อุณหภูมิและ pH ที่ไม่เหมาะสมสารกลุ่ม TCs จะเกิดการสลายตัว นอกจากนี้สารกลุ่ม TCs สามารถรวมตัวกับไอออนของพวกไดวาเลนต์ ที่ตำแหน่ง C-11 และ C-12 รวมเป็นสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำ ถ้าสารกลุ่ม TCs เกิดการรวมตัวกับไอออนก่อนที่จะเกิดการสลายตัวในกระเพาะอาหาร ยา จะไม่มีการดูดซึมเข้ากระแสโลหิตเลย ดังนั้นการผลิตยาในสารกลุ่ม TCs จึงต้องเตรียมให้อยู่ในรูปของเกลือหรือในรูปอื่นๆ ที่จะทำให้ยาไม่สามารถไปรวมตัวกับพวกโลหะ



ตารางที่ 2.1 โครงสร้างของสารกลุ่ม TCs



โครงสร้างหลักของสารกลุ่ม TCs

สาร	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	โครงสร้าง
เตตราไซคลิน (TC)	H	OH	CH <sub>3</sub>	H	NH <sub>2</sub>	
คลอเตตราไซคลิน (CTC)	Cl	OH	CH <sub>3</sub>	H	NH <sub>2</sub>	
ออกซีเตตราไซคลิน (OTC)	H	OH	CH <sub>3</sub>	OH	NH <sub>2</sub>	
ดอกซีไซคลิน (DOX)	H	H	CH <sub>3</sub>	OH	NH <sub>2</sub>	
โรลิเตตราไซคลิน (RTC)	H	CH <sub>3</sub>	OH	H		

#### 2.1.4 กลไกการออกฤทธิ์ของสารกลุ่มTCs

สารกลุ่ม TCs มีคุณสมบัติที่สามารถรวมตัวกับ DNA โพรตีนโพลีนิวคลีโอไทด์ RNA และส่วนไรโบโซม ซึ่งส่วนใหญ่จะเกิดที่ส่วน 30S ซับยูนิตของไรโบโซมในแบคทีเรียที่ตำแหน่ง A site มีผลทำให้ aminoacyl-tRNA ไม่สามารถเข้าไปรวมตัว ที่ตำแหน่ง A site ได้ นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์รวมตัวกับเอนไซม์ GTPase ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถไปรวมตัวกับ aminoacyl-tRNA ที่ A site ของไรโบโซม นอกจากนี้ยังพบว่ายาถ้ามีปริมาณสูงจะขัดขวางการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทุกชนิด ทำให้มีผลต่อระบบการทำงานต่างๆในร่างกาย

#### 2.1.5 อันตรายของสารตกค้าง TC

การเกิดการตกค้างของสารกลุ่ม TCs ในผลิตภัณฑ์อาหารในระดับน้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะไม่เกิดผลเฉียบพลันต่อผู้บริโภค แต่ปริมาณที่ตกค้างอาจทำให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้ในระยะยาว เนื่องจากที่สารตกค้างในเนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ที่บริโภคเข้าไปมีปริมาณน้อยไม่ถึงขนาดที่เฝ้าในการรักษา จึงไม่ทำให้เชื้อโรคในร่างกายตาย แต่จะทำให้เชื้อโรคนั้นเกิดการดื้อยา แต่ถ้าตรวจพบในระดับสูงเกินกว่าที่อนุญาตให้ตรวจพบได้ในอาหาร อาจทำให้เกิดอันตรายต่อร่างกายของผู้บริโภคได้ [10] ยาในกลุ่มนี้สามารถส่งผ่านทางรกถ้าได้รับในขณะตั้งครรภ์ จะส่งผลถึงฟetusของทารกทำให้ฟetusมีน้ำตาล นอกจากนี้ยังส่งผลเรื้อรัง ในความเป็นพิษต่อไต ความเป็นพิษต่อตับ และทำให้ผิวหนังเกิดอาการแพ้ แสบไหม้ ในบริเวณที่ถูกแสงอาทิตย์ เป็นต้น [11]

#### 2.1.6 มาตรฐานสารตกค้าง TCs

จากอันตรายของสารตกค้าง TCs ทำให้ในหลายประเทศรวมถึงประเทศไทย ตระหนักถึงมาตรฐานและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์อาหาร จึงได้มีการกำหนดระดับสารปฏิชีวนะกลุ่ม TCs สูงสุดที่อนุญาตให้ตรวจพบได้ในอาหาร (Maximum Residue Limits; MRLs) ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ระดับสารปฏิชีวนะกลุ่ม TCs สูงสุดที่อนุญาตให้ตรวจพบได้ในอาหาร (Maximum Residue Limits; MRLs)

ผลิตภัณฑ์อาหาร	MRLs (µg/kg)					
	Codex <sup>1</sup>	EU <sup>1</sup>	US.FDA <sup>1</sup>	Canada <sup>1</sup>	Japan <sup>1</sup>	THA <sup>1</sup>
กล้ามเนื้อ	200	100	2,000	200	200	200
ตับ	600	300	6,000	600	600	600
ไต	1,200	600	12,000	1,200	1,000	1,200
ไข่	400	200	-	-	400	400
น้ำนม	100	100	300	100	100	100
น้ำผึ้ง	-	-	-	300 <sup>2</sup>	300	-

หมายเหตุ: 1. ผลรวม TCs (TC, CTC, OTC)

2. OTC

ที่มา: [4, 12-16]

## 2.2 วิธีการตรวจวิเคราะห์สารตกค้าง TC

### 2.2.1 วิธีทางเคมี

วิธีทางเคมีที่นิยมใช้ในการตรวจสอบสารตกค้าง TC คือการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และ Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (LC–MS) ดังแสดงในตารางที่ 2.3 ซึ่งสามารถวิเคราะห์ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ สามารถตรวจสอบสารตกค้างได้อย่างถูกต้องและแม่นยำสูง แต่ใช้เวลาในการเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์นาน นอกจากนี้เครื่องมือและอุปกรณ์มีราคาแพง รวมถึงต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ และมีข้อจำกัดในการนำไปใช้ในการตรวจภาคสนามเพื่อตรวจติดตาม หรือตรวจคัดกรองเบื้องต้น

ตารางที่ 2.3 วิธีการตรวจวิเคราะห์สารตกค้าง TC ด้วยวิธีทางเคมี

เทคนิค	ค่า LOD* (µg/kg)	ตัวอย่าง	เอกสารอ้างอิง
UPLC-ESI-MS/MS	0.24	น้ำผึ้ง	[17]
LC-MS/MS	10	น้ำผึ้ง	[18]
HPLC-FD	8	น้ำผึ้ง	[19]
HPLC-FLD	0.29	น้ำผึ้ง	[20]

หมายเหตุ : \* ค่า LOD คือ Limit of detection

UPLC-ESI-MS/MS; ultra-performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry, FD และ FLD; fluorescence detection

### 2.2.2 วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา

วิธีการทดสอบทางภูมิคุ้มกันวิทยาเป็นอีกหนึ่งวิธีที่นิยมนำมาตรวจวิเคราะห์สารตกค้างปฏิชีวนะ เช่น Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) โดยอาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีบนพื้นผิวของแข็ง เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง ถึงแม้ว่า ELISA จะเป็นเทคนิคที่ง่ายกว่าการตรวจด้วยวิธีทางเคมี แต่ก็มีข้อจำกัดในการนำไปใช้ในการตรวจภาคสนาม อีกหนึ่งเทคนิคที่ในปัจจุบันนิยมใช้ คือ Immunochromatographic assay (ICA) อาศัยหลักการเดียวกับเทคนิค ELISA แต่ปฏิกิริยาจะเกิดบนเมมเบรน เป็นเทคนิคที่ใช้เครื่องมือไม่ซับซ้อน ขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ไม่ต้องอาศัยความชำนาญ เกษตรกรหรือผู้ประกอบการสามารถนำไปใช้ได้เอง เพื่อตรวจคัดกรองเบื้องต้นรวมทั้งราคาของชุดทดสอบไม่แพง นิยมใช้ในการคัดกรองเบื้องต้น โดยรายงานผลการตรวจในลักษณะเชิงคุณภาพ (Qualitative) และกึ่งปริมาณ (Semi-quantitative) [21]

### 2.3 แอนติเจน (Antigen; Ag)

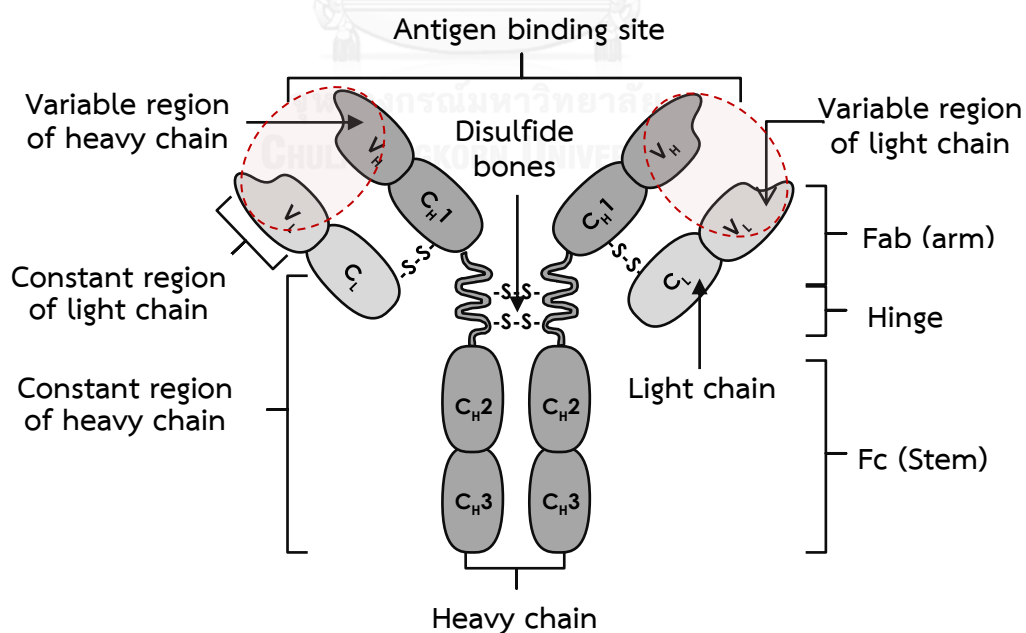
แอนติเจน (antigens) เป็นโมเลกุลของสารที่เป็นสิ่งแปลกปลอมสำหรับร่างกาย เมื่อร่างกายได้รับแอนติเจน ร่างกายจะสร้างภูมิคุ้มกันขึ้นมาต่อต้าน แอนติเจนทุกตัวไม่ได้มีคุณสมบัติหรือประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunogen) โดยเฉพาะแอนติเจนที่มีโมเลกุลขนาดเล็กๆ

หรือเรียกว่า hapten โดย hapten จะเป็นแอนติเจนที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้เมื่อการเกาะรวมตัวกับโมเลกุลตัวพา (carrier) ซึ่งได้แก่ โปรตีน [22]

## 2.4 แอนติบอดี (Antibody; Ab)

แอนติบอดีหรืออิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin; Ig) ถูกผลิตจาก บีเซลล์ (B-Cells) โดย บีเซลล์พบได้ในม้าม ต่อม้ำเหลือง ไช้กระดูก และเพอเยอร์แพทซ์ ส่วนในกระแสเลือดมีเล็กน้อยเท่านั้น หน้าที่ของแอนติบอดีคือยึดเกาะแอนติเจน โดยจะคู่สมกับแอนติเจนิกดีเทอร์มีแนนท์ ทั้งสองบริเวณมีลักษณะรูปร่างคล้ายกันมาก เมื่อแอนติบอดียึดเกาะกับแอนติเจนเป้าหมายแล้ว จะทำหน้าที่ได้หลายลักษณะ เช่น การกระตุ้นคอมพลีเมนต์ การอักเสบ นิวทริไลเซชัน เป็นต้น

โครงสร้างของพื้นฐานของแอนติบอดีเป็นเพปไทด์ 4 สาย โดยมีสายยาวเหมือนกัน 2 สาย เรียกว่า heavy chain และมีสายสั้นเหมือนกันอีก 2 สาย เรียกว่า light chain มีพันธะไดซัลไฟด์ ซึ่งเป็นพันธะโควาเลนต์ ระหว่างอะตอมของกำมะถันในกรดอะมิโนเชื่อม light chain และ heavy chain ทำให้แอนติบอดีมีลักษณะคล้ายอักษร Y ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ สเต็ม (stem) 1 ส่วน แขน (arm) 2 ส่วน และ ฮินจ์ (hinge) (ภาพที่ 2.1)



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของแอนติบอดี (ดัดแปลงมาจาก [22])

แอนติบอดีแบ่งออกได้เป็น 5 ชนิด ตามชนิดของแอนติเจนแปลกปลอม และหน้าที่ของแอนติบอดี ดังนี้ IgG, IgM, IgA, IgE และ IgD ซึ่งแต่ละชนิดจะมีหน้าที่แตกต่างกันออกไปตามระบบภูมิคุ้มกัน ประเภทของแอนติบอดีอาจแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือโพลีโคลนอลแอนติบอดี (Polyclonal antibody; PAb) และโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody; MAb) โดย PAb ประกอบด้วยกลุ่มโมเลกุลของแอนติบอดีที่มีความหลากหลายในการจับกับส่วนต่างๆของแอนติเจน มากกว่า 1 อีพิโทป โดยแต่ละโมเลกุลของ PAb มีโครงสร้างในส่วน variable region ที่แตกต่างกัน จึงมีความเฉพาะเจาะจง และความสามารถในการจับกับ antigen ได้แตกต่าง ส่วน MAb เป็นโมเลกุลของแอนติบอดีเพียงชนิดเดียว มีส่วนโครงสร้างที่ทำหน้าที่ในการจับกับอีพิโทปเพียง 1 ตำแหน่งบนแอนติเจน โดยความแตกต่างระหว่างแอนติบอดีทั้ง 2 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 คุณสมบัติและข้อจำกัดในการผลิตระหว่าง PAb และ Mab

คุณสมบัติ	โพลีโคลนอลแอนติบอดี	โมโนโคลนอลแอนติบอดี
ความจำเพาะ (specificity)	ความจำเพาะต่ำอาจเกิดการทำให้ปฏิกิริยากับสารอื่นๆได้	ความจำเพาะสูงเนื่องจากจำเพาะต่ออีพิโทปเดียวเท่านั้น
สัมพรรคภาพ (affinity)	จับได้หลายอีพิโทปต่อแอนติเจน	จับได้อีพิโทปเดียว
ความเข้มข้นแอนติบอดีที่ผลิตได้	ประมาณ 1 mg/ml	ประมาณ 100–200 µg/ml เมื่อเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบปั่นกววน
ปริมาณที่ผลิตได้	ประมาณ 100 ml จากซีรัมของกระต่าย	ปริมาณไม่จำกัด
ความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีที่ผลิต	ขึ้นอยู่กับแอนติเจนที่ใช้กระตุ้น จึงจำเป็นต้องทำให้บริสุทธิ์	จำเพาะกับอีพิโทปเดียว จึงไม่ต้องทำให้บริสุทธิ์
เวลาที่ใช้ในการผลิต	ไม่เกิน 6 สัปดาห์	อย่างน้อย 4 เดือน
ต้นทุนในการผลิต	ต่ำ	สูง โดยเฉพาะในเวลาเริ่มต้น
ข้อดีหลัก	ต้นทุนต่ำ ง่ายต่อการผลิต	มีความจำเพาะสูง ผลิตได้ไม่จำกัด
ข้อเสียหลัก	คุณภาพแอนติบอดีในแต่ละครั้งไม่เหมือนกัน	เสียเวลาและแรงงานในการผลิตมาก

ที่มา: [23]

## 2.5 หลักการของแถบทดสอบ รูปแบบการไหลในแนวระนาบ (Lateral Flow Immunochromatographic Assay; LFIA)

แถบทดสอบ Immunochromatographic assay (ICA) รูปแบบการไหลในแนวระนาบ (Lateral Flow Immunochromatographic Assay; LFIA) หรือ Test strip เป็นการนำเทคนิคโครมาโทกราฟีมาใช้ร่วมกับเทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา เทคนิคนี้มีข้อดีหลายอย่างเมื่อเทียบกับวิธีการตรวจหาทั่วไปดังแสดงในภาพที่ 2.2 หลักการของแถบทดสอบ มีลักษณะคล้ายกับ ELISA โดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดี และแอนติเจนบนไนโตรเซลลูโลส แถบทดสอบถูกประยุกต์ใช้ครั้งแรกในการทำแถบทดสอบการตั้งครรภ์ การวิเคราะห์ผลสามารถทำได้รวดเร็วโดยการใช้สายตา ปัจจุบันแถบทดสอบถูกนำมาประยุกต์ในหลายสาขาเช่น การตรวจวินิจฉัยโรคในสัตว์ การตรวจติดตามสิ่งแปลกปลอมในอาหาร และสิ่งแวดล้อม เป็นต้น [21, 24]



### Strengths

- One-step assay, no washing step necessary
- Fast and low cost, low sample volume
- Qualitative (on/off) or semi-quantitative results
- Relatively development time short brings applications faster to the market
- Simple test procedure
- Applications at point of care/need
- Proteins, haptens and nucleic acid amplicons can be detected
- Individual tests or sometimes array format for batchwise mid-throughput screening
- Long shelf life without the need to refrigerate, larger batches can be prepared in advance
- For fluid sample, pretreatment is often not necessary

### Weaknesses

- One-step assay, no washing step possible
- Inaccurate sample volume reduces precision
- Restriction on total volume in test gives a limit on sensitivity
- No possibility to enhance the response by enzyme reaction
- Good antibody preparation is obligatory
- Analysis time is dependent on nature of sample i.e. viscosity
- Obstruction of pores due to matrix components
- Sample pretreatment is needed for non-fluid sample

ภาพที่ 2.2 แสดงข้อเด่นและข้อด้อยของแถบทดสอบ (ดัดแปลงมาจาก [25])



### 2.5.1 รูปแบบของแถบทดสอบ

โดยทั่วไปส่วนประกอบหลักของแถบทดสอบจะประกอบด้วย 5 ส่วน ซึ่งแต่ละส่วนจะมีหน้าที่แตกต่างกันดังแสดงในภาพที่ 2.3

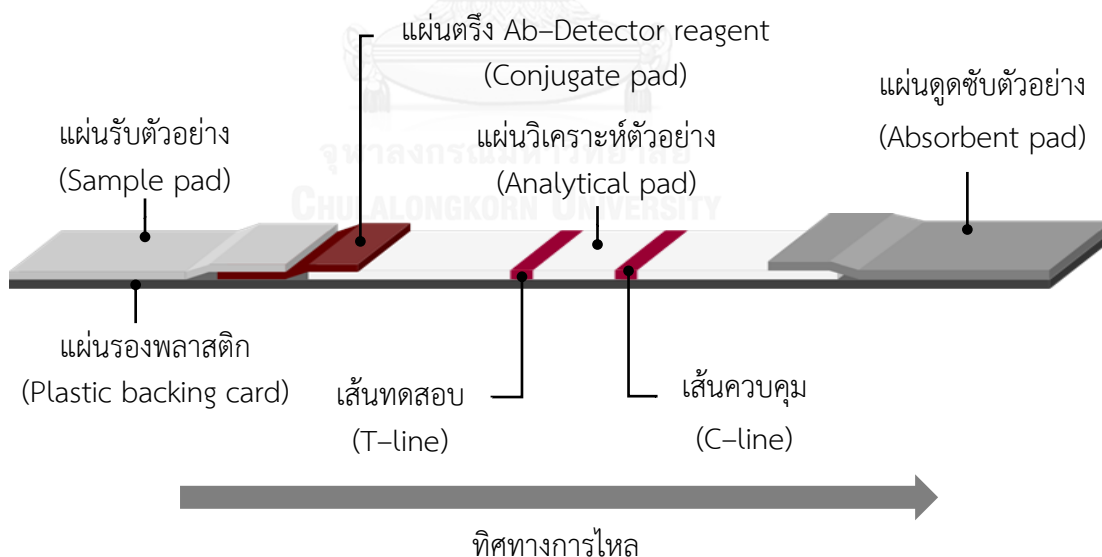
แผ่นรับตัวอย่าง (Sample pad) ทำหน้าที่รับและกรองสารตัวอย่าง

แผ่นตรึงแอนติบอดีที่ติดฉลากกับสารที่ใช้ตรวจสอบ (Conjugate pad) เป็นส่วนที่ใช้ตรึงแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารที่ใช้ตรวจสอบ (Detector reagent)

แผ่นวิเคราะห์ตัวอย่าง (Analytical pad) เป็นบริเวณที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา ประกอบด้วยเส้น 2 เส้น คือ เส้นทดสอบ (Test line; T-line) และเส้นควบคุม (Control line; C-line)

แผ่นดูดซับตัวอย่าง (Absorbent pad) ทำหน้าที่ดูดซับตัวอย่างส่วนเกิน ที่เหลือจากการเกิดปฏิกิริยาจาก Analytical pad

แผ่นรองพลาสติก (Plastic backing card) ทำหน้าที่ยึดส่วนประกอบของแถบทดสอบ

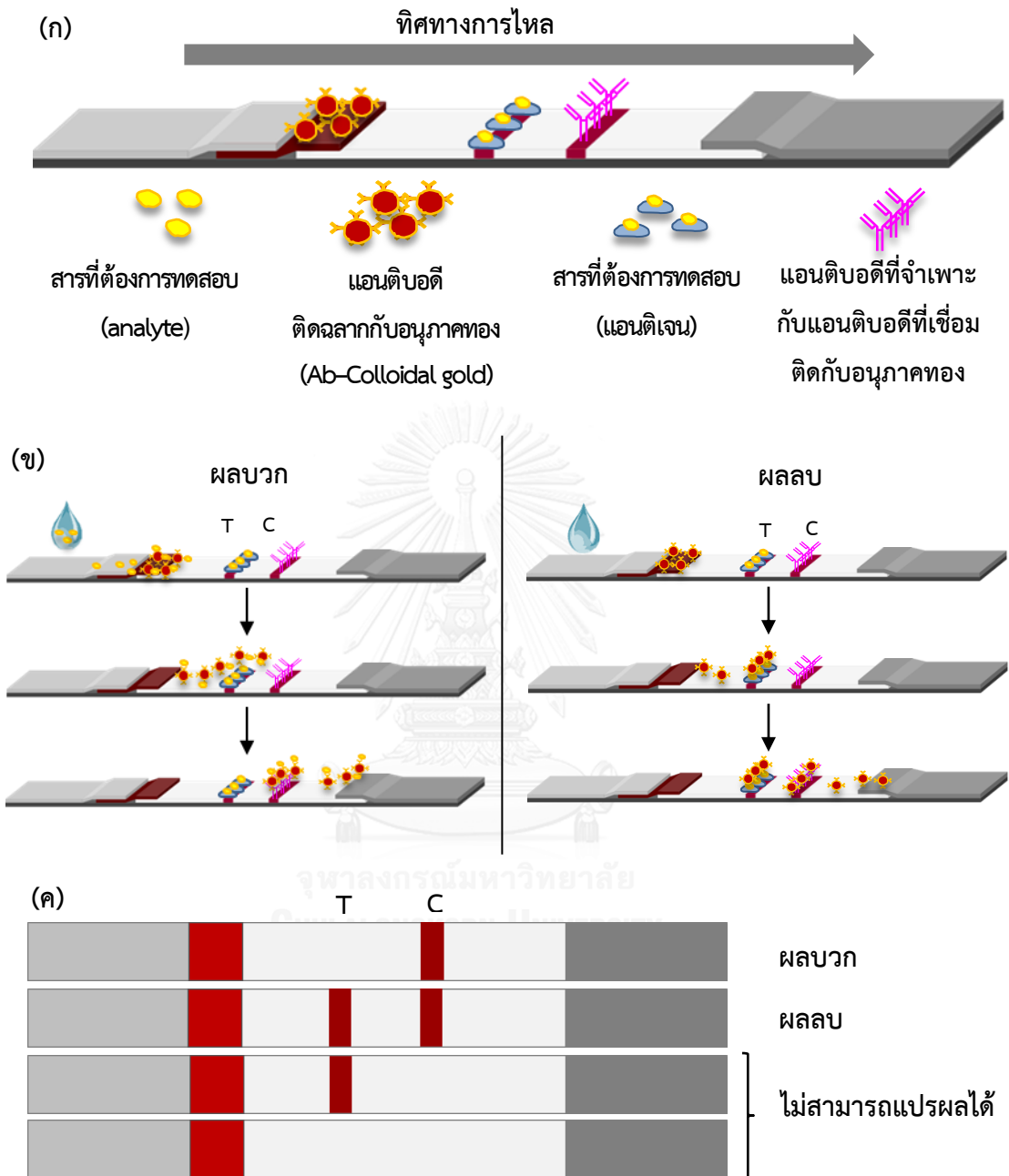


ภาพที่ 2.3 แสดงส่วนประกอบของแถบทดสอบ

รูปแบบของแถบทดสอบแบ่งออกเป็น 2 รูปแบบ ตามขนาดของสารที่ต้องการทดสอบ (Analyte) ถ้าสารที่ต้องการทดสอบมีขนาดเล็กรูปแบบที่เหมาะสมคือ รูปแบบแข่งขัน (Competitive assay format) ในขณะที่สารที่ต้องการทดสอบมีขนาดใหญ่รูปแบบที่เหมาะสมคือ รูปแบบแซนด์วิช (Sandwich assay format). [26]

#### 2.5.1.1 รูปแบบแข่งขัน (Competitive assay format)

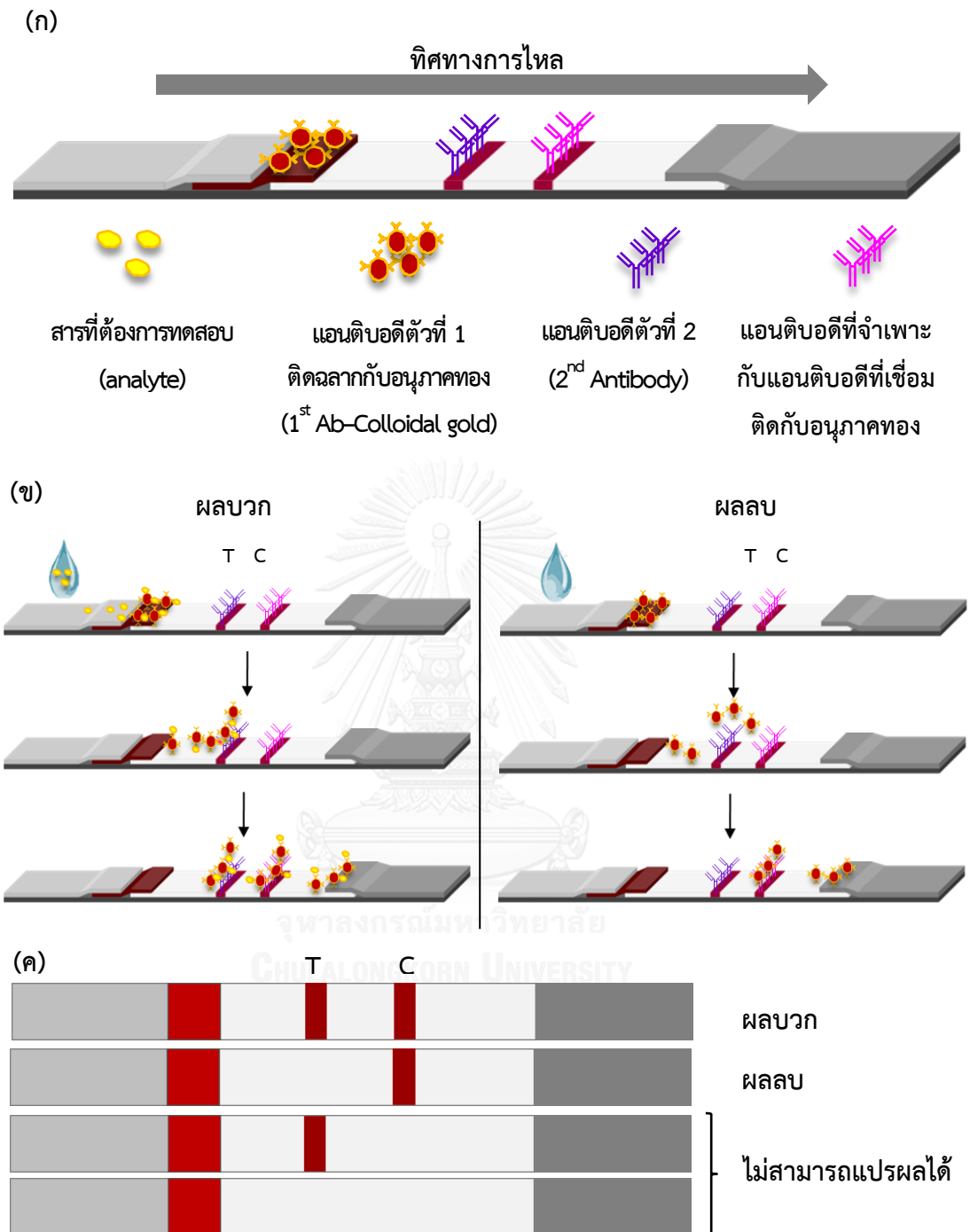
แถบทดสอบรูปแบบแข่งขันเหมาะสมสำหรับตรวจสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กหรือสารที่มีอิพิโทปเดียว องค์ประกอบของแถบทดสอบของรูปแบบแข่งขัน แสดงดังภาพที่ 2.4 ก. หลักการของแถบทดสอบรูปแบบแข่งขัน (ภาพที่ 2.4 ข.) เมื่อตัวอย่างถูกหยดลงบน Sample pad ตัวอย่างจะเคลื่อนที่ผ่าน Conjugate pad ที่มีการตรึงด้วยแอนติบอดีกับสารที่ใช้ตรวจสอบ (Detector reagent) ที่นิยมใช้คืออนุภาคทอง ในกรณีผลบวก จะปรากฏแถบสีแถบเดียว ที่บริเวณ C-line คือในตัวอย่างมีสารที่ต้องการทดสอบ (Analyte) โดยสารในตัวอย่าง และสารที่ตรึงบริเวณเส้นทดสอบจะแข่งขันแย่งกันจับ Ab-Colloidal gold และเคลื่อนที่ผ่าน T-line โดยไม่จับกับสารที่ถูกตรึงบน T-line เนื่องจากสารในตัวอย่างแย่งจับกับ Ab-Colloidal gold หมดแล้วจึงไม่เหลือแอนติบอดีให้จับสารที่ถูกตรึงบน T-line จึงไม่ปรากฏแถบสี จากนั้นสารที่จับกับ Ab-Colloidal gold จะเคลื่อนที่ผ่าน T-line ไปยัง C-line และถูกจับด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับแอนติบอดีที่เชื่อมติดกับอนุภาคทอง และปรากฏแถบสีที่ C-line ในกรณีผลลบ คือในตัวอย่างไม่มีสารที่ต้องการทดสอบ Ab-Colloidal gold จะเคลื่อนที่ผ่าน Analytical pad และจับกับสารที่ถูกตรึงบน T-line เนื่องจากสารที่ตรึงบน T-line เป็นสารชนิดเดียวกันกับสารที่ต้องการทดสอบ จากนั้น Ab-Colloidal gold จะเคลื่อนที่ผ่าน T-line ไปยัง C-line และถูกจับด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับแอนติบอดีที่เชื่อมติดกับอนุภาคทอง และปรากฏแถบสีที่ C-line ในกรณีที่แถบทดสอบปรากฏแถบสีแถบเดียวที่บริเวณ T-line หรือ ไม่ปรากฏแถบสีเลย แสดงว่าแถบทดสอบมีปัญหาไม่สามารถแปรผลได้เนื่องจากหลายสาเหตุเช่น T-line C-line หรือ Ab-Colloidal gold มีการเสื่อมสภาพ เป็นต้น ดังแสดงในภาพที่ 2.4 ค



ภาพที่ 2.4 (ก) ส่วนประกอบของแถบทดสอบรูปแบบแข่งขัน (ข) หลักการทำงาน และ (ค) รูปแบบการแปลผลของรูปแบบแข่งขัน

### 2.5.1.2 รูปแบบแซนด์วิช (Sandwich assay format)

แถบทดสอบรูปแบบแซนด์วิชเหมาะสำหรับตรวจสอบสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ หรือสารที่มีอีพิโทปมากกว่า 1 อีพิโทป องค์ประกอบของแถบทดสอบของรูปแบบแซนด์วิช แสดงดัง ภาพที่ 2.5 ก. หลักการของแถบทดสอบรูปแบบแซนด์วิช (ภาพที่ 2.5 ข.) เมื่อตัวอย่างถูกหยดลงบน Sample pad ตัวอย่างจะเคลื่อนที่ผ่าน Conjugate pad ที่มีการตรึงด้วยแอนติบอดีกับสารที่ใช้ ตรวจสอบ (Detector reagent) ที่นิยมใช้คืออนุภาคทอง ในกรณีผลบวก จะปรากฏแถบสี 2 แถบ บริเวณ T-line และ C-line คือในตัวอย่างมีสารที่ต้องการทดสอบ (Analyte) สารจะจับกับ แอนติบอดีตัวที่ 1 ที่ติดฉลากกับอนุภาคทอง ( $1^{st}$  Ab-Colloidal gold) และเคลื่อนที่ผ่าน Analytical pad โดยสารที่ติดอยู่กับ  $1^{st}$  Ab-Colloidal gold จะถูกแอนติบอดีตัวที่ 2 ( $2^{nd}$  Antibody) ที่ตรึงอยู่บริเวณ T-line จับกับอีพิโทปที่เหลืออยู่ ปรากฏเป็นแถบสีที่บริเวณ T-line และ  $1^{st}$  Ab-Colloidal gold ส่วนที่เหลือ จะเคลื่อนที่ผ่าน T-line ไปยัง C-line และจะถูกจับด้วย แอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับแอนติบอดีที่เชื่อมติดกับอนุภาคทอง และปรากฏแถบสีที่ C-line ในกรณีผลลบ จะปรากฏแถบสีแถบเดียว ที่บริเวณ C-line คือในตัวอย่างไม่มีสารที่ต้องการทดสอบ  $1^{st}$  MAb-Colloidal gold จะเคลื่อนที่ผ่าน  $2^{nd}$  Antibody ที่ตรึงอยู่บริเวณ T-line และไม่เกิดสีขึ้น บริเวณ C-line จากนั้น  $1^{st}$  Ab-Colloidal gold จะเคลื่อนที่ผ่าน T-line ไปยัง C-line และจะถูก จับด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับแอนติบอดีที่เชื่อมติดกับอนุภาคทอง และปรากฏแถบสีที่ บริเวณ C-line ในกรณีที่แถบทดสอบปรากฏแถบสีแถบเดียวที่บริเวณ T-line หรือ ไม่ปรากฏแถบสี เลย แสดงว่าแถบทดสอบมีปัญหาไม่สามารถแปรผลได้เนื่องจากหลายสาเหตุเช่น T-line C-line หรือ  $1^{st}$  Ab-Colloidal gold มีการเสื่อมสภาพ เป็นต้น ดังแสดงในภาพที่ 2.5 ค



ภาพที่ 2.5 (ก) ส่วนประกอบของแถบทดสอบรูปแบบแซนด์วิช (ข) หลักการทำงาน และ (ค) รูปแบบการแปรผลของรูปแบบแซนด์วิช

## 2.6 วัสดุเมมเบรนสำหรับแถบทดสอบ (Membrane materials)

เมมเบรนที่ใช้สำหรับแถบทดสอบเป็นอีกส่วนหนึ่งที่สำคัญของการทำแถบทดสอบ การเลือกใช้ชนิดของวัสดุเมมเบรนสำหรับประกอบแถบทดสอบขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยเช่น อัตราการไหล (Capillary flow rate) ความหนาของวัสดุ ลักษณะพื้นผิว และขนาดรูพรุนของวัสดุ รวมถึงประเภทของตัวอย่างที่นำมาทดสอบ ส่วนประกอบที่ใช้สำหรับแถบทดสอบประกอบด้วย 4 ส่วนหลักได้แก่ Sample pad, Conjugate pad, Analytical pad และ Absorbent pad

สมบัติของวัสดุที่นำมาใช้ทำ Sample pad ต้องมีอัตราการซึมผ่านของตัวอย่างที่สม่ำเสมอ ไม่จับกับสารที่ต้องการทดสอบ วัสดุที่นิยมนำมาใช้ได้แก่ คอตตอน (cotton) และ แผ่นใยแก้ว (glass fiber) ซึ่งการเลือกใช้ขึ้นอยู่กับปริมาตรรวมถึงประเภทของตัวอย่าง

Conjugate pad สมบัติของวัสดุที่นำมาใช้ ต้องมีอัตราการไหลของสารที่ตรงอย่างสม่ำเสมอ และไม่จับกับสารที่ใช้ตรงรวมถึงสารที่ต้องการทดสอบที่เคลื่อนที่ผ่านมาจาก Sample pad วัสดุที่นิยมนำมาใช้คือแผ่นใยแก้ว [27]

Analytical pad ถือเป็นส่วนสำคัญในการทำแถบทดสอบ เนื่องจากเป็นบริเวณที่เกิดปฏิกิริยา ซึ่งวัสดุที่นำมาใช้ต้องต้องง่ายต่อการจับและตรึงโปรตีนบนเมมเบรน และต้องมีความเหมาะสมต่อการเคลื่อนที่ของสารตรวจสอบ (detector reagent) นอกจากนั้นความเร็วในการเคลื่อนที่บนเมมเบรนของสารตัวอย่าง และสารตรวจสอบต้องมีความเหมาะสม วัสดุส่วนใหญ่ที่นำมาใช้คือ ไนโตรเซลลูโลส เนื่องจากเป็นวัสดุที่มีรูพรุนหลายขนาด ตั้งแต่ 0.05 ถึง 12 ไมครอน (ตารางที่ 2.5) นอกจากนั้นยังมีโพลิเมอร์ชนิดอื่นที่นำมาใช้ เช่น ไนลอน polyethersulfone หรือ polyethylene เป็นต้น [28]

สำหรับวัสดุที่นำมาใช้ทำ Absorbent pad ต้องมีอัตราการดูดซับที่ดี เนื่องจากเป็นส่วนสุดท้ายของแถบทดสอบทำหน้าที่ดูดซับสารตัวอย่างที่เหลือจากการเกิดปฏิกิริยาบน Analytical pad วัสดุที่นิยมนำมาใช้คือ คอตตอน (cotton)

ตารางที่ 2.5 สมบัติของไนโตรเซลลูโลสที่ใช้สำหรับแถบทดสอบ

Grad	Capillary rise (s/4cm)	Total caliper ( $\mu\text{m}$ )	Properties
AE 98	160–210	120	An unsupported membrane that gives good line intensity for use with low-viscosity samples
AE 99	120–160	120	A general-purpose membrane for use with most sample types giving a good combination of sensitivity with fast wicking
AE 100	90–120	120	A very fast wicking membrane for use with highly viscous samples

ที่มา: [27]

## 2.7 อนุภาคทอง (Colloidal gold)

อนุภาคทองมีการใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับเป็นตัวตรวจวัดชีวภาพ (biosensors) เนื่องจากสามารถสังเคราะห์ได้ง่าย กำหนดขนาดของอนุภาคได้ โดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมี และขั้นตอนการเชื่อมติดตัวตรวจวัดบนพื้นผิวของอนุภาคทองไม่ยุ่งยาก ลักษณะสีของอนุภาคทองสามารถวัดได้ง่ายโดยการวัดค่าดูดกลืนแสงเพื่อดูการเปลี่ยนแปลง (shift) ของความยาวคลื่นสูงสุด การสังเคราะห์อนุภาคทองสามารถทำได้หลายขนาด โดยการเพิ่ม หรือ ลด  $\text{Au}^{(3+)}$  ในสารละลายที่มี reducing agent อนุภาคทองมีการนำไปประยุกต์ใช้เป็นตัวตรวจวัดทางชีวภาพเพื่อใช้ในการตรวจติดตาม แถบทดสอบหรือ test strip เป็นอีกหนึ่งเทคนิคที่มีการนำอนุภาคทองมาใช้ โดยแอนติบอดีนี้จะเชื่อมติดบนพื้นผิวของอนุภาคทอง [29]

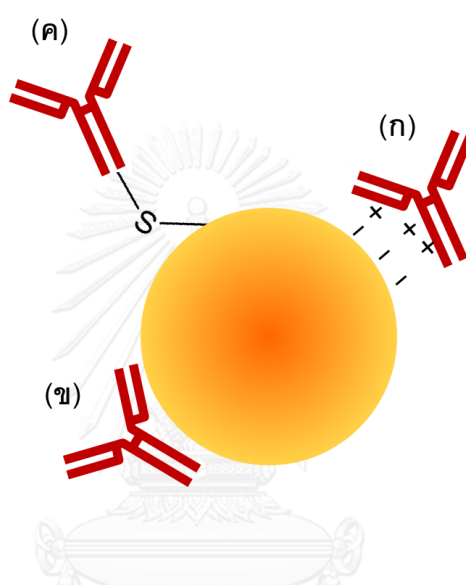
วิธีการเชื่อมติดบนพื้นผิวอนุภาคทองกับแอนติบอดีหรือโมเลกุลอื่นๆ มี 2 วิธีคือ วิธีทางกายภาพ (Physical) และวิธีทางเคมี (Chemical) โดยวิธีทางกายภาพในการเชื่อมติดแอนติบอดีกับอนุภาคทองมี 3 รูปแบบ

1) การเชื่อมติดด้วยประจุ (ionic attraction) โดยอาศัยระหว่างประจุลบของอนุภาคทอง และประจุบวกของแอนติบอดี

2) การเชื่อมติดด้วยแรงไฮโดรโฟบิก (hydrophobic attraction) ระหว่างแอนติบอดี และพื้นผิวของอนุภาคทอง

3) การเชื่อมติดด้วยแรงเดททิฟ (dative binding) หรือ พันธะโคออร์ดิเนตโควาเลนต์ โดยอาศัยอิเล็กตรอนระหว่างอนุภาคทองกับแอนติบอดี ที่มีโมเลกุลของซัลเฟอร์

วิธีทางเคมีในการเชื่อมติดระหว่างแอนติบอดีกับพื้นผิวของอนุภาคทองมีหลายวิธีด้วยกันเช่น การใช้เทคนิคการดูดซับทางเคมี (chemisorption) โดยผ่านทางอนุพันธ์ไทออล การใช้ตัวเชื่อมต่อบifunctional เช่น EDC/NSH หรือการใช้ adapter molecules เช่น Streptavidin และไบโอติน เป็นต้น [30]



ภาพที่ 2.6 แสดงการเชื่อมติดวิธีการเชื่อมติดบนพื้นผิวอนุภาคทองกับแอนติบอดีด้วยวิธีทางกายภาพ (ก) การเชื่อมติดด้วยประจุ (ionic attraction) (ข) การเชื่อมติดด้วยแรงไฮโดรโฟบิก (hydrophobic attraction) และ (ค) การเชื่อมติดด้วยแรงเดททิฟ (dative binding) [30]

## 2.8 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี 2011 ได้มีการพัฒนาชุดทดสอบ ELISA และ แลบทดสอบสำหรับตรวจวัด คลอเทรรา ไชคลิน ในเนื้อสัตว์ โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี ชุดทดสอบ ELISA สามารถตรวจวัด คลอเทรรา ไชคลินในเนื้อไก่ และตับไก่ได้ต่ำสุดเท่ากับ 0.06 และ 0.07 นาโนกรัมต่อกรัมตามลำดับ และมีค่า % recovery ในเนื้อไก่ และตับไก่เท่ากับ 78.8–92.2 % และ 80.3–90.2 % ตามลำดับ และมีค่า % CV ในเนื้อไก่ และตับไก่เท่ากับ 3.2–9.5 % และ 6.5–10.2 % ตามลำดับ สำหรับแลบทดสอบสามารถตรวจวัดคลอเทรราไชคลินในเนื้อไก่ และตับไก่ได้ต่ำสุดเท่ากับ 80 นาโนกรัมต่อกรัมและมีค่า %



recovery ในเนื้อไก่ และตับไก่เท่ากับ 79.0–88.6 % และ 75.2–87.0 % ตามลำดับ โดยประเมินผลภายในเวลา 5–10 นาที [31]

ต่อมาในปี 2015 มีการพัฒนาแถบทดสอบสำหรับตรวจวัด เทตราไซคลิน ในนํ้านม โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี รูปแบบปฏิกิริยาที่ใช้เป็นแบบแข่งขัน สามารถตรวจเทตราไซคลินต่ำสุดอยู่ในช่วง 60 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ถึง 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า % recovery อยู่ในช่วง 90–112 % [32]

และในปีเดียวกัน ได้มีพัฒนาชุดทดสอบ ELISA และแถบทดสอบสำหรับตรวจ เทตราไซคลิน ออกซีเทตราไซคลิน และ คลอเทตราไซคลิน ในนํ้านม และ นํ้าผึ้ง โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี ชุดทดสอบ ELISA สามารถตรวจเทตราไซคลิน ออกซีเทตราไซคลิน และ คลอเทตราไซคลิน ได้ต่ำสุดอยู่ในช่วง 0.26–2.00 ไมโครกรัมต่อลิตร มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.72, 0.32 และ 6.4 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีค่า % recovery ในนํ้านมเท่ากับ 82–102 %, 91–105 % และ 90–101 % ตามลำดับ ค่า % recovery ในนํ้าผึ้งเท่ากับ 88–101 %, 89–101 % และ 89–95 % ตามลำดับ สำหรับแถบทดสอบสามารถตรวจเทตราไซคลิน ออกซีเทตราไซคลิน และ คลอเทตราไซคลิน ในนํ้านมได้ต่ำสุดเท่ากับ 15, 15 และ 50 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และในนํ้าผึ้งเท่ากับ 40, 40 และ 40 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ [33]

ต่อมาในปี 2017 ได้พัฒนาแถบทดสอบสำหรับตรวจวัดออกซีเทตราไซคลินในนํ้านม โดยใช้รูปแบบของแถบทดสอบเป็นรูปแบบแข่งขัน แอนติบอดีที่ใช้เป็นโพลีโคลนอลแอนติบอดี แถบทดสอบสามารถตรวจวัดออกซีเทตราไซคลินในนํ้านมได้ต่ำสุดเท่ากับ 30 ไมโครกรัมต่อลิตร [34]

## บทที่ 3

### อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

#### 3.1 เซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย

เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ TC รหัส 12-3F ที่พัฒนาจากกลุ่มวิจัยการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์และการประยุกต์ใช้ สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี	แหล่งที่มา
• 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
• 40% formaldehyde	Carlo erba, France
• Acetic acid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
• BCA Protein Assay kit	Thermo Scientific, Rockford, Illinois
• Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
• Chlortetracycline hydrocholine (CTC)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
• Citric acid monohydrate	Sigma-Aldrich, Wien, Austria
• Colloidal gold 20 nm, 40 nm	Kestrel Biosciences Co, Ltd, Thailand
• Dimethylformamide (DMF)	Merck, Darmstadt, Germany
• Dimethylsulfoxide (DMSO)	Merck, Darmstadt, Germany
• Di-sodium hydrogen phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Merck, Darmstadt, Germany
• Doxycycline	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
• Fetal calf serum (FCS)	Biochrom, Berlin, Germany
• Glucose	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
• Goat anti mouse IgG (GAM)	Jackson Immuno, West Grove, Pennsylvania

สารเคมี	แหล่งที่มา
• Goat anti mouse IgG-Horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP)	Jackson Immuno, West Grove, Pennsylvania
• Hydrochloric acid (HCl)	Merck, Darmstadt, Germany
• Hydrogen peroxide (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Fluka, Switzerland
• ISF-1 serum free media	Biochrom GmbH, Berlin, Germany
• L-glutamine	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
• MES monohydrate	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
• Ovalbumin (OVA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
• Oxytetracycline hydrochlorid (OTC)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
• Potassium citrate	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
• RPMI 1640 medium	Biochrom, Berlin, Germany
• Skim milk	HiMedia Laboratories, Mumbai, India
• Sodium acetate	Merck, Darmstadt, Germany
• Sodium bicarbonate (NaHCO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
• Sodium carbonate (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt, Germany
• Sodium chloride (NaCl)	Merck, Darmstadt, Germany
• Sodium citrate	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
• Sodium dihydrogen phosphate (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Carlo Erba, Milan, Italy
• Sodium hydroxide (NaOH)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
• Sodium pyruvate	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
• Sodium tetraborate	Riedel-de Haën, Seelze, Germany
• Sucrose	Ajax Finechem, New south wales, Australia
• Sulfuric acid (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt, Germany
• Tetracycline hydrochlorine (TC)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
• Thimerosal	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

สารเคมี	แหล่งที่มา
• Tween-20	Sigma-Aldrich, Gllinyham, UK

### 3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
• กระจกบอกลีดาขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร	Nipro, Autthaya, Thailand
• กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ	Nikon, Tokyo, Japan
• ขวดแก้ว	Boro. Germany
• คอลัมน์โปรตีน จี เอชพี (HiTrap Protein G HP)	GE Healthcare, Sweden
• เครื่อง Microtiterplate reader	Titertek multiskan, Helsinki, Finland
• เครื่องกวนสารละลาย	IKA Work, Wilmington, North Carolina
• เครื่องเย้าสาร	Corning, USA
• เครื่องชั่งหยาบและละเอียด	Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland
• เครื่องตัดแถบทดสอบ Matrix Program able Shear รุ่น 2360	Kinematic Automachine, CA, USA
• เครื่องทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ (ÄKTA start)	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden
• เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ รุ่น 5430 R	Eppendorf, Hamburg, Germany
• เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ รุ่น universal 320	Hettich, Tuttlingen, Germany
• เครื่องผสมสารละลาย	Scientific Industries, Boulder, Colorado
• เครื่องวัดความเป็นกรดเบส	Fisher Scientific, UE Tech Park, Singapore

เครื่องมือและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
• เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง รุ่น Synergy HT	BIO-TEK, Richmond, Virginia
• เครื่องพ่น IsoFlo Flatbed Dispenser	Imagine technology, USA
• งานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม	Costar, USA
• งานเพาะเลี้ยงเซลล์ ขนาด 90 มิลลิเมตร	Sterilin Ltd., Newport, UK
• ตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์	Yamato, Tokyo, Japan
• ตู้ปลอดเชื้อ	Lab Survice Ltd., Bangkok, Thailand
• ตู้อบลมร้อน	Memmert, Schwabach, Germany
• ถังแช่แข็งเซลล์ไนโตรเจนเหลว	Harsco Corp., Camp Hill, Pennsylvania
• ถังไตอะไลซิส ขนาด 12,000-14,000 ดาลตัน	Membrane Filtration Products, Seguin, Texas
• โถดูดความชื้น	Duran group, Mainz, Germany
• ทิปขนาด 10, 200, 300, 1000, 5000 และ 10,000 ไมโครลิตร	Axygen, Union City, California
• ปีเปตมัลติแชนแนล ขนาด 300 ไมโครลิตร	HTL, Warsaw, Poland
• ปีเปตอัตโนมัติ ขนาด 10, 200, 300, 1000, 5000 และ 10,000 ไมโครลิตร	Eppendorf, Hamburg, Germany
• หลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร	Axygen, Union City, California
• หลอดทดลองขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร	Axygen, Union City, California
• หลอดสำหรับแช่แข็งเซลล์	Nunc, Roskilde, Denmark
• อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ	Memmert, Schwabach, Germany

### 3.3 วัสดุสำหรับทำแถบทดสอบ

วัสดุ	แหล่งที่มา
• ตลับพลาสติกสำหรับแถบทดสอบ (Plastic cassette)	DCN, Carlsbad, California
• ไนโตรเซลลูโลส เออี 99 (Nitrocellulose membrane AE 99)	Whatman, Kent, UK
• แผ่นคอตตอน ซีเอฟ 7 (Cotton linter CF 7)	Whatman, Kent, UK
• แผ่นใยแก้ว จีเอฟ 33 (Fiberglass GF 33)	Whatman, Kent, UK
• แผ่นใยแก้ว สแตนดาร์ด 17 (Standard 17)	Whatman, Kent, UK
• แผ่นรองพลาสติก (Plastic backing card)	DCN, Carlsbad, California

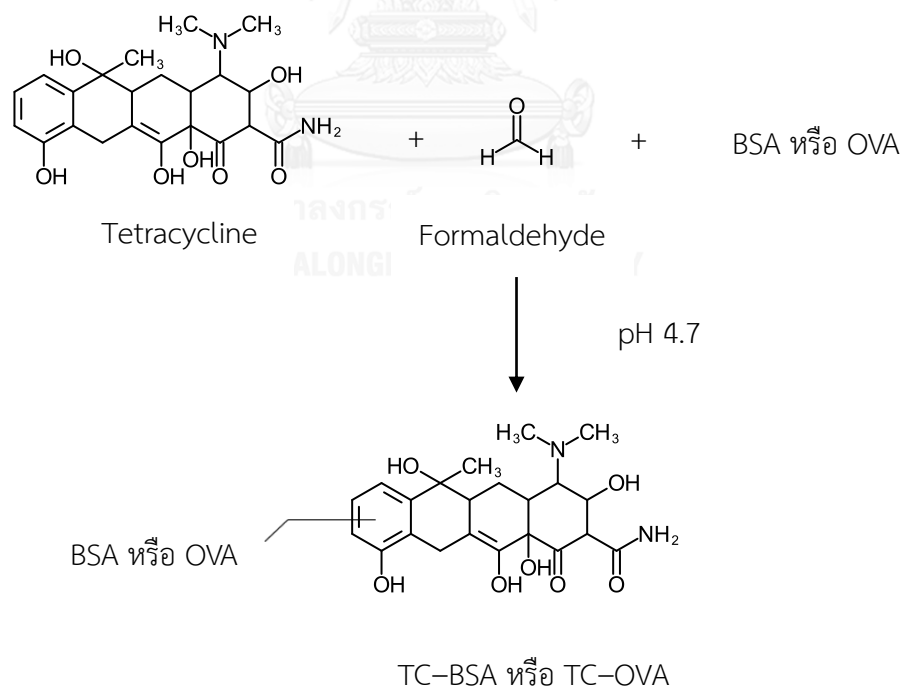


### 3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

#### 3.4.1 การเชื่อม TC กับโปรตีนพาหะ (BSA และ OVA)

3.4.1.1 การเตรียม TC เชื่อมกับโปรตีนพาหะ (TC-BSA และ TC-OVA) โดยใช้ปฏิกิริยา Mannich (ภาพที่ 3.1)

เตรียมสารละลาย BSA และ OVA โดยชั่ง BSA หรือ OVA 10 มิลลิกรัม นำมาละลายใน 0.1 M MES, pH 4.7 ที่มี 0.15 M NaCl ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาผสมกับสารละลาย TC ที่ละลายในน้ำกลั่นความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติม Formaldehyde ความเข้มข้น 37 % (v/v) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำโดยอะไลซิสใน phosphate buffer saline, pH 7.4 (PBS) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์วันละ 2 ครั้ง นำมาวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA Protein Assay kit ดังแสดงในข้อ 3.4.1.3



ภาพที่ 3.1 การเชื่อม TC กับโปรตีนพาหะ BSA และ OVA โดยใช้ปฏิกิริยา Mannich [35]

3.4.1.2 การหาอัตราส่วนโมเลกุลการเชื่อมติด (molar ratio) ของ TC ที่เชื่อมต่อกับ BSA และ OVA

นำสารละลาย TC, BSA, OVA, TC-BSA และ TC-OVA มาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 200–400 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณหาอัตราส่วนการเชื่อมติดของ TC ที่เชื่อมต่อกับ BSA และ OVA จากค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง (absorbance coefficient;  $\epsilon$ ) โดยใช้สมการ

$$\text{โมเลกุลการเชื่อมติด TC กับ โปรตีนพาหะ} = \frac{\epsilon_{\text{TC โปรตีนพาหะ}} - \epsilon_{\text{โปรตีนพาหะ}}}{\epsilon_{\text{TC}}}$$

ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงหาได้จากสมการ เบียร์ และ แลมเบิร์ต (Beer-Lambert law) :

$A = \epsilon cl$  เมื่อ  $A$  คือ ค่าดูดกลืนแสงของสาร  $c$  คือ ความเข้มข้นเป็น โมลต่อลิตร หรือโมลาร์ (M) และ  $l$  = ระยะทางที่แสงผ่านตัวอย่างเป็นเซนติเมตร [36]

### 3.4.1.3 การวัดปริมาณโปรตีน

ทำการหาปริมาณโปรตีนของ BSA และ OVA ที่เชื่อมต่อกับ TC ด้วยวิธี BCA Protein Assay kit โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานโปรตีน BSA ให้มีความเข้มข้นเป็น 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย PBS และเจือจางสารละลายตัวอย่าง จากนั้นเตรียมสารละลายที่ใช้เกิดปฏิกิริยาโดยผสมสารละลาย A และ สารละลาย B ในอัตราส่วน 50 : 1 (v/v) ปิเปตสารละลายมาตรฐานโปรตีน BSA และตัวอย่างที่เตรียมไว้ลงในจานทดสอบชนิด 96 หลุม หลุมละ 25 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายที่ใช้เกิดปฏิกิริยา หลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันและนำไปปมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร และทำการหาปริมาณโปรตีนของสารละลายตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน



### 3.4.2 การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb)

#### 3.4.2.1 การเพิ่มปริมาณ MAb

นำหลอดที่เก็บเซลล์ไฮบริโดมารหัสโคลน 12-3F [6] ที่มีความจำเพาะต่อ TC ออกมาจากถังไนโตรเจนเหลว จากนั้นนำมาละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ทันที เมื่อน้ำยาแช่แข็งละลายหมด ถ่ายเซลล์ลงหลอดทดลองที่มีอาหาร RPMI 1640 และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 380 x g เป็นเวลา 5 นาที เทอาหารเลี้ยงเซลล์ด้านบนทิ้ง นำตะกอนเซลล์มาเลี้ยงในอาหาร RPMI 1640 ที่มี Fetal calf serum (FCS) ความเข้มข้น 10 % (v/v) โดยเลี้ยงในตู้ควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นเริ่มเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์จากที่มี FCS ไปเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี FCS จนกระทั่งได้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี MAb ปริมาตร 500 มิลลิลิตร จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 380 x g เป็นเวลา 5 นาที แยกส่วนของตะกอนเซลล์ทิ้งไปและเก็บส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี MAb เพื่อนำ MAb ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป

#### 3.4.2.2 การทำ MAb ให้บริสุทธิ์

การทำ MAb ให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography นำอาหารเลี้ยงเซลล์มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography โดยใช้คอลัมน์สำเร็จรูป HiTrap Protein G HP นำคอลัมน์ต่อเข้ากับเครื่องทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ (ÄKTA start) ล้างเอทานอลออกด้วย น้ำกลั่น (DDI) ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ โดยปรับอัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นล้างน้ำกลั่นออกด้วย 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร (ปริมาตร 500 มิลลิลิตร) เติมนลงในคอลัมน์ ล้างโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ออกด้วย 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ ซะ MAb ที่จับกับคอลัมน์ออกด้วย 0.1 M glycine-HCl buffer, pH 2.7 ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร เก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์หลอดละ 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่มีการเติม 1 M Tris-HCl buffer, pH 9.0 หลอดละ 120 ไมโครลิตร เพื่อปรับค่าความเป็นกรดเบสให้เป็นกลาง นำสารละลายในแต่ละแฟรกชันไปทดสอบ indirect ELISA (iELISA) ตามข้อ 3.4.2.3 จากนั้นรวบรวมแฟรกชัน (fraction) ที่มีพีคร่วมกันเข้าไว้ด้วยกันมา และนำมาเติม thymersal ความเข้มข้น 0.01 % (v/v) จากนั้นนำ

แอนติบอดีที่ได้ มาหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA Protein Assay kit โดยทำตามวิธีการในข้อ  
3.4.1.3 แบ่งใส่หลอดละ 500 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4.2.3 การเก็บเซลล์ไฮบริโดมาในไนโตรเจนเหลว และการทดสอบการสร้าง MAb  
ที่จำเพาะต่อ TC หลังการทำให้บริสุทธิ์

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากข้อ 3.4.2.1 มาเลี้ยงในอาหาร RPMI 1640 ที่มี  
10 % (v/v) FCS จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนที่ความเร็ว ที่  $380 \times g$  เป็นเวลา 5 นาที  
เป็นเวลา 5 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อยู่ด้านบนทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี  
Dimethylsulfoxide (DMSO) ความเข้มข้น 10 % (v/v) ขณะเย็นลงไปปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใช้ปิเปต  
ดูดขึ้นลงจนเซลล์ผสมเข้ากัน จากนั้นถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ลงในหลอดเก็บเซลล์ขนาด 2 มิลลิลิตร  
และนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วย้ายลงแช่ในไนโตรเจนเหลวที่มี  
อุณหภูมิประมาณ -196 องศาเซลเซียส

นำสารละลายแต่ละแฟรกชัน ในข้อ 3.4.2.2 มาทดสอบการสร้าง MAb ที่  
จำเพาะต่อ TC ด้วยวิธี indirect ELISA (iELISA) ทำการเคลือบจานทดสอบชนิด 96 หลุม ด้วย TC-  
BSA หรือ TC-OVA ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4  
องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS ที่มี 0.05 % (v/v) Tween (PBS-T) 3  
ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนยความเข้มข้น 5 % (w/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส  
เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง เติมสารละลายแต่ละแฟรกชันที่ระดับการเจือจาง  
1/1,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย  
PBS-T 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิ goat anti mouse IgG ที่เชื่อมกับเอนไซม์ horseradish  
peroxidase (GAM-HRP) ที่ระดับการเจือจาง 1/ 10,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37  
องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรตที่  
ประกอบด้วย TMB และ  $H_2O_2$  ที่ละลายใน 205 mM potassium citrate buffer, pH 4.0 หลุมละ  
100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 M  $H_2SO_4$  หลุมละ  
100 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microtiterplate  
reader

3.4.3 การเตรียม MAb เชื่อมติดกับอนุภาคทอง (Colloidal gold) ขนาด 20 และ 40 นาโนเมตร (MAb-Colloidal gold)

3.4.3.1 การหาความเข้มข้นของ MAb ที่เหมาะสมในการเชื่อมติดกับ Colloidal gold

นำสารละลาย Colloidal gold ขนาด 20 และ 40 นาโนเมตรมาปรับค่า pH ด้วย 0.2 M sodium carbonate ให้เท่ากับ 8.2 และนำ MAb ในข้อ 3.4.2.2 มาเจือจางใน 2 mM sodium borate buffer, pH 8.2 (BB) ให้มีความเข้มข้น 0–1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติม MAb ที่เจือจางแล้วลงในจานทดสอบชนิด 96 หลุม หลุมละ 20 ไมโครลิตร เติมน้ำ สารละลาย Colloidal gold ที่ปรับค่า pH แล้วลงไปในหลุมที่มี MAb หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มที่ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำ สารละลาย NaCl ความเข้มข้น 10 % (w/v) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ความเข้มข้นของ MAb ที่เหมาะสม พิจารณาจากความเข้มข้นของ MAb ที่ต่ำที่สุด ที่ทำให้ค่าดูดกลืนแสงสูงที่สุด จากนั้น เตรียม MAb ที่ทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ในข้อ 3.4.3.2 ต่อไป [33, 37]

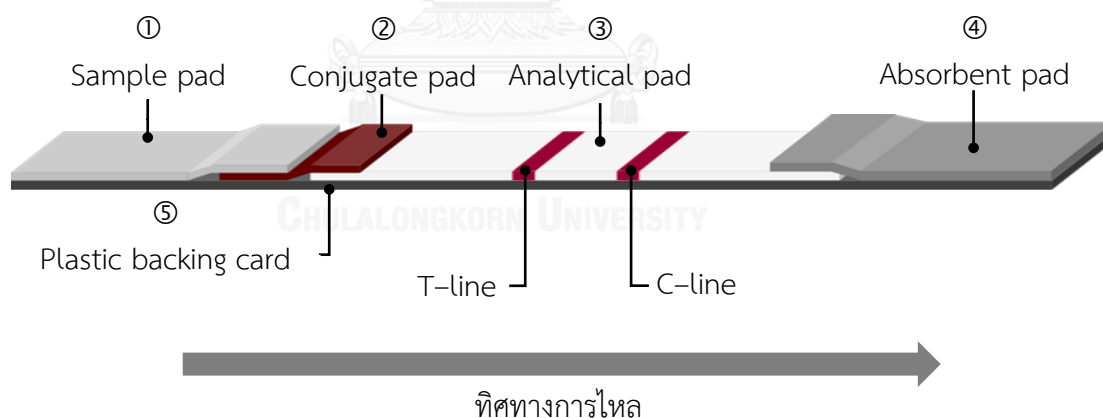
3.4.3.2 การเชื่อมติด MAb กับอนุภาคทอง (MAb-Colloidal gold)

เติม MAb ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.3.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใน สารละลาย Colloidal gold ที่ pH 8.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1 : 10) เขย่าที่ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำ สารละลาย BSA 5 % (w/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน สารละลาย MAb-Colloidal gold และเขย่าต่อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำ สารละลาย MAb-Colloidal gold ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 25,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้งไป นำตะกอน MAb-Colloidal gold มาละลายกลับด้วย 2 mM BB, pH 8.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เพื่อล้างส่วนที่ไม่เชื่อมติดกับอนุภาค ทองออก โดยทำการล้างทั้งหมด 3 ครั้ง จากนั้นนำส่วนตะกอน MAb-Colloidal gold มาละลาย กลับด้วย 2 mM BB, pH 8.2 ที่มี น้ำตาลซูโครส 2 % (w/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำไปวัดค่า ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420–700 นาโนเมตร แบ่งใส่หลอดละ 100 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืดก่อนนำมาใช้งาน

### 3.4.4 การเตรียมส่วนประกอบของแถบทดสอบ (Immunochromatographic Assay; ICA)

เนื่องจาก TC เป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก จึงเตรียมแถบทดสอบ (ICA) โดยเลือกใช้รูปแบบการไหลในแนวระนาบ (Lateral Flow Immunochromatographic Assay; LFIA) และรูปแบบการเกิดปฏิกิริยาใช้รูปแบบแข่งขัน (Competitive assay format) โดยมีส่วนประกอบหลักทั้งหมด 5 ส่วน (ภาพที่ 3.2)

- 1) แผ่นรับตัวอย่าง (Sample pad)
- 2) แผ่นตรึง MAb-Colloidal gold (Conjugate pad)
- 3) แผ่นวิเคราะห์ตัวอย่าง (Analytical pad) ประกอบด้วย
  - เส้นทดสอบ (Test line; T-line)
  - เส้นควบคุม (Control line; C-line)
- 4) แผ่นดูดซับตัวอย่าง (Absorbent pad)
- 5) แผ่นรองพลาสติก (Plastic backing card)



ภาพที่ 3.2 แสดงส่วนประกอบทั่วไปของแถบทดสอบ (1) แผ่นรับตัวอย่าง (Sample pad) (2) แผ่นตรึง MAb-Colloidal gold (Conjugate pad) (3) แผ่นวิเคราะห์ตัวอย่าง (Analytical pad) ประกอบด้วย เส้นทดสอบ (Test (T)-line) และ เส้นควบคุม (Control (C)-line) และ (4) แผ่นดูดซับตัวอย่าง (Absorbent pad)

#### 3.4.4.1 การเตรียม Sample pad และ Absorbent pad

นำแผ่น standard 17 และ CF 7 มาตัดให้มีขนาด 4×17 มิลลิเมตร ตามลำดับ จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เก็บในโถดูดความชื้น ก่อนนำมาใช้งาน

#### 3.4.4.2 การเตรียม Conjugate pad

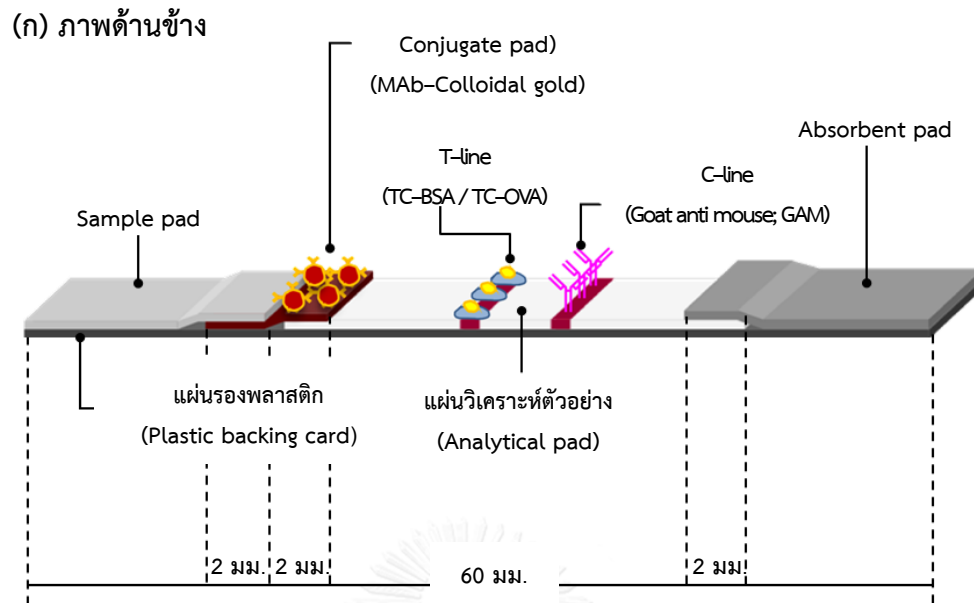
นำแผ่นใยแก้ว GF 33 มาบดด้วยสารละลาย BSA ความเข้มข้น 1 % (w/v) ในสารละลาย 0.1 % PB-T เป็นเวลา 15 นาที และนำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาตัดให้มีขนาด 4×10 มิลลิเมตร เก็บในโถดูดความชื้นก่อนนำมาใช้งาน

#### 3.4.4.3 การเตรียม Analytical pad

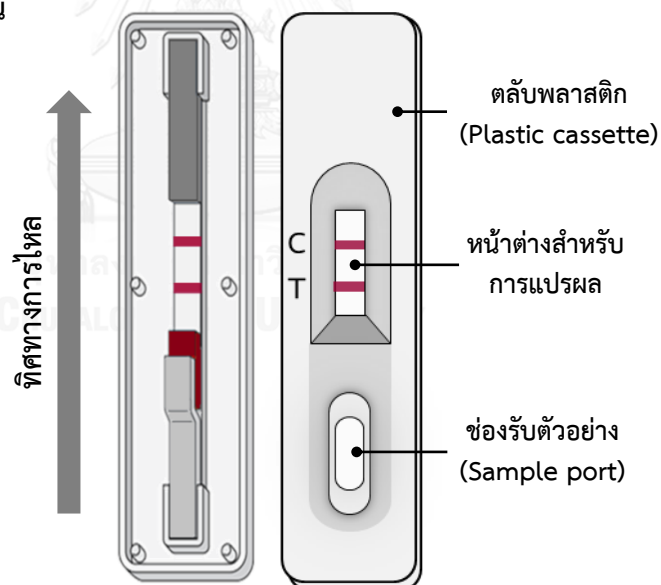
นำแผ่นไนโตรเซลลูโลส AE 99 นำมาตัดให้มีขนาด 4×25 มิลลิเมตร และนำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเก็บในโถดูดความชื้นก่อนนำมาใช้งาน

#### 3.4.4.4 การประกอบแถบทดสอบ TC

นำส่วนประกอบในหัวข้อ 3.4.3 เริ่มจากนำ Analytical pad ที่มีการประทับหรือพ่นด้วย TC-BSA หรือ TC-OVA ที่บริเวณ T-line และประทับหรือพ่น GAM ที่บริเวณ C-line ติดลงแผ่นรองพลาสติก (Plastic backing card) จากนั้นนำ Conjugate pad ที่มีการหยดหรือพ่น MAb-Colloidal gold ติดลงไป โดยให้ด้านบนเกยทับ Analytical pad ประมาณ 2 มิลลิเมตร นำ Sample pad ติดลง Plastic backing card โดยให้ด้านบนเกยทับ Conjugate pad ประมาณ 2 มิลลิเมตร และนำ Absorbent pad ติดลง Plastic backing card อีกด้านหนึ่งให้ปลายด้านล่างทับบน Analytical pad ประมาณ 2 มิลลิเมตร แสดงดังภาพที่ 3.3 ก. จากนั้นนำแถบทดสอบที่ประกอบเสร็จแล้วใส่ลงในตลับพลาสติก (Plastic cassette) แสดงดังภาพที่ 3.3 ข.



(ข) ภาพด้านบน

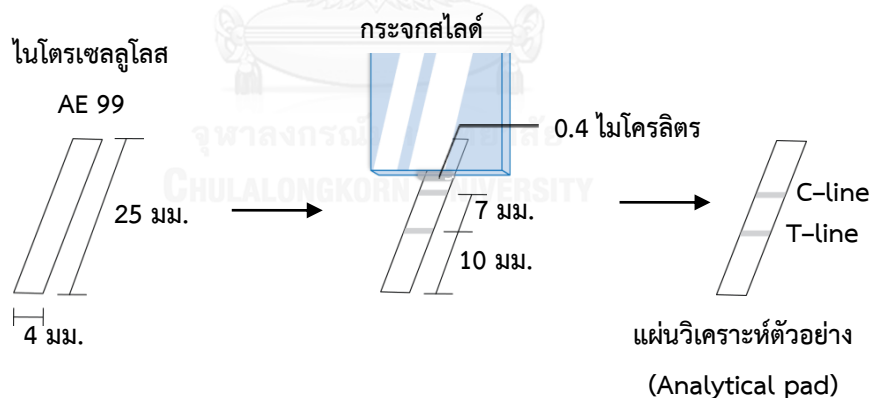


ภาพที่ 3.3 (ก) การประกอบแถบทดสอบบนแผ่นรองพลาสติก (Plastic backing card) (ข) แถบทดสอบที่ประกอบเสร็จแล้ว ในตลับพลาสติก (Plastic cassette)

### 3.4.5 การหาสถานะที่เหมาะสมของแถบทดสอบ TC

3.4.5.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ TC-BSA และ TC-OVA ในการตรึงลงบนบริเวณ T-line ด้วยวิธีการทำด้วยมือ

นำไนโตรเซลลูโลส AE 99 ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.4.4.3 มาตรึงด้วย TC-BSA ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ TC-OVA ความเข้มข้น 1, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร ที่บริเวณ T-line และตรึงสารละลาย goat anti mouse IgG (GAM) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร บริเวณ C-line ตามลำดับ โดยใช้ปิเปตหยดสารลงบนสันของกระดาษไลต์และประทับลงไป ดังแสดงในภาพที่ 3.4 จากนั้นนำไนโตรเซลลูโลส AE 99 ไปบล็อกด้วยสารละลาย BSA 1 % (w/v) ในสารละลาย 0.1 % PB-T เป็นเวลา 15 นาที นำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง



ภาพที่ 3.4 การตรึง T-line และ C-line บน Analytical pad ด้วยการประทับโดยใช้กระดาษไลต์

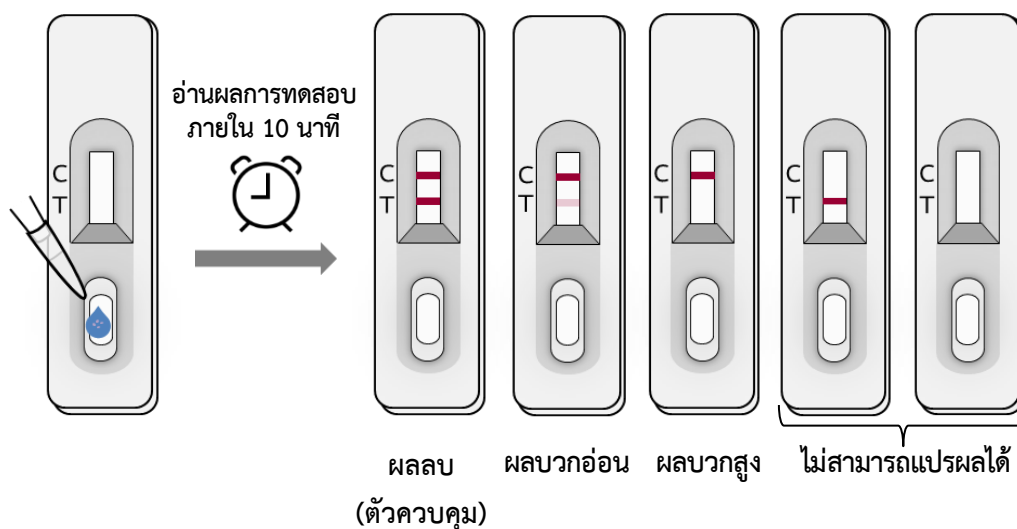
### 3.4.5.2 การหาระดับการเจือจางที่เหมาะสมของ MAb-Colloidal gold

นำสารละลาย MAb-Colloidal gold ขนาด 20 และ 40 นาโนเมตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นใยแก้ว GF 33 ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.4.4.2 ที่ระดับการเจือจาง 1/1, 1/2, 1/3 และ 1/4 ตามลำดับ

### 3.4.6 วิธีการทดสอบและการแปรผลของแถบทดสอบ

หลังจากนำส่วนประกอบทั้งหมดติดลงบน Plastic backing card และใส่ใน Plastic cassette แล้ว นำมาทดสอบโดยใส่ Negative buffer หรือ Positive buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในช่องรับตัวอย่าง สารละลายตัวอย่างจะเคลื่อนที่ไปยังบริเวณ Conjugate pad ถ้าในสารละลายตัวอย่างมีสารที่ต้องการทดสอบ MAb-Colloidal gold จะจับกับสารทดสอบ จากนั้นเคลื่อนที่ไปยังบริเวณ T-line ซึ่งเป็นบริเวณที่ถูกตรึงด้วยแอนติเจน เนื่องจาก MAb-Colloidal gold เหลือไม่พอสำหรับจับกับแอนติเจนบริเวณ T-line จึงไม่ปรากฏแถบสีที่บริเวณ T-line MAb-Colloidal gold ที่จับสารทดสอบจะเคลื่อนที่ไปบริเวณ C-line ซึ่งบริเวณนี้ถูกตรึงด้วย Goat anti mouse (GAM) MAb-Colloidal gold จึงถูกจับที่บริเวณนี้จึงปรากฏเป็นแถบสีที่บริเวณ C-line การแปรผล ถ้าบริเวณ Analytical pad ปรากฏแถบสีที่บริเวณ C-line แถบเดียว แสดงว่าให้ผลบวก (Positive) สารละลายตัวอย่างมีสารที่ต้องการทดสอบ ในทางกลับกันถ้าบริเวณ Analytical pad ปรากฏแถบสี 2 แถบที่บริเวณ T-line และ C-line แสดงว่าให้ผลลบ (Negative) สารละลายตัวอย่างไม่มีสารที่ต้องการทดสอบ ในกรณีที่แถบทดสอบปรากฏแถบสีแถบเดียวที่บริเวณ T-line หรือไม่ปรากฏแถบสีเลย แสดงว่าแถบทดสอบมีปัญหาไม่สามารถแปรผลได้เนื่องจากหลายสาเหตุเช่น T-line C-line และ MAb-colloidal gold มีการเสื่อม หรือเสียสภาพ หรือแถบทดสอบหมดอายุ เป็นต้น ดังแสดงในภาพที่ 3.5





ภาพที่ 3.5 รูปแบบการแปลผล

#### 3.4.6.1 การหาค่าความไว (Sensitivity)

นำแถบทดสอบมาทดสอบด้วยสารละลายมาตรฐาน TC ที่ความเข้มข้น 0, 0.01, 0.1, 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร วิเคราะห์ผลการทดสอบภายในเวลา 10 นาที ด้วยสายตา และถ่ายภาพแถบทดสอบภายใต้กล้องควบคุมแสง ช่วงการวัดของแถบทดสอบ (Visual detection range) และค่าขีดจำกัดของการวัดของแถบทดสอบ (Visual limit of detection; VLOD) รายงานค่าเป็นความเข้มข้นของ TC ที่น้อยที่สุดที่ทำให้ความเข้มสีของ T-line เริ่มจางลงและจางหายไปเมื่อเทียบกับความเข้มสี T-line ตัวควบคุม

#### 3.4.7 การหาสภาวะที่เหมาะสมของแถบทดสอบด้วยเครื่องมือ (บริษัท เซิร์ฟ โซเนนซ์ จำกัด)

3.4.7.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ TC-BSA ในการตรึงลงบนบริเวณ T-line โดยใช้เครื่องพ่นสารระดับไมโครลิตร

เตรียมไนโตรเซลลูโลส AE 99 ตัดให้มีขนาด 2.5×30 เซนติเมตร และอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาติดลงบน Plastic backing card และนำไปพ่นสารละลาย TC-BSA ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 และ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และพ่นสารละลาย GAM ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยเครื่อง IsoFlo Flatbed

Dispenser โดยใช้หัวจ่ายระบบแบบลากสัมผัส (Low Contact Pressure) อัตราการพ่น 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร ที่บริเวณ T-line และ C-line ตามลำดับ จากนั้นนำไปบล็อกด้วย สารละลาย BSA 5 % (w/v) เป็นเวลา 15 นาที อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และตัดให้มีขนาด 4 มิลลิเมตรด้วยเครื่องตัดแถบทดสอบ Matrix Program able Shear รุ่น 2360 (บริษัท เซิร์ฟ ไฮเอนซ์ จำกัด) นำแถบทดสอบที่ตัดแล้วจากบริษัท มาประกอบกับ Conjugate pad ที่หยดด้วย MAb-Colloidal gold ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นนำ Sample pad และ Absorbent pad ติดลงบน Plastic backing card และใส่ใน Plastic cassette ด้วยมือ ตามภาพที่ 3.4 นำมาทดสอบด้วยสารละลาย 0.1 % PB-T ปริมาตร 100 ไมโครลิตร วิเคราะห์ผลการทดสอบ ภายในเวลา 10 นาที ด้วยสายตา ถ่ายภาพแถบทดสอบภายใต้กล้องควบคุมแสง และนำไปอ่านค่า ความเข้มสีด้วยโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ รุ่น 1.47m

#### 3.4.7.2 การหาระดับการเจือจางที่เหมาะสมของ MAb-Colloidal gold ในการ หยดลงบน Conjugate pad

นำสารละลาย MAb-Colloidal gold ขนาด 20 หรือ 40 นาโนเมตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นใยแก้ว GF 33 ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.4.4.2 ที่ระดับการเจือจาง 1/1, 1/2, 1/3 และ 1/4 ตามลำดับ นำมาประกอบกับแถบทดสอบที่ทราบความเข้มข้นที่เหมาะสม ของ TC-BSA ที่ได้จากข้อ 3.4.7.1 จากนั้นนำ Sample pad และ Absorbent pad ติดลงบน Plastic backing card และใส่ใน Plastic cassette ด้วยมือ ดังภาพที่ 3.4 และนำมาทดสอบด้วย สารละลาย 0.1 % PB-T ปริมาตร 100 ไมโครลิตร วิเคราะห์ผลการทดสอบภายในเวลา 10 นาที ด้วยสายตา ถ่ายภาพแถบทดสอบภายใต้กล้องควบคุมแสง และนำไปอ่านค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรม อ่านค่าสี ImageJ รุ่น 1.47m

#### 3.4.7.3 การหาค่าความไว (Sensitivity)

นำแถบทดสอบที่ทราบความเข้มข้นของ TC-BSA และระดับการเจือจาง ของ MAb-Colloidal gold ที่เหมาะสม มาประกอบกับ Sample pad และ Absorbent pad จากนั้นใส่ใน Plastic cassette ด้วยมือ ดังภาพที่ 3.4 นำแถบทดสอบมาทดสอบด้วยสารละลาย มาตรฐาน TC ที่ความเข้มข้น 0-80 นาโนกรัมกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลาย 0.1 % PB-T ปริมาตร 100 ไมโครลิตร วิเคราะห์ผลการทดสอบภายในเวลา 10 นาที ด้วยสายตา และถ่ายภาพแถบทดสอบ

ภายใต้กล้องควบคุมแสง นำไปอ่านค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ รุ่น 1.47m ค่าช่วงความไว (Visual detection range) และค่า VLOD ของแถบทดสอบรายงานค่าเป็นความเข้มข้นของ TC ที่น้อยที่สุดที่ทำให้ความเข้มสีของ T-line เริ่มจางลงและจางหายไปเมื่อเทียบกับความเข้มสี T-line ตัวควบคุม

#### 3.4.7.4 การหาค่าความจำเพาะ (Specificity)

ประเมินการทดสอบด้วยปฏิกิริยาข้ามกับสารปฏิชีวนะในกลุ่ม TCs และสารปฏิชีวนะนอกกลุ่ม TCs โดยนำแถบทดสอบที่ทราบความเข้มข้นของ TC-BSA และระดับการเจือจางของ MAb-Colloidal gold ที่เหมาะสม มาทดสอบกับสารในกลุ่ม TCs (Oxytetracycline; OTC, Chlortetracycline; CTC และ Doxycycline; DOX) ความเข้มข้น 0-80 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลาย 0.1 % PB-T และทดสอบกับสารนอกกลุ่ม (chloramphenicol, norfloxacin และ gentamycin) ความเข้มข้น 1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลาย 0.1 % PB-T วิเคราะห์ผลการทดสอบภายในเวลา 10 นาที ด้วยสายตา และถ่ายภาพแถบทดสอบภายใต้กล้องควบคุมแสง

#### 3.4.8 การประเมินการใช้แถบทดสอบ TC กับตัวอย่างน้ำฝิ่ง

หลังจากหาความเข้มข้นของ TC-BSA และระดับการเจือจางของ MAb-Colloidal gold ที่เหมาะสมแล้ว ทำการเตรียมแถบทดสอบ TC สำเร็จรูป โดยพ่นสารละลาย TC-BSA ที่ทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย และสารละลาย GAM ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยเครื่อง IsoFlo Flatbed Dispenser โดยใช้หัวจ่ายระบบแบบลากสัมผัส (Low Contact Pressure) อัตราการพ่น 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร ที่บริเวณ T-line และ C-line ตามลำดับ จากนั้นพ่นสารละลาย MAb-Colloidal gold ที่ระดับการเจือจางที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.4.7.2 ลงแผ่นใยแก้ว GF 33 ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.4.4.2 ด้วยอัตราการพ่น 5 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร ด้วยเครื่อง IsoFlo Flatbed Dispenser โดยใช้หัวจ่ายระบบแบบไม่สัมผัส (Atomizing nozzle) นำแต่ละส่วนที่เตรียมไว้ติดลงบน Plastic backing card ตามด้วย Sample pad และ Absorbent pad ตัดให้มีขนาด 4 มิลลิเมตรด้วยเครื่องตัดแถบทดสอบ Matrix Program able Shear รุ่น 2360 (บริษัท เซิร์ฟ ไฮเอนซ์ จำกัด) นำแถบทดสอบที่ตัดแล้วใส่ตลับพลาสติก บรรจุในซองพอยล์และปิดผนึก

### 3.4.8.1 ศึกษาผลของเมทริกซ์ (Matrix effect) ในตัวอย่างน้ำฝิ่ง

เจือจางน้ำฝิ่งให้มีระดับการเจือจาง 1/2, 1/5 และ 1/10 (w/v) โดยชั่งน้ำฝิ่ง 1 กรัม ลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 0.1 % PB-T 1, 4 และ 9 มิลลิลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปิเปตสารละลายน้ำฝิ่งปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาทดสอบกับแถบทดสอบในข้อ 3.4.9 วิเคราะห์ผลการทดสอบภายในเวลา 10 นาที ด้วยสายตา และถ่ายภาพแถบทดสอบภายใต้กล้องควบคุมแสง

### 3.4.8.2 การหาค่าความไว (Sensitivity) ในตัวอย่างน้ำฝิ่ง

เตรียมตัวอย่างน้ำฝิ่งที่ทราบระดับการเจือจางที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.8.1 นำมาเติม TC ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปิเปตสารละลายน้ำฝิ่งปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาทดสอบกับแถบทดสอบในข้อ 3.4.8 วิเคราะห์ผลการทดสอบภายในเวลา 10 นาที ด้วยสายตา และถ่ายภาพแถบทดสอบภายใต้กล้องควบคุมแสง นำไปอ่านค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ รุ่น 1.47m ค่าช่วงความไว (Visual detection range) และค่า VLOD ของแถบทดสอบรายงานค่าเป็นความเข้มสีของ TC ที่น้อยที่สุดที่ทำให้ความเข้มสีของ T-line เริ่มจางลงและจางหายไปเมื่อเทียบกับความเข้มสี T-line ตัวควบคุม

### 3.4.8.3 การหาค่าความถูกต้อง (Accuracy) และความแม่นยำ (Precision) ของแถบทดสอบในตัวอย่างน้ำฝิ่ง

นำตัวอย่างน้ำฝิ่งที่ได้จากการเตรียมในข้อ 3.4.8.1 มาเติม TC ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรมาทดสอบกับแถบทดสอบ วิเคราะห์ผลการทดสอบภายในเวลา 10 นาที ด้วยสายตา และถ่ายภาพแถบทดสอบภายใต้กล้องควบคุมแสง นำไปอ่านค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ รุ่น 1.47m นำค่าความเข้มสีที่อ่านได้จากโปรแกรม มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน TC เพื่อคำนวณหาปริมาณ TC ที่มีอยู่ในตัวอย่าง และนำหาค่าความถูกต้อง (Accuracy) จากค่า % recovery

การหาความแม่นยำของชุดทดสอบ ทำโดยศึกษาความแปรปรวนของการทำการทดลองซ้ำในครั้งเดียวกัน (intra-variation assay) และการทำการทดลองซ้ำในระหว่างครั้งการทดลอง (inter-variation assay) จากนั้นคำนวณหา % coefficient of variation (% CV) โดยเตรียมตัวอย่างน้ำผึ้งให้มีความเข้มข้นของ TC สุดท้ายเป็น 0, 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 นาโนกรัมกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเตรียมความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง

#### 3.4.9 การวิเคราะห์ TC ในน้ำผึ้งที่มีจำหน่ายในไทย

นำน้ำผึ้ง 10 เครื่องหมายการค้า มาเจือจางที่ตามข้อ 3.4.9.1 ที่ทราบระดับการเจือจางที่เหมาะสม จากนั้นปิเปตสารละลายน้ำผึ้งปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาทดสอบกับแถบทดสอบวิเคราะห์ผลการทดสอบภายในเวลา 10 นาที ด้วยสายตา และถ่ายภาพแถบทดสอบภายใต้กล้องควบคุมแสง นำไปอ่านค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ รุ่น 1.47m นำค่าความเข้มสีที่อ่านได้จากโปรแกรม มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานมาตรฐาน TC เพื่อคำนวณหาปริมาณ TC ที่มีอยู่ในตัวอย่าง

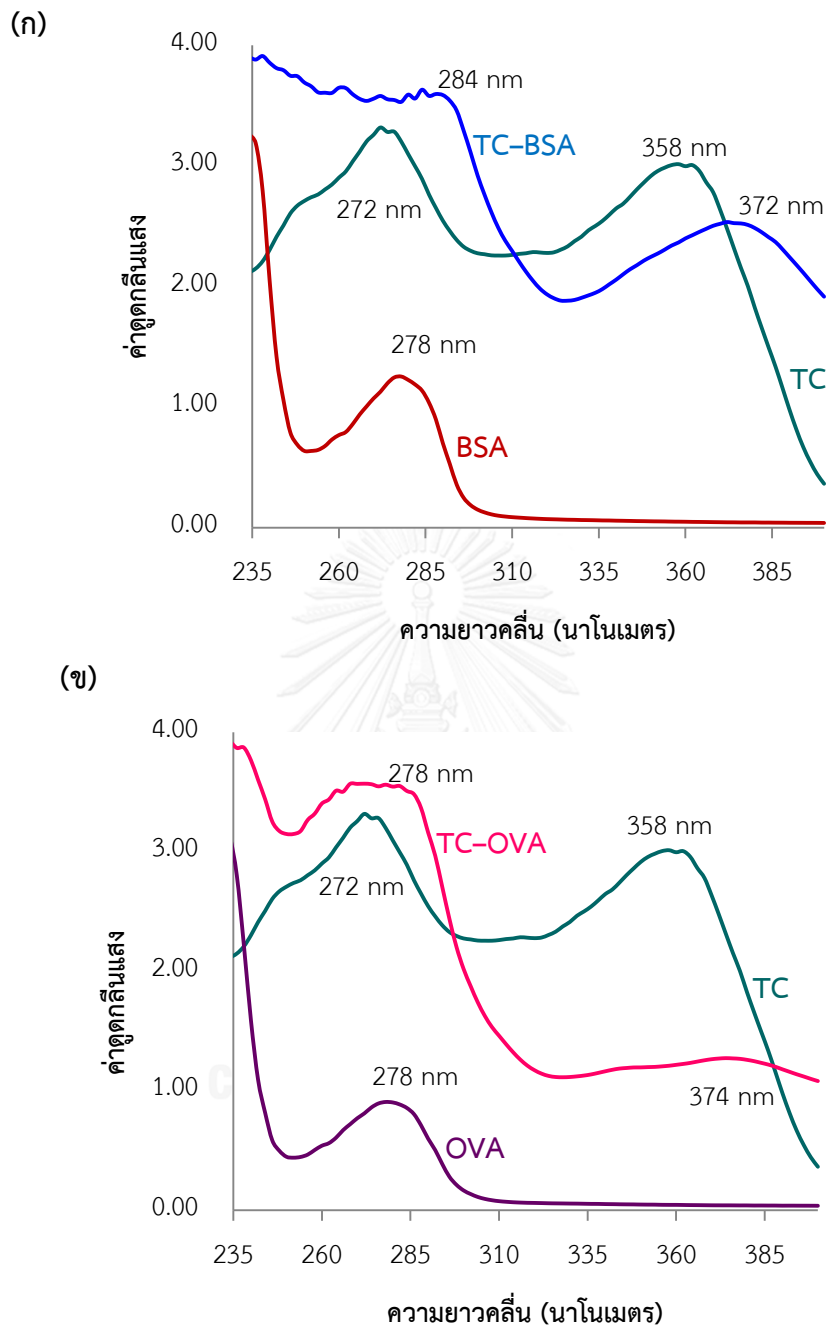
## บทที่ 4

### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1 การเชื่อม TC กับโปรตีนพาหะ BSA (TC-BSA) และ OVA (TC-OVA)

เททราไซคลิน (TC) เป็นสารโมเลกุลเล็ก มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 444.44 ดาลตัน ซึ่งไม่สามารถจับหรือจับได้เล็กน้อยที่พื้นผิวของงานทดสอบชนิด 96 หลุม และแผ่นไนโตรเซลลูโลส ดังนั้นจึงต้องเชื่อมต่อ TC กับโปรตีนพาหะ ในการทดลองนี้ได้เชื่อมต่อ TC กับ BSA และ OVA โดยใช้ปฏิกิริยา Mannich ซึ่งในปฏิกิริยามีการเติม formaldehyde ทำให้เกิดปฏิกิริยาควมแน่นระหว่างหมู่เอมีนของโปรตีนพาหะกับวงฟีนอลของ TC โดยเกิดตัวเชื่อมเมทิลลีนขึ้นระหว่างสองโมเลกุล จากนั้นนำมาหาปริมาณโปรตีนของสาร TC-BSA และ TC-OVA ด้วยวิธี BCA Protein Assay kit ปริมาณโปรตีนของ TC-BSA และ TC-OVA เท่ากับ 3.86 และ 5.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีนดังแสดงในภาคผนวก ก. (ตารางที่ ก.1 ภาพที่ ก.1 และตารางที่ ก.2)

การประเมินประสิทธิภาพการเชื่อม TC กับโปรตีนพาหะ พิจารณาจากอัตราส่วนการเชื่อมติด (Molar ratio) ของ TC-BSA และ TC-OVA จากค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง ( $\epsilon$ ) โดยนำ TC ความเข้มข้น 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร BSA, OVA, TC-BSA และ TC-OVA ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ มาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 200–400 นาโนเมตร ภาพที่ 4.1 ก. TC มีค่าดูดกลืนแสงสูงสุด ( $\lambda_{\max}$ ) เท่ากับ 272 และ 358 นาโนเมตร BSA มีค่า  $\lambda_{\max}$  เท่ากับ 278 นาโนเมตร และ TC-BSA มีค่า  $\lambda_{\max}$  เท่ากับ 284 และ 372 นาโนเมตร ในขณะที่ภาพ 4.1 ข. OVA มีค่า  $\lambda_{\max}$  เท่ากับ 278 นาโนเมตร และ TC-OVA มีค่า  $\lambda_{\max}$  เท่ากับ 278 และ 374 นาโนเมตร จากภาพที่ 4.1 ก. และ ข. เมื่อเปรียบเทียบ  $\lambda_{\max}$  ของ TC-BSA และ TC-OVA กับ  $\lambda_{\max}$  ของ TC, BSA และ OVA พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงไป แสดงให้เห็นว่า TC สามารถเชื่อมต่อกับ BSA และ OVA ได้ คำนวณหาอัตราส่วนการเชื่อมติดของ TC ที่เชื่อมต่อกับ BSA และ OVA จากค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง ( $\epsilon$ ) ได้เท่ากับ 4.19 : 1 และ 1.52 : 1 (ภาคผนวก ก. ตาราง ก.3)



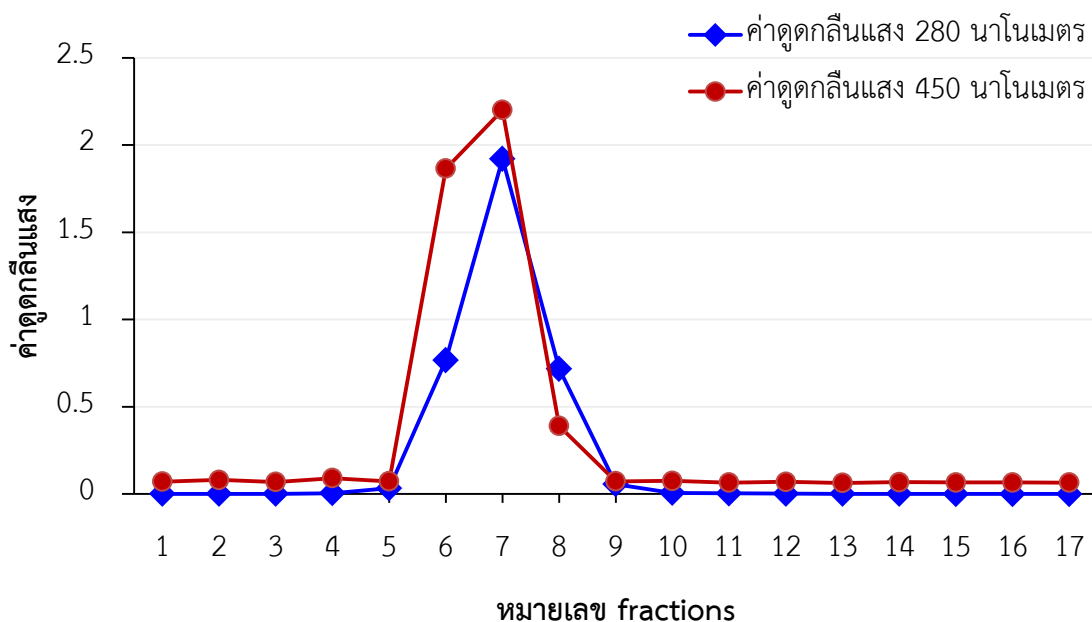
ภาพที่ 4.1 (ก) โครมาโตแกรมของ TC 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (—) BSA 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (—) TC-BSA 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (—) (ข) โครมาโตแกรมของ TC 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (—) OVA 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (—) และ TC-OVA 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (—)

#### 4.2 การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb) ให้บริสุทธิ์

นำเซลล์ไฮบริโดมารหัสโคลน 12-3F ที่ผลิต MAb ต่อ TC มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาปั่นเหวี่ยงเอาตะกอนเซลล์ทิ้งไป เก็บอาหารเลี้ยงเซลล์มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้เทคนิค affinity chromatography โดยผ่านคอลัมน์สำเร็จรูป protein G sepharose ซึ่งเป็นเทคนิคที่นิยมใช้กันในการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ เนื่องจาก Protein G ถูกคัดแยกมาจากแบคทีเรียกลุ่ม *Streptococcus spp.* และมีความจำเพาะสูงในการจับกับ Fc region ของ IgG มีช่วงในการจับ (binding) กับแอนติบอดีที่กว้าง และมีความสามารถจับ Fab ได้น้อย นอกจากนี้ Protein G ยังมีกระบวนการในการจับกับแอนติบอดีเป็นแบบอ่อน ๆ (low binding capacity) ทำให้ง่ายต่อการชะแอนติบอดีออกจากคอลัมน์ ในขณะที่ Protein A มีความสามารถจำเพาะในการจับการกับแอนติบอดีบางชนิดเท่านั้น [38]

หลังจากแยกเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์แล้ว นำอาหารเลี้ยงเซลล์มาเติมลงในคอลัมน์ จากนั้นล้างโปรตีนอื่นที่ไม่จับกับคอลัมน์ออกด้วย equilibrated buffer, pH 7.4 ชะ MAb ที่ถูกจับอยู่ในคอลัมน์ออกด้วย elution buffer, pH 2.7 โดยเก็บทีละส่วน (fraction) ทั้งหมด 24 แฟรกชัน นำแต่ละแฟรกชันมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ได้โครมาโตแกรมดังแสดงในภาพที่ 4.2 จากนั้นนำแต่ละแฟรกชันมาทดสอบด้วย iELISA โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร เพื่อต้องการยืนยันว่าหลังการทำให้บริสุทธิ์ MAb ที่บริสุทธิ์ยังมีความสามารถในการทำปฏิกิริยากับ TC ได้ จากการทดลองพบว่า ได้พีคโครมาโตแกรมสอดคล้องกันกับ พีคโครมาโตแกรมของค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร จากนั้นนำแฟรกชันหมายเลข 6-8 มารวมกันและนำมาหาปริมาณแอนติบอดีโดยวิธี BCA Protein Assay kit โดยใช้โปรตีน IgG เป็นโปรตีนมาตรฐาน (ภาคผนวก ก. ตารางที่ ก.4 และภาพที่ ก.2) ได้ปริมาณ MAb ที่บริสุทธิ์เท่ากับ 1.23 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ก. ตารางที่ ก.5) หลังจากนั้นแบ่งใส่หลอดละ 500 ไมโครลิตร เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป





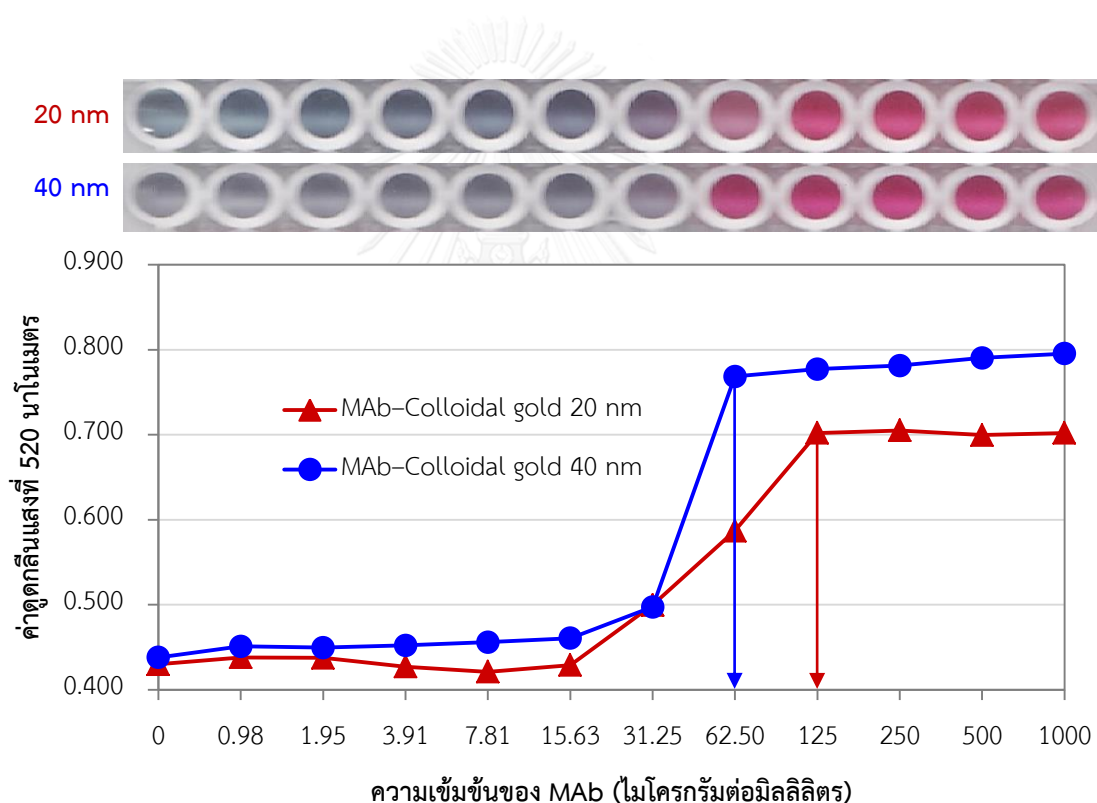
ภาพที่ 4.2 โครมาโตแกรมของ MAb ที่ชะออกมาจากคอลัมน์ HiTrap Protein G HP ที่ค่าดูดกลืนแสง 280 นาโนเมตร (—◆—) และ โครมาโตแกรมของ MAb ที่ได้จาก iELISA ที่ค่าดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร (—●—)

#### 4.3 การเตรียม MAb เชื่อมติดกับอนุภาคทอง (Colloidal gold) ขนาด 20 และ 40 นาโนเมตร

##### 4.3.1 การเลือกขนาดอนุภาคทองที่เหมาะสมในการเชื่อมติดกับ MAb

ในการเลือกขนาด Colloidal gold เพื่อเชื่อมติดกับ MAb ปริมาณของ MAb ที่เหมาะสมเป็นสิ่งสำคัญ เนื่องจากปริมาณของ MAb ที่ใช้ในการเชื่อมติดส่งผลถึงความเสถียรของ Colloidal gold รวมถึงค่าความไวในระบบของการทำแถบทดสอบ การหาความเข้มข้นของ MAb ที่เหมาะสม โดยนำ MAb มาเจือจางให้มีความเข้มข้นเป็น 0–1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับ Colloidal gold ขนาด 20 และ 40 ไมโครเมตร จากนั้นเติมสารละลาย NaCl ผสมให้เข้ากันและนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ดังแสดงในภาคผนวก ก. ตารางที่ ก.6 จากภาพที่ 4.3 จะเห็นได้ว่าเมื่อเติมสารละลาย NaCl ลงไป สารละลาย MAb–Colloidal gold จะเปลี่ยนจากสีม่วงแดงไปเป็นสีม่วงเทา เนื่องจากประจุในสารละลาย MAb–Colloidal gold มีการเปลี่ยนแปลงไป ทำให้ Colloidal gold ที่ไม่เชื่อมติดกับ MAb เกิดการจับกันเองและตกตะกอน จากนั้นนำสารละลาย MAb–Colloidal gold ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่าความเข้มข้นของ MAb

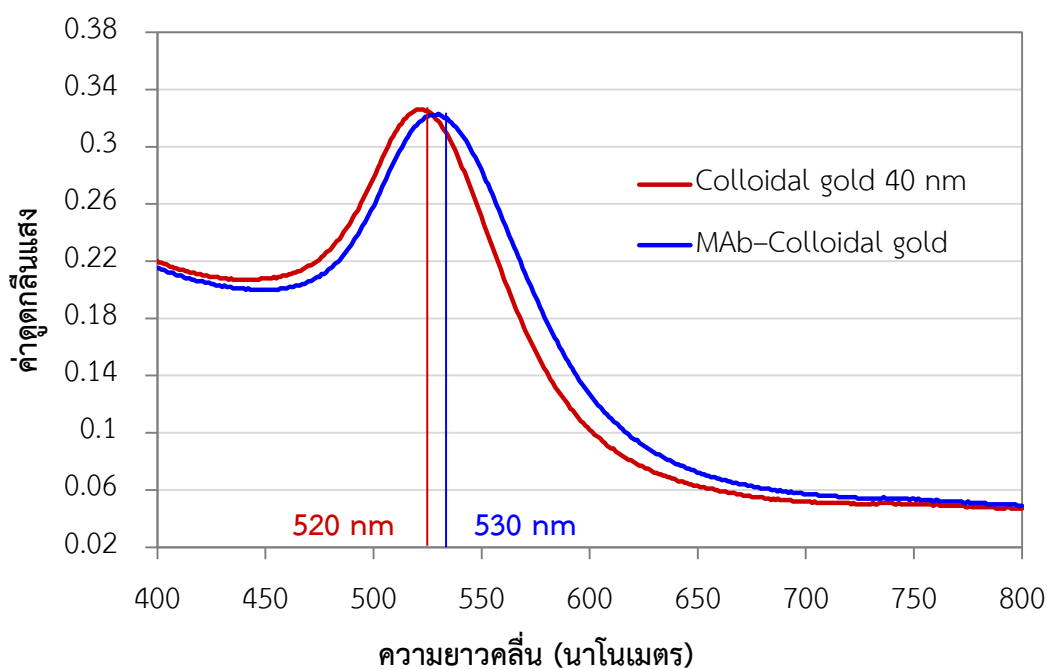
เหมาะสมในการเชื่อมติดกับ colloidal gold ขนาด 20 และ 40 นาโนเมตรเท่ากับ 125 และ 62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โดยพิจารณาจาก ปริมาณ MAb ที่น้อยที่สุดที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด หรือปริมาณ MAb ที่น้อยที่สุดที่ทำให้สีของ Colloidal gold ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงยังมีสีม่วงแดงเหมือนเดิม จากการทดลองหาความเข้มข้นของ MAb ในการเชื่อมติด Colloidal gold ขนาด 20 และ 40 นาโนเมตร ได้เลือก Colloidal gold ขนาด 40 นาโนเมตรไปทำการทดลองต่อไป เนื่องจาก ปริมาณของ MAb ที่ใช้ในการเชื่อมติดน้อยกว่า Colloidal gold ขนาด 20 นาโนเมตร อาจเนื่องมาจากพื้นที่ผิวของ Colloidal gold ยังมีขนาดเล็ก พื้นที่ผิวในการเชื่อมติดก็มากขึ้น ปริมาณของ MAb ที่ใช้ในการเชื่อมติดก็มากจะมากขึ้นตามลำดับ [39]



ภาพที่ 4.3 ความเข้มข้นของ MAb ที่เหมาะสมในการเชื่อมติดกับ Colloidal gold ขนาด 20 นาโนเมตร เท่ากับ 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (▲) และกับ Colloidal gold ขนาด 40 นาโนเมตร เท่ากับ 62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (●)

#### 4.3.2 การเชื่อมติด MAb กับอนุภาคทอง (MAb-Colloidal gold)

จากการทดลองในข้อ 4.3.1 ได้เลือก Colloidal gold ขนาด 40 นาโนเมตรมาเชื่อมติดกับ MAb โดยเตรียม MAb ให้มีความเข้มข้น 62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาเชื่อมต่อกับ Colloidal gold ขนาด 40 จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400–800 นาโนเมตร เพื่อหา  $\lambda_{\max}$  ของ Colloidal gold และ MAb-Colloidal gold พบว่า  $\lambda_{\max}$  ของ Colloidal gold ขนาด 40 นาโนเมตร เท่ากับ 520 นาโนเมตร ในขณะที่ MAb-Colloidal gold  $\lambda_{\max}$  เท่ากับ 530 นาโนเมตร เมื่อเปรียบเทียบ  $\lambda_{\max}$  ของ Colloidal gold และ MAb-Colloidal gold จะเห็นได้ว่า  $\lambda_{\max}$  ของ Colloidal gold เพิ่มขึ้นจาก 520 นาโนเมตร เป็น 530 นาโนเมตร แสดงว่า MAb มีการเชื่อมติดกับ Colloidal gold เนื่องจากเส้นผ่านศูนย์กลางของ MAb-Colloidal gold มีขนาดใหญ่ขึ้น ส่งผลให้ค่า  $\lambda_{\max}$  หลังการเชื่อมติดเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhou (2014) ที่มีการเชื่อมต่อแอนติบอดีที่จำเพาะต่อคลอแรมฟินิคอลกับ Colloidal gold ขนาด 20 นาโนเมตร มีค่า  $\lambda_{\max}$  ของ Colloidal gold และ MAb-Colloidal gold เท่ากับ 528 และ 534 นาโนเมตร ตามลำดับ



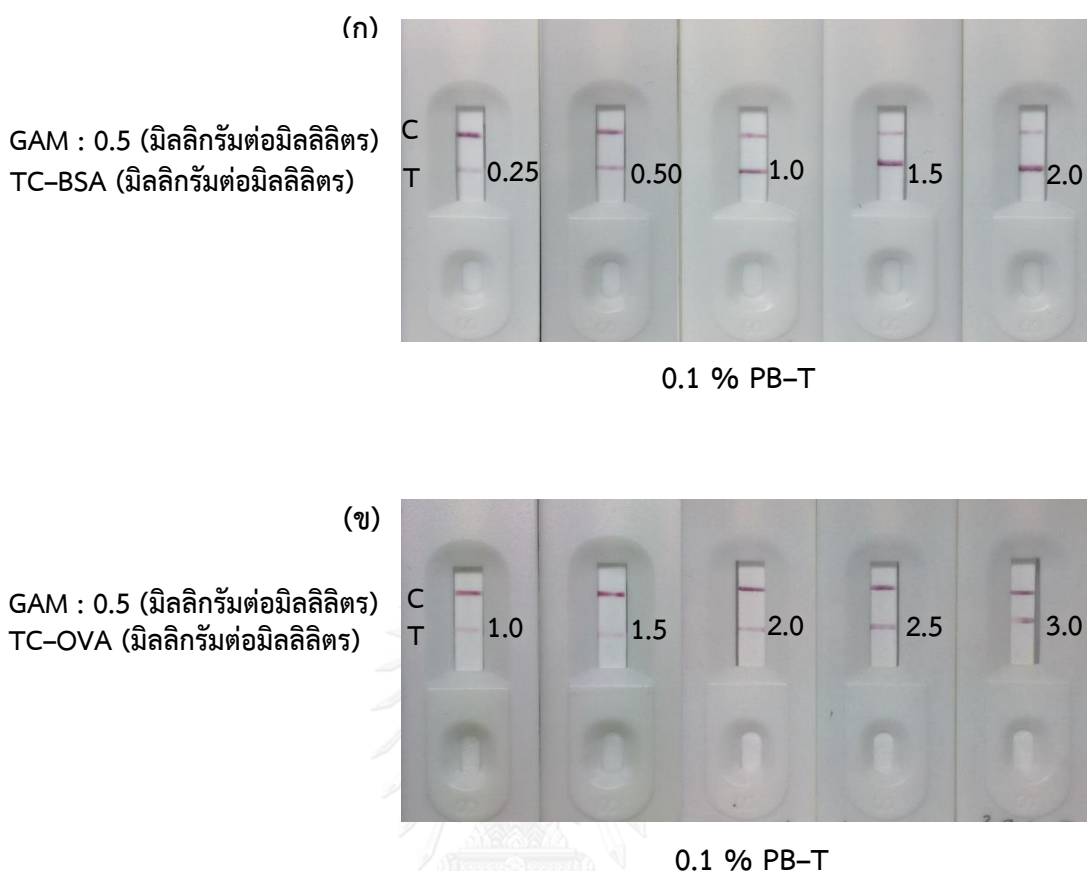
ภาพที่ 4.4 โครมาโตแกรมของ Colloidal gold ขนาด 40 นาโนเมตร (—) และ MAb-Colloidal gold 40 นาโนเมตร (—)

#### 4.4 การเตรียมส่วนประกอบของแถบทดสอบ TC

ในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้รูปแบบการไหลในแนวระนาบ (Lateral Flow Immuno-chromatographic Assay; LFIA) และรูปแบบการเกิดปฏิกิริยาใช้รูปแบบแข่งขัน (Competitive assay format) เนื่องจาก TC เป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก ขั้นตอนการเตรียมแถบทดสอบจะใช้ 2 วิธีคือ วิธีการทำด้วยมือ (handmade method) และวิธีการทำด้วยเครื่องจ่ายสารระดับไมโครลิตร

##### 4.4.1 การหาความเข้มข้นของ TC-BSA หรือ TC-OVA ที่เหมาะสมในการตรึงลง T-line ด้วยวิธีการทำด้วยมือ

ปัจจัยที่มีผลต่อการหาสถานะที่เหมาะสมของ T-line พิจารณาจาก ความเข้มข้นของ TC-BSA หรือ TC-OVA เนื่องจากความเข้มข้นของ TC-BSA หรือ TC-OVA ที่ตรึงลงบริเวณ T-line ส่งผลถึงความเข้มของแถบสีที่เกิดขึ้นและค่าความไวของแถบทดสอบ โดยนำ TC-BSA ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ TC-OVA ความเข้มข้น 1, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตรึงลงบริเวณ T-line และตรึง GAM ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เติมลบบริเวณ C-line โดยหยดสารลงบนสันของกระดาษไลต์และประทับลงไปตามลำดับ และใช้ MAb-Colloidal gold ขนาด 40 นาโนเมตร จากนั้น ทดสอบด้วยบัฟเฟอร์ (0.1 % PB-T) วิเคราะห์ผลการทดสอบภายในเวลา 10 นาที เปรียบเทียบความเข้มสีของแถบทดสอบที่เกิดขึ้นด้วยสายตา จากภาพที่ 4.5 จะเห็นได้ว่าเมื่อความเข้มข้นของ TC-BSA หรือ TC-OVA เพิ่มขึ้น ความเข้มสีที่เกิดขึ้นก็จะเข้มข้นด้วย เนื่องจาก MAb-Colloidal gold ที่เคลื่อนที่ผ่าน T-line จะจับกับ TC ที่ถูกตรึงได้มากขึ้น ในทางกลับกันถ้าความเข้มข้นของ TC-BSA หรือ TC-OVA น้อย MAb-Colloidal gold ที่เคลื่อนที่ผ่าน T-line จะจับกับ T-line ได้น้อยลง ความเข้มสีที่เกิดขึ้นก็จะจางลง จากการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของ TC-BSA หรือ TC-OVA ที่เหมาะสมในการตรึงบน T-line คือ 0.5 มิลลิกรัมต่อ และ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (ภาพที่ 4.5 ก. และ 4.5 ข.) โดยพิจารณาจากความเข้มสีของ TC-BSA หรือ TC-OVA ที่น้อยที่สุด ที่ให้ความเข้มสีของ T-line ใกล้เคียงกับความเข้มสีของ C-line มากที่สุด



ภาพที่ 4.5 (ก) แถบทดสอบที่ตรึงด้วยความเข้มข้นของ TC-BSA 0.25–2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ (ข) แถบทดสอบที่ตรึงด้วยความเข้มข้นของ TC-OVA 1.0–3.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรบน T-line ที่ทดสอบด้วย 0.1 % PB-T

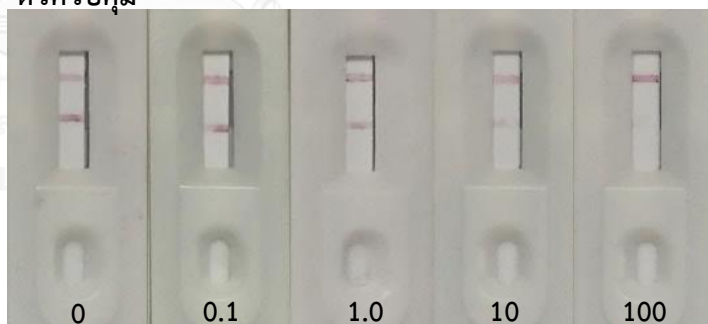
#### 4.4.2 การหาค่าความไว (Sensitivity) ของแถบทดสอบ

จากการศึกษาหาความเข้มข้น TC-BSA หรือ TC-OVA ที่เหมาะสมในการตรึงลงบน T-line ในข้อ 4.4.1 จึงเลือก TC ที่เชื่อมต่อกับ BSA มาศึกษาต่อโดยพิจารณาจากอัตราส่วนการเชื่อมติด (molar ratio) ระหว่าง TC กับโปรตีนพาหะพบว่า TC มีอัตราส่วนการเชื่อมติดกับ BSA มากกว่า OVA ดังแสดงในข้อที่ 4.1 และความเข้มข้นที่ใช้ในการตรึงลงบนไนโตรเซลลูโลส AE 99 โดย TC-BSA ใช้ความเข้มข้นต่ำกว่า TC-OVA ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ส่งผลถึงค่าความไวของแถบทดสอบ เตรียมแถบทดสอบโดยนำ TC-BSA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาตรึงลงบนบริเวณ T-line ด้วยการประทับโดยใช้กระจกสไลด์ เพื่อหาค่าความไวของแถบทดสอบในการตรวจ TC ในสารละลายบัฟเฟอร์ จากนั้นนำแถบทดสอบมาทดสอบกับสารละลายมาตรฐาน TC ความ

เข้มข้น 0–100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร วิเคราะห์ผลการทดสอบภายในเวลา 10 นาที ด้วยสายตา โดยช่วงการวัด และค่าขีดจำกัดของการวัดของแถบทดสอบ รายงานค่าเป็นความเข้มข้นของ TC ที่น้อยที่สุดที่ทำให้ความเข้มสีของ T-line เริ่มจางลงและจางหายไปเมื่อเทียบกับความเข้มสี T-line ตัวควบคุม เนื่องจากเมื่อความเข้มข้นของ TC เพิ่มขึ้น TC ที่อยู่ในสารละลายจะแย่งจับกับ MAb–Colloidal gold ที่หยดลงบน Conjugate pad ทำให้ปริมาณของ MAb–Colloidal gold ที่เหลืออยู่จับกับ TC ที่ตรึงบริเวณ T-line ได้น้อยลงความเข้มสีจะจางลง แต่ถ้า MAb–Colloidal gold ถูกแย่งจับจนหมด เมื่อเคลื่อนที่ผ่าน T-line จะไม่ปรากฏแถบที่บริเวณ T-line จากภาพที่ 4.6 จะเห็นได้ว่าที่ความเข้มข้นของ TC เท่ากับ 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มสีที่ T-line ยังปรากฏอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับความเข้มสีของ T-line ที่ความเข้มข้นของ TC เท่ากับ 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตัวควบคุม) และเมื่อความเข้มข้นของ TC เพิ่มขึ้นเป็น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มสีที่ T-line เริ่มจางลง และจางหายไปที่ TC ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นช่วงการวัดของแถบทดสอบในการตรวจ TC ในสารละลายบัฟเฟอร์อยู่ในช่วง 1–100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า VLOD เท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

#### ตัวควบคุม

GAM : 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร  
TC-BSA : 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



สารละลายมาตรฐาน TC (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ใน 0.1 %

ภาพที่ 4.6 แถบทดสอบที่ทดสอบด้วยสารละลายมาตรฐาน TC ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรใน 0.1% PB-T เพื่อหาค่าความไวของแถบ

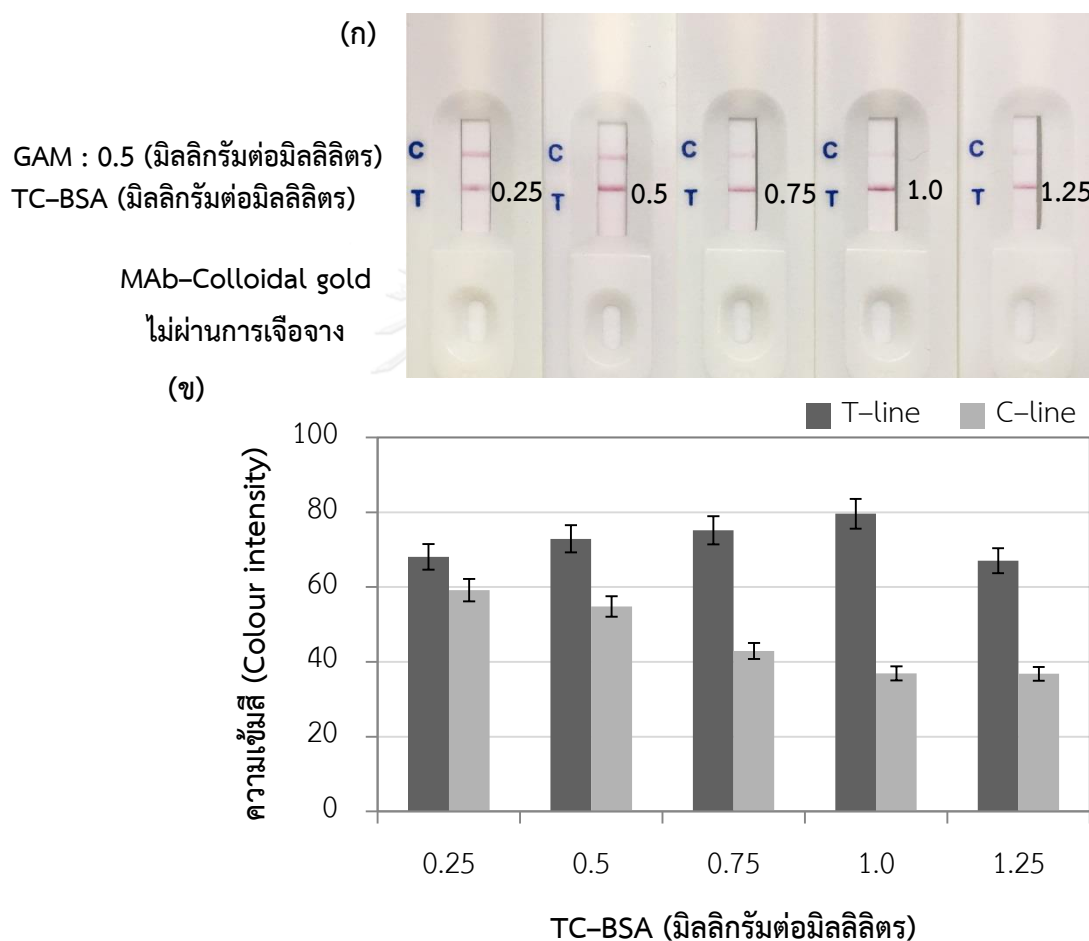
#### 4.5 การหาสถานะที่เหมาะสมของแถบทดสอบด้วยเครื่องมือ (บริษัท เซิร์ฟ ไชเอนซ์ จำกัด)

จากการหาค่าความไวของแถบทดสอบในข้อ 4.4.2 โดยใช้ TC-BSA ความเข้มข้นที่ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ GAM ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร ในการตรึงลงบริเวณ T-line และ C-line ตามลำดับ และในส่วนของ Conjugate pad หยดด้วย MAb-Colloidal gold ขนาด 40 นาโนเมตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร พบว่าช่วงการวัดและค่าขีดจำกัดของการวัดของแถบทดสอบนี้ สามารถตรวจวัด TC อยู่ในช่วง 1-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า VLOD เท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งอยู่ในช่วงค่า MRLs ของ TC 0.1-12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่การเตรียมแถบทดสอบด้วยมือมีข้อจำกัดหลายอย่างเช่น ความสม่ำเสมอหรือการทำซ้ำในการตรึงสารบริเวณ T-line และ C-line ทำให้ขนาดของแถบสี รวมถึงความเข้มสีที่ได้ไม่สม่ำเสมอ และเมื่อต้องการเตรียมในปริมาณมากทำได้ยากเนื่องด้วยข้อจำกัดของเครื่องมือที่ใช้ ดังนั้นจึงได้ส่งให้ทางบริษัท เซิร์ฟ ไชเอนซ์ จำกัด ทำแถบทดสอบ โดยทำการพ่น T-line และ C-line และตัดให้มีขนาด 4 มิลลิเมตร

4.5.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ TC-BSA ในการพ่นลงบน T-line โดยใช้เครื่องจ่ายสารระดับไมโครลิตร

ทำการพ่น T-line และ C-line โดยออกแบบการทดลองดังนี้ เตรียมไนโตรเซลลูโลส AE 99 ส่งให้บริษัทพ่น TC-BSA ที่ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 และ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บริเวณ T-line และพ่น GAM ความเข้มข้นเป็น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่บริเวณ C-line จากนั้นบดด้วยสารละลาย BSA 10 % (w/v) เป็นเวลา 15 นาที นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นติดลงบน Plastic backing card และตัดให้มีขนาด 4 มิลลิเมตร นำแถบทดสอบที่ได้จากบริษัท มาประกอบกับ Conjugate pad ที่หยดด้วย MAb-Colloidal gold ขนาด 40 นาโนเมตร ที่ไม่ผ่านการเจือจาง ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นทดสอบด้วย 0.1 % PB-T วิเคราะห์ผลการทดสอบภายในเวลา 10 นาที ถ่ายภาพภายใต้กล้องควบคุมแสง เปรียบเทียบความเข้มสีของ T-line และ C-line ที่เกิดขึ้นด้วยสายตาร่วมกับโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ รุ่น 1.47m ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.7 ก. จะเห็นได้ว่า เมื่อความเข้มข้นของ TC-BSA เพิ่มขึ้น ความเข้มสีที่ T-line จะเพิ่มขึ้น และความเข้มสีที่ C-line จะจางลง เนื่องจาก MAb-Colloidal gold จะจับกับ T-line ได้มากขึ้น และเหลือปริมาณน้อยในการจับกับ C-line ในทางตรง

ข้ามถ้าความเข้มข้นของ TC-BSA ลดลง ความเข้มสี T-line จะจางลง และความเข้มสีของ C-line จะเข้มขึ้น จากผลการทดลองความเข้มข้นที่เหมาะสมในการพ่นลงบริเวณ T-line เท่ากับ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยพิจารณาจากความเข้มสีของ T-line ให้มีความเข้มสีใกล้เคียงกับ C-line และเมื่อเมื่อนำไปอ่านค่าสีด้วยโปรแกรม (ภาพที่ 4.7 ข.) พบว่าค่าความเข้มสีที่อ่านได้สอดคล้องกับการประเมินความเข้มสีด้วยสายตา

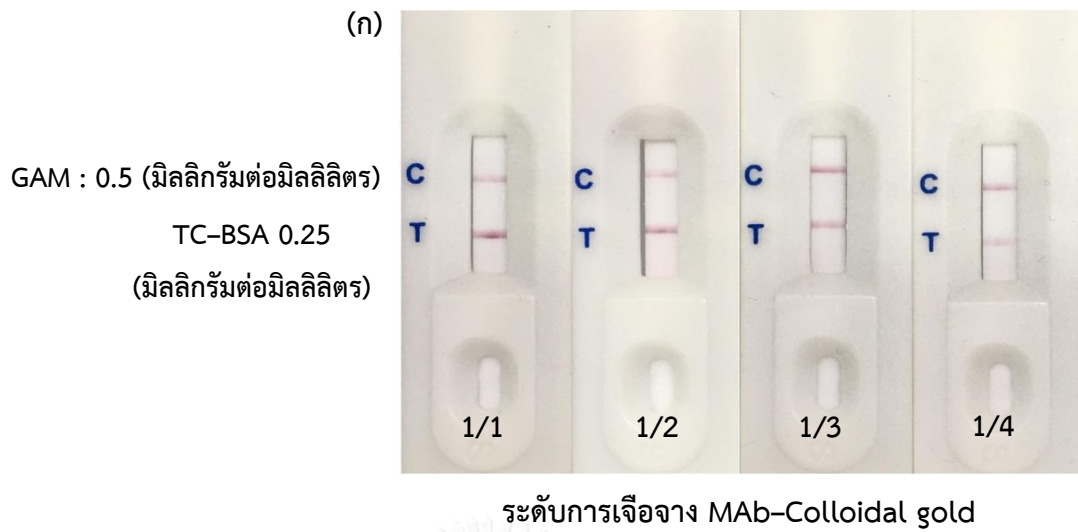


ภาพที่ 4.7 (ก) แถบทดสอบที่พ่นด้วย TC-BSA ความเข้มข้น 0.25–1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บริเวณ T-line และ (ข) แสดงค่าความเข้มสีของ T-line ที่พ่นด้วย TC-BSA ความเข้มข้น 0.25–1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ C-line จากโปรแกรม imageJ รุ่น 1.47m

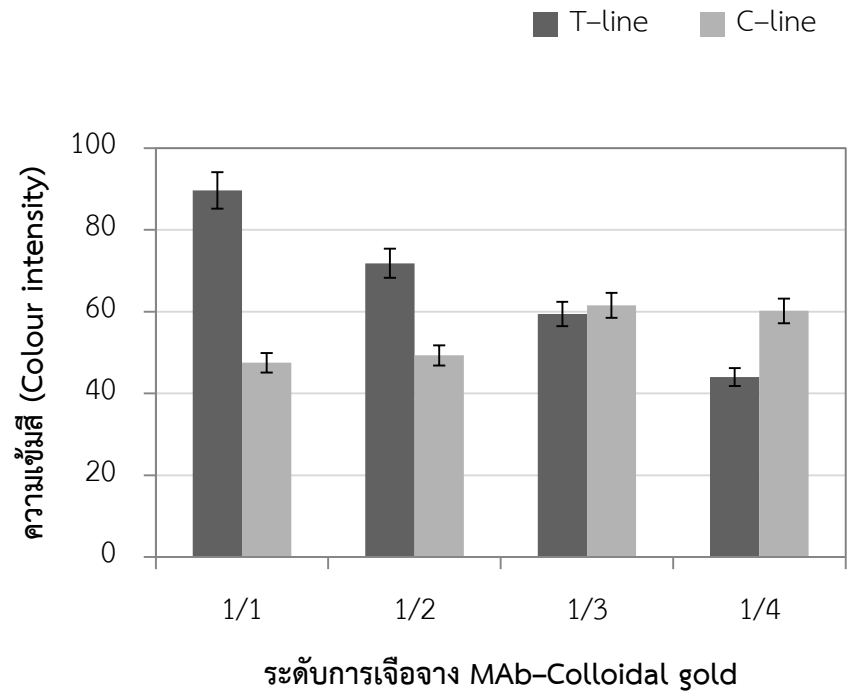


#### 4.5.2 การหาระดับการเจือจางที่เหมาะสมของ MAb–Colloidal gold

ปริมาณ MAb–Colloidal gold เป็นอีกตัวแปรหนึ่งที่สำคัญในการทำแถบทดสอบสำหรับรูปแบบแข่งขัน (Competitive) เนื่องจากปริมาณของ MAb–Colloidal gold ส่งผลถึงค่าความเข้มสีที่บริเวณ T-line และส่งผลถึงค่าความไวของแถบทดสอบ ถ้าปริมาณของ MAb–Colloidal gold มากเกินไป ทำให้สารที่ใช้แข่งขันต้องมีปริมาณมากด้วย จากการทดลองในข้อ 4.5.1 ความเข้มข้นของ T-line ที่เหมาะสมคือ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จึงนำมาศึกษาการหาระดับการเจือจางของ MAb–Colloidal gold ต่อ โดยนำ MAb–Colloidal gold ขนาด 40 นาโนเมตร มาเจือจางที่ระดับการเจือจาง 1/1, 1/2, 1/3 และ 1/4 จากนั้นใช้ปิเปตหยดสารละลาย MAb–Colloidal gold ที่ระดับการเจือจางต่างๆ ลงแผ่นใยแก้ว GF 33 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำมาทดสอบด้วย 0.1 % PB–T วิเคราะห์ผลการทดสอบภายในเวลา 10 นาที ถ่ายภาพภายใต้กล้องควบคุมแสง เปรียบเทียบความเข้มสีของ T-line และ C-line ที่เกิดขึ้นด้วยสายตาร่วมกับโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ รุ่น 1.47m ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.8 ก. จะเห็นได้ว่าเมื่อ MAb–Colloidal gold ถูกเจือจางเพิ่มขึ้นความเข้มสีที่บริเวณ T-line และ C-line จะจางลง เนื่องจากปริมาณของ MAb–Colloidal gold น้อยลง ทำให้ความสามารถในการจับกับ TC–BSA ที่บริเวณ T-line และ GAM ที่บริเวณ C-line ได้น้อยลง โดยเฉพาะที่ระดับการเจือจาง 1/4 ความเข้มสีของ T-line และ C-line จางมากที่สุดเมื่อเทียบกับที่ระดับการเจือจาง 1/1 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าระดับการเจือจาง MAb–Colloidal gold ที่เหมาะสมสำหรับแถบทดสอบนี้คือ ที่ระดับการเจือจาง 1/3 โดยพิจารณาจากความเข้มสีของ T-line และ C-line ที่เกิดขึ้นด้วยสายตาร่วมกับโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ รุ่น 1.47m ดังแสดงในภาพที่ 4.8 ข. จะเห็นได้ว่าค่าความเข้มสีของ T-line และ C-line ที่อ่านได้ของระดับการเจือจาง 1/3 มีความเข้มสีใกล้เคียงกันมากที่สุดเมื่อเทียบกับระดับการเจือจางที่ 1/1, 1/2 และ 1/4



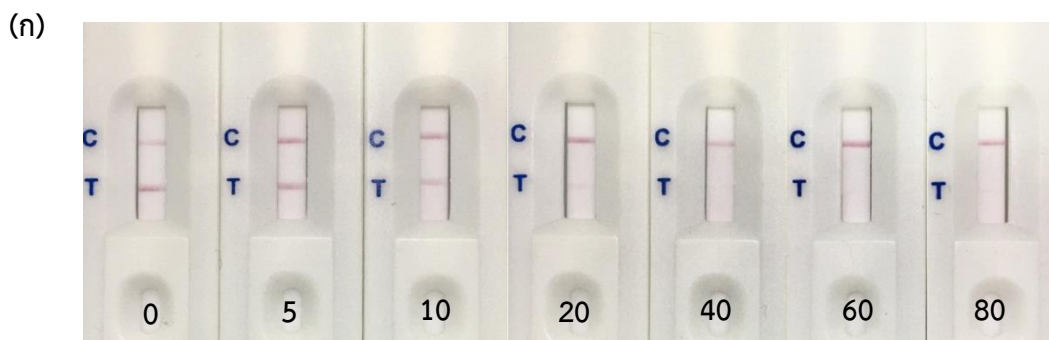
(ข)



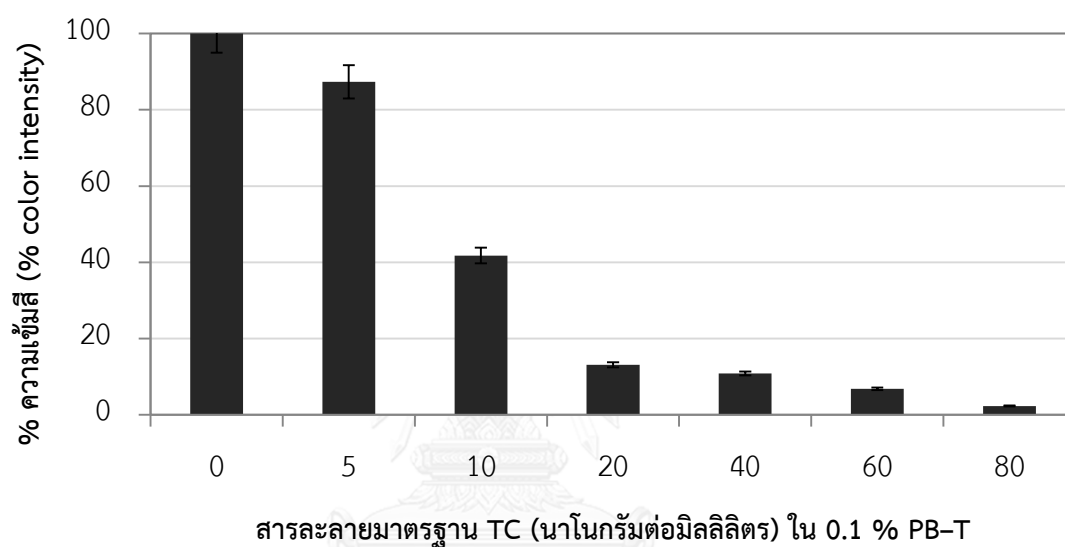
ภาพที่ 4.8 (ก) แถบทดสอบที่ใช้ MAb-Colloidal gold ที่ระดับการเจือจาง 1/1-1/4 ในการหยดลงบนแผ่นใยแก้ว GF 33 (ข) แสดงค่าความเข้มสีของ T-line และ C-line ที่ใช้ MAb-Colloidal gold ที่ระดับการเจือจาง 1/1-1/4 จากโปรแกรม imageJ รุ่น 1.47m

#### 4.5.3 การหาค่าความไว (Sensitivity) ของแถบทดสอบ

จากการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ TC-BSA ในการพ่นบริเวณ T-line และระดับการเจือจางที่เหมาะสมของ MAb-Colloidal gold ได้สภาวะในการเตรียมแถบทดสอบดังนี้ TC-BSA ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร GAM ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ MAb-Colloidal gold ที่ระดับการเจือจาง 1/3 จากนั้นเตรียมแถบทดสอบที่ตามสภาวะข้างต้น และนำมาทดสอบค่าความไวของแถบทดสอบโดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน TC ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 20, 40, 60 และ 80 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลาย 0.1 % PB-T ปีเปตสารละลายมาตรฐาน TC ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงช่องรับตัวอย่าง วิเคราะห์ผลการทดสอบภายในเวลา 10 นาที ถ่ายภาพภายใต้กล้องควบคุมแสง เปรียบเทียบความเข้มสีที่เกิดขึ้นด้วยสายตาร่วมกับโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ รุ่น 1.47m จากภาพที่ 4.9 ก. จะเห็นได้ว่าเมื่อความเข้มข้นของ TC เพิ่มขึ้นความเข้มสีที่บริเวณ T-line จะจางลง เนื่องจากปริมาณ TC ที่อยู่ในสารละลายจะแย่งจับกับ MAb-Colloidal gold ทำให้ MAb-Colloidal gold ไม่เหลือจับกับ TC-BSA ที่ถูกพ่นบริเวณ T-line จึงไม่ปรากฏแถบสี จากผลการทดลองพบว่า แถบทดสอบนี้มีช่วงการวัดอยู่ในช่วง 10-40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า VLOD เท่ากับ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยพิจารณาจากความเข้มสีที่บริเวณ T-line เริ่มจางลงจนจางหายไป เมื่อนำไปอ่านค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ รุ่น 1.47m ดังแสดงในภาพที่ 4.9 ข. พบว่า VLOD แถบทดสอบเท่ากับ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์ (%) การลดลงของความเข้มสีที่มากกว่าหรือเท่ากับ 50 % ดังแสดงในตารางที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าที่ความเข้มข้นของ TC เท่ากับ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร % การลดลงของความเข้มสีเท่ากับ 58.2 %



(ข) สารละลายมาตรฐาน TC (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ใน 0.1 % PB-T



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

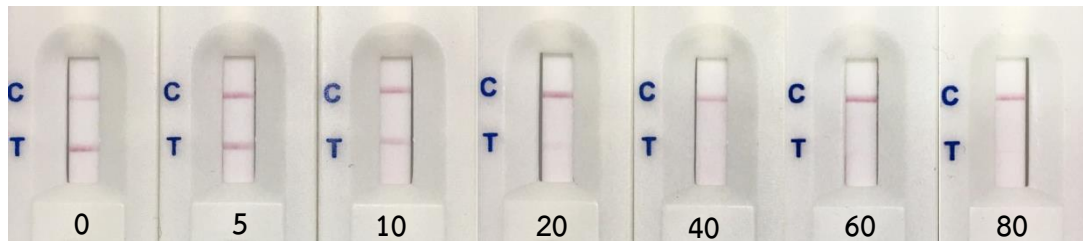
ภาพที่ 4.9 (ก) แถบทดสอบที่ทดสอบด้วยสารละลายมาตรฐาน TC ความเข้มข้น 0–80 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรใน 0.1% PB-T เพื่อหาค่าความไวของแถบทดสอบ และ (ข) แสดงค่า % ความเข้มสีของ T-line ที่อ่านด้วยโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ รุ่น 1.47m

ตารางที่ 4.1 แสดง % ความเข้มสี และการลดลงของความเข้มสี ที่ความเข้มข้น TC ต่างกันใน 0.1% PB-T

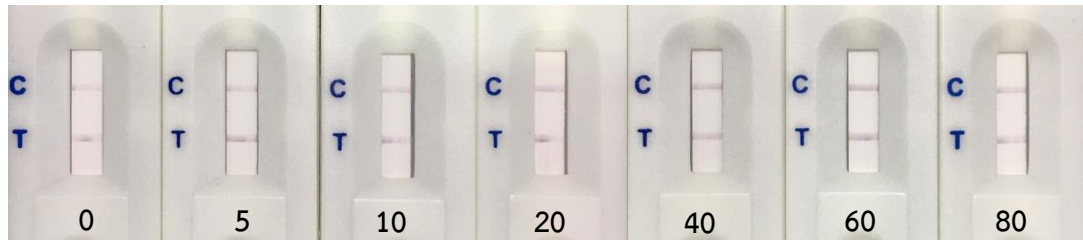
	ความเข้มข้น TC (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)						
	0	5	10	20	40	60	80
% ความเข้มสี	100	87.4	41.8	13.1	10.8	6.8	2.3
% การลดลงของความเข้มสี	0	12.6	58.2	86.9	89.2	93.2	97.7

#### 4.5.4 การหาค่าความจำเพาะ (Specificity) ของแถบทดสอบ

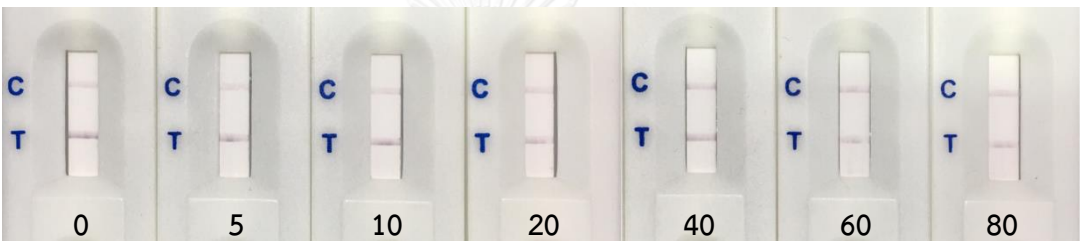
ทำการทดสอบความจำเพาะของแถบทดสอบ โดยนำมาทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้าม กับสารปฏิชีวนะในกลุ่ม และสารปฏิชีวนะนอกกลุ่ม สารปฏิชีวนะในกลุ่มที่ใช้ในการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามได้แก่ Oxytetracycline (OTC), Chlortetracycline (CTC) และ Doxycycline (DOX) โดยเตรียมให้มีความเข้มข้นเป็น 0–80 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย 0.1 % PB-T และสารปฏิชีวนะนอกกลุ่มที่ใช้ในการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามได้แก่ Chloramphenicol, Norfloxacin และ Gentamycin โดยเตรียมให้มีความเข้มข้นเป็น 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย 0.1 % PB-T จากนั้นเปิดสารละลายปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงช่องรับตัวอย่าง วิเคราะห์ผลการทดสอบภายในเวลา 10 นาที ถ่ายภาพภายใต้กล้องควบคุมแสง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.10 จะเห็นได้ว่า เมื่อความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะในกลุ่มที่ใช้ทดสอบเพิ่มขึ้นความเข้มสีที่บริเวณ T-line ยังคงปรากฏไม่จางลง เมื่อเทียบกับแถบทดสอบที่ทดสอบด้วยสารละลายมาตรฐาน TC และเมื่อนำมาทดสอบกับสารนอกกลุ่มก็ยังคงปรากฏแถบสี ถึงแม้ว่าสารที่ใช้มีความเข้มข้นสูงถึง 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 4.11 จากการทดลอง ชี้ให้เห็นว่าแถบทดสอบ TC มีความจำเพาะกับสาร TC เท่านั้น และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารปฏิชีวนะในกลุ่ม และสารปฏิชีวนะนอกกลุ่ม ในช่วงของความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ



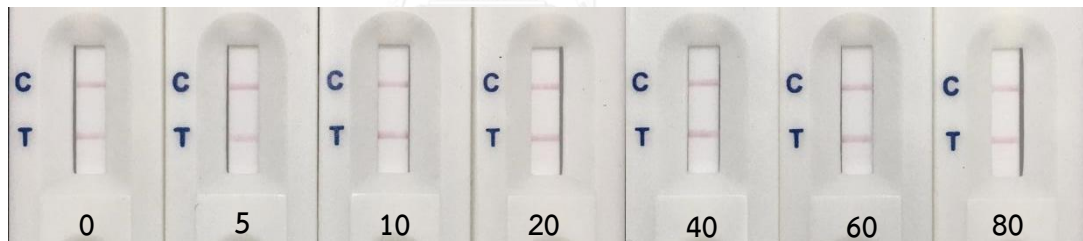
TC (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)



OTC (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)



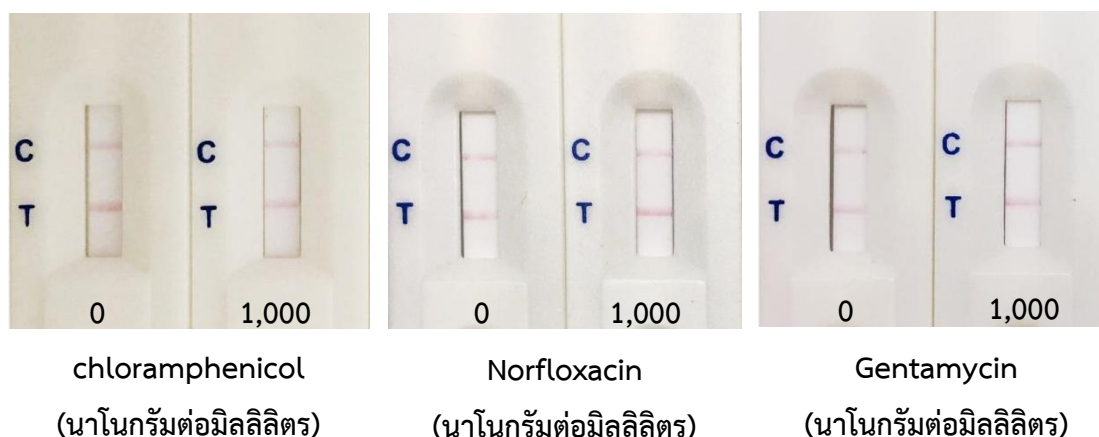
CTC (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)



DOX (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)

ภาพที่ 4.10 แถบทดสอบที่ทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารปฏิชีวนะในกลุ่ม TCs (OTC, CTC และ DOX)

ความเข้มข้น 0-80 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลาย 0.1 % PB-T

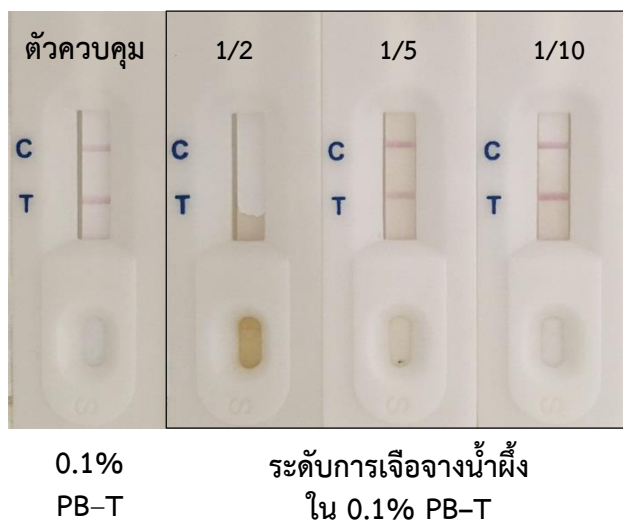


ภาพที่ 4.11 แถบทดสอบที่ทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารปฏิชีวนะนอกกลุ่ม (Chloramphenicol Norfloxacin และ Gentamycin) ความเข้มข้น 0–80 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลาย 0.1 % PB-T

#### 4.6 การประเมินประสิทธิภาพของแถบทดสอบ TC ในตัวอย่างน้ำฝิ่ง

##### 4.6.1 ผลการศึกษาเมทริกซ์ (Matrix effect) ในตัวอย่างน้ำฝิ่ง

Matrix effect เป็นอีกปัจจัยที่มีผลต่อการวิเคราะห์ โดยองค์ประกอบที่อยู่ในตัวอย่างหรือสารสกัดจากตัวอย่างเช่น ตัวทำละลาย ไขมัน เกลือ และสารอื่น ๆ อาจมีผลต่อการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน ซึ่งส่งผลถึงค่าความไว และความเข้มสีของแถบทดสอบ [36] ซึ่งในน้ำฝิ่งมีองค์ประกอบหลายอย่างจึงต้องศึกษาผลของ Matrix effect ในตัวอย่างน้ำฝิ่ง โดยน้ำฝิ่งที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นน้ำฝิ่งป่าเตียน 5 ที่ได้รับรองมาตรฐานระบบเกษตรอินทรีย์ [40] ว่าไม่มีการปนเปื้อนของสารเคมี โดยน้ำฝิ่งมาเจือจางด้วย 0.1 % PB-T ให้มีระดับการเจือจางเป็น 1/2, 1/5 และ 1/10 เนื่องจากการเจือจางเป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะช่วยลดผล Matrix effect ในตัวอย่าง จากนั้นนำมาทดสอบกับแถบทดสอบ ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.12 จะเห็นได้ว่า ที่ระดับการเจือจางน้ำฝิ่ง 1/2 สารละลายน้ำฝิ่งไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านไนโตรเซลลูโลสได้ ในขณะที่ระดับการเจือจางน้ำฝิ่ง 1/5 และ 1/10 สารละลายน้ำฝิ่งสามารถเคลื่อนที่จาก Sample pad ผ่านไปยัง Absorbent pad ได้ ดังนั้นจึงเลือกระดับการเจือจางน้ำฝิ่ง 1/5 โดยพิจารณาจากระดับการเจือจางน้อยที่สุดที่ให้ความเข้มสีใกล้เคียงกับตัวควบคุม ซึ่งระดับการเจือจางที่ 1/5 นี้ จะใช้สำหรับขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างน้ำฝิ่ง เพื่อใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของแถบทดสอบ TC ในตัวอย่างน้ำฝิ่งต่อไป



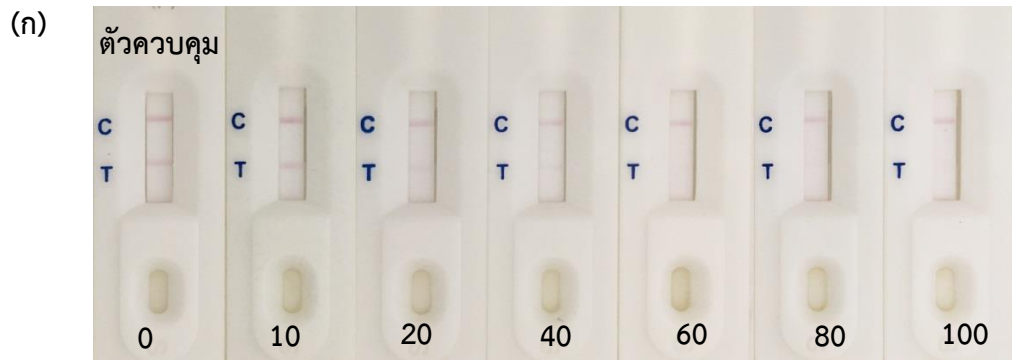
ภาพที่ 4.12 แถบทดสอบที่ทดสอบด้วยตัวอย่างน้ำฝิ่งในที่ระดับการเจือจาง 1/2, 1/5 และ 1/10

#### 4.6.2 การหาค่าความไว (Sensitivity) ของแถบทดสอบในตัวอย่างน้ำฝิ่ง

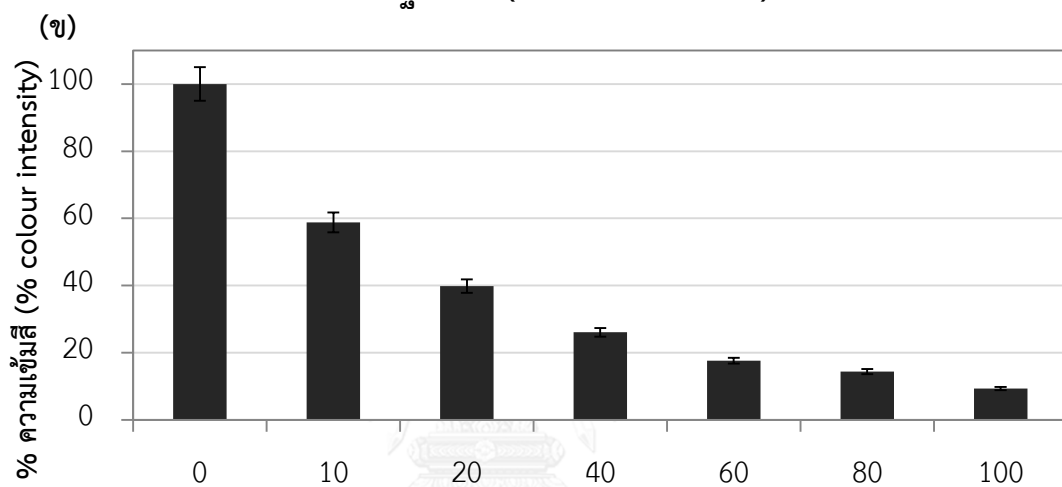
จากการศึกษาผลของ Matrix effect ในข้อ 4.6.1 ระดับการเจือจางที่เหมาะสมที่นำมาศึกษาต่อคือ ระดับการเจือจาง 1/5 โดยนำแถบทดสอบมาทดสอบค่าความไวกับละลายน้ำฝิ่งที่มีการเติม TC ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเปิดสารละลายน้ำฝิ่งปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงช่องรับตัวอย่าง วิเคราะห์ผลการทดสอบภายในเวลา 10 นาที ถ่ายภาพภายใต้กล้องควบคุมแสง เปรียบเทียบความเข้มสีที่เกิดขึ้นด้วยสายตาร่วมกับโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ รุ่น 1.47m จากภาพที่ 4.13 ก. จะเห็นได้ว่าเมื่อความเข้มข้นของ TC เพิ่มขึ้น ความเข้มสีที่บริเวณ T-line จะจางลง เนื่องจากปริมาณ TC ที่อยู่ในสารละลายจะแย่งจับกับ MAb-Colloidal gold ทำให้ MAb-Colloidal gold ไม่เหลือจับกับ TC-BSA ที่ถูกพ่นบริเวณ T-line จึงไม่ปรากฏแถบสี จากการประเมินแถบทดสอบด้วยสายตา พบว่าแถบทดสอบนี้มีช่วงการวัดอยู่ในช่วง 20-60 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า VLOD เท่ากับ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยพิจารณาจากความเข้มสีที่บริเวณ T-line เริ่มจางลงจนจางหายไป เมื่อนำไปอ่านค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ รุ่น 1.47m พบว่าค่าขีดจำกัดของแถบทดสอบเท่ากับ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 4.13 ข. โดยพิจารณาจาก เปอร์เซ็นต์ (%) การลดลงของความเข้มสีที่มากกว่าหรือเท่ากับ 50 % ดังแสดงในตารางที่ 4.2 โดยที่ความเข้มข้นของ TC เท่ากับ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร



% การลดลงของความเข้มข้นเท่ากับ 60.1 % และเมื่อเทียบค่าความไวของแถบทดสอบในสารละลาย 0.1 % PB-T จะเห็นได้ว่าค่าความไวของแถบทดสอบลดลงจาก 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในตัวอย่างน้ำผึ้ง เมื่อพิจารณาค่าความไวของแถบทดสอบ TC ในน้ำผึ้งที่มีการศึกษาในปี 2015 พบว่ามีความสอดคล้องกันโดยค่าความไวของแถบทดสอบลดลงจาก 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลายบัฟเฟอร์ เป็น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในตัวอย่างน้ำผึ้ง และเมื่อคำนวณกลับเป็นปริมาณ TC เริ่มต้นในตัวอย่างน้ำผึ้ง มีค่าความไวเท่ากับ 40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเจือจางตัวอย่างมีประสิทธิภาพในการลด Matrix effect แต่ก็ส่งผลต่อถึงค่าความไวของแถบทดสอบด้วย [33] จากการทดลองเมื่อคำนวณกลับเป็นปริมาณ TC เริ่มต้นในตัวอย่างน้ำผึ้ง (ที่ระดับการเจือจาง 1/5) พบว่าค่าความไวของแถบทดสอบ TC มีค่าเท่ากับ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ถึงแม้ว่าแถบทดสอบจะสามารถตรวจ TC ในน้ำผึ้งได้ในปริมาณที่สูง แต่ค่าที่ได้นั้นยังอยู่ในช่วงค่า MRLs ของสารกลุ่ม TCs (100–12,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และยังต่ำกว่าค่า MRLs ในน้ำผึ้งของประเทศญี่ปุ่นที่กำหนดค่าไวอยู่ที่ 300 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร



สารละลายมาตรฐาน TC (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ในสารละลายน้ำฝิ่ง



สารละลายมาตรฐาน TC (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ในสารละลายน้ำฝิ่ง

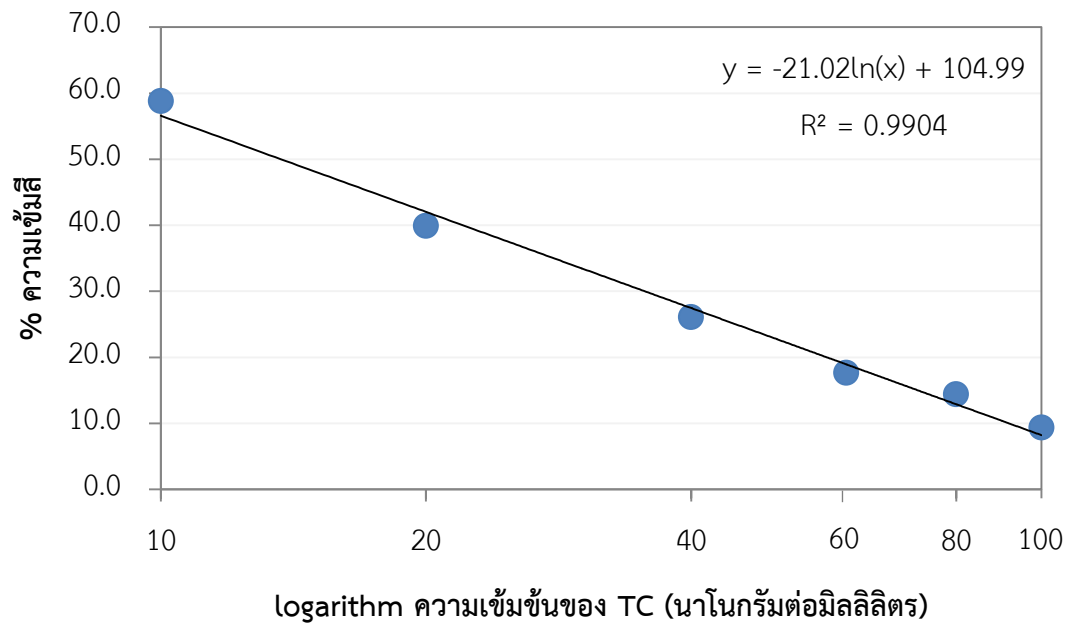
ภาพที่ 4.13 (ก) แถบทดสอบที่ทดสอบด้วยสารละลายมาตรฐาน TC ความเข้มข้น 0–100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลายน้ำฝิ่ง เพื่อหาค่าความไวของแถบทดสอบ และ (ข) แสดงค่า % ความเข้มสีของ T-line ที่อ่านด้วยโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ รุ่น 1.47m

ตารางที่ 4.2 แสดง % ความเข้มสี และ การลดลงของความเข้มสี ที่ความเข้มข้น TC ต่างกันในสารละลายน้ำฝิ่ง

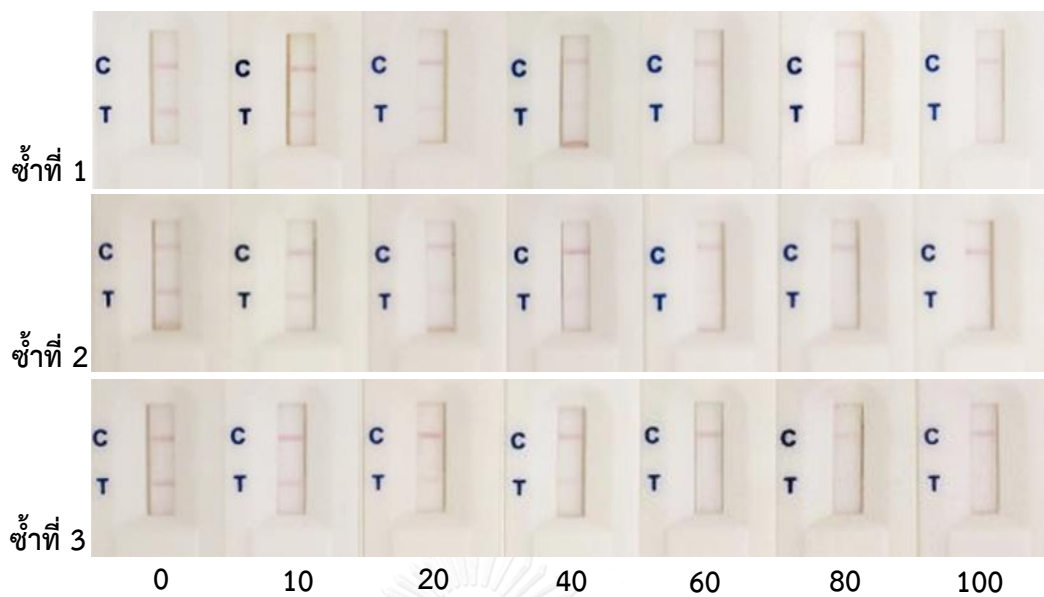
	ความเข้มข้น TC (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)						
	0	10	20	40	60	80	100
% ความเข้มสี	100	58.8	39.9	26.1	17.7	14.4	9.4
% การลดลงของความเข้มสี	0	41.2	60.1	73.9	82.4	85.6	90.6

#### 4.6.3 การหาค่าความถูกต้อง (Accuracy) และความแม่นยำ (Precision) ของแถบทดสอบ

ทำการหาปริมาณ TC ที่มีการเติมในตัวอย่างน้ำฝิ่ง โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปีเปตสารละลายน้ำฝิ่งปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงช่องรับตัวอย่าง วิเคราะห์ผลการทดสอบภายในเวลา 10 นาที ถ่ายภาพภายใต้กล้องควบคุมแสง เปรียบเทียบความเข้มสีที่เกิดขึ้นด้วยสายตาร่วมกับโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ รุ่น 1.47m จากนั้นนำค่าความเข้มสีที่ได้จากโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ รุ่น 1.47m มาทำกราฟมาตรฐานของ TC ในสารละลายน้ำฝิ่ง ดังภาพที่ 4.14 (ภาคผนวก ก. ตารางที่ ก. 7) ทำการหาความเข้มข้นของ TC ที่มีการเติมลงไป โดยนำมาหาค่าความถูกต้องจากการคำนวณ % recovery และความแม่นยำจากการคำนวณ % CV ที่ได้จากการทำ Intra-variation assay และ Inter-variation assay โดยนำความเข้มสีของแถบทดสอบที่อ่านด้วยโปรแกรม ImageJ รุ่น 1.47m มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของ TC ในสารละลายน้ำฝิ่ง จากการทดลองพบว่าการทำ Intra-variation assay ครั้งที่ 1 ค่า % CV อยู่ในช่วง 1.6–8.1 % และ % recovery อยู่ในช่วง 88–120 % ดังแสดงในภาพที่ 4.15 และตารางที่ 4.3 และการทำ Intra-variation assay ครั้งที่ 2 พบว่าค่า % CV อยู่ในช่วง 0.9–9.2 % และ % recovery อยู่ในช่วง 89–114 % ดังแสดงในภาพที่ 4.16 และตารางที่ 4.4 จากนั้นทำการทำ Intra-variation assay ครั้งที่ 3 พบว่าค่า % CV อยู่ในช่วง 1.5–7.8 % และ % recovery อยู่ในช่วง 98–116 % ดังแสดงในภาพที่ 4.17 และตารางที่ 4.5 ในการทำ inter-variation assay พบว่าค่า % CV อยู่ในช่วงเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือไม่เกิน 20 % และ 80–120 % ดังแสดงในตารางที่ 4.6 จากการทดลองทำ Intra-variation assay และ Inter-variation assay พบว่าค่า % CV และค่า % recovery อยู่ในช่วงเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือไม่เกิน 20 % และ 80–120 % ตามลำดับ ซึ่งจากการทดลองหาค่าความถูกต้องและความแม่นยำของแถบทดสอบสามารถร่วมกับโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ รุ่น 1.47m พบว่าแถบทดสอบสามารถตรวจวัดปริมาณ TC ในตัวอย่างน้ำฝิ่งได้



ภาพที่ 4.14 กราฟมาตรฐานของ TC ในสารละลายน้ำฝิ่งที่ทดสอบด้วยแถบทดสอบ โดยอ่านค่าความชื้นด้วยโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ รุ่น 1.47m

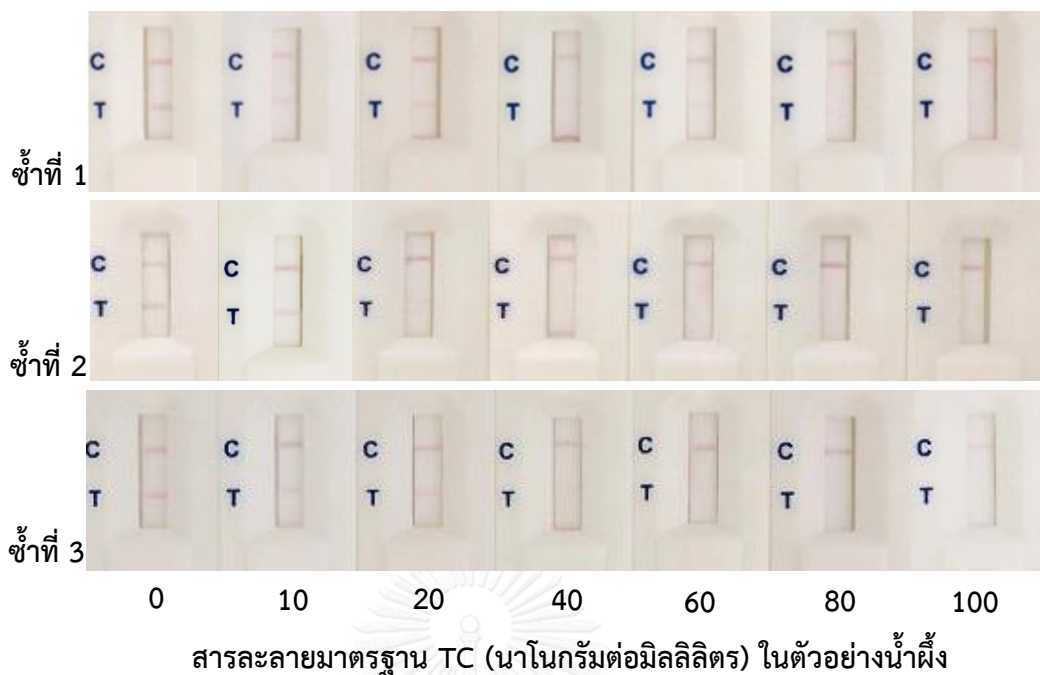


สารละลายมาตรฐาน TC (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ในตัวอย่างน้ำฝิ่ง

ภาพที่ 4.15 การทดสอบ TC ในตัวอย่างน้ำฝิ่ง ด้วยแถบทดสอบครั้งที่ 1

ตารางที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์ intra-variation assay ในตัวอย่างน้ำฝิ่งครั้งที่ 1

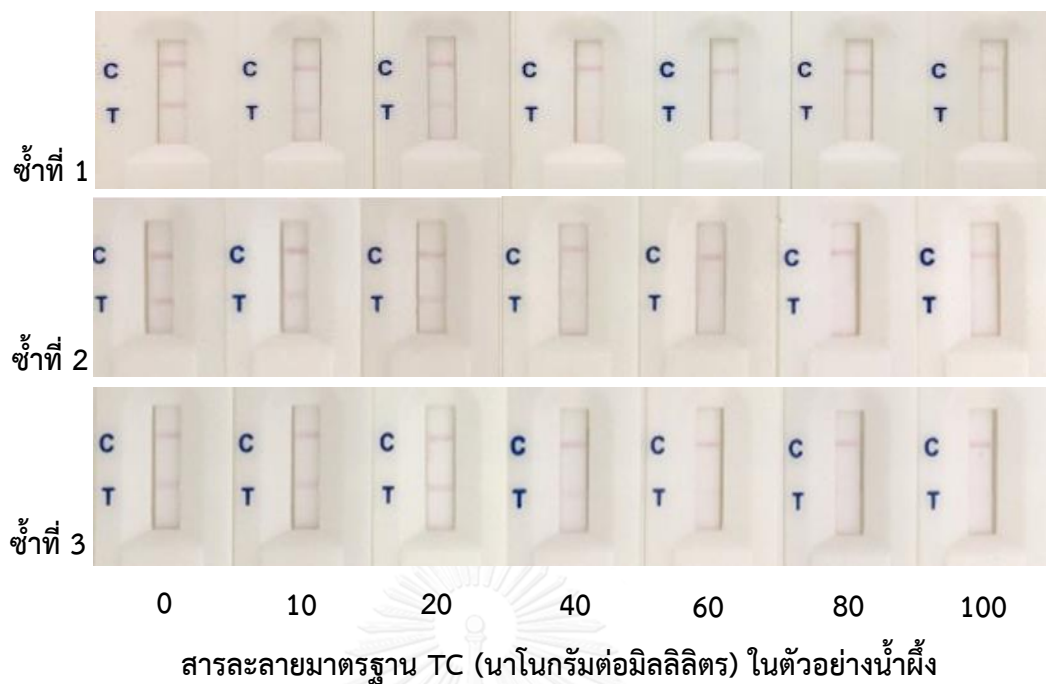
ปริมาณ TC ที่เติมลงใน ตัวอย่างน้ำฝิ่ง (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	Intra assay (n=3)		
	ค่าเฉลี่ยปริมาณ TC ที่วัดได้ $\pm$ SD (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	% recovery	% CV
10	9 $\pm$ 0.3	88	3.1
20	24 $\pm$ 1.9	120	8.1
40	47 $\pm$ 0.8	117	1.6
60	65 $\pm$ 1.7	108	2.7
80	78 $\pm$ 2.3	97	2.9
100	117 $\pm$ 3.1	117	2.7



ภาพที่ 4.16 การทดสอบ TC ในตัวอย่างน้ำฝ้่ง ด้วยแถบทดสอบครั้งที่ 2

ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์ intra-variation assay ในตัวอย่างน้ำฝ้่งครั้งที่ 2

ปริมาณ TC ที่เติมลงใน ตัวอย่างน้ำฝ้่ง (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	Intra assay (n=3)		
	ค่าเฉลี่ยปริมาณ TC ที่วัดได้ $\pm$ SD (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	% recovery	% CV
10	9 $\pm$ 0.8	89	9.2
20	22 $\pm$ 0.7	109	3.0
40	43 $\pm$ 2.1	107	4.8
60	67 $\pm$ 0.6	111	0.9
80	79 $\pm$ 1.3	99	1.6
100	114 $\pm$ 1.5	114	1.3



ภาพที่ 4.17 การทดสอบ TC ในตัวอย่างน้ำฝิ่ง ด้วยแถบทดสอบครั้งที่ 3

ตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์ intra-variation assay ในตัวอย่างน้ำฝิ่งครั้งที่ 3

ปริมาณ TC ที่เติมลงใน ตัวอย่างน้ำฝิ่ง (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	Intra assay (n=3)		
	ค่าเฉลี่ยปริมาณ TC ที่วัดได้ $\pm$ SD (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	% recovery	% CV
10	10 $\pm$ 0.8	102	7.8
20	22 $\pm$ 0.9	112	4.1
40	47 $\pm$ 1.4	116	2.9
60	65 $\pm$ 1.0	108	1.5
80	79 $\pm$ 1.2	98	1.5
100	116 $\pm$ 2.0	116	1.7

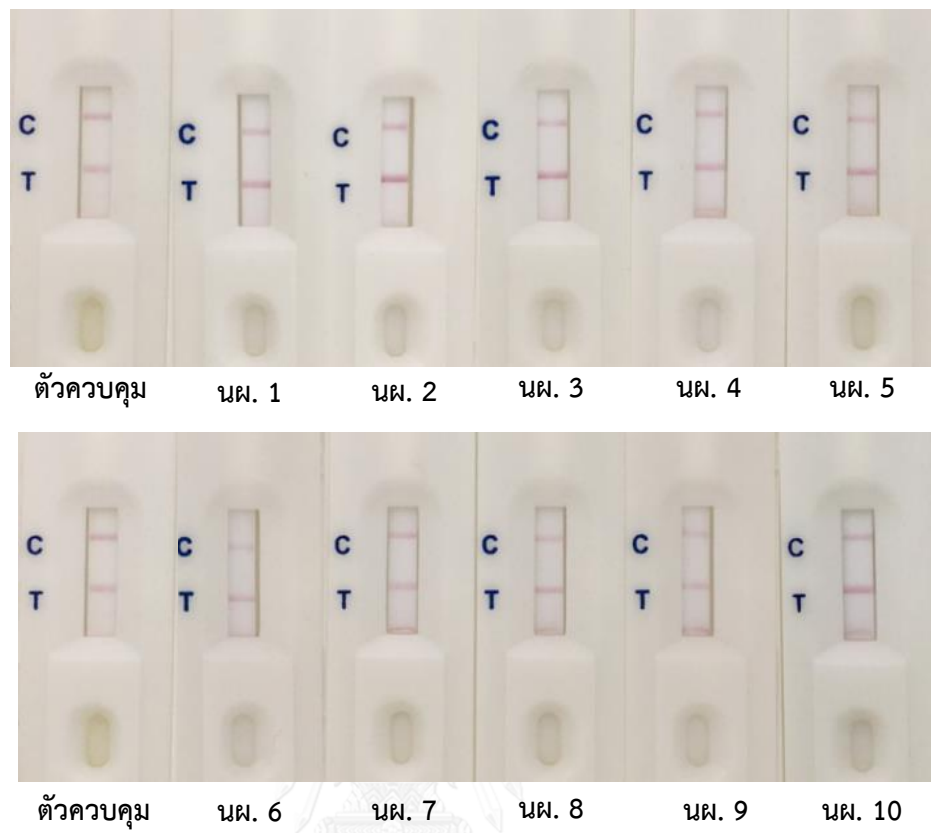
ตารางที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์ inter-variation assay ในตัวอย่างน้ำฝิ่ง

ปริมาณ TC ที่เติมลงใน ตัวอย่างน้ำฝิ่ง (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	Inter assay (n=3)		
	ค่าเฉลี่ยปริมาณ TC ที่วัดได้ $\pm$ SD (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	% recovery	% CV
10	9 $\pm$ 0.8	93	8.6
20	23 $\pm$ 1.1	113	5.0
40	45 $\pm$ 2.2	113	4.9
60	65 $\pm$ 1.1	109	1.6
80	78 $\pm$ 0.8	98	1.0
100	116 $\pm$ 1.5	116	1.3

#### 4.6.4 การวิเคราะห์ TC ในน้ำฝิ่งที่มีจำหน่ายในไทย

การศึกษาประเมินประสิทธิภาพของแถบทดสอบ นำแถบทดสอบมาทดสอบกับตัวอย่างน้ำฝิ่งที่วางจำหน่ายในไทย 10 ตัวอย่าง (นผ. 1-นผ. 10) เตรียมตัวอย่างน้ำฝิ่งโดยใช้ระดับการเจือจาง 1/5 จากนั้นปิเปตสารละลายน้ำฝิ่งปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงช่องรับตัวอย่าง วิเคราะห์ผลการทดสอบภายในเวลา 10 นาที ถ่ายภาพภายใต้กล้องควบคุมแสง เปรียบเทียบความเข้มสีที่เกิดขึ้นด้วยสายตาร่วมกับโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ รุ่น 1.47m ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.18 จะเห็นได้ว่าแถบทดสอบแสดงผลเป็นลบทั้งหมด เนื่องจากที่บริเวณ T-line ปรากฏแถบสีม่วงแดงอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับตัวควบคุม จากนั้นนำแถบทดสอบไปอ่านค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ รุ่น 1.47m นำค่าความเข้มสีที่อ่านได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของ TC ในสารละลายน้ำฝิ่ง ดังภาพที่ 4.13 พบว่าน้ำฝิ่งทั้ง 10 เครื่องหมายค่า ตรวจพบสาร TC น้อยกว่า 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.6





ตัวอย่างน้ำผึ้งที่มีจำหน่ายในไทย

ภาพที่ 4.18 ตัวอย่างน้ำผึ้งที่ทดสอบด้วยแถบทดสอบ TC ประเมินความเข้มข้นสีแถบทดสอบโดยใช้สายตา

ตารางที่ 4.6 การใช้โปรแกรมอ่านค่าสีของแถบทดสอบในการวัดปริมาณ TC ในน้ำฝิ่ง

ตัวอย่างน้ำฝิ่งที่มีจำหน่ายในไทย	ปริมาณ TC ที่วัดได้ (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)
นผ. 1	< 100
นผ. 2	< 100
นผ. 3	< 100
นผ. 4	< 100
นผ. 5	< 100
นผ. 6	< 100
นผ. 7	< 100
นผ. 8	< 100
นผ. 9	< 100
นผ. 10	< 100

หมายเหตุ: นผ. แทนเครื่องหมายการค้าของน้ำฝิ่ง

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

#### สรุปผลการวิจัย

การพัฒนาอิมมูโนโครมาโทกราฟีสำหรับตรวจวัด TC ในน้ำฝิ่ง รูปแบบการไหลในแนวระนาบ และใช้หลักการเกิดปฏิกิริยาแบบแข่งขัน ขั้นตอนการเตรียมแถบทดสอบจะใช้ 2 วิธีคือ วิธีการทำด้วยมือ (handmade method) และวิธีการทำด้วยเครื่องจ่ายสารระดับไมโครลิตร โดย Sample pad และ Absorbent pad ใช้แผ่นใยแก้ว Standard 17 และ Cotton linter CF 7 100 % ตามลำดับ จากการหาสถานะที่เหมาะสมของ TC–BSA และ TC–OVA ในการตรึงลงบริเวณ T-line จึงเลือก TC–BSA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ GAM ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร มาตรึงบนไนโตรเซลลูโลส AE 99 บริเวณ T-line และ C-line โดยการประทับด้วยกระจกสไลด์ ตามลำดับ สำหรับใช้เป็น Analytical pad จากนั้นตรึง MAb–Colloidal gold ขนาด 40 นาโนเมตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร บน Conjugate pad ที่เป็นแผ่นใยแก้ว GF 33 นำแถบทดสอบมาหาค่าความไวด้วยสารละลายมาตรฐาน TC ใน 0.1 % PB–T โดยประเมินผลด้วยสายตา พบว่าช่วงการวัดของแถบทดสอบ TC อยู่ในช่วง 1–100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า VLOD เท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มิลลิลิตร จากนั้นเตรียมแถบทดสอบ TC ด้วยวิธีการใช้เครื่องจ่ายสารระดับไมโครลิตร เนื่องจากการเตรียมแถบทดสอบด้วยมือมีข้อจำกัดหลายอย่างเช่น ความสม่ำเสมอหรือความเสถียรในการประทับสาร ทำให้ขนาดของแถบสี รวมถึงความเข้มสีที่ได้ไม่สม่ำเสมอ และเมื่อต้องการเตรียมในปริมาณมากทำได้ยากเนื่องจากข้อจำกัดของเครื่องมือที่ใช้ จากนั้นทำการพ่นสารละลาย TC–BSA และ GAM ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บน Analytical pad ที่บริเวณ T-line และ C-line ตามลำดับ โดยใช้อัตราการพ่น 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร จากนั้นพ่น MAb–Colloidal gold ขนาด 40 นาโนเมตร ที่ระดับการเจือจาง 1/3 บน Conjugate pad โดยใช้อัตราการพ่น 5 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร นำแถบทดสอบมาหาค่าความไวด้วยสารละลายมาตรฐาน TC ใน 0.1 % PB–T โดยประเมินผลด้วยสายตาร่วมกับโปรแกรมอ่านค่าสี พบว่าช่วงการวัดของแถบทดสอบ TC อยู่ในช่วง 10–40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า VLOD เท่ากับ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำแถบทดสอบ TC มาทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารปฏิชีวนะในกลุ่ม TCs และสารปฏิชีวนะนอกกลุ่ม TCs พบว่าแถบทดสอบ TC ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารปฏิชีวนะในกลุ่มและนอกกลุ่มในช่วงของความเข้มข้นที่นำมาทดสอบ จากนั้นนำแถบทดสอบ TC มาตรวจหา TC ตกค้างในตัวอย่งน้ำฝิ่ง โดยประเมินผลด้วยสายตาร่วมกับโปรแกรมอ่านค่าสี พบว่าช่วง

การวัดของแถบทดสอบ TC อยู่ในช่วง 20–60 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า VLOD เท่ากับ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (หรือเท่ากับ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในตัวอย่งน้ำฝิ่ง ก่อนการเจือจาง 5 เท่า เพื่อลด matrix effect) จากการทดสอบความถูกต้องและความแม่นยำของแถบทดสอบ TC พบว่ามีค่า % recovery และ ค่า % CV อยู่ในช่วง 93–116 % และ 1.0–8.6 % ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าแถบทดสอบที่พัฒนาขึ้นอยู่ในเกณฑ์การเชื่อมั่นและยอมรับได้ จากนั้นนำแถบทดสอบ TC มาทดสอบกับน้ำฝิ่งที่มีจำหน่ายในไทยจำนวน 10 เครื่องหมายการค้า พบว่าน้ำฝิ่งทั้ง 10 เครื่องหมายการค้า ตรวจพบสารตกค้าง TC ในน้ำฝิ่ง น้อยกว่า 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งค่าที่ได้นั้นอยู่ในช่วงค่า MRLs ของสารกลุ่ม TCs (100–12,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และสามารถตรวจ TC ได้ต่ำกว่าค่า MRLs ในน้ำฝิ่งของประเทศญี่ปุ่น ที่กำหนดค่าไว้อยู่ที่ 300 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจากศึกษาในครั้งนี้แถบทดสอบ TC สามารถนำไปประยุกต์ใช้ตรวจวัด TC ในน้ำฝิ่งได้

### ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากแถบทดสอบ TC เป็นวิธีการตรวจคัดกรองเบื้องต้น ซึ่งรายงานผลในเชิงคุณภาพและกึ่งปริมาณ หากต้องการให้แถบทดสอบมีค่าความไวสูงขึ้น อาจต้องมีการเปลี่ยนแอนติบอดีเนื่องจากค่าความไวของแถบทดสอบขึ้นอยู่กับความสามารถของแอนติบอดี นอกจากนี้แถบทดสอบ TC ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารอื่น ๆ เช่น น้ํานม หรือเนื้อสัตว์ได้

## รายการอ้างอิง

- [1] ศูนย์ส่งเสริมเทคโนโลยีการเกษตรด้านแมลงเศรษฐกิจจังหวัดเชียงใหม่. ผลิตภัณฑ์จากผึ้ง [Online]. Available from: <http://www.aopdb04.doae.go.th/aboutus.htm> [11 พฤษภาคม 2560]
- [2] สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. โครงการการศึกษาเกณฑ์คุณภาพและความปลอดภัยของน้ำผึ้ง [Online]. 2551. Available from: [http://research.acfs.go.th/research/doc/2\\_โครงการการศึกษาเกณฑ์คุณภาพและความปลอดภัยของน้ำผึ้ง.pdf](http://research.acfs.go.th/research/doc/2_โครงการการศึกษาเกณฑ์คุณภาพและความปลอดภัยของน้ำผึ้ง.pdf) [23 พฤษภาคม 2560]
- [3] ผู้จัดการออนไลน์. นักวิจัย มช. ค้นเลี้ยงผึ้งอินทรีย์แบบรัง 2 ชั้น ยกอร์ดับน้ำผึ้งไทย [Online]. 2551. Available from: <http://www.manager.co.th/Science/ViewNews.aspx?NewsID=951000021826> [11 พฤษภาคม 2560]
- [4] กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 303) พ.ศ. 2550 เรื่อง อาหารที่มียาสัตว์ตกค้าง [Online]. 2550. Available from: <http://elib.fda.moph.go.th/fulltext2/lawfda/38063/1.pdf> [11 พฤษภาคม 2560]
- [5] กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. มาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 8003-2556 เรื่อง น้ำผึ้ง [Online]. 2556. Available from: <http://www.acfs.go.th/standard/download/HONEY.pdf> [11 พฤษภาคม 2560]
- [6] ชมพูนิกข์ กาญจนพังคะ. การผลิตและลักษณะสมบัติของโมนโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเตตราไซคลิน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2551.
- [7] กรมส่งเสริมการเกษตร. คู่มือปฏิบัติงานเจ้าหน้าที่ส่งเสริมการเกษตร เรื่ององค์ความรู้เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสู่การเป็น smart officer: ผึ้งและแมลงเศรษฐกิจ. พิมพ์ครั้งที่ 1. นนทบุรี: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, 2556.
- [8] ผู้จัดการออนไลน์. “สมุนไพรรักษาโรคผึ้ง” งานวิจัยยกเกเรตน้ำผึ้งเลี้ยง [Online]. 2547. Available from: <http://www.manager.co.th/Science/ViewNews.aspx?NewsID=9470000044947> [11 พฤษภาคม 2560]
- [9] มาลินี ล้อมโกคา. ยาต้านจุลชีพ. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์จรัสสนิทวงศ์, 2540.

- [10] ปริญา มาสวัสดิ์. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราซัยคลินที่ตกค้างในนมโดยวิธี On-line SPE-FIA. วารสารเพื่อห้องปฏิบัติการ วัด/ทดสอบ วิเคราะห์/วิจัย และควบคุมคุณภาพ 6(42) (2550): 41-44.
- [11] Navrátilová, P., Borkovcová, I., Dračková, M., Janštová, B., and Vorlová, L. Occurrence of Tetracycline, Chlortetracyclin and Oxytetracycline Residues in Raw Cow's Milk.pdf. Czech Journal of Food Sciences 27 (5) (2009): 379-375.
- [12] Codex Alimentarius Commission. Maximum Residue Limits (MRLs) and Risk Management Recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods CAC/MRL\_2-2015 [Online]. 2015. Available from: [http://www.codexalimentarius.org/download/standards/45/MRL2\\_2015e.pdf](http://www.codexalimentarius.org/download/standards/45/MRL2_2015e.pdf) [2017, May 11]
- [13] Official Journal of the European Union. Commission Regulation (EU) No 37/2010 on Pharmacologically Active Substances And Their Classification Regarding Maximum Residue Limits (MRL) [Online]. 2010. Available from: [http://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-5/reg\\_2010\\_37/reg\\_2010\\_37\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-5/reg_2010_37/reg_2010_37_en.pdf) [2017, May 11]
- [14] U.S. Food and Drug Administration. CFR-Code of Federal Regulations Title 21 [Online]. 2016. Available from: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=556.720> [2017, May 15]
- [15] Health Canada. List of Maximum Residue Limits (MRLs) for Veterinary Drugs in Foods [Online]. 2017. Available from: [http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/alt\\_formats/pdf/vet/mrl-lmr/mrl-lmr\\_versus\\_new-nouveau-feb2017-eng.pdf](http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/alt_formats/pdf/vet/mrl-lmr/mrl-lmr_versus_new-nouveau-feb2017-eng.pdf) [2017, May 15]
- [16] The Japan Food Chemical Research Foundation. Revision of MRLs of agricultural chemicals, feed additives and veterinary drugs in foods [Online]. 2016. Available from: <http://www.m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/search.html> [2017, May 11]
- [17] Kivrak, İ., Kivrak, Ş., and Harmandar, M. Development of a rapid method for the determination of antibiotic residues in honey using UPLC-ESI-MS/MS. Food Science and Technology (Campinas) 36(1) (2016): 90-96.
- [18] Tarapoulouzi, M., Papachrysostomou, C., Constantinou, S., Kanari, P., and Hadjigeorgiou, M. Determinative and confirmatory method for residues of

- tetracyclines in honey by LC-MS/MS. Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment 30(10) (2013): 1728-32.
- [19] Peres, G.T., Rath, S., and Reyes, F.G.R. A HPLC with fluorescence detection method for the determination of tetracyclines residues and evaluation of their stability in honey. Food Control 21(5) (2010): 620-625.
- [20] Taokaenchan, N. and Sangsrichan, S. HPLC-Fluorescence Detection Method for Quantitative Determination of Tetracycline Antibiotic Residues in Honey. Naresuan University Journal 6(2) (2010): 147-155.
- [21] Posthuma-Trumpie, G.A., Korf, J., and Amerongen, A.V. Lateral flow (immuno)assay its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. Analytical and Bioanalytical Chemistry 393(2) (2009): 569–582.
- [22] เสาวนิตย์ ขอบบุญ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. พิมพ์ครั้งที่ 1. สงขลา: โรงพิมพ์เทพการพิมพ์, 2553.
- [23] ไพศาล สิทธิกรกุล. วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จัดทำขึ้นสำหรับการเรียนการสอนและการวิจัย กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ, 2548.
- [24] Ngom, B., Guo, Y., Wang, X., and Bi, D. Development and application of lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: a review. Analytical and Bioanalytical Chemistry 397(3) (2010): 1113-35.
- [25] Koczula, K.M. and Gallotta, A. Lateral flow assays. Essays in Biochemistry 60 (2016): 111-120.
- [26] Sajid, M., Kawde, A.-N., and Daud, M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. Journal of Saudi Chemical Society 19(6) (2015): 689-705.
- [27] GE Healthcare. Helping you build a smarter diagnostic assay [Online]. 2013. Available from: [https://www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/Related%20Content/Files/1492564535945/litdoc29045102\\_20170419031504.pdf](https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1492564535945/litdoc29045102_20170419031504.pdf) [2017 June 3]
- [28] Pastor-Navarro, N., Morais, S., Maquieira, A., and Puchades, R. Synthesis of haptens and development of a sensitive immunoassay for tetracycline

- residues. Application to honey samples. Analytica Chimica Acta 594(2) (2007): 211-8.
- [29] Lim, M.C. and Kim, Y.R. Analytical Applications of Nanomaterials in Monitoring Biological and Chemical Contaminants in Food. Journal of Microbiology and Biotechnology 26(9) (2016): 1505-16.
- [30] Jazayeri, M.H., Amani, H., Pourfatollah, A.A., Pazoki-Toroudi, H., and Sedighimoghaddam, B. Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies. Sensing and Bio-Sensing Research 9 (2016): 17-22.
- [31] Le, T., Yi, S.H., Zhao, Z.W., and Wei, W. Rapid and sensitive enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic assay for the detection of chlortetracycline residues in edible animal tissues. Food Additives & Contaminants: Part A 28(11) (2011): 1516-23.
- [32] Taranova, N.A., et al. Highly Sensitive Immunochromatographic Identification of Tetracycline Antibiotics in Milk. International Journal of Analytical Chemistry 2015 (2015): 347621.
- [33] Chen, Y., Kong, D., Liu, L., Song, S., Kuang, H., and Xu, C. Development of an ELISA and Immunochromatographic Assay for Tetracycline, Oxytetracycline, and Chlortetracycline Residues in Milk and Honey Based on the Class-Specific Monoclonal Antibody. Food Analytical Methods 9(4) (2015): 905-914.
- [34] Naik, L., Sharma, R., Mann, B., Lata, K., Rajput, Y.S., and Surendra Nath, B. Rapid screening test for detection of oxytetracycline residues in milk using lateral flow assay. Food Chemistry 219 (2017): 85-92.
- [35] Hermanson, G.T. Bioconjugate Techniques. San Diego: Academic Press, 1996.
- [36] Zhang, H.T., et al. Development of an indirect competitive ELISA for simultaneous detection of enrofloxacin and ciprofloxacin. Journal of Zhejiang University-SCIENCE B 12(11) (2011): 884-91.
- [37] Zhou, C., Zhang, X., Huang, X., Guo, X., Cai, Q., and Zhu, S. Rapid detection of chloramphenicol residues in aquatic products using colloidal gold immunochromatographic assay. Sensors 14(11) (2014): 21872-88.
- [38] Arora, S., Saxena, V., and Ayyar, B.V. Affinity chromatography: A versatile technique for antibody purification. Methods 116 (2017): 84-94.



- [39] Moon, J., Kim, G., and Lee, S. A Gold Nanoparticle and Aflatoxin B1-BSA Conjugates Based Lateral Flow Assay Method for the Analysis of Aflatoxin B1. Materials 5(12) (2012): 634-643.
- [40] สำนักงานมาตรฐานเกษตรอินทรีย์. ระบบเกษตรอินทรีย์ IFOAM [Online]. 2012. Available from: <http://www.actorganic-cert.or.th/page/item/582> [5 มิถุนายน 2560]





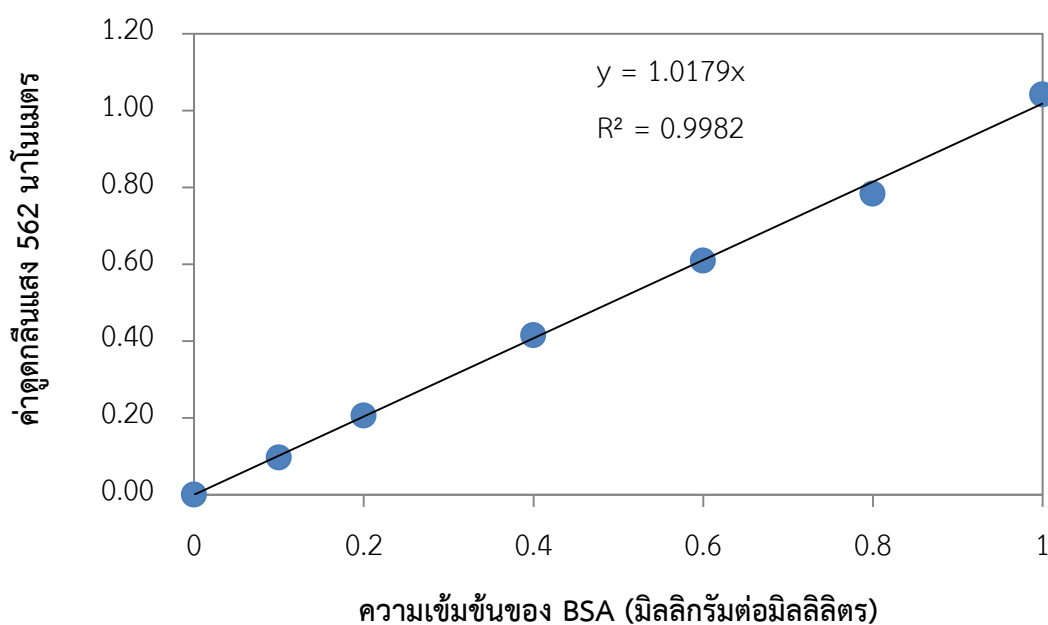
ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

## ภาคผนวก ก

ตารางที่ ก.1 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานโปรตีนด้วยวิธี  
BCA Protein assay kit

ความเข้มข้นของ BSA (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร
0	0
0.1	0.097
0.2	0.206
0.4	0.415
0.6	0.609
0.8	0.783
1.0	1.041



ภาพที่ ก.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน BSA ด้วยวิธี BCA

ตารางที่ ก.2 ปริมาณโปรตีนของสาร TC-BSA และTC-OVA โดยวิธี BCA Protein Assay kit

อัตราส่วนการเจือจาง	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น		ปริมาณโปรตีน	
	562 นาโนเมตร		(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	TC-BSA	TC-OVA	TC-BSA	TC-OVA
1/5	0.74	0.98	3.71	4.38
1/10	0.38	0.54	3.75	5.43
1/20	0.21	0.27	4.11	5.42
	ค่าเฉลี่ย		3.86	5.20

ตารางที่ ก.3 ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง (ε) ของสาร

สาร	Molecular weight (ดาลตัน)	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ความเข้มข้น (ไมโครโมลาร์; μM)	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 358 นาโนเมตร	ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง (ε)
TC-HCl	480.91	0.125	0.260	3.0138	23,190
OVA	45000	3	0.067	0.0505	1,515
BSA	66000	3	0.045	0.0456	2,006
TC-OVA	45480	3	0.088	1.2097	36,678
TC-BSA	66480	3	0.038	2.2372	99,153

การคำนวณหาอัตราส่วนการเชื่อมติดของ TC ที่เชื่อมต่อกับ BSA และ OVA ด้วยวิธีการสแกนความยาวคลื่น

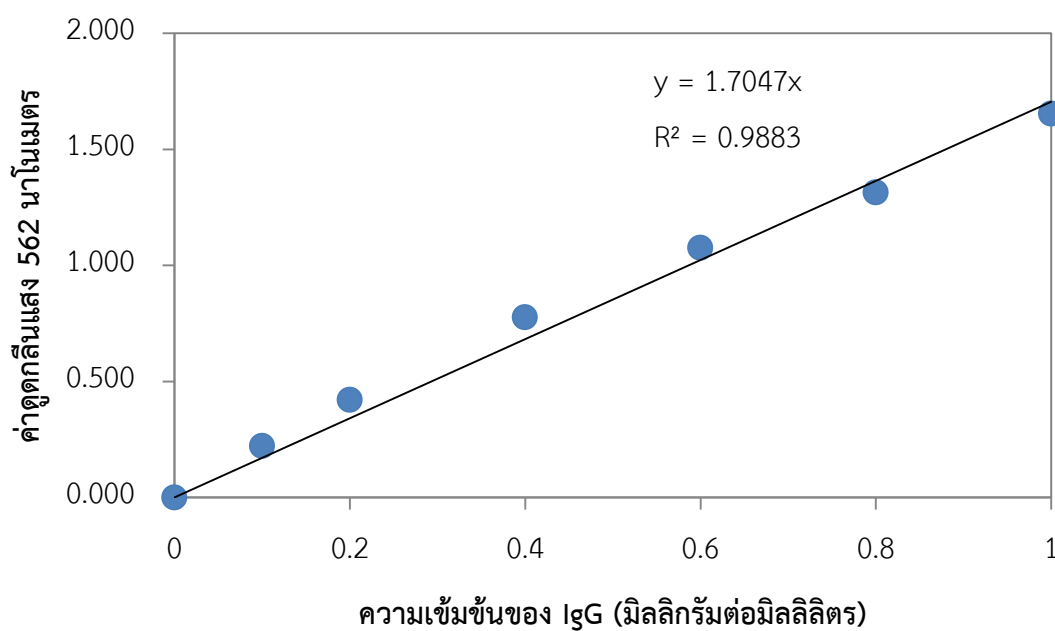
ตัวอย่างการคำนวณโมเลกุลการเชื่อมติด

$$\text{โมเลกุลการเชื่อมติด TC กับ BSA} = \frac{99,153 - 2,006}{23,190} = 4.19$$

เพราะฉะนั้นโมเลกุลการเชื่อมติด TC กับ BSA เท่ากับ 4.19 : 1

ตารางที่ ก.4 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานโปรตีน IgG ด้วยวิธี BCA Protein assay kit

ความเข้มข้นของ IgG (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร
0	0.000
0.1	0.222
0.2	0.420
0.4	0.777
0.6	1.075
0.8	1.314
1.0	1.654



ภาพที่ ก.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน IgG ด้วยวิธี BCA

ตารางที่ ก.5 ปริมาณโปรตีนของอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อน และหลังการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี BCA

Protein Assay kit

แอนติบอดี	อัตราส่วนการเจือจาง	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
ก่อนทำให้บริสุทธิ์	1/4	0.727	1.71
บริสุทธิ์	1/10	0.312	1.83
ค่าเฉลี่ย			1.77
Purified MAb	1/4	0.502	1.18
	1/8	0.274	1.29
ค่าเฉลี่ย			1.23

ตารางที่ ก.6 ค่าดูดกลืนแสงของ MAb ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการเชื่อมติดกับอนุภาคทองขนาด 20 และ 40 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของ MAb (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร	
	อนุภาคทองขนาด 20 นาโนเมตร	อนุภาคทองขนาด 40 นาโนเมตร
0	0.430	0.438
0.98	0.438	0.451
1.95	0.438	0.449
3.91	0.427	0.452
7.81	0.421	0.456
15.63	0.429	0.461
31.25	0.500	0.497
62.50	0.587	0.769
125	0.702	0.777
250	0.705	0.781
500	0.700	0.790
1000	0.702	0.796

ตารางที่ ก.7 % ค่าความเข้มสีของแถบทดสอบสารละลายมาตรฐาน TC ที่อ่านด้วยโปรแกรม ImageJ  
 รุ่น 1.47m

ปริมาณ TC (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	$\Delta$ ความเข้มสีของ T-line (T-T <sub>0</sub> )	% ความเข้มสีของ T-line
0	45.9	100
10	27.0	58.8
20	18.3	39.9
40	12.0	26.1
60	8.1	17.6
80	6.6	14.4
100	4.3	9.4

## ภาคผนวก ข

### การเตรียมสาร

ข.1 การเตรียมสารละลายสำหรับการเชื่อม TC กับ โปรตีนพาหะ BSA และ OVA

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 7.4 ด้วย 1 M HCl หรือ 1 M NaOH

2) 37 % (v/v) Formaldehyde

40 % Formaldehyde 925 ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 มิลลิลิตร

ข.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์

1) อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640

RPMI 1640 10.43 กรัม

NaHCO<sub>3</sub> 2 กรัม

L-glutamine 0.1 กรัม

Glucose 2 กรัม

Sodium pyruvate 0.11 กรัม

Distilled water 1 ลิตร

ละลายสารทุกอย่างในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน กรองด้วยกระดาษกรอง ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2) น้ำยาเก็บเซลล์แช่แข็งไนโตรเจนเหลว (Freezing medium)

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 90 มิลลิลิตร

Dimethyl sulfoxide (DMSO) 10 มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ขณะใช้งานควรแช่ในน้ำแข็ง)



### ข.3 การเตรียมสารละลาย สำหรับใช้ในการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

#### 1) 20 mM sodium phosphate, pH 7.0 (equilibrated buffer)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.85	กรัม
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.65	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	1	ลิตร

กรองด้วยกระดาษกรอง ขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### 2) 0.1 M Glycine-HCl buffer, pH 2.7 (eluted buffer)

Glycine-HCL	7.5	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 2.7 ด้วย 6 M HCl นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง ขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### 3) 1 M Tris-HCl buffer, pH 9.0 (neutralized buffer)

Tris base	121.1	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 9.0 ด้วย 6 M HCl นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง ขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### ข.4 การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในเทคนิค ELISA

#### 1) 0.2 M Phosphate buffer, pH 7.4 (PB stock)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	71.63	กรัม	ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	27.60	กรัม	ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

นำสารละลาย  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  มาไทเทรตด้วยสารละลาย  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  จนได้ pH 7.4. (เก็บเป็น stock)

#### 2) 0.01 M Phosphate buffer saline, pH 7.4 (PBS)

PB stock	1	ลิตร
NaCl	175.2	กรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น	20	ลิตร

3) 0.05 % (v/v) Tween-20 ใน PBS (PBS-T)		
Tween-20	0.5	มิลลิลิตร
PBS	1000	มิลลิลิตร
4) 5 % นมพร่องมันเนย		
นมพร่องมันเนย	5	กรัม
PBS	100	มิลลิลิตร
5) 205 mM potassium citrate buffer, pH 4.0		
Citric acid	43.1	กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
Potassium citrate	66.5	กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
นำสารละลาย Citric acid มาไทเทรตด้วยสารละลาย potassium citrate จนได้ pH 4.0 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส		
6) สับเสตรตTMB		
3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine (TMB)	2.5	มิลลิกรัม (ละลายใน DMSO 250 ไมโครลิตร)
205 mM potassium citrate buffer, pH 4.0	10	มิลลิลิตร
30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3.5	ไมโครลิตร
7) 1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (stop solution)		
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	102	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น	1	ลิตร
ข.5 การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในเทคนิค ICA		
1) 0.01 M phosphate buffer, pH 7.4 (PB)		
0.2 M Phosphate buffer, pH 7.4 (PB stock)	50	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น	1	ลิตร

2) 0.1% (v/v) Tween-20 ใน PB (PBT)		
Tween-20	1	มิลลิลิตร
0.01 M phosphate buffer, pH 7.4 (PB)	1	ลิตร
3) 2 mM sodium borate buffer, pH 8.2 (BB)		
Sodium tetraborat	0.76	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	1	ลิตร
ปรับ pH ให้ได้ 8.2 ด้วย 1 M HCl		
4) 0.2 M sodium carbonate		
Sodium carbonate	2.12	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
5) 10% (w/v) NaCl		
NaCl	10	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
6) 5% (w/v) BSA		
BSA	500	มิลลิกรัม
BB, pH 8.2	10	มิลลิลิตร
7) 2% (w/v) sucrose		
Sucrose	200	มิลลิกรัม
BB, pH 8.2	10	มิลลิลิตร
8) 1% (w/v) BSA ใน PB-T (blocking solution)		
BSA	100	มิลลิกรัม
PB-T	10	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค



CERTIFICATE OF ANALYSIS

KBS Thailand™

**Colloidal Gold, 20 nanometers**

Product Name	Colloidal Gold, 20nm
Catalog	KTOP-CG20001
Lot Number	20500/1207/1
Volume	500 ML
Peak wave length	519
Absorbance:	1.094
Storage	2°C - 8°C
Expiration Date	One years from the date of receipt (August, 2013)



**Atchara Poonchokpanich , Office Manager**

Kestrel Bio Sciences (Thailand) Co., Ltd., Certifies on the date above that this is an accurate record of the analysis of the subject lot and that the data conform to the specifications in effect for this product at the time of analysis.

Printed July, 2012

Kestrel Bio Sciences (Thailand) Co., Ltd.

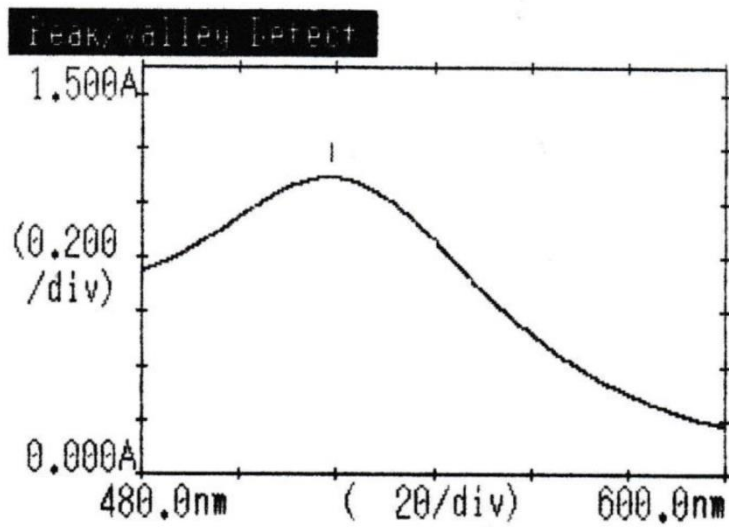
60/77 Moo 19, Navanakorn Ind., Zone 2

Paholyothin Rd., Klong 1, Klong Luang, Pathumthani, 12120

Mobile: +66 81 446 9176

Email: tah.kbsthailand@gmail.com

ภาพที่ ค.1 ใบรับรองการวิเคราะห์ห่อนุภาคทองขนาด 20 นาโนเมตร



Date: 17/Jul/2012 11:59:11  
 Measure mode: Abs  
 Scan range / nm: 600.0 - 480.0  
 Scan pitch / nm: 0.5  
 Scan speed: Slow  
 Slit width / nm: 1.0

Peak  
 519.00 1.094  
 Valley



*Ong Wanchai*

ภาพที่ ค.2 โครมาโตแกรมของอนุภาคทองคำขนาด 0 นาโนเมตร



## CERTIFICATE OF ANALYSIS

KBS Thailand™

### Colloidal Gold, 40 nanometers

Product Name	Colloidal Gold, 40nm
Catalog	KTOP-CG40003
Lot Number	40500/1208/2
Volume	500 ML
Peak wave length	522.50
Absorbance:	1.155
Storage	2°C - 8°C
Expiration Date	One years from the date of receipt (August, 2013)



**Atchara Poonchokpanich , Office Manager**

Kestrel Bio Sciences (Thailand) Co., Ltd., Certifies on the date above that this is an accurate record of the analysis of the subject lot and that the data conform to the specifications in effect for this product at the time of analysis.

Kestrel Bio Sciences (Thailand) Co., Ltd.

Printed August, 2012

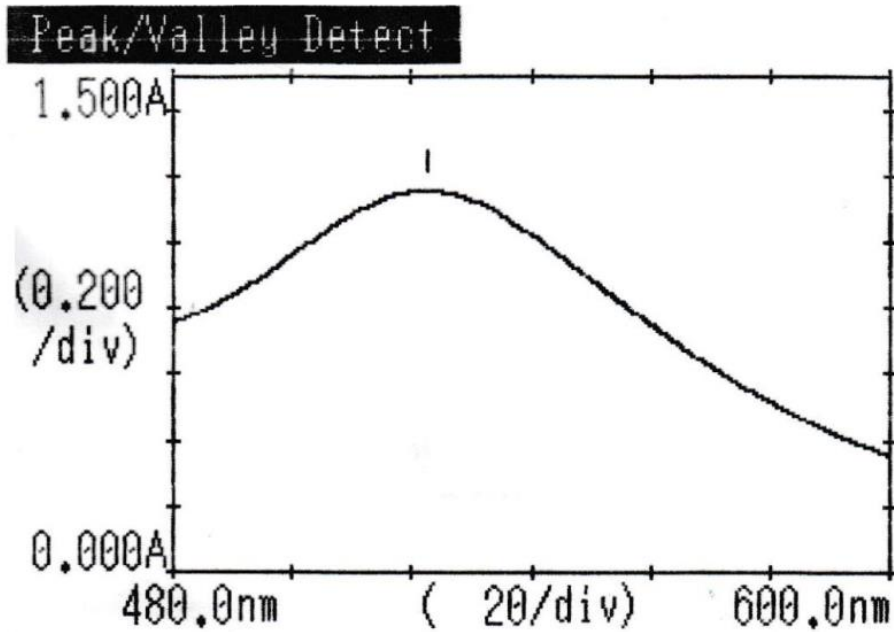
60/77 Moo 19, Navanakorn Ind., Zone 2

Paholyothin Rd., Klong 1, Klong Luang, Pathumthani, 12120

Mobile: +66 81 446 9176

Email: tah.kbsthailand@gmail.com

ภาพที่ ค.3 ใบรับรองการวิเคราะห์ห่อนุภาคทองขนาด 40 นาโนเมตร



Date: 30/Jul/2012 13:17:39  
 Measure mode: Abs  
 Scan range / nm: 600.0 - 480.0  
 Scan pitch / nm: 0.5  
 Scan speed: Slow  
 Slit width / nm: 1.0

Peak  
 522.50 1.155  
 Valley

*Om W...*



ภาพที่ ค.4 โครมาโตแกรมของอนุภาคทองขนาด 40 นาโนเมตร

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายนิติกร เจ๊ะยอด เกิดเมื่อวันที่ 12 มกราคม พ.ศ. 2533 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการหมัก จากคณะอุตสาหกรรม เกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีการศึกษา 2554 และเข้า ศึกษาต่อในหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2557 นำเสนอผลงานวิชาการระดับนานาชาติ ในหัวข้อ เรื่อง Lateral Flow Immunochromatographic Assay (LFIA) for the Detection of Tetracycline ในการประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยบัณฑิตศึกษา ระดับชาติและนานาชาติ 2560 ณ อาคารพจน์ สารสิน มหาวิทยาลัยขอนแก่น วันที่ 10 มีนาคม 2560

