

การพัฒนาวิธีการสกัดตัวอย่างนํานมโคดิบเพื่อตรวจวิเคราะห์ยาสัตว์ตกค้าง กลุ่ม Fluoroquinolones ด้วยวิธี ELISA

ปารัช ขุนพรม ภัทร์สุดา กุลเทียนประดิษฐ์ ธนกฤตา ประเสริฐลาภ
กมลวรรณ ศรีดาวงษ์ สมชาย วงศ์สมุทร

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีการสกัดตัวอย่างนํานมโคดิบสำหรับการวิเคราะห์ Fluoroquinolones โดยชุดทดสอบ ELISA ได้จัดทำขึ้นเพื่อให้มีความรวดเร็วมากกว่าที่กำหนดโดยชุดทดสอบ เตรียมตัวอย่างนํานมโคดิบให้มีความเข้มข้น 0 140 และ 480 ppb นำตัวอย่างเหล่านี้มาสกัดด้วยวิธีที่กำหนดโดยชุดทดสอบและวิธีที่พัฒนา แล้วนำไปวิเคราะห์โดยชุดทดสอบ ผลการวิเคราะห์นำมาเปรียบเทียบด้วยสถิติ pair sample t – test สรุปได้ว่าการสกัดด้วยวิธีที่กำหนดโดยชุดทดสอบและวิธีที่พัฒนาไม่มีนัยสำคัญของความแตกต่างทางสถิติ

คำสำคัญ : วิธีการสกัดตัวอย่าง นํานมโคดิบ การวิเคราะห์ Fluoroquinolones ชุดทดสอบ ELISA
กลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Development of extraction method of raw cow milk samples for analysis of fluoroquinolones by ELISA

Paruch Kunprom Phatsuda Kulthienpradit Thanagita Prasretlap
Kamonwan Sridawong Somchai Wongsamoot

Abstract

Development of extraction method of raw cow milk samples for analysis of fluoroquinolones by ELISA was established in order to be faster than recommendations of test kit. Raw cow milk samples were prepared for concentrations of 0, 140 and 480 ppb. These samples were extracted by the recommendations of test kit and method developed. Then these extracts were analyzed by ELISA test kit. Analysis results of each concentration of extracts were compared with the pair sample t-test. It was concluded that extraction methods by the recommendations of test kit and the developed method were not statistically significantly different.

Keywords : extraction method raw cow milk analysis of fluoroquinolones ELISA test kit

Milk and Milk Products Quality Control Division, Bureau of Quality Control of Livestock
Products, Department of Livestock Development

การพัฒนาวิธีการสกัดตัวอย่างนํ้านมโคดิบเพื่อตรวจวิเคราะห์ยาสัตว์ตกค้าง กลุ่ม Fluoroquinolones ด้วยวิธี ELISA

ปารัช ขุนพรม ภัทร์สุตา กุลเทียนประดิษฐ์ ธนกฤตา ประเสริฐลาภ
กมลวรรณ ศรีดาวงษ์ สมชาย วงศ์สมุทร

บทนำ

ฟลูออโรควิโนโลนเป็นกลุ่มยาปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลน ซึ่งเป็นยาที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี ตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ได้แก่ Ciprofloxacin, Enrofloxacin เป็นต้น (มาลินี ลิ้มโกคา, 2540) นิยมใช้ในการรักษาโรคในสัตว์ ยานี้เป็นอันตรายหากตกค้างในนํ้านมซึ่งสหภาพยุโรปกำหนดระดับของยาตกค้างสูงสุด (MRL) ในนํ้านมวัว Sum of enrofloxacin and ciprofloxacin เท่ากับ 100 ppb (commission Regulation (EU) No. 37/2010) ประเทศไทยมีการใช้ยานี้ในฟาร์มโคนม จึงอาจมีการตกค้างในนํ้านมได้แนวทางในการควบคุมสารตกค้างยาปฏิชีวนะในนํ้านมมีหลายประการ ประการหลักคือการควบคุมในฟาร์ม โดยเริ่มต้นด้วยใบสั่งยาที่ถูกต้องโดยจัดการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างเหมาะสม รมั้ดระวังอย่างรอบคอบในการหยุดยา ฟาร์มต้องตรวจสอบให้แน่ใจว่านํ้านมจากสัตว์ที่ได้รับการรักษาหรือระยะเวลาหยุดยาที่ยังไม่ครบตามกำหนดนั้นไม่ได้เข้าสู่ห่วงโซ่อาหาร มาตรการควบคุมเบื้องต้นนี้จะเสริมด้วยการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างยาปฏิชีวนะในนํ้านม (Food standard agency, 2015) มาตรฐานนํ้านมโคตามมาตรฐานสินค้าเกษตร 2553 ระบุว่าต้องไม่พบยาต้านจุลชีพ จากการทดสอบโดยชุดทดสอบเบื้องต้นที่มีผลการประเมินความใช้ได้ และประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ ๓๕๐) พ.ศ. ๒๕๕๖ เรื่อง นมโคระบุว่า นมโคต้องไม่มีสารที่อาจเป็นพิษ สารเป็นพิษจากจุลินทรีย์ และสารปนเปื้อน ในปริมาณที่อาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพ เช่น สารตกค้างจากยาฆ่าแมลง ยาปฏิชีวนะ ดังนั้นสารตกค้างยาปฏิชีวนะในนํ้านมโคดิบจึงเป็นเรื่องที่กรมปศุสัตว์ให้ความสนใจ โดยในการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างยาปฏิชีวนะในนํ้านมในงานวิจัยนี้เลือกใช้ชุดทดสอบ Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) สำหรับตรวจหายากลุ่ม Fluoroquinolones เนื่องจากเป็นวิธีที่รวดเร็ว สามารถบ่งชี้ชนิดยาได้ ซึ่งดีกว่าวิธีที่ใช้เป็นงานประจำของกลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม อย่างไรก็ตามเนื่องจากเป็นวิธีที่ต้องเลือกใช้วิธีการสกัดตัวอย่างที่เหมาะสมเพื่อให้เกิด

ความรวดเร็วและความถูกต้องของผลการวิเคราะห์ซึ่งวิธีการสกัดตัวอย่างที่ระบุมาโดยชุดทดสอบใช้เวลานาน

1. วัตถุประสงค์

1. พัฒนาวิธีสกัดตัวอย่างน้ำมันที่เหมาะสมและรวดเร็วเพื่อนำมาใช้ในการตรวจหายาชนิดนี้ตกค้างในน้ำมันโคดิบด้วยวิธี ELISA

2. ขอบข่าย

เปรียบเทียบวิธีสกัดตัวอย่างน้ำมัน 2 วิธี ดังนี้

วิธีที่ 1 วิธีวิเคราะห์ที่กำหนดโดยชุดทดสอบ

วิธีที่ 2 วิธีวิเคราะห์ทางเลือกที่พัฒนา

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 3.1 ได้วิธีการสกัดตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ยาในกลุ่มฟลูโอโรควิโนลोनเบื้องต้นที่เหมาะสมและรวดเร็วเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำมันโคดิบด้วยวิธี ELISA

4. วิธีการดำเนินงาน

- 4.1 เตรียมตัวอย่างน้ำมันโคดิบให้มีระดับความเข้มข้นของยา 3 ความเข้มข้น เท่ากับ 0, 140 และ 480 ppb ความเข้มข้นละ 10 ตัวอย่าง

- 4.2 เปรียบเทียบวิธีสกัดตัวอย่างน้ำมันโคดิบ 2 วิธี ดังนี้

4.2.1 วิธีที่ 1 วิธีวิเคราะห์ที่กำหนดโดยชุดทดสอบ

ขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง

4.2.1.1 ใส่ตัวอย่างน้ำมันโคดิบในหลอดทดลอง 50 μ l

4.2.1.2 เติม 8% methanol in sample dilution buffer 4950 μ l mix โดยใช้เครื่อง Shaker (Head over head) 30 นาที

4.2.1.3 นำไป centrifuge 10 นาที 2000 xg

4.2.1.4 ดูดส่วนใสด้านล่างชั้นไขมันเพื่อนำไปทดสอบ ELISA Test

4.2.2 วิธีที่ 2 วิธีวิเคราะห์ทางเลือกที่พัฒนา

ขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง

4.2.2.1 ใส่ตัวอย่างน้ำมันโคดิบ 1 ml ลงใน centrifuge tube

4.2.2.2 นำไป centrifuge 5 นาที 4000 xg

4.2.2.3 ดูดชั้นไขมันทิ้ง

4.2.2.4 ดูดส่วนใสมา 20 µl เติม 8% methanol in sample dilution buffer

1980 µl mix ด้วย vortex เป็นเวลา 1 นาที นำไปทดสอบ ELISA Test

ทำการวิเคราะห์ผลการวิเคราะห์ของวิธีทดสอบทั้ง 2 วิธีด้วยสถิติ t-test เพื่อพิจารณาความแตกต่างของผลการทดลอง

5. ผลการทดลอง

5.1 ตารางแสดงผลการทดลอง

ความเข้มข้นของยา (ppb)			
วิธี	0	140	480
วิธีที่ 1	0.00	146.20	411.30
	0.00	128.60	457.80
	0.00	162.10	440.90
	0.00	148.10	483.70
	0.00	123.90	400.30
	0.00	141.60	406.30
	0.00	169.40	447.80
	0.00	129.90	434.40
	0.00	160.20	476.50
	0.00	148.40	394.90
	0.00	157.70	458.00
	0.00	178.40	459.80
วิธีที่ 2	0.00	151.40	430.00
	0.00	172.80	414.10
	0.00	141.40	383.10
	0.00	157.30	450.60
	0.00	175.40	455.10
	0.00	144.80	456.50

ความเข้มข้นของยา (ppb)			
วิธี	0	140	480
วิธีที่ 2	0.00	167.00	404.70
	0.00	135.70	379.20
$\bar{x}$	0.00	154.25	421.17
SD	-	18.43	37.95
t_{cal}	-	-1.83	0.44
t_{crit}	-	2.10	2.10

เกณฑ์การยอมรับได้ ($t_{cal} < t_{crit}$)

6. สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดสอบและการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย t-test พบว่าการสกัดตัวอย่างน้ำมันด้วยวิธีวิเคราะห์ทางเลือกที่พัฒนาให้ผลไม่แตกต่างจากวิธีที่กำหนดโดยชุดทดสอบ ดังนั้นการใช้วิธีสกัดตัวอย่างน้ำมันด้วยวิธีวิเคราะห์ทางเลือกที่พัฒนาสามารถใช้แทนวิธีที่กำหนดโดยชุดทดสอบได้ ซึ่งจะทำให้การทดสอบมีความรวดเร็ว ลดเวลาลงได้จาก 40 นาทีเหลือ 5 นาทีต่อรอบการสกัดและไม่ต้องใช้เครื่องมือ Shaker ที่ต้องใช้ในขั้นตอนการสกัดตัวอย่างน้ำมันดิบซึ่งระบุโดยชุดทดสอบ

7. ข้อเสนอแนะ

ไขมันที่อยู่ในน้ำมันดิบหากปะปนอยู่กับตัวอย่างน้ำมันดิบอาจทำให้ปฏิกิริยาของ ELISA เกิดไม่สมบูรณ์ ดังนั้นขณะทำการดูดตัวอย่างใส่ในหลุมของ microtiterplate ควรระมัดระวังไขมันที่อาจติดกับ pipette tip และหยดลงไปในหลุมของ microtiterplate ควรทำการทดลองเพิ่มเติมในความเข้มข้นอื่นๆ ที่อยู่ในช่วง standard curve

8. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นมที่ช่วยเหลือในการวิเคราะห์และเจ้าหน้าที่งานสารตกค้างและฮอริโมน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สารมาตรฐาน

9.เอกสารอ้างอิง

- [1] ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ ๓๕๐) พ.ศ. ๒๕๕๖ เรื่อง นมโค ราชกิจจานุเบกษา เล่ม ๑๓๐ ตอนพิเศษ ๘๗ ง ลงวันที่ ๒๔ กรกฎาคม ๒๕๕๖
- [2] สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ มาตรฐานสินค้าเกษตร ๒๕๕๓ นำนมโคดิบ. กรุงเทพมหานคร.
- [3] มาลินี ลิ้มโกคา. การใช้ยาต้านจุลชีพในสัตว์: สัตว์บกและสัตว์น้ำ พิมพ์ครั้งที่ ๔ โรงพิมพ์ จรัสสินทวงศ์. ๒๕๔๐.
- [4] Food standard agency. Information and guidance on the testing of milk for antibiotic residues. 2015
- [5] Procedural Manual twenty first edition. Codex Alimentarius Commission. FAO/WHO Food Standards Programme. Rome. 2013
- [6] Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue.