



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การประเมินประสิทธิภาพชุดแถบทดสอบแร็คโตพามีนตกค้าง โดย lateral flow strip test
ในตัวอย่างเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทิกา คงเจริญพร และคณะ

กันยายน 2562

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การประเมินประสิทธิภาพชุดแถบทดสอบโรคโศพามีนตกค้าง โดย lateral flow strip test
ในตัวอย่างเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์

คณะผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทิกา คงเจริญพร

รองศาสตราจารย์ ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส

นางทรงจันทร์ ภูทอง

นายอนุมาศ บัวเขียว

นางสาวอุมพร พิมพิทักษ์

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกสว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย จากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สทว.) เลขที่สัญญา SRI6120204 คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณ หน่วยปฏิบัติการวิจัยศูนย์ความเสี่ยงอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ช่วยประสานโครงการวิจัยจนได้รับทุนอุดหนุนในครั้งนี้

ขอขอบคุณ กลุ่มงานวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์และฮอร์โมน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ และจากกลุ่มงานวิเคราะห์สารตกค้างในอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง ด้วยวิธี LC-MS/MS

คณะผู้วิจัย

รายละเอียดโครงการ

สัญญาเลขที่.....SRI6120204.....

ชื่อโครงการ (ไทย) การประเมินประสิทธิภาพชุดแถบทดสอบแร็คโตพามีนตกค้าง โดย lateral flow strip test ใน
ตัวอย่างเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์

ชื่อโครงการ (อังกฤษ) Validation of lateral flow strip test for ractopamine residues detection in meat
sample and feed

หัวหน้าโครงการ...ผศ.ดร. นันทิกา คงเจริญพร.....

สังกัด.....สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.....

ผู้ประกอบการผู้ร่วมทุน.....ไม่มี.....

งบประมาณ.....925,000 บาท.....ระยะเวลา.....15 กันยายน 2561 ถึง 14 กันยายน 2562.....

Abstract

This project was continuing from the prototype for the ractopamine residue detection by lateral flow strip test that received the petty patent No.14804 on 11 January 2019. Therefore, the purpose of this present study was to validate of lateral flow strip test for ractopamine residue detection in meat and feed samples, to stabilize the strip test and to compare method with the produced and commercial strip test and LC-MS/MS method. Amount 2,000 strip tests were produced. The quality result was evaluated by naked eye and the qualitative result was taken a picture and evaluated the intensity of color by Image J program. The result showed that the cut-off values of the strip tests were 3, 6, and 5 ng/mL and limit of detection values of this strip test were 0.42, 0.85, and 0.89 ng/mL in buffer, meat, and feed respectively. The accuracy and precision values of this strip test in each extract sample were accepted in range by AOAC.

Twenty of pork and beef sample were bought from local market. The feed sample were kindly provided from Bureau of Quality Control of Livestock Products, Department of Livestock Development Ministry of Agriculture and Cooperatives. The extract sample of these were detected the ractopamine residues using the developed and commercial strip test and random confirming the result by LC-MS/MS which found the corresponding result as negative. In addition, this strip test could be stable in 9 month and kept in wide range of temperature (4-30°C)

Therefore, the evaluation results indicated that this the lateral flow strip test are accuracy and acceptable for detecting ractopamine residues in meat and feed and the technology of this strip test might be transferred to produces commercial strip test.

Keyword: monoclonal antibody, lateral Flow strip test, ractopamine

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยต่อยอดจากต้นแบบชุดทดสอบสำหรับตรวจวัดแครโตะพามีนตกค้าง โดยวิธี Lateral flow strip test ที่ได้รับอนุสิทธิบัตรเลขที่ 14804 เมื่อวันที่ 11 มกราคม 2562 ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อประเมินประสิทธิภาพของชุดแถบทดสอบแครโตะพามีนตกค้าง ในเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์ ความคงสภาพของชุดแถบทดสอบ และการทดสอบเปรียบเทียบจากการใช้ชุดแถบทดสอบที่ผลิตเองกับที่มีจำหน่าย และวิธี LC-MS/MS โดยได้ทำการเตรียมชุดแถบทดสอบจำนวน 2,000 ชุด ทำการแปลผลเชิงคุณภาพทดสอบด้วยสายตา และเชิงปริมาณด้วยการถ่ายภาพและวัดความเข้มแถบสีด้วยโปรแกรม image J พบว่า ค่า cut-off ของชุดแถบทดสอบในบัฟเฟอร์ เนื้อสัตว์และอาหารสัตว์ เท่ากับ 3, 6 และ 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และค่า limit of detection เท่ากับ 0.42, 0.85 และ 0.89 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ผลการทดสอบค่าความถูกต้องและแม่นยำของชุดแถบทดสอบในสารสกัดจากตัวอย่างแต่ละชนิด มีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

จากการเก็บตัวอย่างเนื้อหมู เนื้อวัว จากตลาดชนิดละ 20 ตัวอย่าง และอาหารสัตว์ 20 ตัวอย่าง ได้รับอนุเคราะห์จากกลุ่มงานวิเคราะห์สารตกค้างในอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ นำมาทดสอบการตกค้างของแครโตะพามีน โดยใช้ชุดแถบทดสอบที่ผลิต เทียบกับชุดแถบทดสอบที่มีจำหน่าย และสุ่มยืนยันผลด้วย LC-MS/MS พบว่า ได้ผลทดสอบเป็นลบ สอดคล้องกัน นอกจากนี้จากการทดสอบความคงสภาพ พบว่าชุดแถบทดสอบมีความคงสภาพถึง 9 เดือน และสามารถเก็บได้ที่อุณหภูมิช่วงกว้าง (4-30 องศาเซลเซียส)

ดังนั้นจากผลการประเมินประสิทธิภาพชุดแถบทดสอบ แสดงให้เห็นว่า ชุดแถบทดสอบ โดยวิธี Lateral flow strip test มีความถูกต้องแม่นยำ และน่าเชื่อถือ สามารถนำไปตรวจวัดแครโตะพามีนตกค้าง ในเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์ได้ และอาจถ่ายทอดเทคโนโลยีของชุดแถบทดสอบไปใช้ในเชิงพาณิชย์ได้

คำสำคัญ: แครโตะพามีน, แถบทดสอบ, โมนาโคลนอลแอนติบอดี

บทสรุปผู้บริหาร

สำหรับโครงการวิจัยนี้เป็นงานวิจัยที่ต่อยอดมาจาก “แถบทดสอบอย่างรวดเร็วสำหรับตรวจหาสารเร่งเนื้อแดง และยาปฏิชีวนะตกค้างในตัวอย่างอาหารบริโภค ภายใต้ทุนส่งเสริมกลุ่มวิจัย (เมธีวิจัยอาวุโส) ศาสตราจารย์ ดร. อรรพรรณ ชัยลภากุล ปี 2560-2561 ซึ่งได้พัฒนาชุดแถบทดสอบแร็คโตพามีนต้นแบบสำหรับตรวจวัดแร็คโตพามีน ได้รับ อนุสิทธิบัตร เลขที่ 14804 เมื่อวันที่ 11 มกราคม 2562 วิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทำประเมินประสิทธิภาพการ ตรวจวัดแร็คโตพามีนตกค้าง โดยใช้ชุดแถบทดสอบแร็คโตพามีน ในตัวอย่างเนื้อสัตว์ และอาหารสัตว์ โดยวิธี lateral flow strip test ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่มีขั้นตอนการทดสอบที่ง่าย ให้ผลทดสอบรวดเร็ว เหมาะสำหรับเป็นวิธีคัดกรองเบื้องต้น งานวิจัยเริ่มจากการผลิตโมโนโคลแอนติบอดีต่อแร็คโตพามีน ซึ่งเป็นสารสำคัญ ในปริมาณมาก และนำมาใช้ในการ เตรียมชุดแถบทดสอบ จำนวน 2,000 ชุด ทำการประเมินประสิทธิภาพผลทดสอบของชุดแถบทดสอบแร็คโตพามีนด้วย สายตา ในเชิงคุณภาพ และใช้การถ่ายภาพร่วมกับโปรแกรม Image J เข้ามาช่วย เพื่อประเมินในส่วนของความ สม่ำเสมอหรือคงที่ของเส้นสีที่ปรากฏในแต่ละชุดทดสอบ และผลทดสอบในเชิงปริมาณ จากการนำชุดแถบทดสอบมา ตรวจวัดแร็คโตพามีนในตัวอย่างเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์ พบว่า ค่า cut-off ของชุดแถบทดสอบในเนื้อสัตว์และอาหาร สัตว์ เท่ากับ 6 และ 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ค่าความถูกต้องและแม่นยำของชุดแถบทดสอบ อยู่ในช่วงเกณฑ์ ที่ยอมรับได้ จากการประเมินประสิทธิภาพของชุดแถบทดสอบ แสดงให้เห็นว่ามีความถูกต้องแม่นยำ และน่าเชื่อถือ มีความคงตัวเก็บรักษาไว้ได้นานถึง 9 เดือน ที่ช่วงอุณหภูมิ 4-30 องศาเซลเซียส โดยไม่เสื่อมสภาพ ดังนั้นวิธีการใช้ชุด แถบทดสอบในการตรวจวัดแร็คโตพามีนในเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์ สามารถนำไปใช้เป็นเครื่องมือในการวิเคราะห์ด้าน ความปลอดภัยทางอาหาร ที่สามารถผลิตขึ้นเองในประเทศ เพื่อเฝ้าระวังการตกค้างของแร็คโตพามีน ที่อาจส่งผลต่อ ผู้บริโภคได้ รวมทั้งสามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีไปยังผู้ผลิตและผู้จำหน่ายที่สนใจ ในทางพาณิชย์ต่อไป

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
รายละเอียดโครงการ	ข
Abstract	ค
บทคัดย่อ	ง
บทสรุปผู้บริหาร	จ
สารบัญ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาของโครงการ	1
1.2 วัตถุประสงค์	4
1.3 แผนการดำเนินการ	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 แครดิโพนามีน	5
2.2 มาตรฐานสารตกค้างของแครดิโพนามีน	6
2.3 ผลกระทบของสารเร่งเนื้อแดง	7
2.4 หลักการของแถบทดสอบ Lateral flow immunoassay	9
2.5 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์แถบทดสอบแครดิโพนามีนจากต่างประเทศ	12
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	13
บทที่ 3 ระเบียบวิธีการวิจัย	15
3.1 การเตรียมชุดแถบทดสอบต้นแบบ	15
3.1.1. การเตรียมสารละลายสำหรับประกอบชุดแถบทดสอบ	15
3.1.2. การเตรียมส่วนประกอบของชุดแถบทดสอบ	17
3.2 วิธีการทดสอบและการแปลผลของชุดแถบทดสอบ	19
3.2.1. วิธีการทดสอบ	19
3.2.2. การแปลผลชุดแถบทดสอบ	20
3.2.3. การวิเคราะห์ผล	20

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
3.3 การทดสอบประสิทธิภาพชุดแถบทดสอบแร็คโตะพามีน	21
3.3.1. การศึกษาผลของแมทริกซ์ในตัวอย่าง	21
3.3.2. การหาค่าความไวของชุดแถบทดสอบ	23
3.3.3. การทดสอบความจำเพาะของชุดแถบทดสอบแร็คโตะพามีน	24
3.3.4. การประเมินวิธีทดสอบของชุดแถบทดสอบแร็คโตะพามีน	24
3.3.5. การทดสอบความคงสภาพ	25
3.4 การเปรียบเทียบการทดสอบตัวอย่างด้วยชุดแถบทดสอบที่ผลิตขึ้นเองกับชุดแถบทดสอบทางการค้า	25
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผลการวิจัย	26
4.1 การเตรียมชุดแถบทดสอบแร็คโตะพามีน	26
4.1.1. ผลการเตรียมสารละลาย MAb-Colloidal gold	26
4.1.2. ผลการประกอบชุดแถบทดสอบ	27
4.2 การประเมินประสิทธิภาพชุดแถบทดสอบแร็คโตะพามีนในตัวอย่างเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์	27
4.2.1. ผลของแมทริกซ์ในตัวอย่างเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์	27
4.2.2. การหาค่าความไวของชุดแถบทดสอบ	28
4.2.3. การเกิดปฏิกิริยาข้ามของชุดแถบทดสอบ	34
4.2.4. การหาค่าความถูกต้องและแม่นยำของชุดแถบทดสอบแร็คโตะพามีน	36
4.2.5. ความคงสภาพของชุดแถบทดสอบ	40
4.3 การเปรียบเทียบการทดสอบตัวอย่างด้วยชุดแถบทดสอบที่ผลิตขึ้นเองเปรียบเทียบกับชุดแถบทดสอบทางการค้าและวิธี LC-MS/MS	42
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	46
บทที่ 6 ผลลัพธ์และประโยชน์ที่ได้จากงานวิจัย	48
6.1 ผลที่ได้จากงานวิจัย	48
6.2 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย	48
6.3 ผลกระทบของงานวิจัย	48
เอกสารอ้างอิง	50

สารบัญ (ต่อ)

ภาคผนวก	54
แผนการดำเนินการวิจัย	82
ผลที่ได้รับ	83

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1.1 การทดสอบและการแปลผลของชุดแถบทดสอบ	3
รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของแรคโตพามีนและสารอื่นๆ ในกลุ่มเบต้า-อะโกนิสต์	6
รูปที่ 2.2 ส่วนประกอบทั่วไปของแถบทดสอบ	10
รูปที่ 2.3 (ก) ส่วนประกอบของแถบทดสอบรูปแบบแข่งขัน (ข) หลักการทำงาน และ (ค) รูปแบบการแปลผลของรูปแบบแข่งขัน	11
รูปที่ 2.4 ตัวอย่างชุดแถบทดสอบแรคโตพามีนทางการค้าจากต่างประเทศ	12
รูปที่ 3.1 การเชื่อมแรคโตพามีนกับโปรตีนพาหะ (BSA) โดยปฏิกิริยา Mannich	15
รูปที่ 3.2 การเตรียมอนุภาคทองที่ติดฉลากกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี	17
รูปที่ 3.3 ส่วนประกอบของแถบทดสอบ	18
รูปที่ 3.4 ส่วนประกอบของแถบทดสอบ	18
รูปที่ 3.5 ขั้นตอนการประกอบชุดแถบทดสอบ	19
รูปที่ 3.6 วิธีการทดสอบและการแปลผลชุดแถบทดสอบโดยการประเมินด้วยสายตา	20
รูปที่ 3.7 รูปแบบการแปลผลด้วยโปรแกรมอ่านค่าสี Image J	21
รูปที่ 3.8 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดจากตัวอย่างเนื้อสัตว์	22
รูปที่ 3.9 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดจากตัวอย่างอาหารสัตว์	23
รูปที่ 4.1 ความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการเชื่อมติดกับอนุภาคทอง	26
รูปที่ 4.2 (ก) ผลค่า cut-off ของแถบทดสอบที่ทดสอบด้วยสารละลายมาตรฐานแรคโตพามีนที่ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.75, 1, 2, และ 3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลาย 0.1% PBS-T โดยการแปลผลด้วยสายตา (ข) ค่า % ความเข้มสีของเส้นทดสอบด้วยโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ	29
รูปที่ 4.3 กราฟสารละลายมาตรฐานแรคโตพามีนในสารละลายบัฟเฟอร์	29
รูปที่ 4.4 (ก) ผลค่า cut-off ของแถบทดสอบที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากเนื้อหมูเจือจางด้วย 0.25% PBS-T ที่อัตราส่วน 1:3 โดยการแปลผลด้วยสายตา (ข) แสดงค่า % ความเข้มสีของเส้นทดสอบด้วยโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ	31
รูปที่ 4.5 (ก) ผลค่า cut-off ของแถบทดสอบที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากเนื้อวัวเจือจางด้วย 0.25% PBS-T ที่อัตราส่วน 1:3 โดยการแปลผลด้วยสายตา (ข) แสดงค่า % ความเข้มสีของเส้นทดสอบด้วยโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ	31

สารบัญรูป (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 4.6 (ก) ผลค่า cut-off ของแถบทดสอบที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากอาหารสัตว์เจือจางด้วย 0.25% PBS-T ที่อัตราส่วน 1:2 โดยการแปลผลด้วยสายตา (ข) แสดงค่า % ความเข้มสีของเส้นทดสอบด้วยโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ	32
รูปที่ 4.7 กราฟสารละลายมาตรฐานแรคโตพามีนในสารสกัดจากเนื้อวัว	32
รูปที่ 4.8 (ก) ผลค่า cut-off ของแถบทดสอบที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากอาหารสัตว์เจือจางด้วย 0.25% PBS-T ที่อัตราส่วน 1:2 โดยการแปลผลด้วยสายตา (ข) แสดงค่า % ความเข้มสีของเส้นทดสอบด้วยโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ	33
รูปที่ 4.9 กราฟสารละลายมาตรฐานแรคโตพามีนในสารสกัดจากอาหารสัตว์	34
รูปที่ 4.10 ทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามด้วยเคลนบูเทอรอลและซัลบูทามอลด้วยชุดแถบทดสอบที่ผลิตขึ้นเอง	35
รูปที่ 4.11 ค่า % ความเข้มสีของชุดแถบทดสอบแรคโตพามีนต่อการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C และอุณหภูมิห้องในระยะเวลาต่าง ๆ กัน	41

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 ปริมาณสารสูงสุดที่ยอมรับให้มีการตกค้างของแรคโตพามีน	7
ตารางที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์ Intra-variation assay ในตัวอย่างเนื้อหมู (n=6)	37
ตารางที่ 4.2 ผลการวิเคราะห์ Inter-variation assay ในตัวอย่างเนื้อหมู (N=3)	37
ตารางที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์ Intra-variation assay ในตัวอย่างเนื้อวัว (n=6)	38
ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์ Inter assay ในตัวอย่างเนื้อวัว (N=3)	38
ตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์ Intra assay ในตัวอย่างอาหารสัตว์ (n=6)	39
ตารางที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์ Inter assay ในตัวอย่างอาหารสัตว์ (N=3)	39
ตารางที่ 4.7 ผลการทดสอบความคงสภาพของชุดแถบทดสอบแรคโตพามีนต่อการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C และอุณหภูมิห้องในระยะเวลาต่าง ๆ กัน	41
ตารางที่ 4.8 เปรียบเทียบการใช้งานชุดทดสอบต้นแบบกับชุดทดสอบทางการค้าและวิธี LC-MS/MS ด้วยตัวอย่างเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์	43

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงการ

ประเทศไทยถือว่าเป็นประเทศเกษตรกรรม มีการบริโภคผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรทั้งจากสัตว์และพืชภายในประเทศ และส่งออกผลิตภัณฑ์เกษตรเป็นลำดับต้นๆ ของโลก นอกจากนี้ยังเป็นผู้นำเข้าสินค้าผลิตภัณฑ์เกษตรเช่นกัน ซึ่งกระบวนการผลิตสินค้าเกษตรในปัจจุบัน ทั้งที่ได้จากการเพาะปลูก และการเลี้ยงสัตว์ มีการใช้สารเคมีในกระบวนการผลิต เช่น ยาปฏิชีวนะ ยากำจัดแมลงและวัชพืช สารเติมแต่งต่างๆ เพื่อวัตถุประสงค์ต่างๆ เช่น เพื่อป้องกันโรคและรักษา เพื่อเร่งการเจริญเติบโต และเพื่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ตามความต้องการของตลาด เป็นต้น ซึ่งสารเคมีที่ใช้เหล่านี้ ถ้าใช้ในปริมาณที่มากเกินไป ระยะเวลาใช้สารหรือการหยุดใช้ที่ไม่เหมาะสม หรือใช้ผิดวัตถุประสงค์การใช้งาน ทำให้สารเคมีไม่สลายไปก่อนการนำไปบริโภค ซึ่งอาจนำไปสู่การปนเปื้อนหรือตกค้างของสารเคมีในผลิตภัณฑ์เกษตรเพื่อการบริโภคได้ นอกจากนี้ในปัจจุบันกระแสความต้องการของผู้บริโภค ซึ่งห่วงใยในสุขภาพมากขึ้น ต้องการอาหารที่มีคุณภาพตามมาตรฐานความปลอดภัย ไม่ต้องการอาหารที่ปนเปื้อนที่มาจากกระบวนการผลิต ลดความเสี่ยงที่จะมีผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค ดังนั้นหน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับเรื่องความปลอดภัยทางอาหาร ทั้งจากนานาชาติรวมทั้งประเทศ จึงมีการกำหนดปริมาณมาตรฐานอาหารที่มีการตกค้างสารเคมี เพื่อใช้เป็นค่ามาตรฐานในการตรวจติดตามและเฝ้าระวังคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารนั้น ซึ่งถ้ามีการตรวจพบสารตกค้างเกินกว่ามาตรฐานที่ตั้งไว้ นั้นแสดงว่าคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารไม่ได้มาตรฐานความปลอดภัย ส่งอาจส่งผลต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้

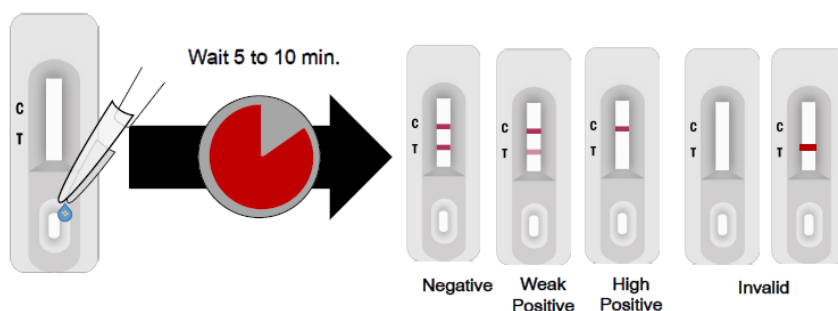
แรคโตพามีน (Ractopamine) เป็นสารเคมีกลุ่มเบต้า-อะโกนิสต์ (beta-agonist) เช่นเดียวกับสารซัลบูเทอรอล และคลีนบูลเทอรอล หรือเรียกทั่วไปว่า “สารเร่งเนื้อแดง” ถูกนำมาใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหาร เพื่อลดไขมัน โดยผสมในน้ำหรือในอาหารสัตว์ ทำให้สัตว์มีปริมาณเนื้อแดงเพิ่มขึ้น และมีการเจริญเติบโตดีขึ้น อย่างไรก็ตามการใช้แรคโตพามีนนั้น มีผลต่อการเต้นของหัวใจและเกิดการขยายของหลอดเลือดได้ ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของสัตว์โดยตรงและสุขภาพของมนุษย์ได้ ซึ่งบางประเทศโดยเฉพาะสหรัฐอเมริกา อนุญาตให้ใช้แรคโตพามีน ในการเลี้ยงสัตว์ประเภทสุกรและโค จากคณะกรรมการอาหารโครงการมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศหรือ Codex (Codex Alimentarius Commission) ได้กำหนดปริมาณสารตกค้างสูงสุดที่อนุญาตให้มีได้ของแรคโตพามีน (Maximum Residue Limits, MRLs) ในเนื้อสัตว์และไขมันไม่เกิน 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และในตับและไตไม่เกิน 40 และ 90 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ แต่ในบางประเทศ เช่น ประเทศในสหภาพยุโรป จีนและประเทศไทยไม่อนุญาตให้ใช้แรคโตพามีนเลี้ยงสัตว์เพื่อการบริโภคเนื้อ

ดังนั้นหน่วยงานของประเทศไทยที่เกี่ยวข้องกับความปลอดภัยด้านอาหารสำหรับผู้บริโภค จึงมีมาตรการด้านกฎหมายเกี่ยวกับการใช้สารเร่งเนื้อแดง ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 269) เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีการปนเปื้อนสารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ “ด้วยปรากฏว่ามีการนำสารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ ซึ่งช่วยในการขยายหลอดลม แก้อาการหอบหืดในมนุษย์ไปใช้ในวงจรผลิอาหารอันเป็นการใช้ที่ผิดวัตถุประสงค์ เช่น ใช้เพื่อลดไขมันเพิ่มปริมาณเนื้อแดงในสุกร เป็นต้น ดังนั้นเพื่อเป็นการป้องกันอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภค จึงจำเป็นต้องกำหนดมาตรฐานอาหารที่มีการปนเปื้อนสารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ โดยให้อาหารทุกชนิดมีมาตรฐานโดยไม่พบการปนเปื้อนสารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ และเกลือของสารกลุ่มนี้ รวมถึงสารในกระบวนการสร้างและสลาย (metabolite) สารดังกล่าว” นอกจากนี้กรมปศุสัตว์ ตาม พรบ. ควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558 ห้ามใช้สารเร่งเนื้อแดงกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ ผสมในอาหารสัตว์ทุกชนิด ยังมีประกาศในราชกิจจานุเบกษา เมื่อวันที่ 11 สิงหาคม 2560 เรื่อง “หลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขการรับรองฟาร์มเลี้ยงสัตว์ปลอดสารเร่งเนื้อแดงหรือสารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์” ซึ่งเป็นการส่งเสริมให้เกษตรกรไม่ใช้สารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ในฟาร์มเลี้ยงสุกร และฟาร์มเลี้ยงโคขุน ซึ่งเป็นการลดความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นจากการปนเปื้อนสารเร่งเนื้อแดงในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ซึ่งมีผลกระทบต่อผู้บริโภค อย่างไรก็ตามปัจจุบันมีการลักลอบใช้สารเร่งเนื้อแดงการเลี้ยงสัตว์ที่ใช้เนื้อบริโภคในประเทศและมีการนำเข้าผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์จากต่างประเทศ ซึ่งการติดตามเฝ้าระวังการตกค้างของสารเร่งเนื้อแดงในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ทั้งผลิตจากภายในประเทศ และจากการนำเข้าจึงเป็นสิ่งจำเป็น ซึ่งวิธีวิเคราะห์สารเร่งเนื้อแดง รวมทั้งแคโรทีน สามารถทำได้หลายวิธี ทั้งวิธี confirmation method ซึ่งเป็นการยืนยันผลทดสอบโดยใช้เครื่องมือ เช่น วิธี LC-MS, HPLC (Wu, 2014 และ Ding, 2015) และวิธี screening method ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการคัดกรองเบื้องต้น ก่อนส่งวิเคราะห์เพื่อยืนยันอีกครั้ง ดังเช่น วิธี immunoassay (He, 2008, Li, 2010, Zhang, 2009 and Zhang, 2012)

เทคนิค immunoassay เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมนำมาตรวจวิเคราะห์สารเร่งเนื้อแดง เช่น Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) และ lateral flow immunoassay หรือ immunochromatography โดยอาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจนหรือสารที่สนใจ นิยมใช้ตรวจคัดกรองตัวอย่างเบื้องต้นหรือติดตามการตกค้างสารเร่งเนื้อแดงในผลิตภัณฑ์อาหาร (He, 2008, Li, 2010, Zhang, 2009 and Zhang, 2012) คณะผู้วิจัยได้ประสบความสำเร็จในการผลิตเซลล์ไฮบริมาสำหรับผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแคโรทีน (Buakeaw, 2016) และนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแคโรทีนที่ได้ไปพัฒนาต่อเป็นชุดแถบทดสอบสำหรับการตรวจวัดแคโรทีนต้นแบบ โดยวิธี immunochromatography แบบ lateral flow immunoassay หรือเรียกว่า strip test โดยอาศัยหลักการของการนำแอนติบอดีต่อแคโรทีน ติดฉลากด้วยอนุภาคทอง เคลื่อนที่ไปทำปฏิกิริยากับแคโรทีนบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน เกิดเป็นสีม่วงแดงของอนุภาคทอง ทำให้เห็นผลทดสอบด้วย

ตาเปล่า เนื่องจากแรคโตพามีนเป็นสารโมเลกุลเล็ก การทดสอบแรคโตพามีนจึงเป็นแบบแข่งขัน (competitive assay) ระหว่างแรคโตพามีนในตัวอย่างกับแรคโตพามีนที่เชื่อมกับโปรตีนบนเมมเบรน ให้ผลทดสอบเชิงคุณภาพ กรณีที่ตัวอย่างมีแรคโตพามีนจะไปแย่งจับกับแอนติบอดีที่ติดฉลากอนุภาคทอง ทำให้ไม่สามารถจับกับแรคโตพามีนที่เชื่อมกับโปรตีนตรึงอยู่บนเส้นทดสอบบนเมมเบรนได้ จึงไม่มีแถบสีปรากฏขึ้น หมายความว่าให้ผลทดสอบเป็นบวก ในกรณีที่ในตัวอย่างไม่มีแรคโตพามีน แอนติบอดีที่ติดฉลากอนุภาคทอง ทำให้สามารถจับกับแรคโตพามีนที่เชื่อมกับโปรตีนตรึงอยู่บนเส้นทดสอบบนเมมเบรนได้ จึงมีแถบสีปรากฏที่เส้นทดสอบ การแปลผลการทดสอบ แสดงดังรูปที่ 1.1 จะเห็นว่าวิธีนี้จึงเห็นผลด้วยตาเปล่าไม่ต้องใช้อุปกรณ์พิเศษ ขั้นตอนง่าย ใช้เวลาอ่านผลได้รวดเร็ว 5-15 นาที ไม่ต้องอาศัยความชำนาญ สามารถนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์ในสถานที่จริงได้

สำหรับโครงการวิจัยนี้เป็นงานวิจัยที่ต่อยอดมาจาก “แถบทดสอบอย่างรวดเร็วสำหรับตรวจหาสารเร่งเนื้อแดง และยาปฏิชีวนะตกค้างในตัวอย่างอาหารบริโภค ภายใต้ทุนส่งเสริมกลุ่มวิจัย (เมธีวิจัยอาวุโส) ศาสตราจารย์ ดร. อรรพรรณ ชัยลภากุล ปี 2560-2561) ซึ่งได้พัฒนาชุดแถบทดสอบแรคโตพามีนต้นแบบสำหรับตรวจวัดแรคโตพามีนได้รับอนุสิทธิบัตร เลขที่ 14804 เมื่อวันที่ 11 มกราคม 2562 ดังนั้นวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทำประเมินประสิทธิภาพการตรวจวัดแรคโตพามีนตกค้าง ในตัวอย่างอาหาร โดยใช้ชุดแถบทดสอบแรคโตพามีน ในตัวอย่างเนื้อสุกร เนื้อวัว และอาหารสัตว์ งานวิจัยเริ่มจากการผลิตโมโนโคลนแอนติบอดีต่อแรคโตพามีน ซึ่งเป็นสารสำคัญที่อยู่ในปริมาณมาก และนำมาใช้ในการเตรียมชุดแถบทดสอบ จำนวนประมาณ 1,500 ชุด ทำการประเมินประสิทธิภาพผลทดสอบของชุดแถบทดสอบแรคโตพามีนด้วยสายตา ในเชิงคุณภาพ และใช้การถ่ายภาพร่วมกับโปรแกรม Image J เข้ามาช่วย เพื่อประเมินในส่วนของความสม่ำเสมอหรือคงที่ของเส้นสีที่ปรากฏในแต่ละชุดทดสอบ และผลทดสอบในเชิงปริมาณ ดังนั้นการประเมินประสิทธิภาพของชุดแถบทดสอบแรคโตพามีนที่ผลิตขึ้นเองนั้น จะเป็นการสร้างความน่าเชื่อถือและความถูกต้องของชุดแถบทดสอบดังกล่าว ซึ่งจะนำไปเป็นประโยชน์ในการใช้งานในเชิงพาณิชย์ต่อไป



รูปที่ 1.1 การทดสอบและการแปลผลของชุดแถบทดสอบ

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพเบื้องต้นของชุดแถบทดสอบแร็คโตะพามีนตกค้างในเนื้อหมู เนื้อวัว และอาหารสัตว์ โดยการเติมแร็คโตะพามีนลงในอาหาร (Fortified Sample)
2. เพื่อประเมินความคงสภาพของชุดแถบทดสอบแร็คโตะพามีนตกค้างที่พัฒนาขึ้น
3. เพื่อเปรียบเทียบการทดสอบแร็คโตะพามีนตกค้างโดยใช้ชุดแถบทดสอบกับวิธี LC-MS/MS จากตัวอย่างกลุ่มเดียวกันในเนื้อหมู เนื้อวัวและอาหารสัตว์

1.3 แผนการดำเนินการ

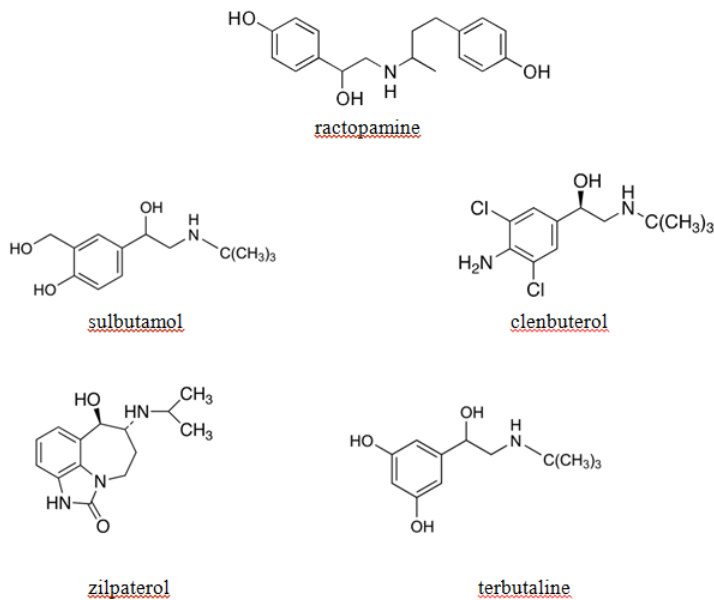
วัตถุประสงค์	กิจกรรม	จำนวนวันที่ใช้	ผู้รับผิดชอบ
1.เพื่อศึกษาประสิทธิภาพเบื้องต้นของชุดแถบทดสอบแร็คโตะพามีน	เตรียมชุดแถบทดสอบที่บรรจุในซองอะลูมิเนียม อย่างน้อย 500 ชุด	60 วัน	นันทิกา
	เตรียมสารสกัด sample blank และ Fortified Sample	20 วัน	อณูมาศ
	การทดสอบประสิทธิภาพชุดแถบทดสอบแร็คโตะพามีนแต่ละชนิด (1) เนื้อหมู (2) เนื้อวัว (3) อาหารสัตว์	60 วัน	อณูมาศ ทรงจันทร์ อุมพร
2.เพื่อประเมินความคงสภาพของชุดแถบทดสอบแร็คโตะพามีนตกค้างที่พัฒนาขึ้น	การเก็บชุดแถบทดสอบที่อุณหภูมิห้อง และนำมาทดสอบที่ระยะเวลาต่างๆ	10 วัน	กิตตินันท์
3.เพื่อเปรียบเทียบการทดสอบแร็คโตะพามีนตกค้างโดยใช้ชุดแถบทดสอบกับ วิธี LC-MS/MS	ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อหมู เนื้อวัว และอาหารสัตว์ อย่างน้อยชนิดละ 20 ตัวอย่าง ทดสอบกับชุดแถบทดสอบ	60 วัน	นันทิกา, อณูมาศ
	สุ่มตัวอย่าง 20% ของจำนวนที่ให้ผลบวกและผลลบ ส่งวิเคราะห์เพื่อยืนยันผล ด้วย LC-MS/MS	30 วัน	กิตตินันท์

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แครโตพามีน

แครโตพามีน เป็นสารในกลุ่มเบต้า-อะโกนิสต์ มีชื่อทางเคมีคือ 4-[3-[[2-Hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]amino]butyl]phenol สูตรโมเลกุล $C_{18}H_{23}NO_3$ มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 301.38 ละลายได้ในตัวทำละลายมีขั้ว ลักษณะทางกายภาพเป็นผงสีขาวหรือสีขาวครีม เมื่อแครโตพามีนเข้าสู่ร่างกายสัตว์จะเข้าสู่กระแสเลือดและเซลล์กล้ามเนื้อ โดยแครโตพามีนจะจับกับรีเซพเตอร์บนผิวเซลล์แล้วเร่งกระบวนการสลายไขมัน ทำให้ปริมาณไขมันในไขสันหลังลดลง เร่งการเจริญเติบโตของสัตว์ เร่งกระบวนการสร้างโปรตีน มีผลทำให้ปริมาณกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้น (He et al., 2008; Michell et al., 1990; Veenhuizen et al., 1987) แครโตพามีนได้รับอนุญาตให้ใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตมากกว่า 20 ประเทศทั่วโลก รวมทั้งแคนาดาและสหรัฐอเมริกาด้วย (Zhang et al., 2010) โดยเมื่อปี 2003 สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาสหรัฐอเมริกา (FDA, 2003) ได้จดทะเบียนให้ใช้ แครโตพามีนเป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ สำหรับประเทศบราซิล เวเนซุเอลา โคลัมเบีย กัวเตมาลา สาธารณรัฐโดมินิกัน ฟิลิปปินส์ (Anonymous, 2001; Weilen et al., 2002) แคนาดา ออสเตรเลีย และเม็กซิโก (European Food Safety Authority, 2009) อนุญาตให้ใช้และกำหนดให้ แครโตพามีนเป็นสารควบคุมในอาหารสัตว์ แต่อีกกว่า 150 ประเทศ เช่น สหภาพยุโรป จีน ญี่ปุ่นได้มีการห้ามใช้ แครโตพามีนเป็นสารเร่งการเจริญเติบโต (Zhang et al., 2010) สำหรับประเทศไทยมีการพยายามขอจดทะเบียนอนุญาตให้ใช้เพื่อการปศุสัตว์แต่ยังมีรายงานพบการลักลอบใช้แครโตพามีนในเมืองไทยเช่นกัน โดยเกษตรกรนิยมนำแครโตพามีนมาใช้กับสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคเนื้อ เช่น สุกร โคเนื้อ รวมทั้งสัตว์ปีกด้วย และได้ผลต่อสัตว์ประเภทโคมากกว่าสุกรและไก่ ทำให้สัตว์มีกล้ามเนื้อมาก ลักษณะของเนื้อเป็นสีแดง ตรงตามความนิยมของผู้บริโภค และเพื่อผลกำไรทางการค้า ทำให้เกษตรกรนิยมใช้แครโตพามีนเพิ่มมากขึ้น เมื่อมีปริมาณการใช้มากขึ้น ทำให้เกิดการตกค้างของสารในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ โดยเฉพาะส่วนต่างๆ ของสุกร เช่น ตับ, ไต, เครื่องใน, เนื้อ, และไขมัน ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค บางรายอาจถึงขั้นเสียชีวิต และหลายประเทศก็มีการนำเข้าและส่งออกผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์รวมทั้งประเทศไทยด้วย จากผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคดังที่กล่าวไว้ข้างต้น องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization, FAO) กับองค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) จึงได้มีการประชุมหารือกันเกี่ยวกับการกำหนดปริมาณสารตกค้างในผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์เพื่อให้เป็นมาตรฐานเดียวกันทั่วโลก



รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของแรคโตพามีนและสารอื่นๆ ในกลุ่มเบต้า-อะโกนิสต์

2.2 มาตรฐานสารตกค้างของแรคโตพามีน

เนื่องจากการอนุญาตให้ใช้แรคโตพามีน ในด้านปศุสัตว์ของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา และการลักลอบใช้แรคโตพามีนเป็นส่วนผสมในอาหารและน้ำดื่มของสัตว์ในประเทศไทย ทำให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค และการเสียผลประโยชน์ทางการค้า ทั้งการนำเข้าและส่งออกผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่มีสารตกค้างของแรคโตพามีน ดังนั้นคณะกรรมการวิชาการโครงการมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (Codex Alimentarius Commission, CAC) ภายใต้การดำเนินงานขององค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization, FAO) กับองค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) ได้กำหนดปริมาณสารสูงสุดที่ยอมรับให้มีการตกค้าง (Maximum residue limits, MRL) เพื่อให้เป็นมาตรฐานสากล ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ปริมาณสารสูงสุดที่ยอมรับให้มีการตกค้างของแรคโตพามีน

ชนิดสัตว์	เนื้อเยื่อ	MRL ($\mu\text{g/kg}$, ppb)
โค	ตับ	40
	ไต	90
	กล้ามเนื้อ	10
	ไขมัน	10
สุกร	ตับ	40
	ไต	90
	กล้ามเนื้อ	10
	ไขมัน	10

แหล่งที่มา : Codex Alimentarius Commission (CAC), 2015

2.3 ผลกระทบของสารเร่งเนื้อแดง

นำมาจากบทความของสมาคมผู้เลี้ยงสุกรแห่งชาติ โดย ผศ.ดร.พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ ศาสตราจารย์เกียรติคุณ ดร.นิธิยา รัตนา เรื่อง “Beta-agonist สารเร่งเนื้อแดง”

<https://www.swinethailand.com/15361790/beta-agonist> Search: 3 Jan 2018

สารในกลุ่มเบต้า-อะโกนิสต์ (beta-agonist) เช่น ซัลบูตามอล (Salbutamol), ซิมบูเทอรอล (Cimbuterol), เคลนบูเทอรอล (Clenbuterol), มาเพนเทอรอล (Mapenterol), แรคโตพามีน (Ractopamine), เคลนเพนเทอรอล (Clenpenterol), ไชมาเทอรอล (Cimaterol), คาบูเทอรอล (Cabuterol), มาบิวเทอรอล (Mabuterol), ทูโลบูเทอรอล (Tulobuterol), โบรโมบูเทอรอล (Bromobuterol), เทอบูทาลีน (Terbutaline)

สารในกลุ่มเบต้า-อะโกนิสต์เป็นตัวยาสำคัญที่ใช้ยาบรรเทาโรคหอบ หืด ช่วยในการขยายหลอดลม มีฤทธิ์ช่วยกระตุ้นการเต้นของหัวใจ ช่วยให้กล้ามเนื้อดลูกคลายตัว และช่วยให้กล้ามเนื้อขยายตัว เพิ่มการสลายตัวไขมันที่สะสมในร่างกาย

ในประเทศไทย ได้มีการนำสารในกลุ่มเบต้า-อะโกนิสต์ โดยเฉพาะคลินบูเทอรอล (Clenbuteral) และซัลบูตามอล (Salbutamol) มาใช้เติมลงในอาหารหมู สารนี้จะตกค้างในเนื้อหมูมาถึงผู้บริโภค เป็นอันตรายในอาหาร (food hazard) ประเภทอันตรายทางเคมี (chemical hazard) โดยเกษตรกรผู้เลี้ยงหมูรู้จักและเริ่มใช้สารเบต้า-อะโกนิสต์ โดยเฉพาะคลินบูเทอรอลมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2531 โดยใช้ชื่อทางการค้าต่างๆ กัน เช่น เลนดอล โดโซลบี แอมโพรฟิต บีดอล 2201 และแมคโต-เอส เป็นต้น

เนื่องจากไม่มีการใช้คลินบูเทอรอลในยาคน และความเข้มงวดในการสั่งนำเข้าประเทศ ดังนั้นสารเร่งเนื้อแดงอีกชนิดหนึ่งที่นิยมในปัจจุบันคือ ซัลบูตามอล (Salbutamol) ซึ่งหาซื้อได้ง่ายกว่าเพราะมีการใช้เป็นยาของคน แต่นำซัลบูตามอลมาใช้ผิดวัตถุประสงค์ คือใช้เป็นสารเร่งเนื้อแดงโดยผสมในอาหารและน้ำสำหรับเลี้ยงหมู เพื่อให้ซากหมูมีเนื้อแดงมาก มีไขมันน้อยซึ่งทำให้ได้ราคาดี

ผลของสารเร่งเนื้อแดงต่อหมู

ก่อให้เกิดผลข้างเคียงต่อตัวสัตว์ ทำให้สัตว์เกิดอาการหัวใจเต้นเร็วขึ้น ในสัตว์บางชนิดอาจพบการตายของกล้ามเนื้อหัวใจ การสร้างความร้อนในตัวสัตว์ที่เพิ่มขึ้น มีผลทำให้สัตว์ทนต่อความร้อนได้ลดน้อยลง และอาจเกิดภาวะเครียดจากความร้อน (heat stress) ได้ นอกจากนี้หมูที่ยังมีชีวิตอยู่สามารถสังเกตมีลักษณะมีกล้ามเนื้อเด่นกว่าปกติ โดยเฉพาะบริเวณสะโพก สันหลัง หรือบริเวณหัวไหล่ ถ้าได้รับปริมาณสูงมากๆ หมูจะมีอาการสั่นอยู่ตลอดเวลา

ผลของสารเร่งเนื้อแดงต่อซากหมู

- ทำให้คุณภาพซากหมูมีเนื้อแดงเพิ่มมากขึ้น ไขมันน้อยลง ตรงกับความต้องการของผู้บริโภค
- การเกิดเนื้อชืดฉ่ำน้ำ (PSE) ลดลง
- เนื้อสีแดงคล้ำกว่าปกติ เมื่อหันทิ้งไว้จะมีลักษณะเนื้อค่อนข้างแห้ง

อันตรายจากการบริโภคเนื้อหมูที่มีสารเร่งเนื้อแดงตกค้าง

การบริโภคเนื้อสัตว์ที่มีสารเร่งเนื้อแดงตกค้างส่งผลต่อการทำงานของระบบประสาทที่ควบคุมการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจ กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด หลอดลม กระเพาะปัสสาวะ เป็นต้น อาจมีอาการมือสั่น กล้ามเนื้อกระตุก ปวดศีรษะ หัวใจเต้นเร็วผิดปกติ กระวนกระวาย วิงเวียนศีรษะ บางรายอาจมีอาการเป็นลม นอนไม่หลับ คลื่นไส้

อาเซียน มีอาการทางจิตประสาท และเป็นอันตรายมากสำหรับหญิงมีครรภ์และผู้ที่เป็นโรคหัวใจ ความดันโลหิตสูง เบาหวาน และโรคไฮเปอร์ไทรอยด์

ประเทศไทยและต่างประเทศได้ห้ามใช้สารกลุ่มนี้ในการผลิตอาหารสัตว์โดยเด็ดขาด เป็นอันตรายในอาหาร (food hazard) ประเภทอันตรายทางเคมี (chemical hazard) ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 269) พ.ศ. 2546 เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีการปนเปื้อนสารเคมีกลุ่มปีตา-อะโกนิสต์ กำหนดให้อาหารทุกชนิดมีมาตรฐานโดยตรวจไม่พบการปนเปื้อนสารเคมีกลุ่มเบต้า-อะโกนิสต์ และเกลือของสารกลุ่มนี้ รวมถึงสารในกระบวนการสร้างและสลาย หรือ เมแทบอลไลต์ (metabolite) ของสารดังกล่าวด้วย การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารเคมีตามวรรคหนึ่ง ให้เป็นไปตามหลักเกณฑ์ เงื่อนไขและวิธีการตรวจวิเคราะห์ทางวิชาการที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาประกาศ โดยความเห็นชอบของคณะกรรมการอาหาร ซึ่งมีความผิดตามพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 แต่ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดชื่อ ประเภท ชนิด หรือลักษณะของอาหารสัตว์ที่ไม่อนุญาตให้นำเข้าเพื่อขาย และกำหนดชื่อ ประเภท ชนิด ลักษณะ คุณสมบัติและส่วนประกอบของวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ที่ห้ามใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารสัตว์ พ.ศ. 2545 ยังมีผลบังคับจนกว่าจะมีการออกฉบับใหม่ตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558

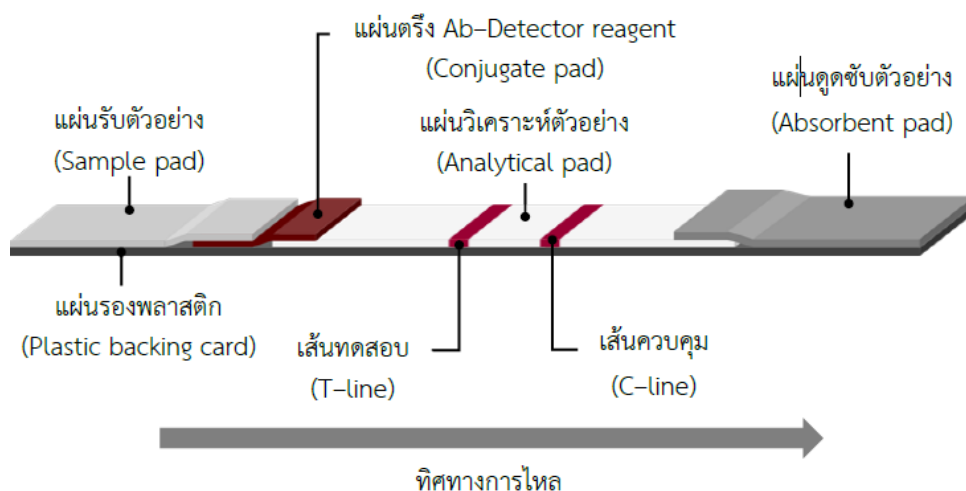
2.4 หลักการของแถบทดสอบ Lateral flow immunoassay

แถบทดสอบ Immunochromatographic assay (ICA) รูปแบบการไหลในแนวระนาบ (Lateral Flow Immunochromatographic Assay; LFIA) หรือ Strip Test เป็นการนำเทคนิคโครมาโทกราฟีมาใช้ร่วมกับเทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา หลักการของแถบทดสอบ มีลักษณะคล้ายกับ ELISA โดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดี และ แอนติเจนบนไนโตรเซลลูโลส แถบทดสอบถูกประยุกต์ใช้ครั้งแรกในการทำแถบทดสอบการตั้งครรภ์ การวิเคราะห์ผลสามารถทำได้รวดเร็วโดยการใช้สายตา ปัจจุบันแถบทดสอบถูกนำมาประยุกต์ใช้ในหลายสาขา เช่น การตรวจวินิจฉัยโรคในสัตว์ การตรวจติดตามสิ่งแปลกปลอมในอาหาร และสิ่งแวดล้อม เป็นต้น โดยทั่วไปส่วนประกอบหลักของแถบทดสอบจะประกอบด้วย 5 ส่วน ซึ่งแต่ละส่วนจะมีหน้าที่แตกต่างกัน ดังรูปที่ 2.2 ซึ่งประกอบด้วย

- (1) แผ่นรับตัวอย่าง (Sample pad) ทำหน้าที่รับและกรองสารตัวอย่าง
- (2) แผ่นตรึงแอนติบอดีที่ติดฉลากกับสารที่ใช้ตรวจสอบ (Conjugate pad) เป็นส่วนที่ใช้ตรึงแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารที่ใช้ตรวจสอบ (Detector reagent)
- (3) แผ่นวิเคราะห์ตัวอย่าง (Analytical pad) เป็นบริเวณที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา ประกอบด้วยเส้น 2 เส้น คือ เส้นทดสอบ (Test line; T-line) และเส้นควบคุม (Control line; C-line)

(4) แผ่นดูดซับตัวอย่าง (Absorbent pad) ทำหน้าที่ดูดซับตัวอย่างส่วนเกิน ที่เหลือจากการเกิดปฏิกิริยาจาก Analytical pad

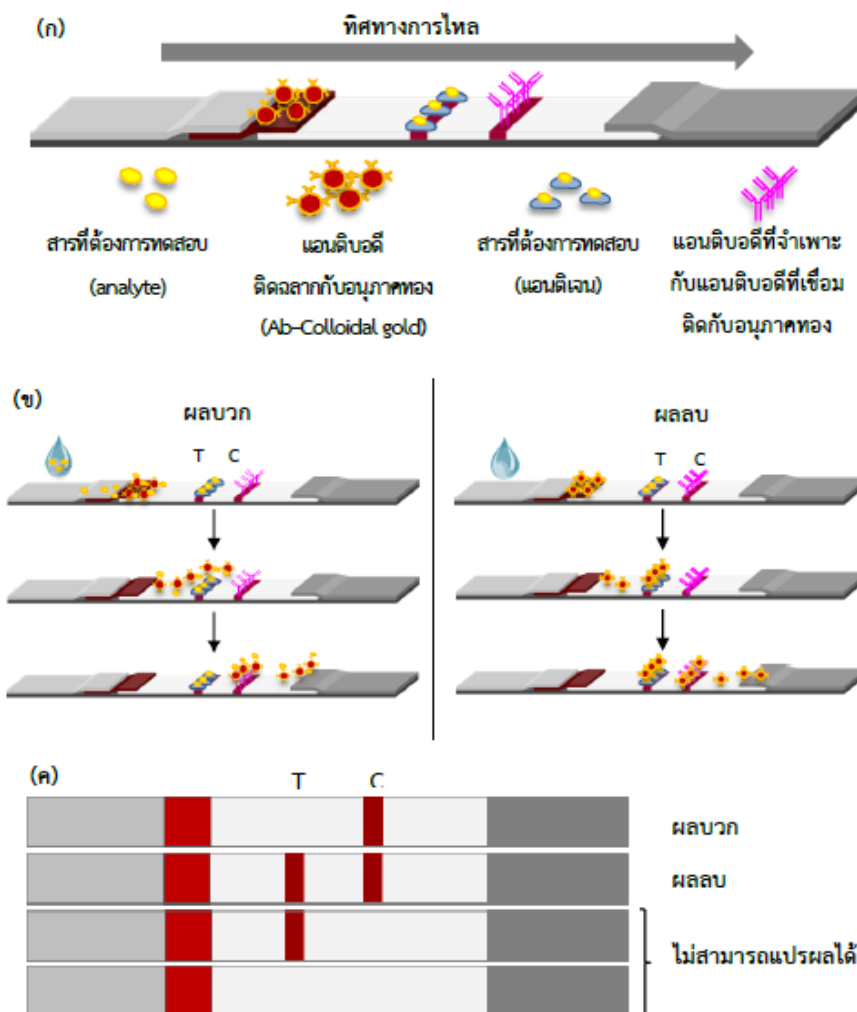
(5) แผ่นรองพลาสติก (Plastic backing card) ทำหน้าที่ยึดส่วนประกอบของแถบทดสอบ



รูปที่ 2.2 ส่วนประกอบทั่วไปของแถบทดสอบ (นิตกร, 2559)

เนื่องจากแร็คโตะพามีน เป็นสารโมเลกุลขนาดเล็ก รูปแบบการทดสอบคือ รูปแบบแข่งขัน (Competitive assay format) (Sajid et al., 2015) ดังนั้นแถบทดสอบรูปแบบแข่งขันเหมาะสำหรับตรวจสอบที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก หรือสารที่มีอิทธิพลเดียว องค์ประกอบของแถบทดสอบของรูปแบบแข่งขัน แสดงดังรูปที่ 2.3 (ก) หลักการของแถบทดสอบรูปแบบแข่งขัน รูปที่ 2.3 (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 และจะถูกจับด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับแอนติบอดีที่เชื่อมติดกับอนุภาคทอง 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 MAb-Colloidal gold มีการเสื่อมสภาพ เป็นต้น ดังแสดงในภาพที่ 2.3 (ค)



รูปที่ 2.3 (ก) ส่วนประกอบของแถบทดสอบรูปแบบแข่งขัน (ข) หลักการทำงาน และ (ค) รูปแบบการแปรผลของรูปแบบแข่งขัน (นิติกร, 2559)

2.5 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์แถบทดสอบแรคโตพามีนจากต่างประเทศ

ยี่ห้อ Green Spring , Quicking ผลิตจากประเทศจีน, ยี่ห้อ Biopanda ผลิตจากประเทศอังกฤษ

ยี่ห้อ NEOGEN และ CD creative diagnostics ผลิตจากประเทศ USA เป็นต้น



รูปที่ 2.4 ตัวอย่างชุดแถบทดสอบแรคโตพามีนทางการค้าจากต่างประเทศ

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี 2009 Zhang และคณะ ได้พัฒนาชุดแถบทดสอบโดยเทคนิค immunochromatography ในการตรวจวัดคลีนบูเทอรอลและแรคโตพามีน พร้อมกันในปัสสาวะหนู การทดสอบให้ผลภายใน 5 นาที ให้ผลการทดสอบเชิงคุณภาพ ขั้นตอนเดียว อ่านผลทดสอบด้วยตาเปล่า พบว่าเมื่อทดสอบในปัสสาวะหนู ให้ค่า cut-off ของ คลีนบูเทอรอลและแรคโตพามีน อยู่ที่ 1 ng/ml และเมื่อใช้เครื่อง scanner ช่วยในการอ่านผล ให้ค่าปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ (the limit of detection, LOD) สำหรับคลีนบูเทอรอลและแรคโตพามีน ที่ 0.1 ± 0.01 ng/ml และ 0.56 ± 0.08 ng/ml ตามลำดับ เมื่อเทียบกับวิธี GC-MS ในการตรวจวัด พบว่าการใช้ชุดแถบทดสอบให้ผลสอดคล้องกัน ดังนั้นแถบทดสอบที่ได้มีความน่าเชื่อถือ ให้ผลรวดเร็ว และราคาไม่แพง จึงสามารถนำไปใช้เป็น screening technique

ในปี 2016 Buakeaw และคณะ ได้เตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแรคโตพามีน และได้นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้นมาพัฒนาการตรวจวัดแรคโตพามีนในเนื้อหมูโดยวิธี indirect competitive ELISA ให้ค่าการตรวจวัดแรคโตพามีนในช่วงเส้นตรงมาตรฐานระหว่าง 0.05-5.0 ng/ml และค่า inter and intra variation assay อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

ในปี 2016 Gu และคณะ ได้พัฒนาการตรวจวัดแรคโตพามีนตกค้างในปัสสาวะหนูด้วยเทคนิค lateral flow immunochromatographic assay โดยใช้โมโนโคลนอลต่อแรคโตพามีนที่พัฒนาขึ้นที่มีความไวสูง ให้ค่า cut-off ของแรคโตพามีนในตัวอย่างปัสสาวะหนู เท่ากับ 2 ng/ml นอกจากนี้ Liu และคณะ (2016) ได้พัฒนาการตรวจวัดแรคโตพามีนตกค้าง ในปัสสาวะหนู ด้วยเทคนิค lateral flow immunochromatographic assay โดยใช้โมโนโคลนอลต่อแรคโตพามีนที่พัฒนาขึ้น ให้ค่า cut-off ของแรคโตพามีนในตัวอย่างปัสสาวะหนู เท่ากับ 1 ng/ml เมื่ออ่านผลด้วยตาเปล่า และเมื่อใช้เครื่อง optical density scanner ให้ค่าปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ เท่ากับ 0.1 ± 0.013 ng/ml เมื่อเทียบกับวิธี LC-MS/MS ให้ผลสอดคล้องกัน แสดงว่าแถบทดสอบที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ในการ screening แรคโตพามีนตกค้างในปัสสาวะได้ มีความน่าเชื่อถือ วิธีตรวจวัดรวดเร็ว ราคาไม่แพง และนำไปใช้ภาคสนามได้

ในปี 2560 ภริมภรณ์ เกื้อนถ้ำแก้ว และคณะ ได้ทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มเบต้า-อะโกนิสต์ ได้แก่ สารซัลบูตามอล คลีนบูเทอรอล และสารแรคโตพามีนในอาหารโค ด้วยวิธี LC-MS/MS ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นภายในห้องปฏิบัติการ จากการทดสอบความใช้ได้ของวิธี พิจารณาจากการสร้างกราฟมาตรฐาน ค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ ทดสอบร้อยละการกลับคืนและทดสอบความเที่ยง แสดงว่ามีคุณลักษณะเฉพาะของวิธีอยู่ในเกณฑ์

การยอมรับได้ ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์นี้จึงเหมาะสม สำหรับใช้วิเคราะห์สารซัลบูทามอล เคลนบูเทรอล และสารแรคโตพามีน ที่ระดับความเข้มข้น 0.10 – 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมในอาหารโค

ในปี 2019 Preechakasedkit และคณะ ได้พัฒนาวิธีการเตรียมแรคโตพามีนเชื่อมกับโปรตีนแบบใหม่โดยใช้ปฏิกิริยาแมนนิซ เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาได้ในขั้นตอนเดียว ง่ายต่อการเตรียม ใช้สารเคมีและเวลาน้อยกว่าวิธีเดิม และนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดแรคโตพามีนในอาหารสัตว์ โดยวิธีแถบทดสอบ พบว่าแถบทดสอบที่ได้ให้ค่า cut-off ของแรคโตพามีนในตัวอย่างอาหารสัตว์ เท่ากับ 1 ng/g เมื่ออ่านผลด้วยตาเปล่า และให้ค่า % recovery และความถูกต้อง อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

บทที่ 3

ระเบียบวิธีการวิจัย

3.1 การเตรียมชุดแถบทดสอบต้นแบบ

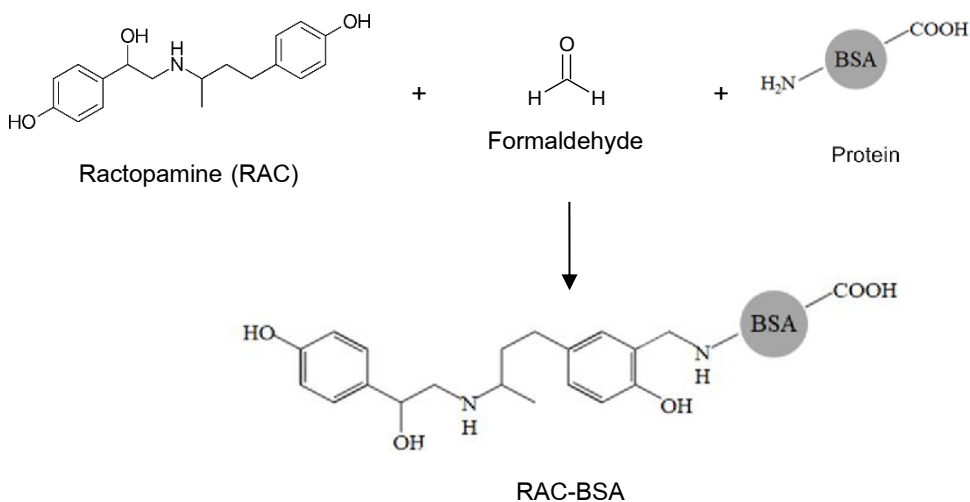
3.1.1. การเตรียมสารละลายสำหรับประกอบชุดแถบทดสอบ

3.1.1.1. Goat Anti-Mouse IgG (GAM)

สารละลายสำหรับใช้เป็นเส้นควบคุมของแถบทดสอบ คือ Goat Anti-Mouse IgG (GAM) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2

3.1.1.2. การเตรียมแรคโตพามีนเชื่อมกับโปรตีน (RAC-BSA)

ทำการเชื่อมติดแรคโตพามีน (Ractopamine; RAC) กับโปรตีน (Bovine serum albumin; BSA) สำหรับใช้เป็นเส้นทดสอบของแถบทดสอบ โดยนำแรคโตพามีน 10 มิลลิกรัมละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายโปรตีนพาวะ 10 มิลลิกรัมที่ละลายอยู่ใน 0.1 M 2-(N-morpholino) ethansulfonic acid; MES pH 4.7 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติม 37% (v/v) ฟอर्मัลดีไฮด์ (Formaldehyde) 250 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาข้ามคืน จากนั้นการทำไดอะไลซิสในสารละลาย Phosphate buffer saline pH 7.2 เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bicinchoninic Acid Assay (BCA assay)



รูปที่ 3.1 การเชื่อมแรคโตพามีนกับโปรตีนพาวะ (BSA) โดยปฏิกิริยา Mannich

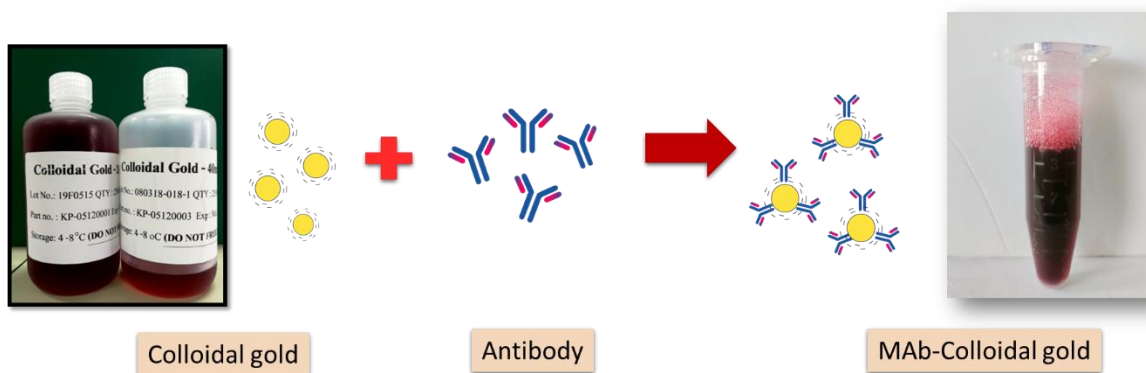
3.1.1.3. การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี

นำเซลล์ไฮบริโดมา รหัส 10A4 ที่ผลิตโมโนโคลนอลต่อแร็คโทพามีนในรูปอิสระที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ISF-1 serum free เพื่อเพิ่มปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดี แยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที กรองอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วย filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี protein G affinity chromatography ด้วยเครื่อง affinity chromatography (AKTA™ Start) โดยใช้คอลัมน์สำเร็จรูป HiTrap Protein G ขนาด 5 มิลลิลิตร เชดด้วย 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.2 และปรับอัตราการไหลให้เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาทีเพื่อปรับคอลัมน์ให้เข้าสู่สภาวะสมดุล เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีโมโนโคลนอลแอนติบอดี ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ลงไปในคอลัมน์ ล้างโปรตีนที่ไม่จับกับโปรตีน G ในคอลัมน์ด้วย 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.2 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ทำการชะ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จับกับโปรตีน G ให้ออกจากคอลัมน์ด้วย 0.1 M glycine-HCl buffer pH 2.7 เก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ fraction ละ 1 มิลลิลิตร ซึ่งแต่ละหลอดมี 1 M Tris-HCl, buffer pH 9.0 ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เพื่อปรับให้มี pH ประมาณ 7 โดยสารละลายแต่ละหลอดจะผ่านการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรจากเครื่อง หลังจากนั้นนำหลอดที่มีโมโนโคลนอลแอนติบอดีมารวมกัน นำไปไดอะไลซิสใน 2mM Borate buffer (BB) pH 8.2 เป็นเวลา 3 วัน และนำไปหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA assay

3.1.1.4. การเตรียมสารละลายอนุภาคทองติดฉลากกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb-Colloidal gold)

ศึกษาสัดส่วนความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีและอนุภาคทองคำที่เหมาะสม โดยนำสารละลายอนุภาคทองคำ (Colloidal gold) ขนาด 20 นาโนเมตร มาปรับ pH ให้เท่ากับ 8.2 ด้วย 0.2 M Na_2CO_3 pH 9.0 เตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้มีความเข้มข้นในช่วง 0–300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย 2 mM Borate buffer, pH 8.2 เติมน้ำในจานชนิด 96 หลุม หลุมละ 20 ไมโครลิตร เติมน้ำสารละลายอนุภาคทองคำ pH 8.2 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม 10% NaCl ลงไปหลุมละ 80 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร พิจารณาจากความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต่ำที่สุดที่ให้ค่าดูดกลืนแสงสูงสุด หรือปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่น้อยที่สุด ที่ทำให้สีของอนุภาคทองไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง โดยสีของสารละลายอนุภาคทองคำยังคงมีสีม่วงแดงเช่นเดิม จากนั้นเตรียมอนุภาคทองเพื่อติดฉลากกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีในปริมาณมาก โดยนำสารละลายอนุภาคทองคำ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมน้ำโมโนโคลนอลแอนติบอดีความเข้มข้นที่เหมาะสมดังที่กล่าวไว้ข้างต้น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 10 : 1) เขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมน้ำสารละลาย 3% BSA ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำ

สารละลายอนุภาคทองที่ติดฉลากกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb-Colloidal gold) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใสทิ้งไป ละลายตะกอน MAb-Colloidal gold ด้วยสารละลาย Borate buffer 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อล้างส่วนที่ไม่เชื่อมติด โดยทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง และละลายตะกอนสารละลาย MAb-Colloidal gold กลับด้วย 3% BSA และ 2% Sucrose ที่ละลายในสารละลาย 0.01 M Phosphate Buffer Saline pH 7.4 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ได้สารละลาย MAb-Colloidal gold สำหรับนำไปพ่นบน conjugate pad ดังรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 การเตรียมอนุภาคทองที่ติดฉลากกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี

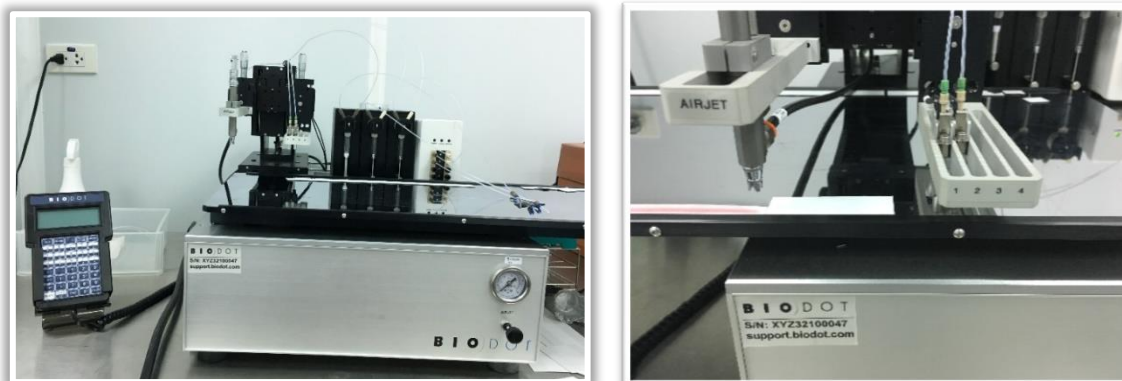
3.1.2. การเตรียมส่วนประกอบของชุดแถบทดสอบ

3.1.2.1. การเตรียม Sample pad และ Absorbent pad

นำแผ่น Sample pad (standard 17) และ Absorbent pad (CF7) อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้งาน

3.1.2.2. การเตรียม Conjugate pad

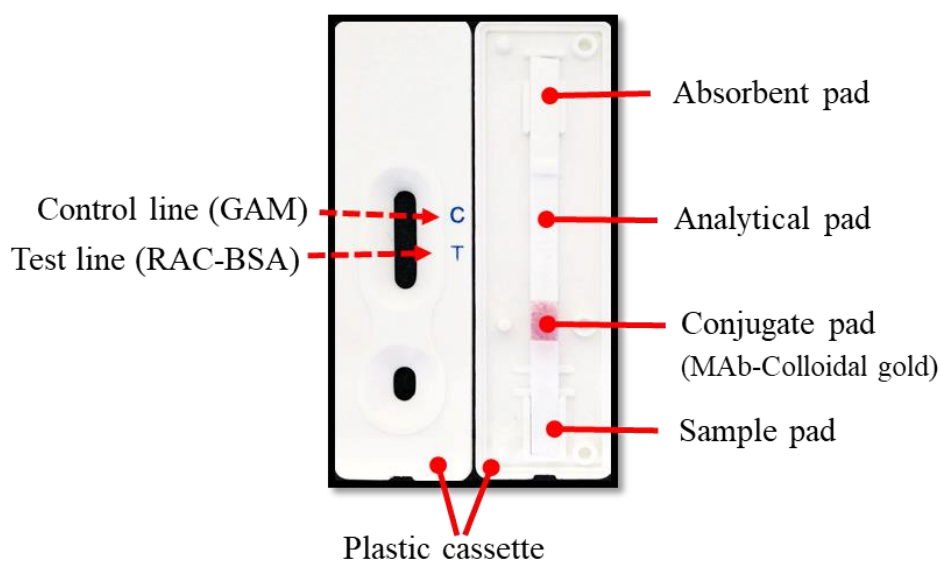
นำแผ่นใยแก้ว GF 33 อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำสารละลาย MAb-Colloidal gold พ่นลงบนแผ่น Conjugate pad ด้วยอัตราการพ่น 10 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร ด้วยเครื่อง Dispense Platform (Biodot) อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที



รูปที่ 3.3 เครื่อง Dispense Platform (Biodot)

3.1.2.3 การเตรียม Analytical pad

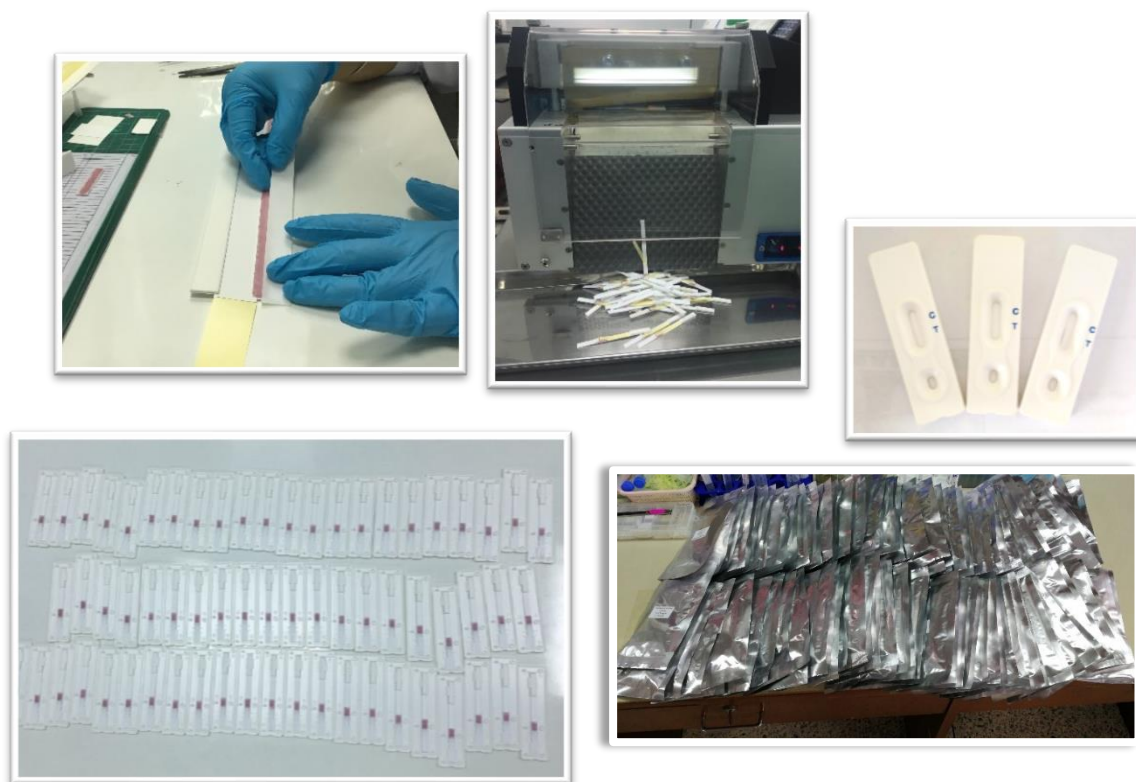
นำแผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลส (unisant CN 140) ติดบนแผ่นรองพลาสติก (plastic backing card) นำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พ่นเส้นทดสอบ (Test-line; T-line) ด้วย RAC-BSA ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเส้นควบคุม (Control-line; C-line) ด้วย GAM ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยเครื่อง Dispense Platform (Biodot) อัตราการพ่น 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที



รูปที่ 3.4 ส่วนประกอบของแถบทดสอบ

3.1.2.4. การประกอบชุดแถบทดสอบ

นำ Absorbent pad ติดลงบน plastic backing card โดยให้ปลายด้านล่างเหลื่อมทับกับ Analytical pad จากนั้นติด Conjugate pad ที่พ่นด้วยสารละลาย MAb-Colloidal gold ให้ด้านบนเกาะทับ Analytical pad และติด Sample pad ให้ด้านบนเกาะทับ Conjugate pad จากนั้นนำมาตัดให้มีความกว้างขนาด 4 มิลลิเมตร ด้วยเครื่องตัดแถบทดสอบ Guillotine Cutter (Biodot) นำแต่แถบทดสอบมาประกอบเข้ากับตลับพลาสติก นำชุดแถบทดสอบเก็บในถุงฟรอยด์พร้อมถุงกันความชื้น ปิดให้สนิท เก็บที่อุณหภูมิห้อง ดังรูปที่ 3.5



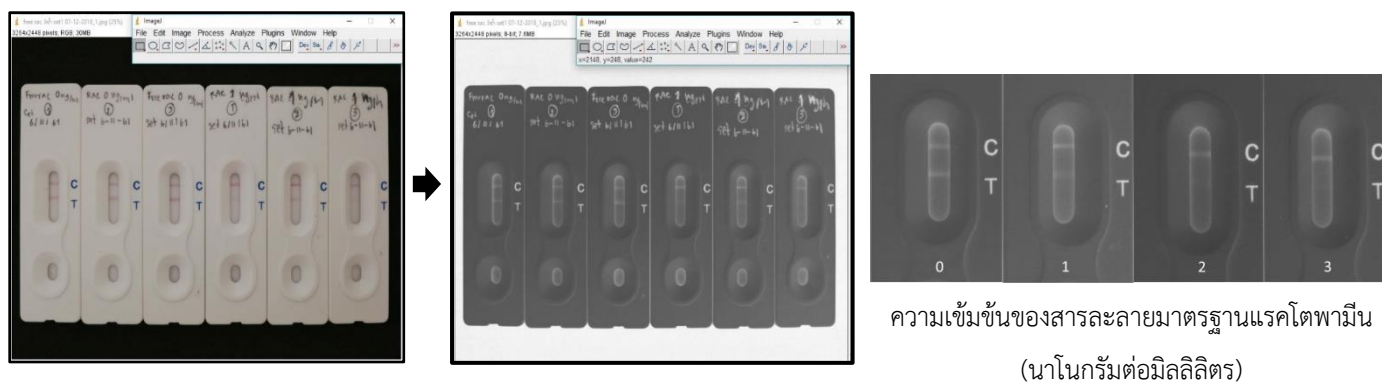
รูปที่ 3.5 ขั้นตอนการประกอบชุดแถบทดสอบ

3.2 วิธีการทดสอบและการแปลผลของชุดแถบทดสอบ

3.2.1. วิธีการทดสอบ

โดยหยดตัวอย่างปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงในช่องหยดตัวอย่าง จากนั้นวางทิ้งไว้ 15 นาที อ่านผลทดสอบ ประเมินผลด้วยสายตา และทำการถ่ายภาพภายใต้กล่องควบคุมแสง เพื่อวัดค่าความเข้มสีของเส้นทดสอบด้วยโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ

ช่วงที่วัดค่าได้ (Detection range) คือ ช่วงความเข้มข้นของแร็คโตพามีนที่เป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน



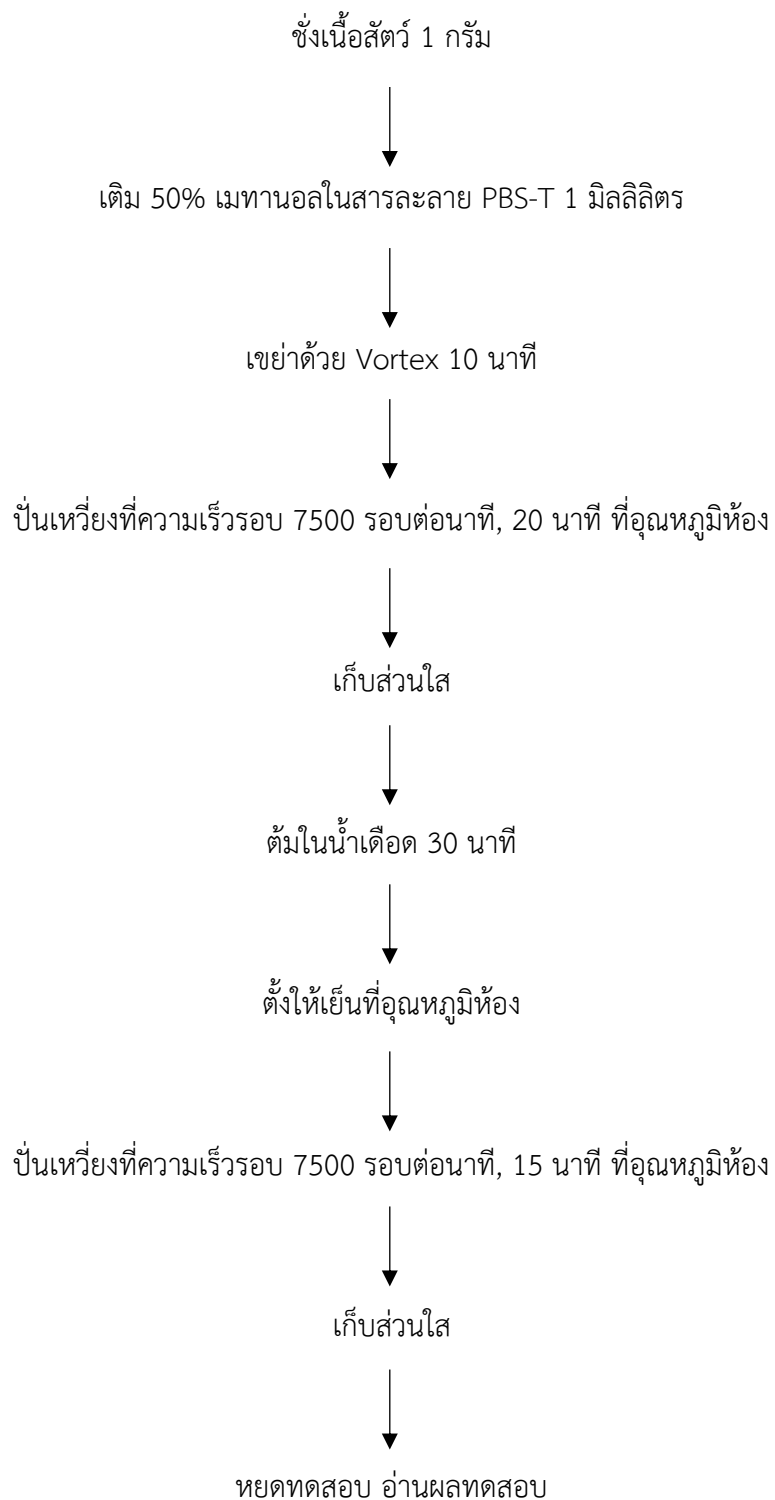
รูปที่ 3.7 รูปแบบการประเมินผลด้วยโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ

3.3 การทดสอบประสิทธิภาพชุดแถบทดสอบแร็คโตพามีน

3.3.1. การศึกษาผลของเมทริกซ์ในตัวอย่าง (Matrix effect)

3.3.1.1. การเตรียมสารสกัดจากตัวอย่างเนื้อสัตว์

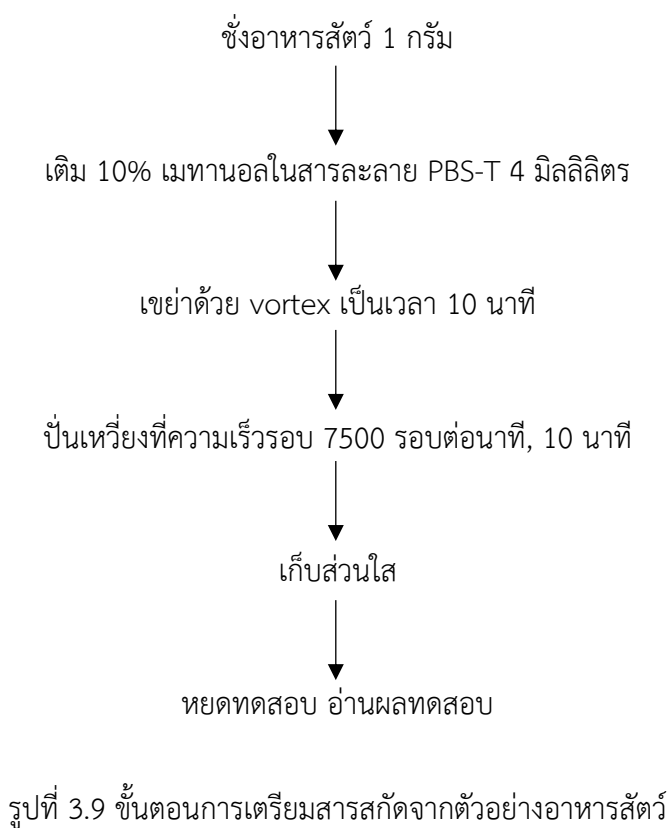
นำเนื้อหมูหรือเนื้อวัว บดให้ละเอียด นำมาชั่ง 1 กรัม ใส่หลอดทดลอง จากนั้นเติม 50% เมทานอลในสารละลาย PBS-T 1 มิลลิตร เขย่าด้วย vortex เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนใสแล้วนำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้ได้สารสกัดส่วนใสจากเนื้อหมูและเนื้อวัว ดังรูปที่ 3.7 เนื่องจากผลของเมทริกซ์จากสารสกัด อาจส่งผลต่อชุดแถบทดสอบ จึงต้องทำการเจือจางสารสกัด เพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมกับชุดแถบทดสอบ จากนั้นหยดตัวอย่างสารสกัดลงบนแถบทดสอบ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร จากนั้นวางทิ้งไว้ 15 นาที อ่านผลทดสอบแปลผลด้วยตาเปล่า



รูปที่ 3.8 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดจากตัวอย่างเนื้อสัตว์

3.3.1.2. การเตรียมสารสกัดจากตัวอย่างอาหารสัตว์

ชั่งอาหารสัตว์ 1 กรัม ใส่หลอดทดลอง เติม 10% เมทานอลในสารละลาย PBS-T 4 มิลลิลิตร เขย่าด้วย vortex เป็นเวลา 10 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเก็บสารสกัดส่วนใสใส่หลอดทดลองใหม่ ดูดสารสกัดส่วนใสที่ได้ไปทดสอบกับชุดแถบทดสอบ ดังรูปที่ 3.8 เนื่องจากผลของแมทริกซ์สารสกัดจากอาหารสัตว์ อาจส่งผลต่อชุดแถบทดสอบ จึงต้องทำการเจือจางสารสกัดและทดสอบเช่นเดียวกับเนื้อสัตว์



3.3.2. การหาค่าความไวของชุดแถบทดสอบ (Sensitivity)

3.3.2.1. การหาค่าความไวในสารละลายบัฟเฟอร์

เตรียมสารละลายแรคโตพามีนให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0 - 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร หยดลงแถบทดสอบ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร จากนั้นวางทิ้งไว้ 15 นาที อ่านผลทดสอบแปลผลด้วยตาเปล่าเพื่อหาค่า cut off และอ่านค่าความเข้มสีของเส้นทดสอบด้วยโปรแกรม ImageJ นำค่าความเข้มสีมาสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายแรคโตพามีน และหาค่า LOD ทำการทดสอบความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ 3 ชุดการทดลอง

3.3.2.2. การหาค่าความไวในตัวอย่างเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์

เนื่องจากผลของเมทริกซ์จากการสกัดตัวอย่างแต่ละชนิด อาจส่งผลต่อชุดแถบทดสอบ จึงต้องทำการหาค่า cut-off ของชุดแถบทดสอบในแต่ละชนิดตัวอย่าง โดยพิจารณาจากการนำสารสกัดจากเนื้อหมู เนื้อวัว และอาหารสัตว์ มาใช้เป็นสารละลายตัวอย่างแทนสารละลายบัฟเฟอร์ โดยเติมแรคโตพามีนให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0 - 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 150 ไมโครลิตร หยดลงแถบทดสอบ วางทิ้งไว้ 15 นาที อ่านผลทดสอบ แปลผลด้วยสายตา หาค่า cut-off และอ่านค่าความเข้มสีของเส้นทดสอบด้วยโปรแกรม ImageJ นำค่าความเข้มสีมาสร้างกราฟมาตรฐานและหาค่า LOD ทำการทดสอบความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ 3 ชุดการทดลอง

3.3.3. การทดสอบความจำเพาะของชุดแถบทดสอบแรคโตพามีน (Specificity)

เพื่อทดสอบความจำเพาะของชุดแถบทดสอบ โดยพิจารณาจากการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามของชุดแถบทดสอบในตัวอย่างแต่ละชนิด ด้วยสารเคลือบเทอรอลและซัลบูตามอล ซึ่งเป็นสารในกลุ่มเบต้า-อะโกนิสต์ เช่นเดียวกับแรคโตพามีน โดยเตรียมสารละลายเคลือบเทอรอลและซัลบูตามอล ให้มีความเข้มข้นเดียวกับค่า cut-off และสูงกว่าค่า cut-off 10 เท่าของตัวอย่างแต่ละชนิด จากนั้นปิเปตสารละลาย ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงในช่องหยดตัวอย่าง วิเคราะห์ผลทดสอบภายใน 15 นาที ทำการทดสอบความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ 3 ชุดการทดลอง

3.3.4. การประเมินวิธีทดสอบของชุดแถบทดสอบแรคโตพามีน (Method of validation)

3.3.4.1. การหาค่าความถูกต้อง (Accuracy)

การหาค่าความถูกต้องของชุดแถบทดสอบ พิจารณาจากค่าเฉลี่ยการกลับคืน (% recovery) และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% coefficient of variation; %CV) โดยนำตัวอย่างเนื้อหมู เนื้อวัว และอาหารสัตว์ ที่ผ่านการตรวจแล้วว่าไม่มีแรคโตพามีนตกค้าง ทำการเติมแรคโตพามีน โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ในช่วงเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน หยดตัวอย่าง 150 ไมโครลิตร ลงแถบทดสอบ วางทิ้งไว้ 15 นาที อ่านผลทดสอบ โดยอ่านค่าความเข้มสีของเส้นทดสอบ ด้วยโปรแกรม ImageJ นำค่าความเข้มสีที่อ่านได้จากโปรแกรมมาเทียบกับกราฟมาตรฐานแรคโตพามีน เพื่อกำหนดหาปริมาณแรคโตพามีนที่มีอยู่ในตัวอย่าง แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหา % recovery โดยพิจารณาจากเกณฑ์มาตรฐานของ AOAC (2016) คือ สารที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1-10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า % recovery อยู่ในช่วง 60-115 และค่า %CV มีค่าเท่ากับหรือน้อยกว่า 32 นอกจากนี้ ทำการส่งตัวอย่างเนื้อสัตว์ที่ผ่านการเติมแรคโตพามีน เพื่อวิเคราะห์และตรวจสอบการตกค้างของแรคโตพามีน ด้วย LC-MS/MS

3.3.4.2. การหาค่าความแม่นยำ (Precision)

การหาค่าความแม่นยำของชุดแถบทดสอบด้วยการวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน (intra-variation assay) และวิเคราะห์ซ้ำต่างวัน (inter-variation assay) ทำการเตรียมสารสกัดตามข้อ 3.3.1. โดยเติมแรคโทพามีน โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ในช่วงเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน และนำมาทดสอบกับชุดแถบทดสอบ เพื่อหาค่าความแม่นยำจาก % coefficient of variation (%CV) โดยทำการทดสอบความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ เพื่อศึกษาความแปรปรวนของการวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน และทำการวิเคราะห์ซ้ำต่างวัน โดยทำการทดสอบความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ ทั้งหมด 3 วัน โดยอ่านค่าความเข้มสีของเส้นทดสอบด้วยโปรแกรม ImageJ นำค่าความเข้มสีที่อ่านได้จากโปรแกรมมาเทียบกับกราฟมาตรฐานแรคโทพามีน เพื่อคำนวณหาปริมาณแรคโทพามีนที่มีอยู่ในตัวอย่าง แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหา % CV

3.3.5. การทดสอบความคงสภาพ (Stability)

โดยเก็บชุดแถบทดสอบในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 0, 3, 6 และ 9 เดือน นับจากวันผลิตชุดแถบทดสอบ จากนั้นหยดทดสอบชุดแถบทดสอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 150 ไมโครลิตร ลงแถบทดสอบวางทิ้งไว้ 15 นาที อ่านผลทดสอบ สังเกตความเข้มสีของแถบทดสอบว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปหรือไม่ และอ่านค่าความเข้มสีของเส้นทดสอบด้วยโปรแกรม ImageJ ทำการทดสอบจำนวน 6 ซ้ำ

3.4 การเปรียบเทียบการทดสอบตัวอย่างด้วยชุดแถบทดสอบที่ผลิตขึ้นเองกับชุดแถบทดสอบทางการค้า

ทดสอบตัวอย่างด้วยชุดแถบทดสอบที่ผลิตขึ้นเองและชุดแถบทดสอบทางการค้า โดยทำการเตรียมสารสกัดและใช้วิธีวิเคราะห์ตามวิธีของแต่ละชุดทดสอบ ทำการสุ่มตัวอย่างเนื้อหมู เนื้อวัว และอาหารสัตว์ ชนิดละ 20 ตัวอย่าง จากตลาดและซูเปอร์มาร์เก็ตทั่วไปในกรุงเทพมหานคร จากนั้นนำตัวอย่างเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์ มาสกัดเป็นสารสกัดตามวิธีที่กล่าวไว้ข้างต้น และทดสอบด้วยชุดแถบทดสอบที่ผลิตขึ้นเอง หากใช้ชุดแถบทดสอบทางการค้า ใช้วิธีสกัดสารสกัดตามที่ชุดแถบทดสอบนั้นๆ กำหนด และนำสารสกัดมาทดสอบกับชุดแถบทดสอบตัวอย่างละ 2 ซ้ำ โดยทำการสุ่มตัวอย่างแต่ละชนิด 25% จากตัวอย่างทั้งหมด ส่งวิเคราะห์เพื่อยืนยันผล ด้วย LC-MS/MS

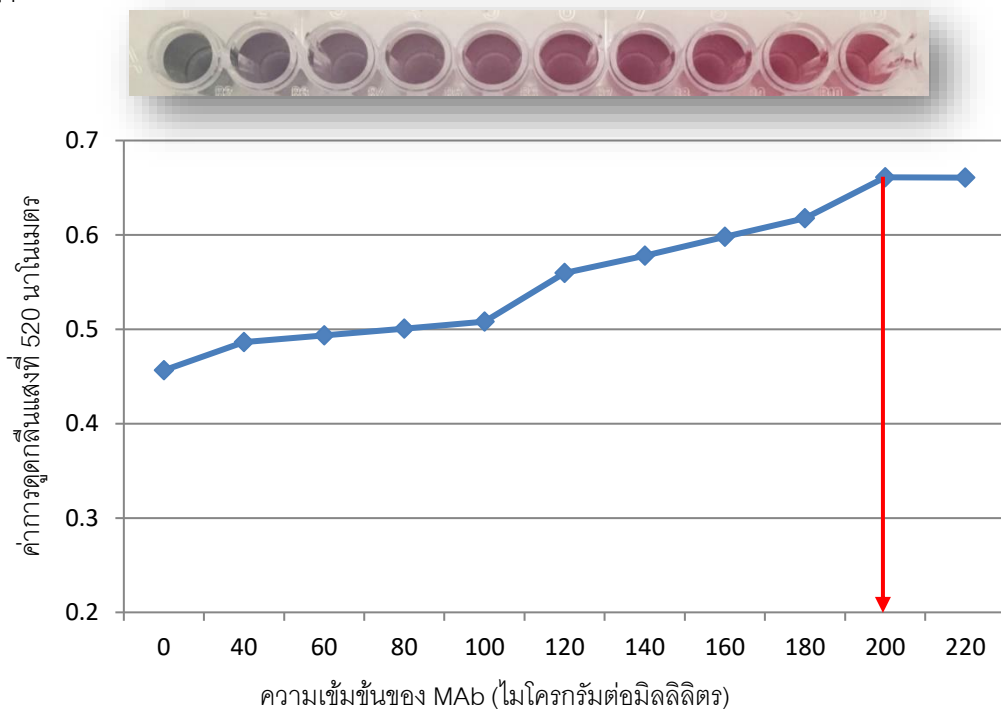
บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผลการวิจัย

4.1. การเตรียมชุดแถบทดสอบแร็คไตพามีน

4.1.1. ผลการเตรียมสารละลาย MAb-Colloidal gold

หาความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เหมาะสมในการเชื่อมติดอนุภาคทองคำ เพื่อไม่ให้อนุภาคทองคำเกิดการจับกันเองและตกตะกอนลงมา ซึ่งส่งผลต่อความเสถียรของอนุภาคทองคำ พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดี สำหรับใช้ในการคอนจูเกตติดลากอนุภาคทองคำ ขนาด 20 นาโนเมตรที่ pH 8.2 เท่ากับ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวัดจากปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่น้อยที่สุดที่แสดงค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร หรือปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่น้อยที่สุดที่ทำให้สีของอนุภาคทองคำไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง โดยสีของสารละลายอนุภาคทองคำ ยังคงมีสีม่วงแดงเช่นเดิม ดังรูปที่ 4.1 โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สีของสารละลายยังคงเป็นสีแดง เนื่องจากมีปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพียงพอในการติดลากกับอนุภาคทองคำ ทำให้อนุภาคทองคำไม่เกิดการจับตัวและตกตะกอนลงมา ในขณะที่โมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่ความเข้มข้น 0-180 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้สารละลายอนุภาคทองคำเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีม่วงเทา เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีน้อยเกินไปทำให้ประจุของอนุภาคทองคำเปลี่ยนไป เกิดการจับกันเองและตกตะกอนลงมา



รูปที่ 4.1 ความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการเชื่อมติดกับอนุภาคทองคำ

4.1.2. ผลการประกอบชุดแถบทดสอบ

เนื่องจากงานวิจัยนี้ต่อยอดมาจากงานวิจัยของ Preechakasedkit และคณะ (2019) ซึ่งใช้ความเข้มข้นของเส้นควบคุมและเส้นทดสอบของชุดแถบทดสอบที่ผลิตขึ้นเองนี้ ด้วย GAM ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ RAC-BSA ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ บน Analytical pad พ่นสารละลาย MAb-Colloidal gold บน Conjugated pad ด้วยอัตราการพ่น 10 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร จากนั้นทำการประกอบชุดแถบทดสอบ ซึ่งสารละลาย MAb-Colloidal gold ปริมาตร 5 มิลลิลิตร สามารถผลิตชุดแถบทดสอบได้ครั้งละ 1000 ชิ้น และได้สุ่มชุดแถบทดสอบมาทดสอบเบื้องต้นกับสารละลายบัฟเฟอร์ โดยพิจารณาจากความเข้มสีของเส้นควบคุมและเส้นทดสอบ พบว่าจากการผลิตทั้งสองครั้ง ชุดแถบทดสอบให้ความเข้มสีที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงนำชุดแถบทดสอบทั้งหมดประมาณ 2000 ชิ้น นำไปทดสอบต่อไป

4.2. การประเมินประสิทธิภาพชุดแถบทดสอบแรคโตพามีนในตัวอย่างเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์

4.2.1. ผลของเมทริกซ์ในตัวอย่างเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์

เมทริกซ์เป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ชุดแถบทดสอบ เนื่องจากในเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์ มีองค์ประกอบต่างๆ เช่น ไขมัน แร่ธาตุ และสารอาหารอื่นๆ ซึ่งสารสกัดที่นำมาทดสอบ อาจจะส่งผลต่อการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนของเส้นทดสอบบนแถบทดสอบ โดยทดสอบชุดแถบทดสอบด้วยสารสกัดจากเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์ พบว่าเมื่อนำสารสกัดจากตัวอย่างแต่ละชนิดไปหยดทดสอบ เส้นของแถบทดสอบทั้งบริเวณเส้นควบคุมและเส้นทดสอบไม่ปรากฏแถบสี เนื่องจากผลของเมทริกซ์ของตัวอย่างเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์ อาจมีผลต่อการจับกันระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจน ส่งผลต่อความเข้มสีของแถบทดสอบ จึงทำให้ไม่ปรากฏแถบสี

การเจือจาง เป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยลดผลของเมทริกซ์ ดังนั้น ทำการทดสอบแถบทดสอบด้วยการเจือจางสารสกัดเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์ นอกจากนี้จากการทดลองเบื้องต้น พบว่าการเพิ่มอัตราส่วนของ tween ในบัฟเฟอร์ จาก 0.1% PBS-T เป็น 0.25% PBS-T ทำให้สารสกัดตัวอย่างเคลื่อนที่บนแผ่นเมมเบรนได้ดีกว่า จึงได้ใช้ 0.25% PBS-T เป็นสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับเจือจางสารสกัด เพื่อช่วยลดผลของเมทริกซ์อีกทางหนึ่ง จากการทดลองเจือจางสารสกัดจากเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์ด้วย 0.25% PBS-T ที่อัตราส่วน 1:1, 1:2, 1:3 และ 1:4 พบว่าสารสกัดจากเนื้อสัตว์ระดับการเจือจางที่อัตราส่วน 1:1 และ 1:2 ไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านเมมเบรนได้ ในขณะที่ระดับการเจือจางสารสกัดที่อัตราส่วน 1:3 และ 1:4 สามารถเคลื่อนที่จาก Sample pad ผ่านไปยัง Absorbent pad ได้ โดยสามารถมองเห็นแถบสีของเส้นทดสอบและเส้นควบคุม

ในส่วนของอาหารสัตว์ ระดับการเจือจางที่อัตราส่วน 1:1 ไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนได้ ในขณะที่ระดับการเจือจางสารสกัดที่อัตราส่วน 1:2, 1:3 และ 1:4 สามารถเคลื่อนที่จาก Sample pad ผ่านไปยัง Absorbent pad ได้ โดยสามารถมองเห็นแถบสีบริเวณเส้นทดสอบและเส้นควบคุม ดังนั้น เมื่อพิจารณาจากระดับการเจือจางที่น้อยที่สุดของสารสกัดที่ให้ความเข้มข้นใกล้เคียงกับตัวควบคุมที่สุด จึงเลือกสารสกัดจากเนื้อสัตว์ที่ระดับการเจือจาง 1:3 และสารสกัดจากอาหารสัตว์ที่ระดับการเจือจาง 1:2 สำหรับทดสอบต่อไป

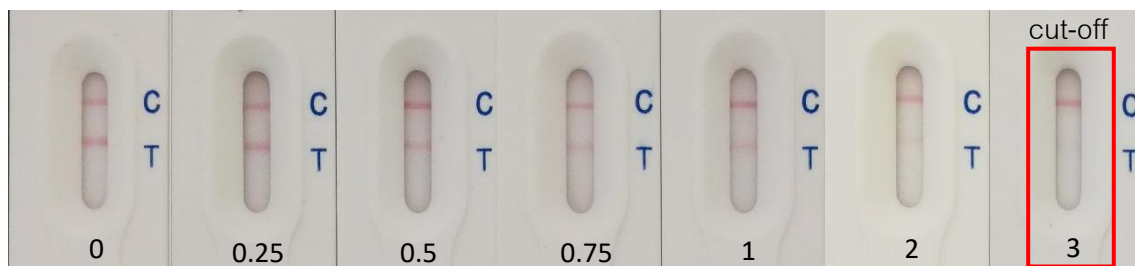
4.2.2. การหาค่าความไวของชุดแถบทดสอบ (Sensitivity)

4.2.2.1. การหาค่าความไวในสารละลายบัฟเฟอร์

นำชุดแถบทดสอบที่ผลิตขึ้นเอง มาทดสอบหาค่าความไวของแถบทดสอบ โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน แรคโตพามีนที่มีความเข้มข้น 0-10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1% PBS-T จากนั้นปีปเตตสารละลายมาตรฐานแรคโตพามีน ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงในช่องหยดตัวอย่าง วิเคราะห์ผลทดสอบภายใน 15 นาที โดยแปลผลด้วยตาเปล่าเพื่อหาค่า cut-off และถ่ายภาพภายใต้กล้องควบคุมแสง เพื่อหาค่าความเข้มข้นด้วยโปรแกรม ImageJ และนำค่า % ความเข้มข้นที่ได้ สร้างกราฟสารละลายมาตรฐานของแรคโตพามีนในสารละลายบัฟเฟอร์ สำหรับหาค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในเชิงปริมาณ (LOD) โดยทำการทดสอบความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ 3 ชุดการทดลอง

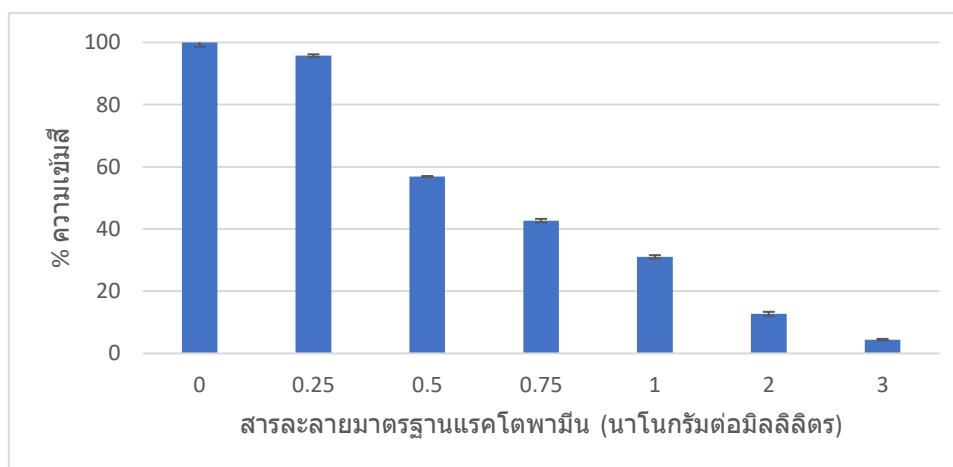
จากผลการทดลองพบว่าเมื่อความเข้มข้นของแรคโตพามีนเพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของเส้นทดสอบจะจางลง ค่า cut-off จากการแปลผลด้วยสายตา เท่ากับ 3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งพิจารณาจากค่าความเข้มข้นของแรคโตพามีนที่น้อยที่สุด ที่ทำให้แถบทดสอบไม่ปรากฏแถบสี ณ บริเวณเส้นทดสอบ เมื่อนำไปอ่านค่าความเข้มข้นด้วยโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ พบว่า % ความเข้มข้นมีค่าลดลงเมื่อแรคโตพามีนความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.2 ซึ่งเท่ากับ 95.75 ± 0.45 , 56.90 ± 0.15 , 42.71 ± 0.56 , 31.07 ± 0.53 , 12.70 ± 0.69 , และ 4.43 ± 0.11 ที่ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, และ 3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเป็นช่วงที่วัดค่าได้ (Detection range) จากกราฟมาตรฐานเส้นตรง โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; R^2) เท่ากับ 0.9906 ซึ่งมีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ โดยค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในเชิงปริมาณ (LOD) จากกราฟมาตรฐานแรคโตพามีนในสารละลายบัฟเฟอร์ พบว่าสารละลายบัฟเฟอร์มีค่า LOD เท่ากับ 1.36 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ดังรูปที่ 4.3

(ก)

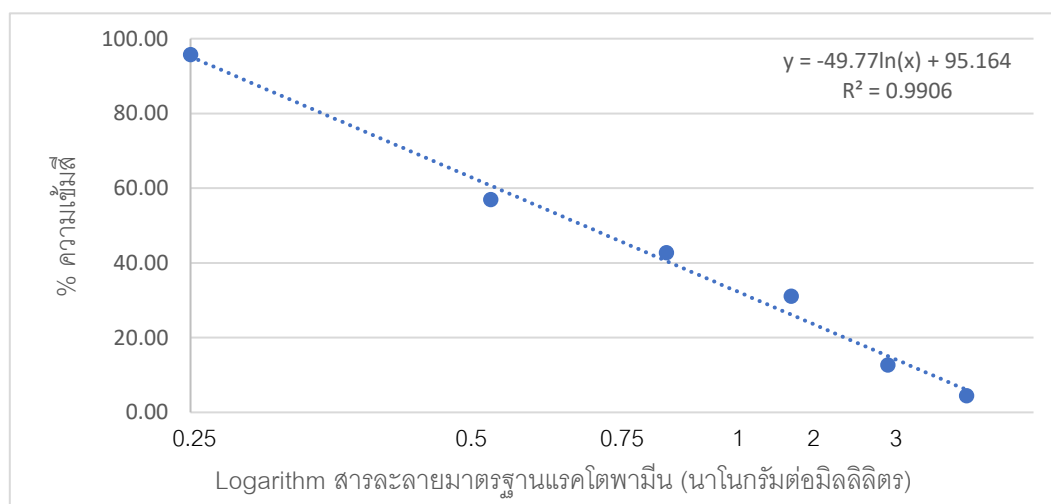


ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแคดโทพามีน (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)

(ข)



รูปที่ 4.2 (ก) ผลค่า cut-off ของแถบทดสอบที่ทดสอบด้วยสารละลายมาตรฐานแคดโทพามีนที่ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, และ 3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลาย 0.1% PBS-T โดยการแปลผลด้วยสายตา (ข) แสดงค่า % ความเข้มสีของเส้นทดสอบด้วยโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ



รูปที่ 4.3 กราฟสารละลายมาตรฐานแคดโทพามีนในสารละลายบัฟเฟอร์

4.2.2.1. การหาค่าความไวในสารสกัดจากเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์

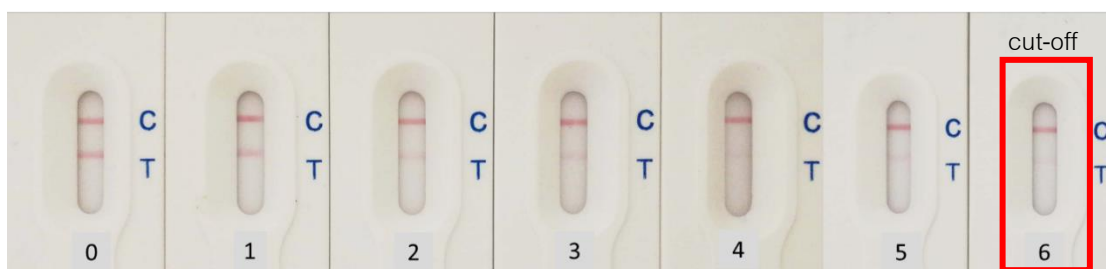
เมทริกซ์เป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ชุดแถบทดสอบ เนื่องจากในเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์ มีองค์ประกอบต่างๆ เช่น ไขมัน แร่ธาตุ และสารอาหารอื่นๆ ซึ่งสารสกัดที่นำมาทดสอบ อาจจะส่งผลต่อการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนของเส้นทดสอบบนแถบทดสอบ ทำให้ค่าความไวของแถบทดสอบที่ทดสอบด้วยบัฟเฟอร์เปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นจึงต้องทำการทดสอบหาค่าความไวของชุดแถบทดสอบด้วยสารสกัดจากตัวอย่างเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์ โดยตัวอย่างเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์ที่นำมาใช้ทดสอบ ได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มงานวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์และฮอร์โมน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ และจากกลุ่มงานวิเคราะห์สารตกค้างในอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ในการตรวจสอบและยืนยันผลว่าไม่มีสารแครโคโทพามีนตกค้างในเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์ที่นำมาใช้ทดสอบ

จากผลการทดลอง การเจือจางสารสกัดเป็นปัจจัยหนึ่งในการลดผลของเมทริกซ์ ซึ่งระดับการเจือจางสารสกัดที่เหมาะสมจากเนื้อสัตว์ คือ ระดับการเจือจางอัตราส่วน 1:3 และสารสกัดจากอาหารสัตว์ คือ ระดับการเจือจางอัตราส่วน 1:2 โดยเตรียมสารละลายแครโคโทพามีนที่ความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 0-10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารสกัดแต่ละชนิด ทำการทดสอบความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ 3 ชุดการทดลอง พบว่าเมื่อความเข้มข้นของแครโคโทพามีนเพิ่มขึ้น ความเข้มสีที่บริเวณเส้นทดสอบจะจางลง โดยค่า cut-off ของแถบทดสอบที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์ จากการแปลผลด้วยสายตา เท่ากับ 6 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรและ 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยพิจารณาจากค่าความเข้มข้นของแครโคโทพามีนที่น้อยที่สุด ที่ทำให้แถบทดสอบไม่ปรากฏแถบสี ณ บริเวณเส้นทดสอบ

โดยชุดแถบทดสอบที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากเนื้อหมู เนื้อวัวและอาหารสัตว์ มีค่า % ความเข้มสีที่ค่อยๆ ลดลงตามความเข้มข้นของแครโคโทพามีนที่เพิ่มขึ้น โดย % ความเข้มสีของสารสกัดจากเนื้อหมู เท่ากับ 58.36 ± 0.34 , 41.81 ± 1.68 , 31.80 ± 0.25 , 23.66 ± 0.33 , 18.20 ± 0.26 , และ 14.31 ± 0.18 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.4 (ข), % ความเข้มสีของสารสกัดจากเนื้อวัว เท่ากับ 73.82 ± 0.64 , 49.51 ± 2.16 , 35.29 ± 0.55 , 25.95 ± 1.10 , 14.76 ± 0.02 , และ 10.32 ± 0.28 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.6 (ข) ที่ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5, และ 6 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเป็นช่วงที่วัดค่าได้จากกราฟมาตรฐานเส้นตรง โดยสารสกัดจากเนื้อหมู ค่า R^2 เท่ากับ 0.9993 และสารสกัดจากเนื้อวัว ค่า R^2 เท่ากับ 0.998 ซึ่งมีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ โดยค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในเชิงปริมาณจากกราฟมาตรฐาน โดยพิจารณาจากการลดลงของสีที่ 20 % โดยวัดความเข้มสีด้วยโปรแกรม ImageJ พบว่าสารสกัดจากเนื้อหมูและเนื้อวัว ค่า LOD เท่ากับ 0.42 และ 0.85 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.5 และ 4.7

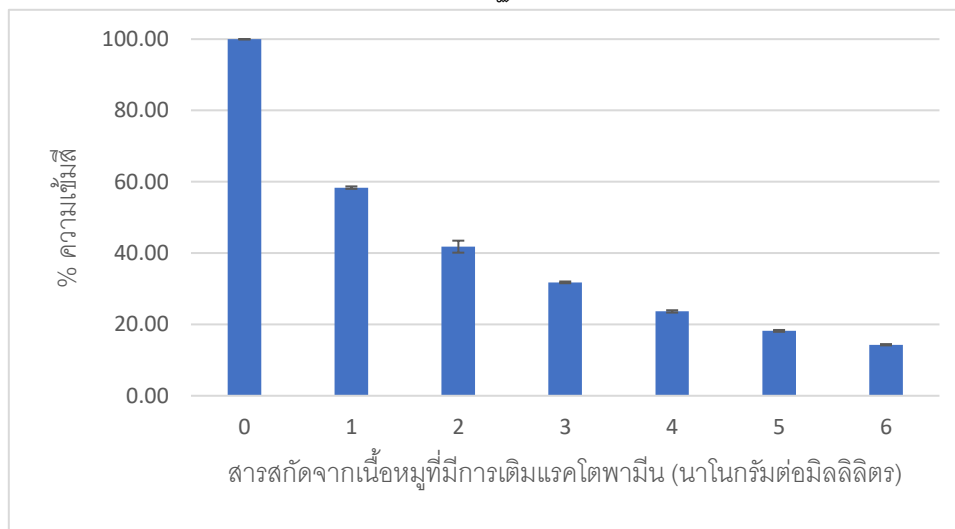
(ก)

สารสกัดจากเนื้อหมู

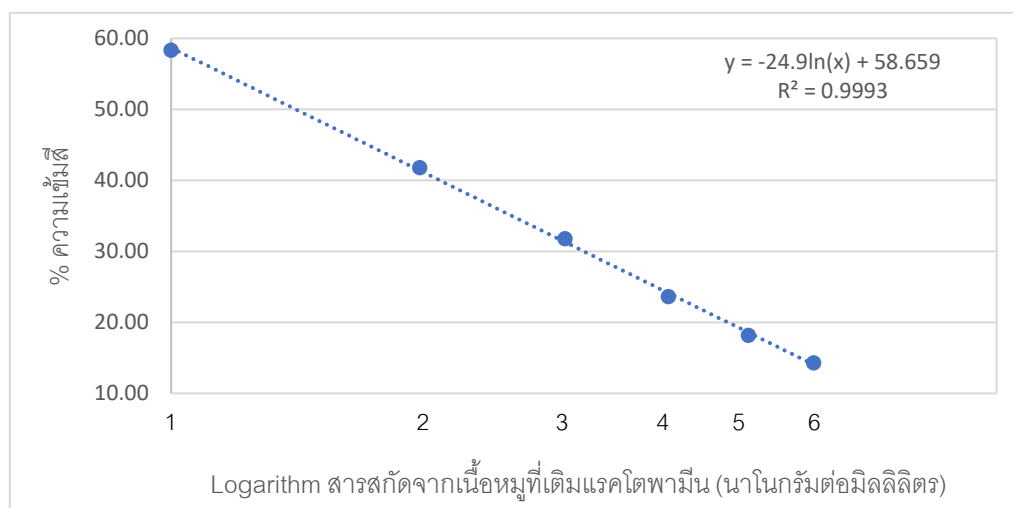


ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแครคโตพามีน (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)

(ข)



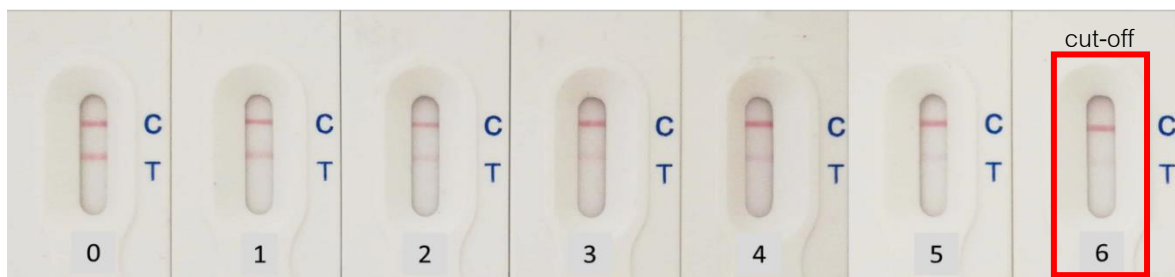
รูปที่ 4.4 (ก) ผลค่า cut-off ของแถบทดสอบที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากเนื้อหมูเจือจางด้วย 0.25% PBS-T ที่อัตราส่วน 1:3 โดยการแปลผลด้วยสายตา (ข) แสดงค่า % ความเข้มสีของเส้นทดสอบด้วยโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ



รูปที่ 4.5 กราฟสารละลายมาตรฐานแครคโตพามีนในสารสกัดจากเนื้อหมู

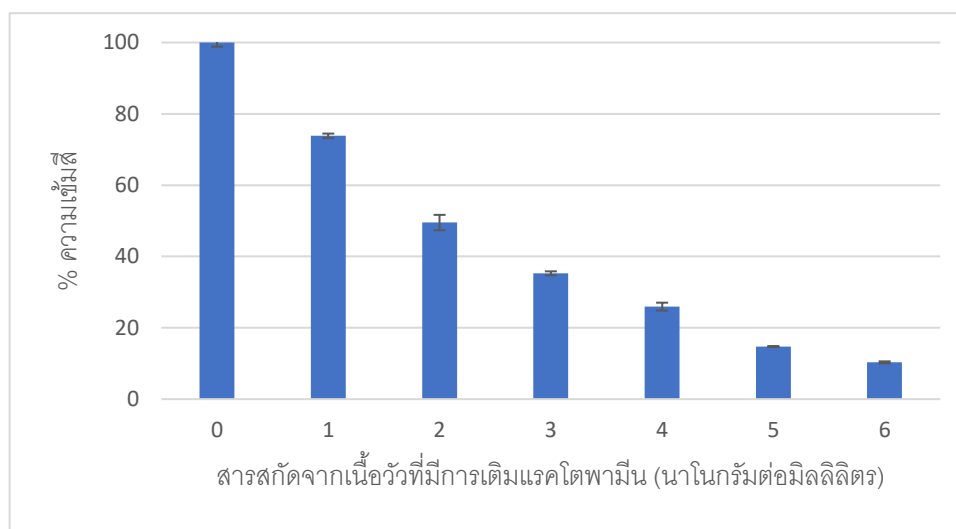
สารสกัดจากเนื้อวัว

(ก)



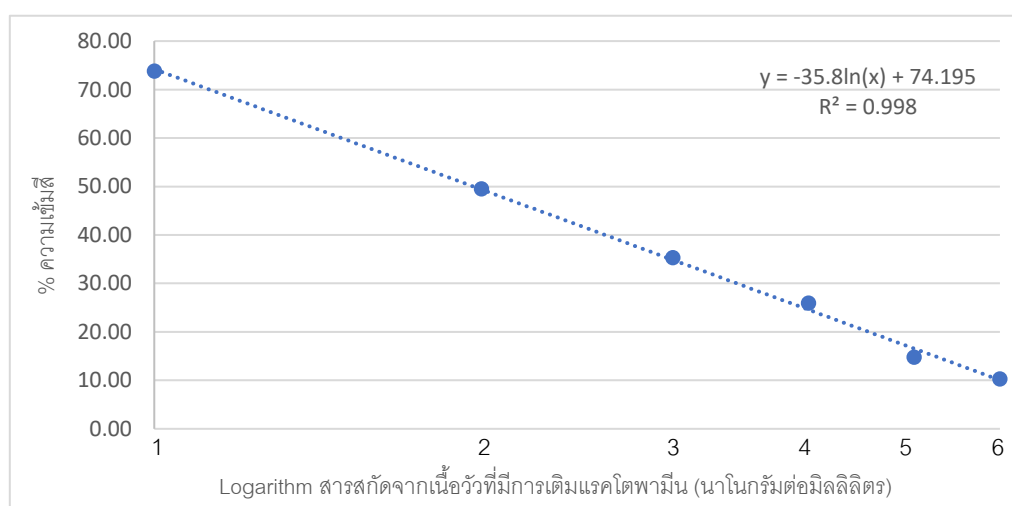
ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแรคโตพามีน (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)

(ข)



สารสกัดจากเนื้อวัวที่มีการเติมแรคโตพามีน (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)

รูปที่ 4.6 (ก) ผลค่า cut-off ของแถบทดสอบที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากเนื้อวัวเจือจางด้วย 0.25% PBS-T ที่อัตราส่วน 1:3 โดยการแปลผลด้วยสายตา (ข) แสดงค่า % ความเข้มสีของเส้นทดสอบด้วยโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ

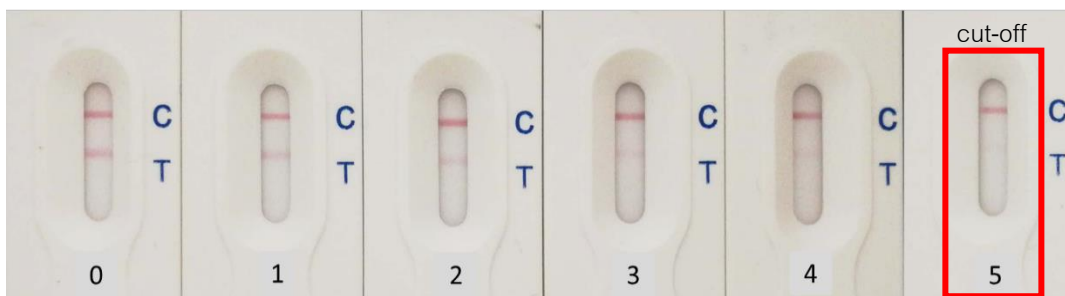


รูปที่ 4.7 กราฟสารละลายมาตรฐานแรคโตพามีนในสารสกัดจากเนื้อวัว

นอกจากนี้ชุดแถบทดสอบที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากอาหารสัตว์ให้ผลในทิศทางเดียวกัน ซึ่งค่า % ความเข้มสีจะค่อยๆ ลดลงตามความเข้มข้นของแครโตพามีนที่เพิ่มขึ้น โดย % ความเข้มสีของสารสกัดจากอาหารสัตว์ เท่ากับ 76.35 ± 0.98 , 51.43 ± 0.54 , 37.02 ± 0.62 , 28.52 ± 0.60 , และ 19.50 ± 0.48 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.8 (ข) ที่ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, และ 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเป็นช่วงที่วัดค่าได้จากกราฟมาตรฐานเส้นตรง ซึ่งมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9992 ซึ่งมีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ โดยค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในเชิงปริมาณจากกราฟมาตรฐานสารสกัดจากอาหารสัตว์โดยพิจารณาจากการลดลงของสีที่ 20 % พบว่าสารสกัดจากอาหารสัตว์ มีค่า LOD เท่ากับ 0.89 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ดังรูปที่ 4.9

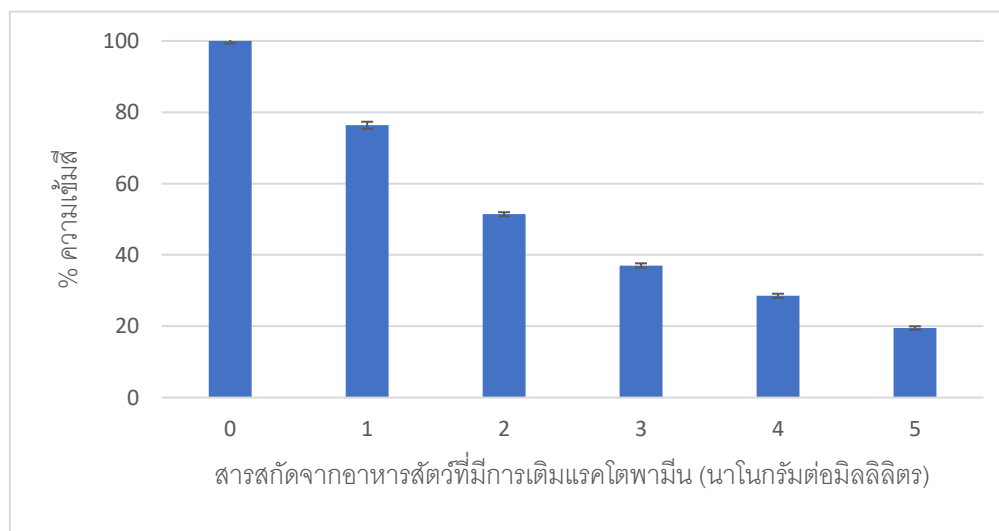
(ก)

สารสกัดจากอาหารสัตว์

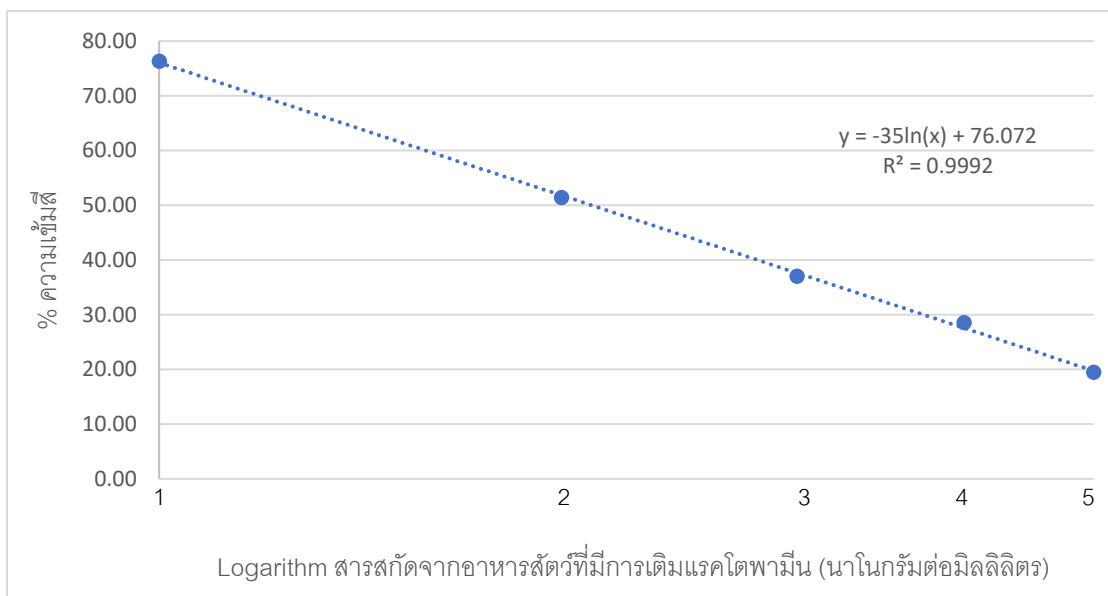


ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแครโตพามีน (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)

(ข)



รูปที่ 4.8 (ก) ผลค่า cut-off ของแถบทดสอบที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากอาหารสัตว์เจือจางด้วย 0.25% PBS-T ที่อัตราส่วน 1:2 โดยการแปลผลด้วยสายตา (ข) แสดงค่า % ความเข้มสีของเส้นทดสอบด้วยโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ



รูปที่ 4.9 กราฟสารละลายมาตรฐานแร่โคพาไมนในสารสกัดจากอาหารสัตว์

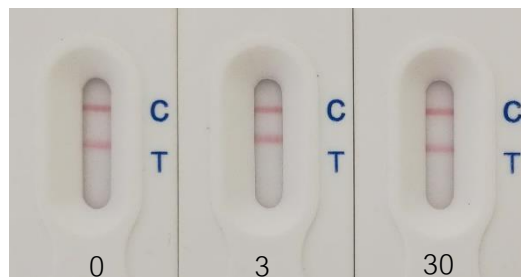
4.2.3. การเกิดปฏิกิริยาข้ามของชุดแถบทดสอบ

ทำการทดสอบความจำเพาะของชุดแถบทดสอบแร่โคพาไมน โดยนำมาทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารปฏิชีวนะในกลุ่ม ได้แก่ เคลนบูเทอรอลและซัลบูทามอล ซึ่งเป็นสารในกลุ่มเบต้า-อะโกนิสต์ เช่นเดียวกับแร่โคพาไมน โดยเตรียมให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 3, และ 30 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลาย 0.1% PBS-T ซึ่งสูงกว่า 10 เท่าของค่า cut-off ในบัฟเฟอร์ นอกจากนี้ ทำการทดสอบในสารสกัดจากเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์เช่นเดียวกัน โดยเตรียมให้มีความเข้มข้นเป็น 0, 6, และ 60 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในสารสกัดจากเนื้อสัตว์ และความเข้มข้น 0, 5, และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในสารสกัดจากอาหารสัตว์ซึ่งสูงกว่า 10 เท่าของค่า cut-off ของสารสกัดจากเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์ จากนั้นเปิดสารละลายปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงในช่องหยดตัวอย่าง วิเคราะห์ผลทดสอบภายใน 15 นาที ทำการทดลองความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ 3 ชุดการทดลอง ผลการทดลองพบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารเคลนบูเทอรอลและซัลบูทามอลเพิ่มสูงขึ้น ความเข้มสีบริเวณเส้นทดสอบยังคงปรากฏไม่จางลง ดังแสดงในรูปที่ 4.10 ถึงแม้ว่าสารละลายเคลนบูเทอรอลและซัลบูทามอลที่ใช้มีความเข้มข้นสูงกว่าค่า cut-off 10 เท่า เมื่อเทียบกับแถบทดสอบที่ทดสอบด้วยสารละลายมาตรฐานแร่โคพาไมนที่แถบสีของแถบทดสอบจางลงเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าชุดแถบทดสอบที่ผลิตขึ้นเองนี้ มีความจำเพาะกับแร่โคพาไมนและไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามในช่วงความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ

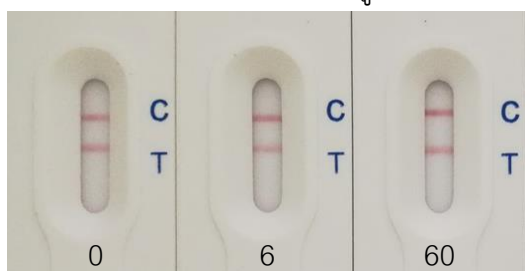
สารละลายบัฟเฟอร์



สารละลายบัฟเฟอร์



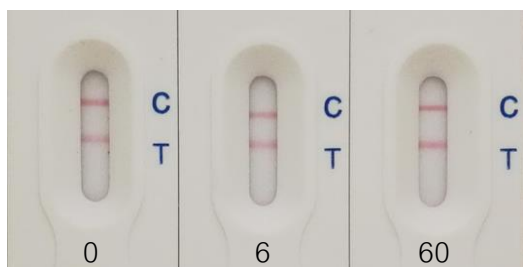
สารสกัดจากเนื้อหมู



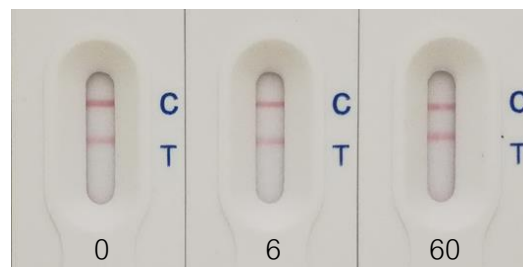
สารสกัดจากเนื้อหมู



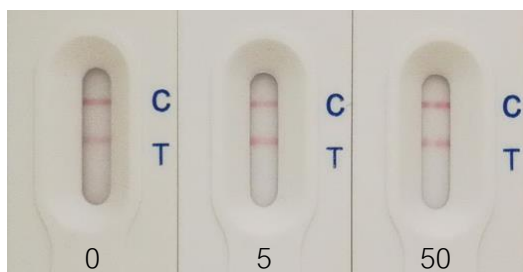
สารสกัดจากเนื้อวัว



สารสกัดจากเนื้อวัว



สารสกัดจากอาหารสัตว์



สารสกัดจากอาหารสัตว์



เคลนบูเทอรอล (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)

ซัลบูทามอล (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)

รูปที่ 4.10 ทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามด้วยเคลนบูเทอรอลและซัลบูทามอลด้วยชุดแถบทดสอบที่ผลิตขึ้นเอง

4.2.4. การหาค่าความถูกต้องและแม่นยำของชุดแถบทดสอบ

ทดลองโดยนำตัวอย่างเนื้อหมู เนื้อวัว และอาหารสัตว์ ที่ผ่านการตรวจแล้วว่าไม่มีแร็คโตพามีนตกค้าง ทำการเติมแร็คโตพามีน โดยให้ความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 1, 2, 3, 4, 5, และ 6 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในตัวอย่างเนื้อสัตว์ และในอาหารสัตว์ให้ความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 1, 2, 3, 4, และ 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารสกัดที่ได้มาหยดทดสอบ อ่านค่าความเข้มสีของเส้นทดสอบด้วยโปรแกรม ImageJ นำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณแร็คโตพามีนที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานแร็คโตพามีนในตัวอย่างแต่ละชนิด โดยกราฟมาตรฐานเส้นตรงที่ได้ มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9993, 0.998, และ 0.9992 ในตัวอย่างเนื้อหมู, เนื้อวัว, และอาหารสัตว์ ตามลำดับ ซึ่งมีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ เหมาะสมกับการใช้เป็นกราฟมาตรฐาน แล้วนำค่าความเข้มสีของแร็คโตพามีนที่ได้ มาคำนวณหาค่าเฉลี่ยการกลับคืน (% recovery) เพื่อหาค่าความถูกต้องของชุดแถบทดสอบ พบว่าตัวอย่างเนื้อหมู มีค่า % recovery อยู่ในช่วง 87.02-91.73% ตัวอย่างเนื้อวัว อยู่ในช่วง 82.44-88.00% และตัวอย่างอาหารสัตว์ อยู่ในช่วง 98.34-100.37% ซึ่งค่าที่ได้ อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ตามเกณฑ์มาตรฐานของ AOAC (2016)

นอกจากนี้การหาความแม่นยำของชุดแถบทดสอบด้วยการทำ intra-variation assay และ inter-variation assay ทำการทดสอบความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ ทั้งหมด 3 วัน แล้วนำค่าความเข้มสีของแถบทดสอบที่วัดได้จากตัวอย่างเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์ด้วยโปรแกรม ImageJ เทียบกับกราฟมาตรฐานแร็คโตพามีนในตัวอย่างแต่ละชนิด แล้วนำค่าความเข้มสีของแร็คโตพามีนที่ได้ มาคำนวณหา % CV เพื่อหาค่าความแม่นยำของชุดแถบทดสอบ ผลการทดลองพบว่าการทำ intra-variation assay ตัวอย่างเนื้อหมูมีค่า %CV อยู่ในช่วง 6.44-17.83% ตัวอย่างเนื้อวัวมีค่า %CV อยู่ในช่วง 9.21-17.02% และตัวอย่างอาหารสัตว์มีค่า %CV อยู่ในช่วง 1.15-15.18% และการทำ inter-variation assay ของตัวอย่างเนื้อหมูมีค่า %CV อยู่ในช่วง 3.03-4.39% ตัวอย่างเนื้อวัวมีค่า %CV อยู่ในช่วง %CV อยู่ในช่วง 4.27-9.31% และตัวอย่างอาหารสัตว์มีค่า %CV อยู่ในช่วง 0.42- 4.94% ซึ่งค่าที่ได้ อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ตามเกณฑ์มาตรฐานของ AOAC (2016) คือ สารที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1-10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า % recovery อยู่ในช่วง 60-115 และค่า %CV มีค่าเท่ากับหรือน้อยกว่า 32 แสดงว่าชุดแถบทดสอบที่ผลิตขึ้นเองนี้อยู่ในเกณฑ์ความเชื่อมั่นและยอมรับได้

ตารางที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์ Intra-variation assay ในตัวอย่างเนื้อหมู (n=6)

	ปริมาณ RAC ที่เติมในตัวอย่าง (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าเฉลี่ย RAC ที่วัดได้ (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	% Recovery	%CV
วันที่ 1	1	0.88±0.10	88.35	11.07
	2	1.73±0.21	86.46	12.27
	3	2.83±0.44	94.40	15.64
	4	3.75±0.30	93.85	8.02
	5	4.32±0.53	86.40	12.23
	6	5.51±0.35	91.85	6.44
วันที่ 2	1	0.94±0.17	94.22	17.83
	2	1.69±0.21	84.68	12.11
	3	2.71±0.35	90.38	12.88
	4	3.71±0.49	92.76	13.17
	5	4.54±0.52	90.75	11.39
	6	5.24±0.37	87.35	7.05
วันที่ 3	1	0.87±0.11	86.74	12.85
	2	1.83±0.32	91.27	17.60
	3	2.62±0.40	87.41	15.13
	4	3.54±0.38	88.59	10.82
	5	4.20±0.39	83.92	9.41
	6	5.61±0.77	93.44	13.73

ตารางที่ 4.2 ผลการวิเคราะห์ Inter-variation assay ในตัวอย่างเนื้อหมู (N=3)

ปริมาณ RAC ที่เติมในตัวอย่าง (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าเฉลี่ย RAC ที่วัดได้ (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	% Recovery	%CV
1	0.90±0.04	89.77	4.39
2	1.75±0.07	87.47	3.90
3	2.72±0.11	90.73	3.87
4	3.67±0.11	91.73	3.03
5	4.35±0.17	87.02	3.97
6	5.45±0.19	90.88	3.47

ตารางที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์ Intra-variation assay ในตัวอย่างเนื้อวัว (n=6)

	ปริมาณ RAC ที่เติมในตัวอย่าง (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าเฉลี่ย RAC ที่วัดได้ (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	% Recovery	%CV
วันที่ 1	1	0.91±0.14	90.73	15.39
	2	1.76±0.23	88.14	12.96
	3	2.67±0.38	89.16	14.14
	4	3.68±0.63	91.98	17.02
	5	4.87±0.53	97.31	10.82
	6	5.33±0.50	88.79	9.37
วันที่ 2	1	0.84±0.13	83.54	15.43
	2	1.57±0.26	78.26	16.52
	3	2.45±0.35	81.58	14.24
	4	3.36±0.57	84.05	17.01
	5	4.09±0.45	81.86	11.03
	6	5.14±0.47	85.62	9.21
วันที่ 3	1	0.89±0.11	88.94	12.69
	2	1.62±0.24	80.91	14.80
	3	2.32±0.39	77.42	16.84
	4	3.20±0.44	80.09	13.68
	5	4.24±0.59	84.85	14.00
	6	4.77±0.65	79.57	13.67

ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์ Inter assay ในตัวอย่างเนื้อวัว (N=3)

ปริมาณ RAC ที่เติมในตัวอย่าง (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าเฉลี่ย RAC ที่วัดได้ (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	% Recovery	%CV
1	0.88±0.04	87.74	4.27
2	1.65±0.10	82.44	6.21
3	2.48±0.18	82.72	7.20
4	3.42±0.24	85.38	7.09
5	4.40±0.41	88.00	9.31
6	5.08±0.28	84.66	5.53

ตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์ Intra assay ในตัวอย่างอาหารสัตว์ (n=6)

	ปริมาณ RAC ที่เติมในตัวอย่าง (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าเฉลี่ย RAC ที่วัดได้ (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	% Recovery	%CV
วันที่ 1	1	1.04±0.04	104.02	3.61
	2	2.06±0.09	103.18	4.18
	3	2.94±0.09	97.95	2.91
	4	3.98±0.34	99.40	8.65
	5	4.98±0.06	99.66	1.15
วันที่ 2	1	0.94±0.11	94.22	11.68
	2	2.00±0.09	100.09	4.25
	3	2.96±0.38	98.76	12.81
	4	4.04±0.28	100.98	7.05
	5	4.91±0.49	98.20	10.00
วันที่ 3	1	0.99±0.15	99.19	15.18
	2	1.96±0.19	97.83	9.51
	3	2.95±0.12	98.32	3.92
	4	3.90±0.28	97.49	7.25
	5	4.94±0.26	98.84	5.17

ตารางที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์ Inter assay ในตัวอย่างอาหารสัตว์ (N=3)

ปริมาณ RAC ที่เติมในตัวอย่าง (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าเฉลี่ย RAC ที่วัดได้ (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	% Recovery	%CV
1	0.99±0.05	99.14	4.94
2	2.01±0.05	100.37	2.68
3	2.95±0.01	98.34	0.42
4	3.97±0.07	99.29	1.76
5	4.94±0.04	98.90	0.74

นอกจากนี้ทำการสุ่มตัวอย่างเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์ 25% จากตัวอย่างแต่ละชนิด 20 ตัวอย่าง ส่งตรวจวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) เพื่อยืนยันผลและหาค่าความถูกต้องโดยการหาค่า % recovery ด้วย LC-MS/MS ผลการทดลองพบว่าการตรวจสอบหาแรโคโตพามีนในเนื้อสัตว์ที่มีการเติมสารแรโคโตพามีนที่ความเข้มข้น 2, 4, และ 6 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย LC-MS/MS เท่ากับ 2.19, 4.04, และ 6.19 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในเนื้อหมู และ 2.02, 4.02, และ 6.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในเนื้อวัว ในขณะที่การทดสอบหาแรโคโตพามีนด้วยชุดแถบทดสอบที่ผลิตขึ้นเอง เท่ากับ 1.78, 3.67, และ 5.45 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในเนื้อหมู และ 1.65, 3.42, และ 5.08 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในเนื้อวัว ซึ่งแสดงให้เห็นว่าชุดแถบทดสอบที่ผลิตขึ้นเองสามารถตรวจสอบหาแรโคโตพามีนในตัวอย่างได้ใกล้เคียงกับความเข้มข้นที่เติมไป

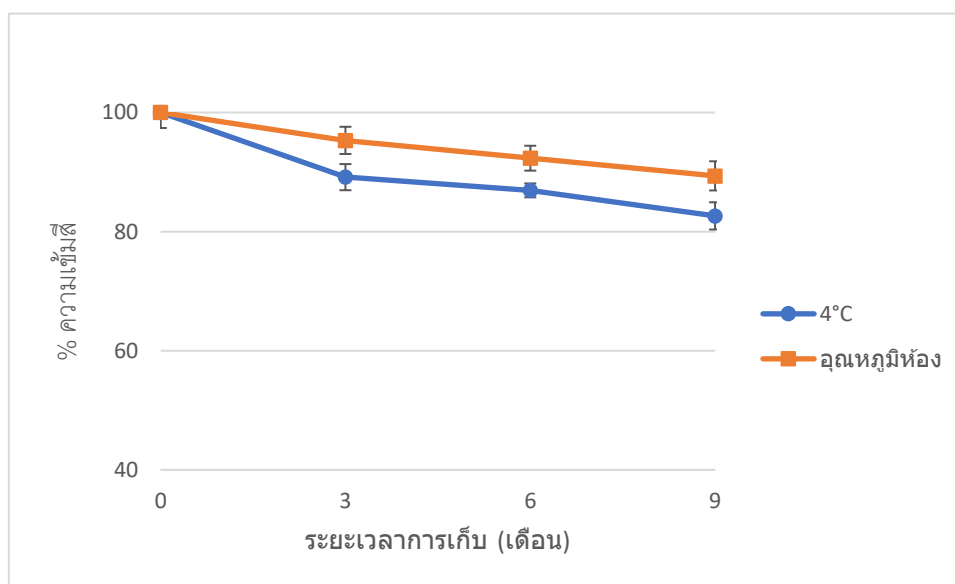
4.2.5. ความคงสภาพของชุดแถบทดสอบ

ทำการทดสอบความคงสภาพของชุดแถบทดสอบแรโคโตพามีน โดยเก็บชุดแถบทดสอบในห้องเย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบกำหนดระยะเวลา 0, 3, 6, และ 9 เดือน นับจากวันผลิตชุดแถบทดสอบ นำชุดแถบทดสอบมาหยดทดสอบด้วยบัฟเฟอร์ 0.1% PBS-T ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงในช่องหยดตัวอย่าง วิเคราะห์ผลทดสอบภายใน 15 นาที และถ่ายภาพภายใต้กล้องควบคุมแสง โดยเปรียบเทียบความเข้มสีที่เกิดขึ้นของแถบทดสอบ และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ ประเมินผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS ด้วยวิธีวิเคราะห์ Analysis of variance และวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ผลการทดลองพบว่าค่าความเข้มสีของแถบทดสอบที่เก็บ ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 0-6 เดือน และที่อุณหภูมิห้องระยะเวลา 0-9 เดือน ไม่มีความแตกต่างกัน ในขณะที่ค่าความเข้มสีของแถบทดสอบที่เก็บ ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสระยะเวลา 9 เดือนมีค่าความเข้มสีลดลงความแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.7 และจากการอ่านค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ พบว่า % ความเข้มสีของแถบทดสอบมีค่าลดลงไม่ถึง 20% ของระยะเวลาการเก็บ 9 เดือน โดยที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ 3, 6, และ 9 เดือน มีค่า % ความเข้มสี เท่ากับ 89.14 ± 2.19 , 86.92 ± 1.16 , 82.64 ± 2.29 ตามลำดับ และความเข้มสีของแถบทดสอบที่เก็บ ณ อุณหภูมิห้องที่ 3, 6, และ 9 เดือน เท่ากับ 95.32 ± 2.28 , 92.32 ± 2.09 , 89.36 ± 2.45 ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.11 พบว่า แสดงให้เห็นว่าชุดแถบทดสอบที่ผลิตขึ้นเอง มีความเสถียรและสามารถเก็บรักษาได้เป็นระยะเวลานาน อีกทั้งสามารถเก็บได้ในช่วงอุณหภูมิกว้าง ทั้งที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยชุดแถบทดสอบไม่เสื่อมสภาพ

ตารางที่ 4.7 ผลการทดสอบความคงสภาพของชุดแถบทดสอบแร็คโตพามีนต่อการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C และอุณหภูมิห้องในระยะเวลาต่าง ๆ กัน

ระยะเวลาเก็บ (เดือน)	ข้อมูลค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมอ่านค่าสี ImageJ	
	4°C	อุณหภูมิห้อง (28 - 35°C)
0	22.31±2.61 ^a	22.31±2.61 ^a
3	19.89±2.19 ^{ab}	21.27±2.28 ^{ab}
6	19.39±1.16 ^{ab}	20.60±2.09 ^{ab}
9	18.44±2.29 ^b	19.94±2.45 ^{ab}

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแถวเดียวกันและคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P>0.05$)



รูปที่ 4.11 ค่า % ความเข้มสีของชุดแถบทดสอบแร็คโตพามีนต่อการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C และอุณหภูมิห้องในระยะเวลาต่าง ๆ กัน

4.3. การเปรียบเทียบการทดสอบตัวอย่างด้วยชุดแถบทดสอบที่ผลิตขึ้นเองเปรียบเทียบกับชุดแถบทดสอบทางการค้าและวิธี LC-MS/MS

ทดสอบการใช้งานชุดทดสอบที่ผลิตขึ้นเองและชุดทดสอบทางการค้า จากบริษัท Biopanda Reagents ทำการสุ่มตัวอย่างเนื้อหมู เนื้อวัว และอาหารสัตว์ อย่างน้อยชนิดละ 20 ตัวอย่าง จากตลาดและซูเปอร์มาร์เก็ตทั่วไปในกรุงเทพมหานคร จากนั้นนำตัวอย่างเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์ มาสกัดเป็นสารสกัด โดยทำการเตรียมสารสกัดและใช้วิธีวิเคราะห์ตามวิธีของแต่ละชุดทดสอบ โดยรายงานผลเป็น ผลบวก (+) ในกรณีชุดทดสอบปรากฏแถบสีของเส้นควบคุมเส้นเดียว แสดงว่ามีการตกค้างของแครโธพามีในปริมาณมากกว่าหรือเท่ากับค่า cut-off ของชุดแถบทดสอบ แต่ถ้าชุดทดสอบปรากฏแถบสีสองเส้น ทั้งบริเวณเส้นควบคุมและเส้นทดสอบ แสดงว่ามีการตกค้างของแครโธพามีในปริมาณที่น้อยกว่าค่า cut-off ของชุดแถบทดสอบ รายงานผลเป็น ผลลบ (-) จากผลการทดลองพบว่า การทดสอบหาสารแครโธพามีในตัวอย่างเนื้อหมู เนื้อวัวและอาหารสัตว์ด้วยชุดแถบทดสอบที่ผลิตขึ้นเองและชุดแถบทดสอบทางการค้าไม่พบสารแครโธพามีตกค้าง ในขณะที่การตรวจสอบด้วยวิธี LC-MS/MS จากการสุ่มตัวอย่าง 20% จากตัวอย่างแต่ละชนิด ไม่พบสารแครโธพามีตกค้างเช่นเดียวกัน ยกเว้นตัวอย่าง B10 พบว่ามีการตรวจพบสารแครโธพามีในตัวอย่าง ซึ่งค่าที่พบ มีค่าต่ำกว่าค่า MRL ที่กำหนดให้ใช้ได้เนื้อสัตว์ ในส่วนของอาหารสัตว์ได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มงานวิเคราะห์สารตกค้างในอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ตรวจสอบและยืนยันผลว่าไม่มีสารแครโธพามีตกค้างด้วย LC-MS/MS ดังแสดงในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 เปรียบเทียบการใช้งานชุดทดสอบต้นแบบกับชุดทดสอบทางการค้าและวิธี LC-MS/MS ด้วยตัวอย่างเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์

ตัวอย่างเนื้อหมู	ชุดทดสอบต้นแบบ (cut-off = 6 ng/ml)	ชุดทดสอบทางการค้า (cut-off = 5 ng/ml)	ตรวจสอบด้วยวิธี LC-MS/MS LOD = 0.5 ng/ml
P1	-	-	-
P2	-	-	-
P3	-	-	-
P4	-	-	-
P5	-	-	-
P6	-	-	
P7	-	-	
P8	-	-	
P9	-	-	
P10	-	-	
P11	-	-	
P12	-	-	
P13	-	-	
P14	-	-	
P15	-	-	
P16	-	-	
P17	-	-	
P18	-	-	
P19	-	-	
P20	-	-	

ตารางที่ 4.8 (ต่อ) เปรียบเทียบการใช้งานชุดทดสอบต้นแบบกับชุดทดสอบทางการค้าและวิธี LC-MS/MS ด้วยตัวอย่างเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์

ตัวอย่างเนื้อวัว	ชุดทดสอบต้นแบบ (cut-off = 6 ng/ml)	ชุดทดสอบทางการค้า (cut-off = 5 ng/ml)	ตรวจสอบด้วยวิธี LC-MS/MS LOD = 0.5 ng/ml
B1*	-	-	-
B2*	-	-	-
B3	-	-	
B4	-	-	
B5*	-	-	-
B6	-	-	
B7	-	-	
B8	-	-	
B9	-	-	
B10*	-	-	0.60 µg/Kg
B11	-	-	
B12	-	-	
B13	-	-	
B14*	-	-	-
B15	-	-	
B16	-	-	
B17	-	-	
B18	-	-	
B19	-	-	
B20	-	-	

ตารางที่ 4.8 (ต่อ) เปรียบเทียบการใช้งานชุดทดสอบต้นแบบกับชุดทดสอบทางการค้าและวิธี LC-MS/MS ด้วยตัวอย่างเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์

ตัวอย่างเนื้อวัว	ชุดทดสอบต้นแบบ (cut-off = 5 ng/ml)	ชุดทดสอบทางการค้า (cut-off = 10 ng/ml)	ตรวจสอบด้วยวิธี LC-MS/MS LOD = 20 ng/ml
F1	-	-	-
F2	-	-	-
F3	-	-	-
F4	-	-	-
F5	-	-	-
F6	-	-	-
F7	-	-	-
F8	-	-	-
F9	-	-	-
F10	-	-	-
F11	-	-	-
F12	-	-	-
F13	-	-	-
F14	-	-	-
F15	-	-	-
F16	-	-	-
F17	-	-	-
F18	-	-	-
F19	-	-	-
F20	-	-	-

* หมายถึง ตัวอย่างที่ส่งห้องปฏิบัติการกลาง เพื่อตรวจด้วยวิธี LC-MS/MS

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

โครงการวิจัยนี้เป็นงานวิจัยต่อยอดจากชุดทดสอบต้นแบบ สำหรับตรวจวัดแรคโตพามีน โดยวิธี lateral flow strip test ที่ได้รับอนุสิทธิบัตรเลขที่ 14804 เมื่อวันที่ 11 มกราคม 2562 และงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อประเมินประสิทธิภาพของชุดแถบทดสอบแรคโตพามีนที่ผลิตขึ้นเอง ในการนำไปตรวจวัดแรคโตพามีนตกค้างในตัวอย่างเนื้อหมู เนื้อวัว และอาหารสัตว์ได้ ซึ่งต้องการนำมาทดสอบกับตัวอย่างอาหารสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ โดยในงานวิจัยนี้เลือกความเข้มข้นโมโนโคลนอลแอนติบอดี 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับใช้ในการคอนจูเกตติดฉลากอนุภาคทอง ขนาด 20 นาโนเมตร โดยใช้ความเข้มข้นของเส้นควบคุมและเส้นทดสอบของชุดแถบทดสอบที่ผลิตขึ้นเองนี้ ด้วย GAM ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ RAC-BSA ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พ่นสารละลาย MAb-Colloidal gold ด้วยอัตราการพ่น 10 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร จากนั้นทำการประกอบชุดแถบทดสอบ โดยสามารถผลิตชุดแถบทดสอบได้ทั้งหมด 2,000 ชิ้น

เมทริกซ์เป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ชุดแถบทดสอบ เนื่องจากในเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์ มีองค์ประกอบต่างๆ เช่น ไขมัน แร่ธาตุ และสารอาหารอื่นๆ ซึ่งสารสกัดที่นำมาทดสอบ อาจจะส่งผลต่อการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนของเส้นทดสอบบนแถบทดสอบ การเจือจาง เป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยลดผลของเมทริกซ์ ดังนั้น การเจือจางสารสกัดเนื้อสัตว์ที่อัตราส่วน 1:3 และอาหารสัตว์ที่อัตราส่วน 1:2 ทำให้สารสกัดตัวอย่างเคลื่อนที่บนแผ่นเมมเบรนได้ดีกว่า จากนั้นนำแถบทดสอบมาหาค่าความไวของชุดแถบทดสอบ พบว่าค่า cut-off ของชุดแถบทดสอบที่ทดสอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์, สารสกัดจากเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์ จากการแปลผลด้วยสายตา เท่ากับ 3, 6, และ 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในเชิงปริมาณ เท่ากับ 0.42, 0.85, และ 0.89 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยพิจารณาจาก % การลดลงของสีที่ 20% โดยเปรียบเทียบจากช่วงที่วัดค่าได้จากกราฟมาตรฐาน นอกจากนี้ชุดแถบทดสอบที่ผลิตได้มีความจำเพาะกับแรคโตพามีนและไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารปฏิชีวนะในกลุ่มเบต้า-อะโกนิสต์ ในช่วงความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ

การหาค่าความถูกต้องและแม่นยำของชุดแถบทดสอบ เพื่อประเมินวิธีทดสอบมีค่าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ตามมาตรฐาน AOAC (2016) นอกจากนี้ทำการสุ่มตัวอย่างเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์ ส่งตรวจวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) เพื่อตรวจหาสารแรคโตพามีนในตัวอย่าง เพื่อยืนยันผลและหาค่าความถูกต้องด้วย LC-MS/MS และทำการทดสอบการใช้งานชุดทดสอบที่ผลิตขึ้นเองเปรียบเทียบกับชุดทดสอบทางการค้าและวิธี LC-MS/MS พบว่าการทดสอบหา

แร็คโตพามีนในตัวอย่างเนื้อหมู เนื้อวัวและอาหารสัตว์ด้วยชุดแถบทดสอบที่ผลิตขึ้นเอง ไม่พบสารแร็คโตพามีนตกค้าง สอดคล้องกับผลการทดลองที่ทดสอบด้วยชุดแถบทดสอบทางการค้า และวิธี LC-MS/MS

จากการทดสอบความคงสภาพของชุดแถบทดสอบ พบว่าชุดแถบทดสอบมีความคงตัวถึง 9 เดือนและสามารถเก็บได้ในช่วงอุณหภูมิกว้าง ทั้งที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยชุดแถบทดสอบไม่เสื่อมสภาพ

ดังนั้น จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการตรวจสอบแร็คโตพามีนตกค้างในเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์ โดยวิธี lateral flow strip test มีคุณภาพ มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ สามารถนำไปใช้งานจริงกับตัวอย่างเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์ได้ โดยชุดแถบที่ผลิตขึ้นเอง มีประสิทธิภาพค่า cut-off และความคงตัวของชุดแถบทดสอบ ใกล้เคียงกับชุดแถบทดสอบทางการค้า นอกจากนี้ อาจถ่ายทอดเทคโนโลยีของชุดแถบทดสอบไปยังบริษัทผู้ผลิต หากมีการผลิตในระดับอุตสาหกรรม อาจทำให้ต้นทุนการผลิตชุดแถบทดสอบลดลง โดยราคาต้นทุนของการผลิตชุดแถบทดสอบแร็คโตพามีนตกค้างจากงานวิจัยนี้ ประมาณ 50 บาท ต่อชุด ส่วนราคาจำหน่ายที่มีการสั่งจากต่างประเทศ ราคาประมาณ 65-200 บาท ต่อชุด ซึ่งอาจเพิ่มศักยภาพในการแข่งขันได้ และช่วยลดค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์เพื่อยืนยันผลได้

บทที่ 6

ผลลัพธ์และประโยชน์ที่ได้จากงานวิจัย

6.1 ผลที่ได้จากงานวิจัย (Output)

- ได้ข้อมูลที่แสดงถึงความไว ความถูกต้องแม่นยำ และความคงสภาพของชุดแถบทดสอบแร็คโตพามีน ที่นำไปใช้ในการตรวจวัดแร็คโตพามีนตกค้างในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์และอาหารสัตว์
- ได้วิธีการทดสอบและผลิตภัณฑ์ชุดแถบทดสอบสำหรับตรวจวัดแร็คโตพามีนตกค้าง ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์และอาหารสัตว์
- เผยแพร่บทความวิชาการ (กำลังเตรียมร่างบทความ)

6.2 ประโยชน์ที่ได้จากงานวิจัย (Outcome)

- ผลิตภัณฑ์ชุดแถบทดสอบสำหรับตรวจวัดแร็คโตพามีนตกค้าง สามารถใช้เป็นเครื่องมือวิเคราะห์ในการเฝ้าระวังการตกค้างแร็คโตพามีนในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ และการลักลอบใช้แร็คโตพามีนในอาหารสัตว์ ที่จะส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค
- ผลิตภัณฑ์ชุดแถบทดสอบสำหรับตรวจวัดแร็คโตพามีนตกค้าง เหมาะสำหรับวิธีวิเคราะห์คัดกรองเบื้องต้น (screening test) เนื่องจากใช้งานง่าย ให้ผลทดสอบรวดเร็ว ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ในการแปลผล สามารถลดการวิเคราะห์ตัวอย่างเพื่อยืนยันผล

6.3 ผลกระทบของงานวิจัย (Impact)

- ชุดแถบทดสอบแร็คโตพามีนตกค้างนี้เป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถผลิตได้ในประเทศ เป็นการเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจ เนื่องจากช่วยลดการนำเข้าชุดแถบทดสอบจากต่างประเทศ และอาจมีโอกาสนำไปสู่การยอมรับจากต่างชาติได้
- ถึงแม้ว่าจะสามารถผลิตชุดแถบทดสอบแร็คโตพามีนตกค้างในปริมาณมากได้แต่ยังอยู่ในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งยังขาดเกี่ยวกับมาตรฐานการผลิต (GMP) แต่งานวิจัยนี้สามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีไปยังบริษัทผู้ผลิตและจำหน่ายชุดแถบทดสอบด้านความปลอดภัยทางอาหาร
- ราคาต้นทุนของการผลิตชุดแถบทดสอบแร็คโตพามีนตกค้างจากงานวิจัยนี้ ประมาณ 50 บาท ต่อชุด ส่วนราคาจำหน่ายที่มีการสั่งจากต่างประเทศ ราคาประมาณ 65-200 บาท ต่อชุด ซึ่งอาจเพิ่มศักยภาพในการแข่งขันได้ และช่วยลดค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์เพื่อยืนยันผล

- เพิ่มคุณค่าทางสังคมและวัฒนธรรม คือช่วยสร้างความมั่นใจในความปลอดภัยและคุณภาพของอาหารแก่ผู้บริโภคได้
- เป็นเครื่องมือวิเคราะห์ เพื่อช่วยเฝ้าระวังการตกค้างของแร่โคโทพามีน แก่ภาครัฐและเอกชนในการตรวจสอบสินค้าให้เป็นไปตามกฎหมาย

6.4 กระบวนการผลักดันผลงานออกสู่การใช้ประโยชน์ (แนวทางที่จะนำไปสู่การใช้ประโยชน์)

เนื่องจากโครงการวิจัยนี้เป็นการประเมินการใช้งานของชุดแถบทดสอบแร่โคโทพามีนต้นแบบที่ผลิตขึ้นเอง ซึ่งต้องการนำมาทดสอบกับตัวอย่างอาหารสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เทียบกับวิธีการที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน โดยคาดว่าจะมีความร่วมมือกับกรมปศุสัตว์ในการสุ่มตัวอย่างทดสอบ เป็นการสร้างความถูกต้องและน่าเชื่อถือของชุดแถบทดสอบดังกล่าวที่ผลิตขึ้นในการใช้งานจริง และถ่ายทอดเทคโนโลยีต้นแบบของชุดแถบทดสอบไปยังบริษัทผู้ผลิตและจำหน่ายชุดแถบทดสอบด้านความปลอดภัยอาหาร

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 269 พ.ศ. 2546 เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีการปนเปื้อนสารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์. [Online]. 2546. Available from:

http://food.fda.moph.go.th/law/data/announ_moph/P269.pdf [13 ธันวาคม 2560]

นิติกร เจียยอเด. การพัฒนาอิมมูโนโครมาโทกราฟีสำหรับตรวจวัดเทตราไซคลินในน้ำผึ้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญา
มหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2559.

พระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558. [Online]. 2558. Available from:

<http://afvc.dld.go.th/index.php/2016-04-12 04-46-53/func-startdown/53/> [13 ธันวาคม 2560]

ภิรมภรณ์ เกื้อนถ้ำแก้ว, วิทยาสังข์ทอง, รัชนก ทองอ่อน และ กลวิทย์ ไชยทองศรี. (2560). การทดสอบความใช้ได้ของ
วิธีวิเคราะห์สารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ในอาหารโค ด้วยวิธี LC-MS/MS. วารสารอิเล็กทรอนิกส์ สำนักตรวจสอบ
คุณภาพปศุสัตว์. 8(2). 1-15.

ราชกิจจานุเบกษา. ประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่อง “หลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขการรับรองฟาร์มเลี้ยงสัตว์ปลอดสารเร่ง
เนื้อแดงหรือสารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์” [Online]. 2560. Available from:

<http://www.ratchakitcha.soc.go.th/DATA/PDF/2560/E/204/33.PDF> [13 ธันวาคม 2560]

สมาคมผู้เลี้ยงสุกรแห่งชาติ. Beta-agonist สารเร่งเนื้อแดง. [Online]. 2558. Available from:

<https://www.swinethailand.com/153617 90/ beta-agonist> [3 มกราคม 2561]

AOAC. (2016) Guidelines for Standard Method Performance Requirements.

Buakeaw, A., Puthong, S., Kongkavitoon, P., Khongarsa, K., Komolpis, K. and Khongchareonporn, N.
(2016). Production of monoclonal antibodies for ractopamine residue detection in pork.
Maejo International Journal of Science and Technology. 10(02): 175 – 186.

- 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 [2017, May 11]
- Codex alimentarius. Veterinary Drug Residues in Food [online] 2015 [2016, December 6]. Available from: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/vetdrugs/veterinary-drug-detail/en/?d_id=12
- Ding, G., Li, D., Qin, J., Zhu, J., Wang, B., Geng, Q., Guo, M., Punyapitak, D., and Cao, Y. 2015. Development and validation of high-performance liquid chromatography method for determination of Ractopamine residue in pork samples by solid phase extraction and pre-column derivatization. *Meat Science*. 106: 55-60.
- European Food Safety Authority. 2009. Safety evaluation of ractopamine: scientific opinion of the panel on additives and products or substances used in animal feed. European Food Safety Authority 1041: 1-52. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*. 88: 61-69.
- FDA. 2003. New animal drugs; ractopamine. Federal Register 68: 54658-54659.
- Gu, H., Liu, L., Song, S., Kuang, H., and Xu, C. 2016. Development of an immunochromatographic strip test assay for ractopamine detection using an ultrasensitive monoclonal antibody. *Food and Agricultural Immunology*. 27(4): 471-483.
- He, P., Zhang L., and Yang, T. 2008. Determination of ractopamine in swine feed and urine using an indirect competitive immunoassay. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 7(3): 268-275.
- He, P., Zhang, L., and Yang, T. 2008. Determination of ractopamine in swine feed and urine using an indirect competitive immunoassay. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 7(3): 268-275.

- Li, X., Zhang, G., Deng, R., Yang, Y., Liu, Q., Xiao, Z., Yang, J., Xing, G., Zhao, D., and Cai, S. 2010. Development of rapid immunoassays for the detection of ractopamine in swine urine. *Food Additives and Contaminants*. 27(8): 1096-1103.
- Liu, A., Lin, J., Dai, M., Ma, B., Wu, Y., Fang, J., and Zhang, M. 2016. Development of a monoclonal antibody-based immunochromatographic in swine urine. *Food Analytical Methods*. 9: 2016-2025.
- Michell, A. D., Solomon, M. B., and Steele, N. C. 1990. Response of low and high protein select lines of pigs to the feeding of the beta-adrenergic agonist ractopamine (phenethanolamine). *Journal of Animal Science*. 68: 3226-3232.
- Preechasedkit, P., Ngamrojanavanich, N., Khongchareonporn, N., and Chailapakul, O. 2019. Novel ractopamine–protein carrier conjugation and its application to the lateral flow strip test for ractopamine detection in animal feed. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)*. 1673-1581.
- Veenhuizen, E. L., Schmiegel, K. K., Waitt, W.P., and Anderson, D. B. 1987. Lipolytic, growth, feed, efficiency and carcass response to phenethanolamines in swine. *Journal of Animal Science*. 65: 130-133.
- Wu, J., Liu, X., and Peng, Y. 2014. Determination of ractopamine in pig hair using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 69: 211-216.
- Zhang, H.Y. and Wang, S. 2009. Review on enzyme-linked immunosorbent assays for sulfonamide residues in edible animal products. *Journal of Immunological Methods*. 350: 1-7.

- Zhang, M. Z., Wang, M. Z., Chen, Z. L., Fang, J. H., Fang, M. M., Liu, J., and Yu, XP. 2009. Development of a colloidal gold-based lateral-flow immunoassay for the rapid simultaneous detection of clenbuterol and ractopamine in swine urine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 395: 2591-2599.
- Zhang, M., Cong, Y., Sheng, Y. and Liu, B. 2010. A direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay by antibody coated for diethyl phthalate analysis. *Analytical Biochemistry*. 406: 24–28.
- Zhang, Q., Ni, Y., and Kokot, S. 2010. Molecular spectroscopic studies on the interaction between ractopamine and bovine serum albumin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 52: 280–288.
- Zhang, Y., Gao, X., Gao, A., and Fan, M. 2012. A biotin-streptavidin amplified enzyme-linked immunosorbent assay with improved sensitivity for rapid detection of ractopamine in muscular tissue. *Food Analytical Methods*. 5(5): 1214-1220.
- Zhang, Y., Wang, F. X., Fang, L., Wang, S., and Fang, G. Z. 2009. Rapid determination of ractopamine residues in edible animal products by enzyme-linked immunosorbent assay: Development and investigation of matrix effects. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2009: 1-9.

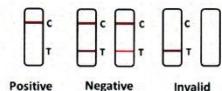
ภาคผนวก

ขั้นตอนการสกัดสารสกัดจากเนื้อสัตว์ด้วยแถบทดสอบทางการค้า



PRODUCT INSERT: RAPG-RAC-003

Ractopamine Rapid Test Kit (Meat 5 ppb) Catalogue No: RAPG-RAC-003



TEST KIT DESCRIPTION

The Biopanda Ractopamine Rapid Test Kit semi-quantitatively detects residual Ractopamine from animal's tissue with a cut-off value of 5 ppb. This test is a competitive lateral flow immuno-chromatographic assay and results can be obtained between five to ten minutes. The cassette has a test window with invisible Test (T) and Control (C) regions that become visible during sample testing. A red line in the test region indicates a negative result, if the control line is also present. If Ractopamine is present in the sample, in concentrations at or above 5 ppb, the test band will not become visible, indicating a positive result. The C band will appear during all tests to clarify a valid result.

KIT CONTENTS

- 10 foil wrapped pouches containing a test cassette, one pipette and desiccant
- 1 assay diluent (15 ml, ready-to-use)
- Two 50-ml centrifugal tubes
- 2 graduated pipettes (up to 3 ml)
- 1 product insert

METHOD

1. Discard all fatty tissue and slice the tissue sample into small pieces. Homogenize the sample at 10,000 rpm for 1 minute.
2. Use 8.0 g of homogenized sample, placing it into a 50 ml centrifugal tube.
3. Add 1.0 ml of assay diluent and tightly close the lid.
4. Place the tube in a water bath at 80°C for 10 minutes.
5. Extract the liquid from the tube and place in a 1.5 ml Eppendorf centrifugal tube.
6. Centrifuge the sample at 4000×g for 1 minute to produce a clear sample. **Note:** If a fat layer remains, insert the pipette through the layer and use the aqueous part under the layer to run the assay.
7. Remove the test cassette from its foil pouch and place it on a flat surface.
8. Drip 3 drops of the sample into the specimen well and read the results between 5 to 10 minutes.
9. Results read after 10 minutes are considered invalid.

RESULTS

Positive results: Only the C line is visible. This indicates the concentration of RAC is ≥ 5 ppb in the sample.

Negative results: Both the T and C lines are visible.

Invalid results: No coloured line becomes visible in the C zone regardless if the T line appears.

SPECIFICITY

The results are negative when the test is applied to detecting 100 ppm of Clenbuterol, Salbutamol, Trenbolone-acetate, Chloramphenicol, Aminoglycosides, Beta-Lactams, Macrolides, Quinolones, and Tetracyclines.

STORAGE INSTRUCTIONS

Store the kit between 2-30°C and ensure the kits are not frozen or stored in direct sunlight. The test is valid for 18 months until the expiration date printed on the foil wrapping.

SAFETY MEASURES

Follow these instructions for the best results:

- Ensure the test kit is at room temperature before running the test.
- Keep the cassette inside the foil wrapper until it is needed.
- Do not use tap water, distilled water or purified water as a negative control.
- Ensure each test is used only once.
- Tests that have reached their expiry date should not be used.
- Only use reagents from this kit when performing the test to ensure quality controlled testing.
- If no liquid appears at the test window, add 1 extra drop of sample.

LIMITATIONS

The Biopanda RAC Rapid Test provides a semi-quantitative method to detect RAC residue at ≥ 5 ppb. For a quantitative result, please use a method such as ELISA.

Thank you for purchasing Biopanda's Ractopamine (Meat) Rapid Test kit. Please read this manual carefully before operating to ensure proper use.

Biopanda Reagents Ltd.

Unit 14 Carrowreagh Business Park
Carrowreagh Road
Belfast, BT16 1QQ
United Kingdom
Tel: +44 (0) 28 95438774
Fax: +44 (0) 28 90486696
E-mail: info@biopanda.co.uk
Website: www.biopanda.co.uk

ขั้นตอนการสกัดสารสกัดจากอาหารสัตว์ด้วยแถบทดสอบทางการค้า



Ractopamine Rapid Test Kit

(Feed 10 ppb)

Catalogue No: RAPG-RAC-006

TEST KIT DESCRIPTION

The Biopanda Ractopamine (RAC) Rapid Test semi-quantitatively detects residual RAC from animal feed with a cut-off value of 10 ppb. This test is a competitive lateral flow immunochromatographic assay and results can be obtained between five to ten minutes.

The cassette has a test window with invisible Test (T) and Control (C) regions that become visible during sample testing. If RAC is present in the sample, in concentrations of ≥ 10 ppb, the T line will be invisible or weaker than the C line, indicating a positive result; If RAC is present in the sample, in concentrations of < 10 ppb, the T line will be the same strength as or darker than the C line, indicating a negative result. The C line will appear during all tests to clarify a valid result.

KIT CONTENTS

- 10 foil wrapped pouches containing a test cassette, one pipette and desiccant
- 1 assay buffer (30 ml, ready-to-use)
- Two 15-ml centrifugal tubes
- 2 graduated pipettes (up to 3 ml)
- 1 product insert

METHOD

1. Grind a sample of the animal feed to a fine powder, and put through a 20-mesh sieve.
2. Weigh 0.5 g of the ground and sieved sample into a centrifugal tube and add 1.5 ml of the assay buffer.
3. Close the lid and shake for 5 minutes.
4. Centrifuge the sample at 6000 $\times g$ for 5 minutes. Use the supernatant for the assay.
5. Remove the test cassette from its foil pouch and place it on a flat surface.
6. Drip 3 drops of the sample extraction into the specimen well and read the results between 5 to 10 minutes.
7. Results read after 10 minutes are considered invalid.

NOTE: The sample preparation method above is only a suggestion. The kit user can use their own methods to prepare samples due to big variations among feeds.

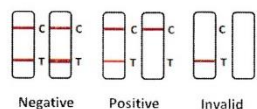
RESULTS

Positive results: The C line is visible and the T line is either invisible or weaker than the C line. This indicates the concentration of RAC is ≥ 10 ppb in the sample.

Negative results: Both the T and C lines are visible, and the T line is the same strength as or darker than the C line.

Invalid results: No coloured line becomes visible in the C region regardless if the T line appears.

PRODUCT INSERT: RAPG-RAC-006



SPECIFICITY

The results are negative when the test is applied to detecting 100 ppm of Clenbuterol, Salbutamol, Trenbolone-acetate, Chloramphenicol, Aminoglycosides, Beta-Lactams, Macrolides, Quinolones, and Sulfonamides.

STORAGE INSTRUCTIONS

Store the kit between 2-30°C and ensure the kits are not frozen or stored in direct sunlight. The test is valid for 18 months until the expiration date printed on the foil wrapping.

SAFETY MEASURES

Follow these instructions for the best results:

- Ensure the test kit is at room temperature before running the test.
- Keep the cassette inside the foil wrapper until it is needed.
- Do not use tap water, distilled water or purified water as a negative control.
- Ensure each test is used only once.
- Tests that have reached their expiry date should not be used.
- Only use reagents from this kit when performing the test to ensure quality controlled testing.
- If no liquid appears at the test window, add 1 extra drop of sample.

LIMITATIONS

The Biopanda RAC Rapid Test provides a semi-quantitative method to detect RAC residue at ≥ 10 ppb. For a quantitative result, please use a method such as ELISA.

Thank you for purchasing Biopanda's Ractopamine (Feed) Rapid Test kit. Please read this manual carefully before operating to ensure proper use.

Biopanda Reagents Ltd.

Unit 14 Carrowreagh Business Park
Carrowreagh Road
Belfast, BT16 1QQ
United Kingdom
Tel: +44 (0) 28 95438774
Fax: +44 (0) 28 90486696
E-mail: info@biopanda.co.uk
Website: www.biopanda.co.uk

การตรวจสอบสารแคโรทีนในตัวอย่างเนื้อสัตว์ด้วยวิธี LC-MS/MS



บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด

Central Laboratory (Thailand) Co., Ltd.

สาขากรุงเทพฯ : 50 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

Bangkok Branch : 50 Phaholyothin Rd., Laddymao, Jatujak, Bangkok 10900 Thailand

Tel : (662) 561 4387-8, (662) 940 6881-3 Ext. 164, 218 Fax : (662) 579 4895, (662) 940 6881-3 Ext. 209

http://www.centralabthai.com

Central Lab
One Stop & Fast Services

รายงานผลการทดสอบ

วันที่ออกรายงาน 18 กันยายน 2562

เลขที่รายงาน TRBK62/28148

หน้า 01/01

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

รายละเอียดตัวอย่าง B 1

(ข้อมูลจากลูกค้า)

รหัสตัวอย่าง BK62/15496-004

ลักษณะและสภาพตัวอย่าง ประเภทตัวอย่าง : เนื้อวัว

ภาชนะบรรจุ : ขวดพลาสติก ปิดสนิท, จำนวน : 1 ขวด, น้ำหนัก/ปริมาตร : 40 กรัม.

อุณหภูมิ : แช่เย็น, สภาพตัวอย่างปกติ

วันที่รับตัวอย่าง 23 สิงหาคม 2562

วันที่ทดสอบ 29 สิงหาคม 2562 - 18 กันยายน 2562

ผลการทดสอบ

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

~End of Report~

อนุมัติโดย

นางสาวนิภาพร ขงประพันธ์กุล

(นางสาวนิภาพร ขงประพันธ์กุล)

ผู้ตรวจการ

บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด สาขากรุงเทพฯ

CERTIFIED

รายงานฉบับนี้มีผลเฉพาะกับตัวอย่างที่นำมาทดสอบเท่านั้น

รายงานผลการทดสอบต้องไม่ถูกทำสำเนาเฉพาะเพียงบางส่วน โดยไม่ได้รับความยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษรจากห้องปฏิบัติการ ยกเว้นทำทั้งฉบับ
FM-QP-24-01-001-R04(16/10/61)P1/1



ประวัตินักวิจัย

หัวหน้าโครงการ

ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) : นาง นันทิกา คงเจริญพร

(ภาษาอังกฤษ) : Mrs. Nanthika Khongchareonporn

ตำแหน่งปัจจุบัน (ทางวิชาการ/ราชการ) : ผู้ช่วยศาสตราจารย์

สถานที่ติดต่อ (ที่ทำงาน) : สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ที่อยู่ (หน่วยงาน) : อาคารสถาบัน 3 ซอยจุฬาฯ 62 ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-218-8078 โทรสาร 02-253-3543

โทรศัพท์มือถือ 081-628-2664 E-mail nanthika.k@chula.ac.th

สถานที่ติดต่อ (ที่บ้าน)

ที่อยู่ (ที่บ้าน) : 99/53 หมู่ 6 ตำบลบางรักน้อย อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี

โทรศัพท์ - โทรสาร -

ประวัติการศึกษา (ปริญญาตรี-เอก ; สาขา และสถาบัน)

ปริญญา	สาขาวิชา	ปีพ.ศ.ที่ได้รับ	สถาบัน
วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต	เทคโนโลยีชีวภาพ	2547	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	เทคโนโลยีชีวภาพ	2542	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
วิทยาศาสตรบัณฑิต	ชีวเคมีและชีวเคมีเทคโนโลยี	2539	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ภาระงานในปัจจุบัน (งานประจำที่รับผิดชอบ)

สอน 18 ชั่วโมงต่อสัปดาห์

วิจัย 12 ชั่วโมงต่อสัปดาห์

บริการวิชาการและบริหาร 5 ชั่วโมงต่อสัปดาห์

งานวิจัยที่รับผิดชอบ (กำลังดำเนินงาน) (ชื่อโครงการ แหล่งทุน และระยะเวลาดำเนินการ)

- การพัฒนาแถบทดสอบแบบไหลในแนวระนาบสำหรับตรวจคัดกรองสารเคสนบูเทรอล ซัลบูตามอลและซิลพาเทอรอลในปัสสาวะสุกร สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ฝ่ายเกษตร ระยะเวลาดำเนินการ 1 มิถุนายน 2562 - 30 พฤศจิกายน 2563 (ผู้วิจัยร่วม)
- การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของแถบทดสอบแบบไหลในแนวระนาบ สำหรับตรวจหาสารนอร์ฟลอกซาซินและเอนโรฟลอกซาซิน สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) ระยะเวลาดำเนินการ 15 กันยายน 2561-14 กันยายน 2562 (ผู้วิจัยร่วม)

ผลงานที่ผ่านมา

ก. ผลงานวิจัยตีพิมพ์ (ระดับชาติ และระดับนานาชาติ) (ชื่อผลงาน ชื่อวารสาร แหล่งทุน ปีที่พิมพ์)

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

Prasatkaew, W., Nanthanawat, P., **Khongchareonporn, N.** and Kingtong, S. (2019). A monoclonal antibody against *Lates calcarifer* vitellogenin and a competitive ELISA to evaluate vitellogenin induction after exposure to xenoestrogen. *Journal of Environmental Science*. 75: 325-333.

Thongyoo, S., Phakham, T., **Khongchareonporn, N.**, Reamtong, O., Karnchanatat, A., Puthong, S., Wichai, T., Noitang, S. and Sooksai, S. (2019). Expression, purification and biological activity of monomeric insulin precursor from methylotrophic yeasts. *Protein Expression and Purification*. 153: 35-43.

สุพรรณิ ลิ้โทขลิต, จันทรจรัส วัฒนะโชติ และ นันทิกา คงเจริญพร. (2562). การสำรวจความชุกของปรสิต *Perkinsus olseni* ในหอยลาย (*Paphia undulata*) จากจังหวัดเพชรบุรี สมุทรสงครามและสมุทรสาคร. แก่นเกษตร. 47 (ฉบับพิเศษ 1): 1231-1238.

- Preechakasedkit, P., Siangproh, W., **Khongchareonporn, N.**, Ngamrojanavanich, N. and Chailapakul, O. (2018). Development of an automated wax-printed paper-based lateral flow device for alpha-fetoprotein enzyme-linked immunosorbent assay. *Biosensors and Bioelectronics*. 102: 27- 32.
- Buakeaw, A., Puthong, S., Kongkavitoon, P., Khongarsa, K., Komolpis, K. and **Khongchareonporn, N.** (2016). Production of monoclonal antibodies for ractopamine residue detection in pork. *Maejo International Journal of Science and Technology*. 10(02): 175 – 186.
- จันทร์จรัส วัฒนะโชติ สุพรรณิ สิทโฆวลิต นันทิกา คงเจริญพรและ นาริรัตน์ ฤทธิธรม. (2559). การใช้สารสกัดเมมเบรนโปรตีนจากปรสิต *Cryptocaryon irritans* กระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาว. แก่นเกษตร. 44 (ฉบับพิเศษ 1): 662-668
- Kaewsalabnil S., Leethochavalit S., Watanochote J., Komolpis K and **Khongchareonporn N.** 2015. Production and characterization of monoclonal antibody against *Perkinsus olseni* in undulated surf clams *Paphia undulata*. *Food and Applied Bioscience Journal*. 3(3): 231-238
- พอจิต นันทนาวัฒน์ นันทิกา คงเจริญพร วิชชุดา ประสาทแก้ว และภาศิริ บาร์เนท. (2557). การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไซโตโครม P4501A (CYP1A) ในปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch) ที่ได้รับสารเบนโซ(เอ)ไพรีน. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*. 19(2): 1-13.
- Wongtangprasert, T., Natakuathung, W., Pimpitak, U., Buakeaw, A., Palaga, T., Komolpis, K. and **Khongchareonporn, N.** 2014. Production of a monoclonal antibody against oxytetracycline and its application for oxytetracycline residue detection in shrimp. *Journal of Zhejiang University-Science B (Biomed & Biotech)*. 15(2): 165-172.
- Techaprempreecha, S., **Khongchareonporn, N.**, Chaicharoenpong, C., Aranyakananda, P., Chunhabandit, S. and Petsom, A. 2011. Nutritional composition of farmed and wild sandworms, *Perinereis nuntia*. *Animal Feed Science*. 169: 265-269
- Khamjing, W., **Khongchareonporn, N.** and Rengpipat, S. 2011. Detection by using monoclonal antibodies of *Yersinia enterocolitica* in artificially contaminated pork. *Microbiology and Immunology*. 55: 605-615.
- Panchan N**, Sithigorngul P, Chaivisurhangkura P, Longyant S, Sithigorngul W and Petsom A. 2005. Production of monoclonal antibodies specific to eyestalk neuropeptides of *Penaeus monodon* using sinus gland section and immunosuppression technique. *ScienceAsia*. 31: 29-35.

Panchan N, Bendena WG, Brower P, Lungchukiet P, Tobe SS, Sithigorngul W, Chaivisurhangkura P, Rangsiruji A, Pewnim T and Sithigorngul P. 2003. Immunolocalization of allatostatin-like neuropeptides and their putative receptor in eyestalk of the giant tiger prawn (*Penaeus monodon*). Peptide. 24(10):1563-1570.

Sithigorngul P, **Panchan N**, Chaivisurhangkura P, Longyant S, Sithigorngul W and Petsom A. 2002. Differential expression of CMG peptide and crustacean hyperglycemic hormone (CHHs) in the eyestalk of the giant tiger prawn (*Penaeus monodon*). Peptide. 23: 1934-1952

Sithigorngul P, Pupurm J, Krungkasem C, Longyant S, **Panchan N**, Chaivisurhangkura P and Sithigorngul W. 2002. Four novel PYFs: members of NPY /PP peptide superfamily from the eyestalk of the giant tiger prawn (*Penaeus monodon*). Peptide. 23: 1895-1906.

Sithigorngul P, Saraithongkum W, Longyant S, **Panchan N**, Sithigorngul W and Petsom A. 2001. Three more novel FMRFamide-like neuropeptide sequences from the giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergi*) i. Peptide. 22: 191-197.

Sithigorngul P, **Panchan N**, Vilaivan T, Sithigorngul W and Petsom. 1999. Immunochemical analysis and immunocytochemical localization of crustacean hyperglycemic hormone from the giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). Comp Biochem Physiol B. 124 : 73-80.

Proceeding

Poungmalai P, Buakeaw A, and **Khongchareonporn N**. Production and characterization of monoclonal antibody against chlortetracycline. International Conference of Agriculture and Natural Resources. 26-28 April 2018. Kasetsart University Research and Development Institute, Thailand.

Siengkasem O, Buakeaw A, Komolpis K and **Khongchareonporn N**. Enzyme-linked immunosorbent assay for ciprofloxacin residue detection in food sample. The 19th Food Innovation Asia Conference 2017 (FIAC2017), 15-17 June 2017. Bangkok, Thailand.

Jeeyodae N, Buakeaw A, Komolpis K and **Khongchareonporn N**. Lateral flow Immunochromatographic assay (LFIA) for detection of tetracycline. The National and International Graduate Research Conference 2017. March 10, 2017. Khon Kaen University, Thailand.

Kanokphat K, Thongyoo S, Phakum T, Noitang S, **Khongchareonporn N**, Thongchul N and Sooksai S. Optimization of recombinant insulin production in *Pichia pastoris* KM71H (TP1). Biotechnology International Congress (BIC) 2016 “Biomass energy and its refinery”. 20-23 September 2016. BITEC Bang Na, Bangkok, Thailand.

พอจิต นันทนาวัฒน์ม **นันทิกา คงเจริญพร** วิชชุดา ประสาทแก้ว และศุภกิจ ศรีสวัสดิ์, การผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อไวเทรโลเจนินจากพลาสมาปลากระพงขาว, Proceeding The 8th Science Research Conference. 30-31 May 2016. มหาวิทยาลัยพะเยา.

Pimpitak U, Komolpis K, Buakeaw A, **Khongchareonporn N**, Palaga T and Puthong S. Production of monoclonal antibody against 3-amino-oxazolidinone. The 27th Annual Meeting of the Society for Biotechnology and International Conference. November 17-20, 2015. Bangkok, Thailand.

Puthong S, Komolpis K, **Khongchareonporn N**, Pimpitak U and Buakeaw A. Production of monoclonal antibody against semicarbazide. The 27th Annual Meeting of the Society for Biotechnology and International Conference. November 17-20, 2015. Bangkok, Thailand.

Puthong S, Komolpis K, Buakeaw A, **Khongchareonporn N**, Palaga T and Pimpitak U. Development of enzyme-linked immunosorbent assay for detecting progesterone in milk. The 27th Annual Meeting of the Society for Biotechnology and International Conference. November 17-20, 2015. Bangkok, Thailand.

Thongyoo S, Phakham T, karnchanatat A, **Khongchareonporn N**, Noitang S, Puthong S, Reamtong O and Sooksai S. Recovery of recombinant monomeric insulin from culture broth of *Pichia pastoris* KM71H (TP1) by amberlite XAD-7. The 10th International Symposium of the Protein Society of Thailand. 15-17 July 2015, Bangkok, Thailand.

Phakham T, **Khongchareonporn N**, Noitang S, Karnchanatat A, Sermsuvitwong K, and Sooksai S. Effect of gene copy number on recombinant insulin expression in *Pichia pastoris* GS115. The 4th International Biochemistry and Molecular Biology Conference. April 2-3, 2014, Bangkok, Thailand.

Kaewsalabnil S, Leethochavalit S, Watanachote, Komolis K and **Khongchareonporn N**. International Conference on Food and Applied Bioscience. 6-7 Feb 2014, Chiang Mai, Thailand.

Mungmee P, Komolpis K, Palaga T, Buakeaw A and **Khongchareonporn N**. The 24th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology “Renewable Energy and Global Care. 29-30 November, 2012. Ubon Ratchthani University. Thailand

Sangkaew O, **Khongchareonporn N** and Rengpipat. The 24th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology “Renewable Energy and Global Care. 29-30 November 2012. Ubon Ratchthani University. Thailand

Noiprapai K, **Khongchareonporn N** and Rengpipat S. 2012. Production of monoclonal antibodies against *Vibrio parahaemolyticus*. The 23 Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. February 1-2, 2012. Bangkok, Thailand

Nuntanidvorakul P, Komolpis K and **Khongchareonporn N**. Production and characterization of monoclonal antibody against ciprofloxacin. 1st ASEAN Plus Three Graduate Research Congress. March 1-2, 2012. Chiang Mai, Thailand.

Khongarsa K, **Khongchareonporn N**, and Komolpis K. Development of ractopamine test kit using enzyme-linked immunosorbent assay technique. 1st ASEAN Plus Three Graduate Research Congress. March 1-2, 2012. Chiang Mai, Thailand

Kanchanabanca C, Komolpis K and **Khongchareonporn N**. Production and characterization of monoclonal antibodies against tetracycline. 9th National Grad Research Conference. 14-15 March 2008. Burapha University, Bangsaen Chonburi, Thailand. p: 185.

Khamjing W, **Khongchareonporn N** and Rengpipat. Production of monoclonal antibodies against *Yersinia enterocolitica*. 9th National Grad Research Conference. 14-15 March 2008. Burapha University, Bangsaen Chonburi, Thailand. p: 120.

Kongkavitoon P, **Khongchareonporn N** and Komolpis K. Production and characterization of monoclonal antibodies against ractopamine. The 20th Annual Meeting and international Conference of the Thai Society for Biotechnology “TSB 2008: Biotechnology for Global Care”. October 14th-17th, 2008. Taksila Hotel, Maha Sarakham, Thailand. p: 138.

Saneewong S, **Khongchareonporn N** and Komolpis K. Development of norfloxacin test kit using enzyme-linked immunosorbent assay technique. The 20th Annual Meeting and international Conference of the Thai Society for Biotechnology “TSB 2008: Biotechnology for Global Care”. October 14th-17th, 2008. Taksila Hotel, Maha Sarakham, Thailand. p: 129.

Leethochavalit S, Watanachote J, Pratoomyot J, Khongchareonporn N, Rittirut N. The immobilized parasitic protozoa *Cryptocaryon irritans* induced immune response in clownfish (*Amphiprion ocellaris*). APCBEES Jeju island conference. 23-25 May 2016. Jeju Island, South Korean.

Preechakasedkit P, **Khongchareonporn N**, Ngamrojanavanich N and Chailapakul. Rapid and cost-effective determination of beta-agonists using colorimetric immunoassay on paper-based microfluidic devices. The 2016 Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON2016), 9-11 Feb 2016, Bangkok, Thailand.

Barnette, P., Panutrakul, S., Nanthanawat, P., **Khongcharoenporn, N.**, Mekkongpai, P., Srivilas, P., Cholumpai, V., Thanomsit, C. and Wiwekwin, N. 2013. Determination of PAHs, mercury and biomarkers of exposure in feral fishes and cultivated green mussel (*Perna viridis*) from the industrial coast of Map Ta Phut, Gulf of Thailand. 7th International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology. 17-21 June 2013. Hong Kong. Oral presentation

Techaprempreecha S, **Khongchareonporn N**, Chaicharoenpong C, Aranyakananda P, Chunhabandit S and Petsom A. Proximate composition of farmed and wild sandworms (*Perinereis nantia* Savigny). 4th International Greek Biotechnology Forum. 2-3 February 2008. Zappeio, Megaro, Athens.

ข. ผลงานวิจัยที่นำไปใช้ประโยชน์ (ต่อสาธารณะ, ชุมชน, กลุ่มเกษตรกร ฯลฯ)

-

ค. ผลงานอื่น ๆ เช่น บทความ หนังสือ สิทธิบัตร ฯลฯ

- อนุสิทธิบัตร เลขที่ 14804 ชุดทดสอบแบบไหลตามแนวราบสำหรับการตรวจวัดแบคทีเรีย

ง. รางวัลผลงานวิจัยที่ได้รับ

-

ผู้ร่วมโครงการ

ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) : นายกิตตินันท์ โกมลภิส

(ภาษาอังกฤษ) : Mr. Kittinan Komolpis

ตำแหน่งปัจจุบัน (ทางวิชาการ/ราชการ) : รองศาสตราจารย์

สถานที่ติดต่อ (ที่ทำงาน) : สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ที่อยู่ (หน่วยงาน) : อาคารสถาบัน 3 ซอยจุฬาฯ 62 ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-218-8078 โทรสาร 02-253-3543

โทรศัพท์มือถือ 089-664-6266 E-mail kittinan.k@chula.ac.th

สถานที่ติดต่อ (ที่บ้าน)

ที่อยู่ (ที่บ้าน) : 869/40 ซอยบางนา-ตราด 21 แยก 7 ถนนเทพรัตน แขวงบางนา เขตบางนา กรุงเทพฯ 10260

โทรศัพท์ 02-747-4140 โทรสาร -

ประวัติการศึกษา (ปริญญาตรี-เอก ; สาขา และสถาบัน)

ปริญญา	สาขาวิชา	ปีพ.ศ.ที่ได้รับ	สถาบัน
Doctor of Philosophy	Chemical Engineering	2545	University of Michigan, USA
Master of Engineering	Chemical Engineering	2539	University of Michigan, USA
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	ชีวเคมี	2535	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
วิทยาศาสตรบัณฑิต	ชีวเคมี	2532	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาระงานในปัจจุบัน (งานประจำที่รับผิดชอบ)

สอน 20 ชั่วโมงต่อสัปดาห์

วิจัย 10 ชั่วโมงต่อสัปดาห์

บริการวิชาการและบริหาร 5 ชั่วโมงต่อสัปดาห์

งานวิจัยที่รับผิดชอบ (กำลังดำเนินงาน) (ชื่อโครงการ แหล่งทุน และระยะเวลาดำเนินการ)

- การพัฒนาวิธีเอนไซม์ลิงก์อิมมูโนซอร์เบนแอสเสย์สำหรับตรวจเคซีนจากวัว (ผู้ร่วมโครงการ โครงการวิจัย เงินงบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ พ.ศ. 2560)
- การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของแถบทดสอบสำหรับตรวจหาอะฟลา ทอกซินเอ็ม 1 ในผลิตภัณฑ์ น้านม (ผู้ร่วมโครงการ สวก. 10 มี.ค. 2560 – 9 มี.ค. 2561)
- การพัฒนาแถบทดสอบแบบไหลในแนวระนาบสำหรับตรวจคัดกรองสารเคลือบบูเทรอล ซัลบูตามอลและซิล พาทะรอลในปัสสาวะสุกร (หัวหน้าโครงการ สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและ นวัตกรรม ฝ่ายเกษตร 1 มิถุนายน 2562 - 30 พฤศจิกายน 2563X)
- การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของแถบทดสอบแบบไหลในแนวระนาบ สำหรับตรวจหาสารนอร์ ฟลอกซาซินและเอนโรฟลอกซาซิน (หัวหน้าโครงการ สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) 15 กันยายน 2561-14 กันยายน 2562)

ผลงานที่ผ่านมา

ก. ผลงานวิจัยตีพิมพ์ (ระดับชาติ และระดับนานาชาติ) (ชื่อผลงาน ชื่อวารสาร แหล่งทุน ปีที่พิมพ์)

Jarupalee T, Chatchatee P, **Komolpis K**, Suratannon N, Roytrakul S, Yingchutrakul Y, Yimchuen W, Butta P, Jacquet A and Palaga T. 2018. Detecting allergens from black Tiger Shrimp *Penaeus monodon* that can bind and cross-link IgE by ELISA, western blot and humanized rat basophilic leukemia reporter cell line RS-ATL8. Allergy, Asthma and Immunology Research (in print, published online Sep 28, 2017).

Mala J, Puthong S, Maekawa H, Kaneko Y, Palaga T, **Komolpis K**, Sooksai S. 2017. Construction and sequencing analysis of scFv antibody fragment derived from monoclonal antibody against norfloxacin (Nor155). J Gen Eng Biotech 15: 69-76

Netchareonsirisuk P, Puthong S, Dubas S, Palaga T, **Komolpis K**. 2016. Effect of capping agents on the cytotoxicity of silver nanopartiCLBs in human normal and cancer skin cell lines. *J Nanopart Res* 18: 322 (แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

Chadseesuwana U, Sangdokmai A, Pimpitak U, Puthong S, Palaga T, **Komolpis K**. 2016. Production of a monoclonal antibody against aflatoxin M1 and its application for detection of aflatoxin M1 in fortified milk. *J Food Drug Anal* 24: 780-787

Boonsombuti A, **Komolpis K**, Luengnaruemitchai A and Wongkasemjit S. 2014. Enhancement of ABE fermentation through regulation of ammonium acetate and D-xylose uptake from acid-pretreated corncobs. *Annals of Microbiology* 64: 431-439 (แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาแห่งชาติ)

Wongtangprasert T, Natakathung W, Pimpitak U, Buakeaw A, Palaga T, **Komolpis K** and Kongchareonporn N. 2014. Production of a monoclonal antibody against oxytetracycline and its application for oxytetracycline residue detection in shrimp. *Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine and Biotechnology)* 15: 165-172 (แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

Chadseesuwana, U., Puthong, S., Gajanandana, O., Palaga, T. and **Komolpis, K**. 2013 Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for 1-aminohydantoin detection. *Journal of AOAC International* 96: 1-8 (แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาแห่งชาติ)

Chusri, M., Wongphanit, P., Palaga, T., Puthong, S., Sooksai, S. and **Komolpis, K**. 2013. A Production and Characterization of Monoclonal Antibody Against Enrofloxacin. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 69-75 (แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

Komolpis, K., Udomchokmongkol, C., Phutong, S. and Palaga, T. 2010. Comparative production of a monoclonal antibody specific for enrofloxacin in a stirred-tank bioreactor. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 16: 567-571

Pimpitak U., Puthong, S., **Komolpis, K.**, Petsom, A., Palaga T. 2009. Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of the furaltadone metabolite, AMOZ, in fortified shrimp samples. *Food Chemistry* 116: 785-791

Damrongsakkul S., Ratanathammapan K., **Komolpis K.** and Tanthapanichakoon W. 2008. Enzymatic hydrolysis of rawhide using papain and neutrase. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 14: 202-206

Komolpis K., Srivannavit, O. and Gulari E. 2002. Light-directed simultaneous synthesis of oligopeptides on microarray substrate using a photogenerated acid. *Biotechnology Progress*, 18:641-646.

Wang H.Y., **Komolpis K.**, Kaufman P.B., Malakul P., Shotipruk A. 2001. Permeabilization of metabolites from biologically viable soybeans (*Glycine max*). *Biotechnology Progress*; 17:421-430.

Wu E., **Komolpis K.**, Wang H.Y. 1999. Chemical extraction of indigo from *Indigofera tinctoria* while attaining biological integrity. *Biotechnology Techniques*, 13:567-569.

Komolpis K., Kaufman P.B., Wang H.Y. 1998. Chemical permeabilization and in situ removal of daidzein from biologically viable soybean (*Glycine max*) seeds. *Biotec. Techniques*, 12:697-700.

Wongphayak W, Pimpitak U, Palaga T, **Komolpis K** and Puthong S. Development of test strip for bovine casein detection. The 43rd Congress on Science and Technology of Thailand. Thailand. 2017.

Komolpis K, Puthong S, Buakeaw A, Khongchareonporn N and Pimpitak U.

Development of immunochromatographic strip test for detection of AMOZ, a nitrofurantoin metabolite, in shrimp. The 29th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. Thailand. 2017.

Puthong S, Sarunyutanon S, Singkhaimuk P, Noitang S, Buakeaw A, **Komolpis K** and Sooksai S. Cytotoxicity of cecropin A and B against lung cancer, ChoGo-K1. National Genetics Conference: "Integrative Genetics: from Discovery to Innovation". 2017.

Siengkasem O, Buakeaw A, **Komolpis K** and Khongchareonporn N. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Ciprofloxacin Residue Detection in Food Sample. Food Innovation Asia Conference. 2017.

Jeayodae N, Buakeaw A, **Komolpis K**, Khongchareonporn N. Lateral Flow Immunochromatographic Assay (LFIA) for the Detection of Tetracycline. The National and International Graduate Research Conference. 2017.

Mala J, Palaka T, Puthong S, **Komolpis K**, Sooksai S and Kaneko Y. Construction and sequencing analysis of scFv antibody fragment derived from monoclonal antibody against norfloxacin (Nor155). Seoul International Conference on Applied Science and Engineering. 2015

Saruanyutanon S, **Komolpis K**, Puthong S and Sooksai S. Cloning and expression of recombinant cecropin B-polyproline in *Pichia pastoris*. National Genetics Conference. 2015.

Puthong S, **Komolpis K**, Buakeaw A, Khongchareonporn N, Sangvanich P and Pimpitak U. Development of enzyme-linked immunosorbent assay for detecting progesterone in milk. The 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. Thailand. 2015.

Buakeaw A, Puthong S, **Komolpis K**, Khongchareonporn N, and Pimpitak U. Production of monoclonal antibody against semicarbazide. The 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. Thailand. 2015.

Sathitsemakul J, Puthong S, Patarakul K, Palaga T and **Komolpis K**. Production and characterization of monoclonal antibodies against *Leptospira interrogans* Serovar *Manilae*. International Conference on Food and Applied Bioscience. February 6-7, 2014. Chiang Mai, Thailand.

Kaewsalabnil S, Leethochavalit S, Watanachote J, **Komolpis K** and **Khongchareonporn N**. Production and characterization of monoclonal antibodies against *Perkinsus olseni* in undulated surf clams *Paphia undulata*

Nuntanidvorakul P, **Komolpis K** and Khongchareonporn N. Production and characterization of monoclonal antibody against ciprofloxacin. 1st ASEAN Plus Three Graduate Research Congress. March 1-2, 2012. Chiang Mai, Thailand.

Chapanont Y, **Komolpis K** and Rengpipat S. Production of monoclonal antibodies against *Salmonella* Typhimurium. The 23rd Annual Meeting of the Thai Society of Biotechnology. February 1-2, 2012. Bangkok, Thailand.

Sangdokmai A, Pimpitak U, Buakeaw A, Palaga T and **Komolpis K**. Production and characterization of monoclonal antibody against aflatoxin M1. 2011 International Conference on Environmental, Biomedical and Biotechnology (IPCBEE), Singapore.

Wongtangprasert T, Palaga T, **Komolpis K** and Khongchareonporn N. Development of oxytetracycline test kit using enzyme-linked immunosorbent assay technique. International Conference on Asia Agriculture and Animal (ICAAA 2011). July 2-3, 2011. Hong Kong.

Tesvichian S, **Komolpis K**, Khongchareonporn N, Puthong S, Piampitak U and Buakeaw A. Development of tetracycline test kit using enzyme-linked immunosorbent assay technique. The 3th Technology and Innovation for Sustainable Development International Conference (TISD2010). 4-6 March 2010. Faculty of Engineering, Khon Kaen University, Thailand.

Khongchareonporn N, **Komolpis K** and Puthong S. Production and Characterization of monoclonal antibodies against oxytetracycline. The 1st CMU Graduate Research conference. 27th November 2009. Chiangmai University, Chiangmai, Thailand.

Kanchanabanca C, **Komolpis, K.**, Khongchareonporn, N. Production and characterization of monoclonal antibodies against tetracycline. 9th National Grad Research Conference. 14-15 March 2008. Burapha University, Bangsaen Chonburi, Thailand. p: 185.

Kongkaviton, P., Khongchareonporn, N., **Komolpis., K.** Production and characterization of monoclonal antibodies against ractopamine. The 20th Annual Meeting and international Conference of the Thai Society for Biotechnology “TSB 2008: Biotechnology for Global Care”. October 14th-17th,2008. Taksila Hotel, Maha Sarakham, Thailand. p: 138

Saneewong, S., Khongchareonporn, N., **Komolpis, K.** Development of norfloxacin test kit using enzyme-linked immunosorbent assay technique. The 20th Annual Meeting and international Conference of the Thai Society for Biotechnology “TSB 2008: Biotechnology for Global Care”. October 14th-17th,2008. Taksila Hotel, Maha Sarakham, Thailand. p: 129

Kaewwiset, S., **Komolpis, K.**, Palaga, T. Development of progesterone test kit using enzyme-linked immunosorbent assay. 9th National Grad Research Conference. 14-15 March 2008. Burapha University, Bangsaen Chonburi, Thailand. p: 185

Wongphanit P., Komolpis, K., Palaga, T. Development of enrofloxacin detecting test kit using enzyme-linked immunosorbent assay. The 12th Biological Science Graduate Congress. 17-19 December 2007. Institute of Biological Sciences, Faculty of Science, University of Malaya, Malaysia. P:196

ข. ผลงานวิจัยที่นำไปใช้ประโยชน์ (ต่อสาธารณะ, ชุมชน, กลุ่มเกษตรกร ฯลฯ)

-

ค. ผลงานอื่น ๆ เช่น บทความ หนังสือ สิทธิบัตร ฯลฯ

อุมาพร ฉัตรศรีสุวรรณ ธนาภัทรपालกะ และกิตตินันท์ โกมลภิส. “การตรวจวัดยาปฏิชีวนะกลุ่มไนโตรฟูแรนในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์และอาหารสัตว์.” วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 41, 1 (มกราคม - มีนาคม 2556): 36-45

ง. รางวัลผลงานวิจัยที่ได้รับ

-

ผู้ร่วมโครงการ

ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) : นางทรงจันทร์ ภูทอง

(ภาษาอังกฤษ) : Mrs.Songchan Puthong

ตำแหน่งปัจจุบัน (ทางวิชาการ/ราชการ) : นักวิจัย ระดับชำนาญการพิเศษ

สถานที่ติดต่อ (ที่ทำงาน) : สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ที่อยู่ (หน่วยงาน) : อาคารสถาบัน 3 ซอยจุฬาฯ 62 ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-218-8076 โทรสาร 02-253-3543

โทรศัพท์มือถือ 089-005-2661 E-mail songchan.p@chula.ac.th

สถานที่ติดต่อ (ที่บ้าน)

ที่อยู่ (ที่บ้าน) : 29/113 ซอยแจ้งวัฒนะ 14 ถนนแจ้งวัฒนะ แขวงทุ่งสองห้อง เขตหลักสี่ กรุงเทพฯ 10210

โทรศัพท์ - โทรสาร -

ประวัติการศึกษา (ปริญญาตรี-เอก ; สาขา และสถาบัน)

ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.	สถาบัน
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	เทคโนโลยีชีวภาพ	2539	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
วิทยาศาสตรบัณฑิต	ชีววิทยา	2529	มหาวิทยาลัยบูรพา

ภาระงานในปัจจุบัน (งานประจำที่รับผิดชอบ)

วิจัย 28 ชั่วโมงต่อสัปดาห์

บริการวิชาการและบริหาร 7 ชั่วโมงต่อสัปดาห์

งานวิจัยที่รับผิดชอบ (กำลังดำเนินงาน) (ชื่อโครงการ แหล่งทุน และระยะเวลาดำเนินการ)

- การพัฒนาวิธีเอนไซม์ลิงก์อิมมิวโนซอร์เบนแอสเสย์สำหรับตรวจเคซินจากวัว (หัวหน้าโครงการ โครงการวิจัย เงินงบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ พ.ศ. 2560)
- การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของแถบทดสอบสำหรับตรวจหาอะฟลา ทอกซินเอ็ม 1 ในผลิตภัณฑ์ น้านม (ผู้ร่วมโครงการ สวก. 10 มี.ค. 2560 – 9 มี.ค. 2561)
- โครงการ การเพิ่มความไวของแถบทดสอบสำเร็จรูปสำหรับตรวจติดตามสารเมแทบอลิต์ฟูรัลทาโดน (AMOZ) ในผลิตภัณฑ์สัตว์ (แหล่งทุน – งบประมาณแผ่นดินปี 59-60)

ผลงานที่ผ่านมา

ก. ผลงานวิจัยตีพิมพ์ (ระดับชาติ และระดับนานาชาติ) (ชื่อผลงาน ชื่อวารสาร แหล่งทุน ปีที่พิมพ์)

Komenek, S., Luesakul, U., Ekgasit, S., Vilaivan, T., Praphairaksit, N., **Puthong, S.** and Muangsin, N. (2016). Nanogold-gallate chitosan-targeted pulmonary delivery for treatment of lung cancer. American Association of Pharmaceutical Scientists. 1 – 12.

- Netchareonsirisuk, P., **Puthong, S.**, Dubas, S., Palaga, T. and Komolpis, K. (2016) Effect of capping agents on the cytotoxicity of silver nanopartiCLBs in human normal and cancer skin cell lines. *Journal of NanopartiCLB Research*. 18(322): 1 – 11.
- Luesakul, U., Komenek, S., **Puthong, S.** and Muangsins, N. (2016). Shape-controlled synthesis of cubic-like selenium nanopartiCLBs via the self-assembly method. *Carbohydrate Polymers*. 153: 435 – 444.
- Chadseesuwana, U., Sangdokmai, A., Pimpitak, U., **Puthong, S.**, Palaga, T. and Komolpis, K. (2016). Production of a monoclonal antibody against aflatoxin M1 and its application for detection of aflatoxin M1 in fortified milk. *Journal of Food and Drug Analysis*. 1 – 8.
- Khunsap, S., Khaw, O., Buranapraditkun, S., Suntrarachun, S., **Puthong, S.** and Boonchang, S. (2016). Anticancer properties of phospholipase A₂ from *Daboia siamensis* venom on human skin melanoma cells. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 22(7): 1 – 8.
- Mitupatum, T., Aree, K., Kittisenachai, S., Roytrakul, S., **Puthong, S.**, Kangsadalampai, S. and Rojpibulstit, P. (2016). mRNA expression of *Bax*, *Bcl-2*, *p53*, *Cathepsin B*, *Caspase-3* and *Caspase-9* in the HepG2 cell line following introduction by a novel monoclonal Ab Hep88 mAb: Crosstalk for paraptosis and apoptosis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 17(2): 703 – 712.
- Buakeaw, A., **Puthong, S.**, Kongkavitoon, P., Khongarsa, K., Komolpis, K. and Khongchareonporn, N. (2016). Production of monoclonal antibodies for ractopamine residue detection in pork. *Maejo International Journal of Science and Technology*. 10(02): 175 – 186.
- Nugitrangson, P., **Puthong, S.**, Iempridee, T., Pimtong, W., Pornpakakul, S. and Chanchao, C. (2016). *In vitro* and *in vivo* characterization of the anticancer activity of Thai stingless bee (*Tetragonula laeviceps*) cerumen. *Experimental Biology and Medicine*. 241(2): 166 – 176.
- Buahom, S., **Puthong, S.**, Palaga, T., Lirdprapamongkol, K., Phuwapraisirisan, P., Svasti, J. and Chanchao, C. (2015). Cardanol isolated from Thai *Apis mellifera* propolis induces cell cycle arrest and apoptosis of BT-474 breast cancer cells via p21 upregulation. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 23(55): 1 – 11.

Kustiawan, M.P., Phuwapraisirisan, P., **Puthong, S.**, Palaga, T., Arung, T.E. and Chanchao, C. (2015). Propolis from the stingless bee *Trigona incise* from East Kalimantan, Indonesia, induces *in vitro* cytotoxicity and apoptosis in cancer cell lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 16(15): 6581 – 6589.

Mitupatum, T., Aree, K., Kittisenachai, S., Roytrakul, S., **Puthong, S.**, Kangsadalampai, S. and Rojpibulstit, P. (2015). Hep88 mAb-mediated paraptosis-like apoptosis in HepG2 cells via downstream upregulation and activation of Caspase-3, Caspase-8 and Caspase-9. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 16(5): 1771 – 1779.

Sathitsemakul, J., **Puthong, S.**, Patarakul, K., Palaga, T. and Komolpis, K. (2015). Production and characterization of monoclonal antibodies against leptospira interrogans serovar sanilae. *Food and Applied Bioscience Journal*. 3(3): 239 – 246.

Nuanyai, T., Chailap, B., **Puthong, S.** and Buakeaw, A. (2015). Cytotoxicity of xanthone from twigs of *Cratoxylum cochinchinense* (Lour.) Blume. *Journal of Science Ladkrabang*. 2: 1 – 12.

Rojpibulstit, P., Kittisenachai, S., **Puthong, S.**, Manochantr, S., Gamnarai, P., Jitrapakdee, S. and Roytrakul, S. (2014). Hep88 mAb-initiated paraptosis-like PCD pathway in hepatocellular carcinoma cell line through the binding of mortalin (HSPA9) and alpha-enolase. *Cancer Cell International*. 14(69): 1 – 10.

Srisurichan, S., **Puthong, S.** and Pornpakakul, S. (2014). Pregnane-type steroidal glycosides from *Gymnema griffithii* Craib. *Phytochemistry*. 106: 197 – 206.

Kustiawan, M.P., **Puthong, S.**, Arung, T.E. and Chanchao, C. (2014). *In vitro* cytotoxicity of Indonesian stingless bee products against human cancer cell lines. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 4(7): 549 – 556.

Luesakul, U., Palaga, T., Krusong, K., Ngamrojanavanich, N., Vilaivan, T., **Puthong, S.** and Muangsin, N. (2014). Synthesis, cytotoxicity, DNA binding and topoisomerase II inhibition of cassiarin A derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 24(13): 2845 – 2850.

- Sangthong, S., Sangphech, N., Palaga, T., Ngamrojanavanich, N., **Puthong, S.**, Vilaivan, T. and Muangsin, N. (2014). Anthracene-9, 10-dione derivatives induced apoptosis in human cervical cancer cell line (CaSki) by interfering with HPV E6 expression. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 77: 334 – 342.
- Manaspong, C., Wongphanit, P., Palaga, T., **Puthong, S.**, Sooksai, S., and Komolpis, K. (2013). Production and Characterization of a Monoclonal Antibody Against Enrofloxacin. *Journal of Microbiological Biotechnology*. 23(1): 69-75.
- Stewart, P., Boonsiri, P., **Puthong, S.**, and Rojpibulstit P. (2013). Antioxidant activity and ultrastructural changes in gastric cancer cell lines induced by Northeastern Thai edible folk plant extracts. *BMC Complementary & Alternative Medicine*. 13(60): 1-11.
- Chadseesuwana, U., **Puthong, S.**, Gajanandana, O., Palaga, T., and Komolpis, K. (2013). Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for 1-Aminohydantoin Detection. *Journal of AOAC International*. 96(3): 680 – 686.
- Khunsap, S., Buranapraditkun, S., Suntrarachun, S., **Puthong, S.**, Know, O., Chulasugandha, P., and Boonchang, S. (2013). The effects of *Cryptelytrops albolabris*, *Calloselasma rhodostoma* and *Daboia siamensis* venoms on human cancer cells. *Asian Journal of Biological and Life Sciences*. 2(1): 50 – 53.
- Graisuwana, W., Wairachai, O., Ananthanawat, C., **Puthong, S.**, Soogarun, S., Kaitkamjornwong, S., and Voravee P.H. (2012). Multilayer film assembled from charged derivatives of chitosan: Physical characteristics and biological responses. *Journal of Colloid and Interface Science*. 376: 177 – 188.
- Teerasripreecha, D., Phuwapraisirisan, P., **Puthong, S.**, Kimura, K., Okuyama, M., Mori, H., Kimura, A., and Chanchao, C. (2012). *In vitro* antiproliferative/cytotoxic activity on cancer cell lines of a cardanol and a cardol enriched from Thai *Apis mellifera* propolis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 12(27): 1-17.
- Puthong, S.**, Gamnarai, P., Roittrakul, S., Kittisenachai, S., Kangsadalampai, S., and Rojpibulstit P. (2011). Hep88 mAb Induced Ultrastructural Alteration Through Apoptosis Like Program Cell Death in Hepatocellular Carcinoma. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 94(12): 109 - 116.

Sangthong, S., Krusong, K., Ngamrojanavanich, N., Vilaivan, T., **Puthong, S.**, Chandchawan, S., and Muangsin, N. (2011). Synthesis of rotenoid derivatives with cytotoxic and topoisomerase II inhibitory activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 21 : 4813 – 4818.

Tantithanagornkul, W., Sujitwanit, A., Piluk, J., Tolieng, V., Petsom, A., Sangvanich, P., Palaga, T., **Puthong, S.**, Thamchaipenet, A., and Pinphanichakarn, P. (2011). Screening for brine shrimp larvicidal activity of *Streptomyces* isolated from soil and anti-tumor activity of the active isolates. *Australian Journal of Basic and Applied sciences*. 5(7): 15-22.

Umthong, S., Phuwapraisirisan, P., **Puthong, S.**, and Chanchao, C. (2011). *In vitro* antiproliferative activity of partially purified *Trigona laeviceps* propolis from Thailand on human cancer cell lines. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 11(37): 1-8.

Karnchanatat, A., Tiengburanatam, N., Boonmee, A., **Puthong, S.**, and Sangvanich, P. (2011). Zingipain, A cysteine protease from *Zingiber ottensii* valetton rhizomes with antiproliferative activities against fungi and human malignant cell lines. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. 41: 1-17.

Kheeree, N., Sangvanich, P., **Puthong, S.**, and Kanchanatat, A. (2010). Antifungal and antiproliferative activity of lectin from the Rhizomes of *Curcuma amarissima* Roscoe. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 162: 912-925.

Komolphis, K., Udomcheokmongkol, C., **Puthong, S.**, and Palaga, T. (2010). Comparative production of a monoclonal antibody specific for enrofloxacin in a stirred-tank bioreactor. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 16: 567-571.

Chadseesuwan, U., **Puthong, S.**, Gajanandana, O., Palaga, T., and Komolpis, K. (2011). Production of monoclonal antibodies against 1-aminohydantoin. *Proceedings of 2011 International Conference on Asia Agriculture and Animal (ICAAA 2011)*. July 2-3 ,2011, Hong Kong.

Puthong, S., Buakeaw, A., Komolpis, K., Khnongchareonporn, N., and Pimpitak, U. (2015). Production of monoclonal antibody against 3-amino-2-oxazolidinone. *The 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference*. Thailand.

Kittisenachai, S., **Puthong, S.**, Manochan, S., Gamnarai, P., Kangsadalampai, S., Roytrakul, S., and Rojpibulstit, P. (2011). Proteomic study of tumor antigen recognized by Hep88 mAb: A novel harmful mAb to hepatocellular carcinoma. Proceeding in the 3rd Biochemistry and Molecular biology (BMB) conference “From Basic to Translational Research for a Better Life”. April 6-8, 2011, The Empress Convention Centre, Chiang Mai, Thailand.

Rojpibulstit, P., Manochantr, S., Gamnarai, P., **Puthong, S.**, Kittisenachai, S., Kangsadalampai, S., and Roitrakul, S. (2010). Ultracellular alterations of the hepatocellular carcinoma cell line induced by Hep-88 mAb: A novel harmful mAb. Proceedings of the Austration Society for Biochemistry and molecular biology. 42: 248

ข. ผลงานวิจัยที่นำไปใช้ประโยชน์ (ต่อสาธารณะ, ชุมชน, กลุ่มเกษตรกร ฯลฯ)

-

ค. ผลงานอื่น ๆ เช่น บทความ หนังสือ สิทธิบัตร ฯลฯ

-

ง. รางวัลผลงานวิจัยที่ได้รับ

-

ผู้ร่วมโครงการ

ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) : นางสาวอุมาพร พิมพิทักษ์

(ภาษาอังกฤษ) : Miss Umaporn Pimpitak

ตำแหน่งปัจจุบัน (ทางวิชาการ/ราชการ) : นักวิจัย

สถานที่ติดต่อ (ที่ทำงาน) : สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ที่อยู่ (หน่วยงาน) : อาคารสถาบัน 3 ซอยจุฬาฯ 62 ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-218-8076 โทรสาร 02-253-3543

โทรศัพท์มือถือ 085-156-5428 E-mail tikchula@gmail.com

สถานที่ติดต่อ (ที่บ้าน)

ที่อยู่ (ที่บ้าน) :

โทรศัพท์ - โทรสาร -

ประวัติการศึกษา (ปริญญาตรี-เอก ; สาขา และสถาบัน)

ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.	สถาบัน
ปริญญาโท	เทคโนโลยีชีวภาพ	2549	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปริญญาตรี	เทคโนโลยีชีวภาพ	2542	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล

ภาระงานในปัจจุบัน (งานประจำที่รับผิดชอบ)

วิจัย 28 ชั่วโมงต่อสัปดาห์

บริการวิชาการและบริหาร 7 ชั่วโมงต่อสัปดาห์

งานวิจัยที่รับผิดชอบ (กำลังดำเนินงาน) (ชื่อโครงการ แหล่งทุน และระยะเวลาดำเนินการ)

- การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของแถบทดสอบสำหรับตรวจหาอะฟลา ทอกซินเอ็ม 1 ในผลิตภัณฑ์
น้ำมัน (ผู้ร่วมโครงการ สวก. 10 มี.ค. 2560 – 9 มี.ค. 2561)
- โครงการ การเพิ่มความไวของแถบทดสอบสำเร็จรูปสำหรับตรวจติดตามสารเมแทบอลิต์ฟูลิคาโดน
(AMOZ) ในผลิตภัณฑ์สัตว์ (25%) (แหล่งทุน – งบประมาณแผ่นดินปี 59-60)

ผลงานที่ผ่านมา

ก. ผลงานวิจัยตีพิมพ์ (ระดับชาติ และระดับนานาชาติ) (ชื่อผลงาน ชื่อวารสาร แหล่งทุน ปีที่พิมพ์)

Komolpis, K., Puthong, S., Buakeaw, A., Khnongchareonporn, N., and **Pimpitak, U.** (2017). Development of immunochromatographic strip test for detection of AMOZ, a nitrofurantoin metabolite, in shrimp. The 29th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. Thailand.

Puthong, S., Komolpis, K., Buakeaw, A., Khnongchareonporn, N., Palaga, T. and **Pimpitak, U.** (2015). Development of enzyme-linked immunosorbent assay for detecting progesterone in milk. The 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. Thailand.

Puthong, S., Buakeaw, A., Komolpis, K., Khnongchareonporn, N., and **Pimpitak, U.** (2015). Production of monoclonal antibody against 3-amino-2-oxazolidinone. The 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. Thailand.

Sangdokmai, A., **Pimpitak, U.**, Buakeaw, A., Palaga, T., and Komolpis, K. (2011). Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Against Aflatoxin M1. 2011 International Conference on Environmental, Biomedical and Biotechnology IPCBEE. 16. IACSIT Press, Singapore.

Tesvichian, S., Komolpis, K., Khongchareonporn, N., Puthong, S., **Pimpitak, U.**, and Buakeaw, A. Development of Tetracycline Test Kit Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Technique. (2010). The 3rd Technology and Innovation for Sustainable Development International Conference. (TISD2010). Faculty of Engineering, Khon Kaen University, Thailand, 4 – 6 March 2010.

ข. ผลงานวิจัยที่นำไปใช้ประโยชน์ (ต่อสาธารณะ, ชุมชน, กลุ่มเกษตรกร ฯลฯ)

-

ค. ผลงานอื่น ๆ เช่น บทความ หนังสือ สิทธิบัตร ฯลฯ

-

ง. รางวัลผลงานวิจัยที่ได้รับ

-

ผู้ร่วมโครงการ

ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) : นายอนุมาศ บัวเขียว

(ภาษาอังกฤษ) : Mr. Anumart Buakeaw

ตำแหน่งปัจจุบัน (ทางวิชาการ/ราชการ) : นักวิจัย

สถานที่ติดต่อ (ที่ทำงาน) : สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ที่อยู่ (หน่วยงาน) : อาคารสถาบัน 3 ซอยจุฬาฯ 62 ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-218-8076 โทรสาร 02-253-3543

โทรศัพท์มือถือ 089-8724917 E-mail anumart.b@chula.ac.th

สถานที่ติดต่อ (ที่บ้าน)

ที่อยู่ (ที่บ้าน) :

โทรศัพท์ โทรสาร -

ประวัติการศึกษา (ปริญญาตรี-เอก ; สาขา และสถาบัน)

ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.	สถาบัน
ปริญญาโท	เทคโนโลยีชีวภาพ	2545	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปริญญาตรี	ชีวเคมี	2541	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาระงานในปัจจุบัน (งานประจำที่รับผิดชอบ)

วิจัย 28 ชั่วโมงต่อสัปดาห์

บริการวิชาการและบริหาร 7 ชั่วโมงต่อสัปดาห์

งานวิจัยที่รับผิดชอบ (กำลังดำเนินงาน) (ชื่อโครงการ แหล่งทุน และระยะเวลาดำเนินการ)

- การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของแถบทดสอบสำหรับตรวจหาอะฟลา ทอกซินเอ็ม 1 ในผลิตภัณฑ์น้ำมัน (ผู้ร่วมโครงการ สวก. 10 มี.ค. 2560 – 9 มี.ค. 2561)
- โครงการ การเพิ่มความไวของแถบทดสอบสำเร็จรูปสำหรับตรวจติดตามสารเมแทบอลิต์ฟูรัลทาโดน (AMTZ) ในผลิตภัณฑ์สัตว์ (25%) (แหล่งทุน – งบประมาณแผ่นดินปี 59-60)

ผลงานที่ผ่านมา

ก. ผลงานวิจัยตีพิมพ์ (ระดับชาติ และระดับนานาชาติ) (ชื่อผลงาน ชื่อวารสาร แหล่งทุน ปีที่พิมพ์)

Puthong, P., Rojpibulstit, P., and **Buakeaw, A.** (2009). Cytotoxic effect of Hep 88 mAb: A novel monoclonal antibody against hepatocellular carcinoma. Thammasat Int. J. Se. Tech. 14(1): 95-104.

Somwong, P., Suttisri, R., and **Buakeaw, A.** (2011). A new 1,3-diketofriedelane triterpene from *Salacia verrucosa*. Fitoterapia. 82: 1047 -1051.

Mungmee, C., Sithigool, S., **Buakeaw, A.**, and Suttisri, R. (2013). A new biphenyl and other constituents from the wood of *Garcinia schomburgkiana*. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, DOI:10.1080/14786419.2013.796469.

Somwong, P., Suttisri, R. and **Buakeaw, A.** (2013). New sesquiterpenes and phenolic compound from *Ficus foveolata*. Fitoterapia. 85: 1 – 7.

Wongtangprasert, T., Natakuthung, W., Pimpitak, U., **Buakeaw, A.**, Palaga, T., Komolpis, K. and Khongchareonporn, N. (2014). Production of a monoclonal antibody against oxytetracycline and its application for oxytetracycline residue detection in shrimp. Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology). 15(2): 165 – 172.

Nuanyai, T., Chailap, B., Puthong, S. and **Buakeaw, A.** (2015). Cytotoxicity of xanthone from twigs of *Cratoxylum cochinchinense* (Lour.) Blume. *Journal of Science Ladkrabang*. 2: 1 – 12.

Buakeaw, A., Puthong, S., Kongkavitoon, P., Khongarsa, K., Komolpis, K. and Khongchareonporn, N. (2016). Production of monoclonal antibodies for ractopamine residue detection in pork. *Maejo International Journal of Science and Technology*. 10(02): 175 – 186.

Sangdokmai, A., Pimpitak, U., **Buakeaw, A.**, Palaga, T., and Komolpis, K. (2011). Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Against Aflatoxin M₁. 2011 International Conference on Environmental, Biomedical and Biotechnology IPCBEE. 16. IACSIT Press, Singapore.

Buakeaw, A., Puthong, S., Komolpis, K., Khnongchareonporn, N., and Pimpitak, U. (2015). Production of monoclonal antibody against semicarbazide. The 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. Thailand.

Khongarsa, K., Khongchareonporn, N., Komolpis, K., and **Buakeaw, A.** (2012). 1st ASEAN PLUS THREE GRADUATE RESEARCH CONGRESS. 1 – 2 March 2012 Chaing Mai, Thailand.

Tesvichian, S., Komolpis, K., Khongchareonporn, N., Puthong, S., Pimpitak, U., and **Buakeaw, A.** Development of Tetracycline Test Kit Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Technique. (2010). The 3rd Technology and Innovation for Sustainable Development International Conference. (TISD2010). Faculty of Engineering, Khon Kaen University, Thailand, 4 – 6 March 2010.

ข. ผลงานวิจัยที่นำไปใช้ประโยชน์ (ต่อสาธารณะ, ชุมชน, กลุ่มเกษตรกร ฯลฯ)

-

ค. ผลงานอื่น ๆ เช่น บทความ หนังสือ สิทธิบัตร ฯลฯ

-

แผนการดำเนินการวิจัยและผลที่ได้รับ

แผนการดำเนินการวิจัย (.12 เดือน เริ่มตั้งแต่ กันยายน 2561 ถึง กันยายน 2562)

ขั้นตอนการทำงาน	เดือนที่												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
เตรียมชุดแถบทดสอบที่บรรจุในซองอะลูมิเนียม													
การทดสอบประสิทธิภาพชุดแถบทดสอบแรคโตพามีน ด้วยสารสกัดจากตัวอย่างเนื้อหมู เนื้อโคและอาหารสัตว์ - หาค่า cut-off ของชุดแถบทดสอบที่ทดสอบด้วยเนื้อหมู เนื้อวัวและอาหารสัตว์ที่มีการเติมสารแรคโตพามีน - การเกิดปฏิกิริยาข้ามของชุดแถบทดสอบในตัวอย่างแต่ละชนิด - ค่าความถูกต้อง (Accuracy) และความแม่นยำ (Precision) ของชุดแถบทดสอบ													
ประเมินความคงสภาพของชุดแถบทดสอบแรคโตพามีนตกค้างที่พัฒนาขึ้น นับจากวันผลิตชุดแถบทดสอบ													
เปรียบเทียบการทดสอบแรคโตพามีนตกค้างโดยใช้ชุดแถบทดสอบที่ผลิตขึ้นเอง ชุดแถบทดสอบทางการค้า และวิธี LC-MS/MS ด้วยตัวอย่างเนื้อหมู เนื้อวัว และอาหารสัตว์ อย่างน้อยชนิดละ 20 ตัวอย่าง สุ่มตัวอย่าง 20% ของตัวอย่าง ส่งวิเคราะห์เพื่อยืนยันผล ด้วยวิธี LC-MS/MS													
สรุปผลและจัดทำรายงานวิจัย													

ผลที่ได้รับ (Outputs)

แผนการดำเนินงาน	ผลที่ได้รับ (Outputs)	ผลสำเร็จ (%)
เตรียมชุดแถบทดสอบที่บรรจุในซองอะลูมิเนียมอย่างน้อย 500 ชุด	ได้ชุดแถบทดสอบประมาณ 2,000 ชุด	100%
การทดสอบประสิทธิภาพชุดแถบทดสอบแร่โคพาซีนแต่ละชนิด (1) เนื้อหมู (2) เนื้อวัว (3) อาหารสัตว์	ได้ผลค่า cut-off ของชุดแถบทดสอบที่ทดสอบด้วยเนื้อหมู เนื้อวัว และอาหารสัตว์ที่มีการเติมสารแร่โคพาซีน	100%
	ได้ผลการเกิดปฏิกิริยาข้ามของชุดแถบทดสอบในตัวอย่างแต่ละชนิด	100%
	ได้ค่าความถูกต้อง (Accuracy) และความแม่นยำ (Precision) ของชุดแถบทดสอบ	100%
การเก็บชุดแถบทดสอบที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง และนำมาทดสอบที่ระยะเวลาต่างๆ	ผลความคงสภาพของชุดแถบทดสอบ เมื่อครบกำหนดระยะเวลา 0, 3, 6, และ 9 เดือน นับจากวันผลิตชุดแถบทดสอบ โดยเก็บชุดแถบทดสอบที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง	100%
เปรียบเทียบการทดสอบแร่โคพาซีนตกค้างโดยใช้ชุดแถบทดสอบที่ผลิตขึ้นเอง, ชุดแถบทดสอบทางการค้าและวิธี LC-MS/MS	ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อหมู เนื้อวัว และอาหารสัตว์ อย่างน้อยชนิดละ 20 ตัวอย่าง ทดสอบกับชุดแถบทดสอบที่ผลิตขึ้นเองและชุดแถบทดสอบทางการค้า	100%
	สุ่มตัวอย่าง 20% ของจำนวนที่ให้ผลบวกและผลลบ ส่งวิเคราะห์เพื่อยืนยันผล ด้วย LC-MS/MS	100%

ลงนาม.....

(หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน)

วันที่.....