

อิมมูโนเซ็นเซอร์แบบแข่งขันสำหรับการตรวจวัดที่ว่องไวของยาปฏิชีวนะนีโอมัยซินที่ตกค้างในน้ำนมดิบ

A competitive immunosensor for sensitive detection of neomycin residues in raw milk

เจ๊ะฮาซัน เจ๊ะอุบง^{1*} และ กัญญารัตน์ โมคกุล²
Chehasan Cheubong^{1*} and Kanyarat Mokkul²

Received: 29 June 2024 ; Revised: 4 August 2024 ; Accepted: 13 September 2024

บทคัดย่อ

นีโอมัยซินเป็นยาปฏิชีวนะกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในโคนม เนื่องจากสามารถฆ่าได้ทั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ถ้ามนุษย์ได้รับในปริมาณสูงจะส่งผลเป็นพิษต่อไตและระบบประสาทหู ดังนั้นการตกค้างในปริมาณสูงของยาปฏิชีวนะนีโอมัยซินในน้ำนมดิบจะส่งผลเสียต่อผู้บริโภค ด้วยเหตุนี้เทคนิคการตรวจวัดการตกค้างของยาปฏิชีวนะนีโอมัยซินในน้ำนมดิบที่มีความว่องไวสูง มีความจำเพาะและแม่นยำในการตรวจวัดจึงมีความจำเป็นมากที่จะต้องพัฒนาเพื่อควบคุมปริมาณการตกค้างของนีโอมัยซินในน้ำนมดิบให้ปลอดภัยต่อผู้บริโภค งานวิจัยครั้งนี้ได้พัฒนาเทคนิคอิมมูโนเซ็นเซอร์แบบแข่งขันเพื่อตรวจวัดการตกค้างของนีโอมัยซินในน้ำนมดิบ โดยทำการเชื่อมนีโอมัยซินเข้ากับโบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin, BSA) แล้วนำไปบ่มในไมโครเพลตเพื่อเป็นตัวแทนแข่งขันกับนีโอมัยซินในสารตัวอย่างในการจับกับแอนติบอดีนีโอมัยซินที่เชื่อมไปโอดีน หลังจากนั้นการแข่งขันระหว่างนีโอมัยซินที่อยู่ในไมโครเพลตกับนีโอมัยซินในตัวอย่างจะถูกตรวจวัดด้วยสีที่เกิดจากการเร่งของเอนไซม์ HRP-streptavidin (horseradish peroxidase (HRP)-labeled streptavidin) ที่อยู่ในไมโครเพลตกับสับสเตรท 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) ในสภาวะมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ผลการศึกษาพบว่าเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพสูงในการตรวจวัดการตกค้างของยาปฏิชีวนะนีโอมัยซิน โดยมีปริมาณต่ำสุดที่วัดได้คือ 4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (4 ppb) มีช่วงความเป็นเส้นตรงตั้งแต่ 1 ถึง 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ($R^2=0.9976$) มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 3.7 มีความจำเพาะเจาะจงต่อยาปฏิชีวนะนีโอมัยซินสูง และมีความถูกต้อง (accuracy) ของการตรวจวัดการตกค้างของยาปฏิชีวนะนีโอมัยซินในตัวอย่างน้ำนมดิบด้วยค่าเปอร์เซ็นต์การไถ่คืนที่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ (%Recovery; 85-111%) ดังนั้นเทคนิคอิมมูโนเซ็นเซอร์แบบแข่งขันที่พัฒนาในครั้งนี้จึงเป็นวิธีวิเคราะห์ที่สามารถใช้ตรวจสอบการตกค้างของนีโอมัยซินในน้ำนมดิบได้ในปริมาณต่ำ มีความว่องไวสูง แม่นยำ ใช้งานง่าย และมีศักยภาพที่จะพัฒนาเพื่อนำไปใช้ประเมินคุณภาพของน้ำนมดิบเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคได้

คำสำคัญ: อิมมูโนเซ็นเซอร์แบบแข่งขัน, ยาปฏิชีวนะ, นีโอมัยซิน, น้ำนมดิบ

Abstract

Neomycin is a common broad-spectrum aminoglycoside antibiotic that inhibits the growth of both gram-negative and gram-positive bacteria. Overdose has the potential to cause ototoxicity as well as nephrotoxicity. Thus, the presence of neomycin in raw milk poses a possible health risk to consumers. Therefore, sensitive and selective methods are necessary to monitor and detect neomycin. A competitive immunosensor was designed to detect neomycin residues in raw milk. First, a microplate was coated with conjugated neomycin-bovine serum albumin and used as an analytical competitor. The competitive immunosensor was created by incubating free neomycin with anti-neomycin antibodies labelled with HRP-streptavidin. After the competitive reaction, captured HRP catalysed the oxidation of 3,3',5,5'-

¹ อาจารย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

² นักศึกษาปริญญาตรี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

¹ Lecturer, Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Thailand

² Bachelor student, Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Thailand

* Corresponding author: Email: Chehason@rmutt.ac.th

tetramethylbenzidine (TMB) in the presence of hydrogen peroxide (H_2O_2) to create colour responses. The proposed immunosensor had excellent analytical performance with a low detection limit of 4 ng/mL, a wide linear range from 1 to 50 ng/mL ($R^2 = 0.9976$), high precision with a %RSD of 3.7, and high selectivity in neomycin detection compared to six competitive antibiotics. The applicability of the sensor was evaluated by analysing neomycin in raw milk samples. Detection of neomycin in real samples demonstrated remarkable accuracy, with a recovery rate of 85–111%. The results showed that the proposed immunosensor can successfully detect neomycin in raw milk samples with excellent sensitivity and ease of use. Additionally, the proposed method has great potential for farmers to detect neomycin residues in raw milk.

Keywords: Competitive immunosensor, antibiotic, neomycin, raw milk

บทนำ

การตกค้างของยาปฏิชีวนะจัดเป็นการปนเปื้อนที่พบมากที่สุด ในน้ำนมและผลิตภัณฑ์จากนม (Cháfer-Pericás *et al.*, 2010) โดยนีโอมัยซิน (neomycin) เป็นยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้มากที่สุด ชนิดหนึ่งในการรักษาโรคทางเดินอาหารในปศุสัตว์ที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากนีโอมัยซินเป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่ม อะมิโนไกลโคไซด์ (aminoglycoside antibiotic) ที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (broad spectrum antibacterial activities) (Schwarz *et al.*, 2016) ในปัจจุบันพบว่านีโอมัยซินมีการใช้กันอย่างกว้างขวางมากขึ้นเพื่อรักษาโรคลำไส้อักเสบ (Gastrointestinal infection) ทั้งใน วัว แกะ แพะ หมู และสัตว์ปีก มากกว่านั้นมันยังสามารถใช้ในการรักษาโรคเต้านมอักเสบ (Mastitis) ได้ผลดีอีกด้วย (van Duijken *et al.*, 2019; Glinka *et al.*, 2020; Jospe-Kaufman *et al.*, 2020) อย่างไรก็ตามนีโอมัยซินที่ถูกใช้ในการรักษาดังกล่าวจะมีส่วนตกค้างในเนื้อเยื่อหรือน้ำนมดิบ ซึ่งพบว่า มีความเป็นพิษต่อระบบประสาทหู (Ototoxic) และระบบการทำงานของไต (Nephrotoxic) ทั้งในสัตว์และมนุษย์ที่เป็นผู้บริโภค ซึ่งเป็นส่วนกระตุ้นให้เกิดการแพ้อาหาร และอาการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (Rosenberg *et al.*, 2020; Ogier *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021) และยิ่งกว่านั้นการตกค้างของยาปฏิชีวนะในน้ำนมดิบยังส่งผลกระทบต่อกระบวนการหมักของผลิตภัณฑ์จากนมอีกเช่นกัน (Arsand *et al.*, 2016) ทำให้หลายหน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการคุ้มครองผู้บริโภคในกลุ่มประเทศใหญ่ๆ ได้มีการกำหนดปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด (maximum residue limits; MRLs) ของนีโอมัยซินในน้ำนมดิบ เช่น องค์การอาหารและยาสหรัฐ (FDA) กำหนดไว้พบได้ไม่เกิน 150 $\mu\text{g/kg}$ (Luan *et al.*, 2020) ในประเทศไทยพบว่า ยังไม่มีการห้ามใช้หรือกำหนดค่าปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุดของนีโอมัยซินในน้ำนมดิบ จึงมีโอกาสมากที่จะพบการตกค้างของนีโอมัยซินในน้ำนมดิบจากเกษตรกรในประเทศไทย ดังนั้น การพัฒนาวิธีตรวจสอบปริมาณสารตกค้างของนีโอมัยซิน ที่ถูกต้อง แม่นยำ และใช้งานง่าย จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อ

การพัฒนาคุณภาพของน้ำนมดิบและผลิตภัณฑ์จากนมของเกษตรกรไทยเพื่อการส่งออกในอนาคต

วิธีทั่วไปที่ใช้ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารตกค้างนีโอมัยซินในอาหารที่นิยมใช้ ได้แก่ การวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี (Tzanavaras *et al.*, 2007) เทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) (Abualhasan *et al.*, 2012; Ianni *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018) เทคนิคลิควิดโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ (Liquid Chromatography Mass Spectrometer, LC-MS) (Zu *et al.*, 2018; Pandey *et al.*, 2020) เทคนิคทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemical technique) (Giang & Huan, 2021; Li *et al.*, 2022) และเทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโตรโฟรีซิส (capillary electrophoresis) (García-Campaña *et al.*, 2009) แต่พบว่าเทคนิคดังกล่าว มีข้อจำกัดคือ มีขั้นตอนเตรียมตัวอย่างที่ซับซ้อนเนื่องจากนีโอมัยซินเป็นสารประกอบที่ไม่มีองค์ประกอบทางเคมีที่มีให้สีหรือเรืองแสงได้ (chromophores or fluorophores) การวิเคราะห์จึงต้องมีการทำให้เกิดสารอนุพันธ์ก่อนหรือหลังการวิเคราะห์ (pre- or post-column derivatization) (Zhang *et al.*, 2021) รวมถึงเครื่องมือที่ใช้มีราคาสูง ผู้วิเคราะห์จะต้องมีความชำนาญในการใช้เครื่องมือเป็นอย่างดี และต้องส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเท่านั้น เพื่อพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์สารตกค้างนีโอมัยซินที่มีความไวสูง ใช้งานง่าย และรวดเร็วในการตรวจวิเคราะห์ เทคนิคอิมมูโนเซ็นเซอร์ (Immunosensor) จึงเป็นทางเลือกที่มีความเหมาะสมและมีแนวโน้มสูงที่จะสามารถตรวจวัดสารตกค้างได้ในปริมาณต่ำ (He *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2020) เนื่องจากเทคนิคดังกล่าวอาศัยการจับกันระหว่าง แอนติเจน (Antigen) กับ แอนติบอดี (Antibody) ที่มีจำเพาะเจาะจงกันสูง (Li *et al.*, 2022; Chen *et al.*, 2007; Cheubong *et al.*, 2023) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเทคนิคอิมมูโนเซ็นเซอร์แบบแข่งขัน (Competitive immunosensor) ซึ่งสามารถตรวจสอบสารที่มีโมเลกุลเล็ก เช่น สารกลุ่มยาฆ่าแมลงหรือยาปฏิชีวนะได้อย่าง

แม่นยำ รวดเร็วและมีความไวสูงในการวิเคราะห์สารเหล่านี้ในปริมาณต่ำ (Merola *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2018)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่สามารถตรวจวัดสารตกค้างนีโอมาซินในน้ำนมดิบที่ให้ผลการตรวจวัดที่ถูกต้อง รวดเร็ว ง่ายและใช้งานง่ายโดยใช้เทคนิคอิมมูโนเซ็นเซอร์แบบแข่งขัน

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

1. สารเคมี

สารเคมีสำคัญที่ใช้ได้แก่ นีโอมาซิน โพลีโคลนอล แอนติบอดี (from rabbit, Catalog No.6615-0005, Bio-rad), นีโอมาซินซัลเฟต, เจนตามัยซินซัลเฟต, สเตรปโตมัยซินซัลเฟต, เพนนิซิลลินซัลเฟต, เตตระไซคลิน, แอมพิซิลลิน, อะม็อกซิซิลลิน, โบวินเซรัมอัลบูมิน, 1-(3-ไดเมทิลอะมิโนโพรพิล), 3-เอทิลคาร์โบไดอิมิดไฮโดรคลอไรด์ (1-(3-Dimethyl aminopropyl), 3-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC), 3,3',5,5'-เตตระเมทิลเบนซิดีน(3,3',5,5'-tetramethyl ben zidine,TMB), ฮอร์สแรดิช เปอร์ออกซิเดส สเตรปตาวิดอิน (Horseradish peroxidase-strepta vidin, HRP-Streptavidin), ไบโอติน (Biotin 3-sulfo- N-hydroxysuccinimide ester sodium salt, BAC-SulfoNHS) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) จากบริษัท Sigma-Aldrich สารเคมีทั้งหมดที่ใช้ทดลองเป็นเกรดวิเคราะห์ (Analytical grade)

2. เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่สำคัญได้แก่ เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น UV-P1 (UV-Visible Spectro photometer, MAPADA, CN), ไมโครเพลตติชว (Poly propylene microplate, Thermo Fisher) และ เครื่องวัด pH รุ่น Model UB-10 (Denver instrument, USA)

3. การเตรียมสารละลายมาตรฐานนีโอมาซินที่เชื่อมต่อกับโบวินเซรัมอัลบูมิน

ทำการเชื่อมสารละลายมาตรฐานนีโอมาซินกับโบวินเซรัมอัลบูมินด้วยปฏิกิริยาเคอไมคัล (Chen *et al.*, 2007) โดยทำการชั่งนีโอมาซิน 50 มิลลิกรัมและ โบวินเซรัมอัลบูมิน 20 มิลลิกรัม ละลายด้วย 10 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.5 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปกวนให้เข้ากันเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นชั่งอีดีซี (EDC) 20 มิลลิกรัม ละลายด้วย 10 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติมลงไปในการละลายข้างต้นและกวนต่อไปอีก 1 ชั่วโมง นำสารละลายผสมที่ได้ใส่ถุงไดอะไลซิส (Mw cutoff : 10,000 Dalton) นำไปไดอะไลซิสใน 10 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.5 ที่อุณหภูมิ 4

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วันเพื่อนำเอานีโอมาซินอิสระที่ไม่เชื่อมต่อกับโบวินเซรัมอัลบูมินออกจากสารละลาย แล้วนำสารละลายที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อไปใช้ต่อไป

4. การติดฉลากแอนติบอดีนีโอมาซินด้วยไบโอติน

การติดฉลากแอนติบอดีนีโอมาซินด้วยไบโอตินทำได้โดยนำแอนติบอดีนีโอมาซินที่ผ่านการไดอะไลซิสใน 10 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.2 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมกับไบโอติน (BAC-SulfoNHS) ที่ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วกวนให้เข้ากันเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารละลายผสมไปไดอะไลซิสที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากไดอะไลซิสแล้วจึงนำสารละลายไปผสมกับ 1% โบวินเซรัมอัลบูมินที่ละลายใน 10 มิลลิโมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร สุดท้ายแล้วจะได้สารละลายแอนติบอดีนีโอมาซินที่ติดฉลากด้วยไบโอติน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

5. เทคนิคอิมมูโนเซ็นเซอร์แบบแข่งขันสำหรับการตรวจวัดการตกค้างของยาปฏิชีวนะนีโอมาซิน

การศึกษาครั้งนี้เป็นการพัฒนาเทคนิคอิมมูโนเซ็นเซอร์แบบแข่งขัน (Competitive immunosensor) ที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณของยาปฏิชีวนะนีโอมาซิน โดยใช้แอนติบอดีนีโอมาซินที่จำเพาะกับนีโอมาซินซึ่งเป็นแอนติเจนเพื่อตรวจวัดการตกค้างของนีโอมาซินในน้ำนมดิบ ดังแสดงไว้ใน Figure 1 ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ เริ่มด้วยทำการตรึงนีโอมาซินที่เชื่อมด้วยโบวินเซรัม อัลบูมินความเข้มข้น 1, 2, 5, 7 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในไมโครเพลท โดยการบ่มด้วยสารละลายคาร์บอนเนตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 9.6 เป็นสารเชื่อม หลังจากบ่มเป็นเวลา 12 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไมโครเพลทมาล้างซ้ำ 3 ครั้งด้วยบัฟเฟอร์สำหรับชะล้าง (1% โบวินเซรัมอัลบูมินใน 0.1โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4) จากนั้นผสมแอนติบอดีนีโอมาซินที่ติดฉลากด้วยไบโอติน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตรกับนีโอมาซินที่ทราบความเข้มข้นหรือสารละลายตัวอย่างน้ำนมดิบในสัดส่วนปริมาตร 1:1 ในสารละลาย 10 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6, 7, 7.4 และ 8 แล้วบ่มลงในไมโครเพลทที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 20 40 และ 60 นาที หลังจากบ่มทำการล้างซ้ำ 3 ครั้ง ขั้นตอนต่อไปทำการบ่มสเตรปตาวิดอิน-เปอร์ออกซิเดส ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและทำการล้างไมโครเพลทซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นเติม 3, 3' 5,5' เตตระเมทิลเบนซิดีน

(TMB) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) จะได้สารละลายสีฟ้า ขั้นตอนสุดท้ายเติมกรดซัลฟิวริกลงไป สารละลายจะเปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีเหลือง นำไปตรวจวัดสัญญาณที่ได้ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร โดยสัญญาณค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จะแปรผกผันกับปริมาณความเข้มข้นของสารนีโอมัยซินที่ต้องการวิเคราะห์

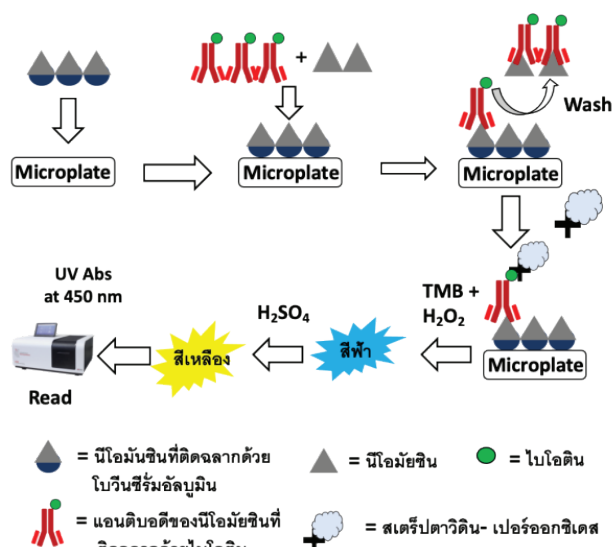


Figure 1 Schematic illustration of the developed competitive immunosensor for detection of neomycin residues.

6. การตรวจวัดการตกค้างของนีโอมัยซินในตัวอย่างน้ำนมดิบ

ทำการวิเคราะห์ตรวจหาปริมาณการตกค้างของยาปฏิชีวนะนีโอมัยซินในน้ำนมดิบ โดยนำน้ำนมดิบที่ได้จากเกษตรกรที่เลี้ยงวัวนมบางแห่งในจังหวัดสระบุรีและปทุมธานี มา 3 ตัวอย่าง จากนั้นนำไปสกัดเพื่อแยกไขมันและโปรตีนออกด้วยวิธีดังนี้ ตวงน้ำนมดิบ 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยง ขนาด 50 มิลลิลิตร และเติมเอทิลอะซิเตต 10 มิลลิลิตร ตามลงไป นำไปสั่นด้วยเครื่องอัลตราโซนิกเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปเหวี่ยง เป็นเวลา 20 นาที ที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อวินาที นำเฉพาะสารละลายส่วนที่ใสมาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณยาปฏิชีวนะที่ตกค้างในน้ำนมดิบทั้ง 3 ตัวอย่าง (A,B และ C) ด้วยเทคนิคอิมมูโนเซ็นเซอร์แบบแข่งขัน โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับปริมาณความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะนีโอมัยซินที่ตรวจพบ นำไปคำนวณสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานนีโอมัยซิน

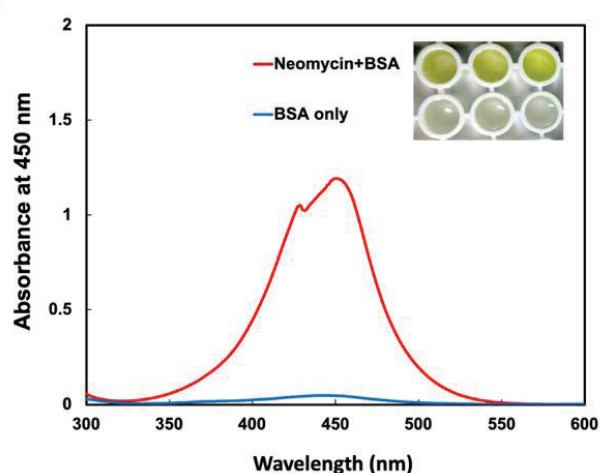


Figure 2 The UV-visible spectra obtained from immobilized Neomycin+BSA conjugate (red curve) and BSA only (blue curve). (Inset; yellow-colored products).

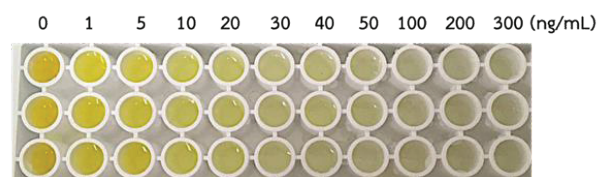


Figure 3 Photographs of competitive immunosensor responses to different concentrations of neomycin by yellow-colored products.

ผลการทดลองและอภิปรายผล

1. สัญญาณที่ตอบสนองต่อการตรวจวัดนีโอมัยซินด้วยเทคนิคอิมมูโนเซ็นเซอร์แบบแข่งขัน

เทคนิคอิมมูโนเซ็นเซอร์แบบแข่งขันที่พัฒนาในครั้งนี้อาศัยการแข่งขันในการจับแอนติบอดีนีโอมัยซินระหว่างนีโอมัยซินที่ถูกตรึงในไมโครเพลตกับนีโอมัยซินอิสระที่อยู่ในสารละลายมาตรฐานหรือสารตัวอย่าง นีโอไมซินที่ถูกตรึงในไมโครเพลตนั้นจะต้องเชื่อมต่อกับโบวีนซีรัมอัลบูมินเพื่อที่จะสามารถตรึงในไมโครเพลตโดยสารละลายคาร์บอเนตบัฟเฟอร์เป็นสารเชื่อมได้ เมื่อทำการตรึงนีโอมัยซินที่เชื่อมต่อกับโบวีนซีรัมอัลบูมินเปรียบเทียบกับโบวีนซีรัมอัลบูมินอย่างเดียวพบว่า หลุมที่ตรึงด้วยนีโอมัยซินที่เชื่อมกับโบวีนซีรัมอัลบูมินมีสัญญาณโดยสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร แต่ไม่พบสัญญาณในหลุมที่ตรึงด้วยโบวีนซีรัมอัลบูมินเพียงอย่างเดียว ดังแสดงใน Figure 2 จึงสามารถยืนยันความสำเร็จในการเชื่อมนีโอมัยซินกับโบวีนซีรัมอัลบูมิน ด้วย EDC ที่เป็นสาร amide coupling ที่สร้างพันธะเอไมด์ระหว่างกรดคาร์บอกซิลิกในโบวีนซีรัมอัลบูมินกับนีโอมัยซินซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะชนิดอะมิโนไกลโคไซด์ซึ่งมีหมู่เอมีนในโครงสร้าง

ส่วนการติดฉลากไบโอตินบนแอนติบอดีนีโอมายซินนั้นอาศัยพันธะเอไมด์ระหว่างหมู่N-hydroxysulfo succinimide (sulfo-NHS) esters ที่มีไบโอตินกับหมู่เอมีนชนิดปฐมภูมิหรือทุติยภูมิ (primary or secondary amines) ที่อยู่ในแอนติบอดีนีโอมายซิน โดยสามารถยืนยันการติดฉลากสำเร็จจากสัญญาณสีที่เกิดขึ้นเมื่อนำไปตรวจวัดสารละลายมาตรฐานนีโอมายซินที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยเทคนิคอิมมูโนเซ็นเซอร์แบบแข่งขัน ดังแสดงใน Figure 3 พบว่าสัญญาณสีเหลืองที่เกิดขึ้นนั้นมีสีที่จางลงไปเมื่อความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานนีโอมายซินเพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกันระหว่างสีเหลืองกับความเข้มข้นของนีโอมายซิน โดยสัญญาณที่ลดลงเมื่อปริมาณของนีโอมายซินเพิ่มขึ้นนั้น หมายความว่า นีโอมายซินอิสระในสารละลายมีปริมาณมากจึงแย่งจับกับแอนติบอดีนีโอมายซินทำให้เหลือแอนติบอดีนีโอมายซินน้อยลงที่จะไปจับกับนีโอมายซินที่ตรึงบนไมโครเฟลต ส่งผลทำให้สัญญาณน้อยลง และทำให้ปริมาณเอนไซม์สเตรปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส สำหรับเร่งปฏิกิริยาน้อยลงด้วย นอกจากนี้จะสามารถยืนยันการติดฉลากไบโอตินกับแอนติบอดีสำเร็จแล้ว ผลการศึกษายังสามารถตรวจวัดสัญญาณที่ตอบสนองต่อการตรวจวัดนีโอมายซินด้วยเทคนิคอิมมูโนเซ็นเซอร์แบบแข่งขันที่พัฒนาขึ้นในครั้งนี้ด้วย

2. สภาวะที่เหมาะสมสำหรับตรวจวัดนีโอมายซินด้วยเทคนิคอิมมูโนเซ็นเซอร์แบบแข่งขัน

เพื่อให้วิธีวิเคราะห์มีความไวและมีประสิทธิภาพสูงในการตรวจวัดนีโอมายซิน จึงได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์โดยศึกษาปัจจัยดังนี้ คือ ความเข้มข้นที่แตกต่างกันของนีโอมายซินที่เชื่อมโบวีนเซิร์มอัลบูมิน (1 2 5 7 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ค่าพีเอชที่แตกต่างกันของสารละลายบัฟเฟอร์ (6 7 7.4 และ 8) และเวลาที่แตกต่างกันในการจับกันของนีโอมายซินกับแอนติบอดี (10 20 40 และ 60 นาที) โดยทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำในทุกการทดลอง จากนั้นใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way ANOVA) เพื่อเลือกสภาวะที่เหมาะสมที่สุด ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะอื่นๆ ในแต่ละปัจจัยที่ได้ศึกษา

การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการตรึงนีโอมายซินที่เชื่อมโบวีนเซิร์มอัลบูมินในไมโครเฟลตมีความจำเป็นที่ต้องควบคุมปริมาณความเข้มข้นให้เหมาะสม เพื่อให้การตรวจวัดนีโอมายซินมีประสิทธิภาพเนื่องจากนีโอมายซินที่ตรึงในไมโครเฟลตจะเป็นตัวจับกับแอนติบอดีนีโอมายซินแบบแข่งขันกับนีโอมายซินอิสระในหลอดทดลอง ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาที่ความเข้มข้น 1 2 5 7 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงใน Figure 4a ผลการศึกษาพบว่าค่าการ

ดูดกลืนแสงมีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของนีโอมายซินที่เชื่อมโบวีนเซิร์มอัลบูมินที่ตรึงในไมโครเฟลต และที่ความเข้มข้น 7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรนั้นได้ผลค่าการดูดกลืนแสงที่มากที่สุด แม้ว่าเพิ่มความเข้มข้นสูงขึ้นอีกเป็น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าการดูดกลืนแสงไม่ได้เพิ่มขึ้นเนื่องจาก พื้นที่ในไมโครเฟลตมีจำกัด ถ้ามีการตรึงสารเข้มข้นมากเกินไปอาจจะมีการซ้อนทับหรือการแย่งเกาะบนผิวไมโครเฟลตจนทำให้ปริมาณสารที่ตรึงได้นั้นน้อยลงส่งผลต่อประสิทธิภาพในการจับของแอนติบอดีลดลงเช่นกัน ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการตรึงนีโอมายซินที่เชื่อมโบวีนเซิร์มอัลบูมินในไมโครเฟลตคือที่ 7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

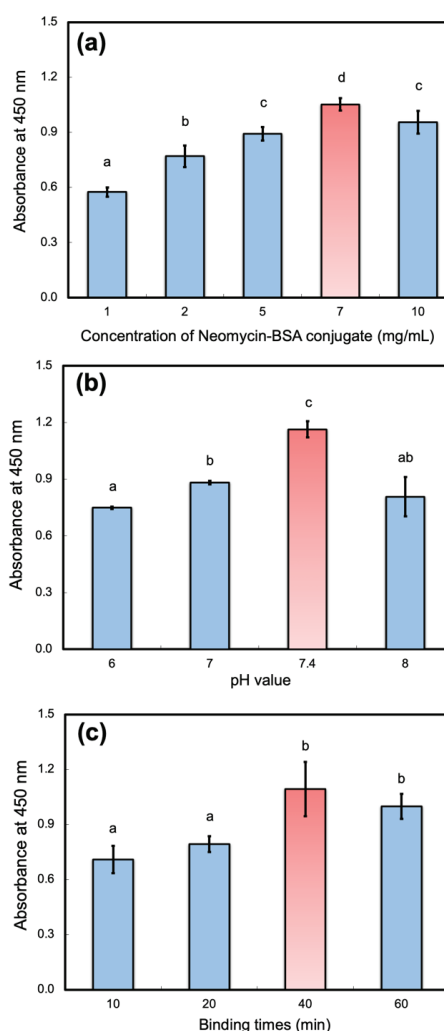


Figure 4 Optimization of the experimental condition on the competitive immunosensor response for neomycin detection. (a) Optimization of the concentration of neomycin-BSA conjugate. (b) Optimization of the pH value. (c) Optimization of the binding time. The red-bar plots present the optimized conditions. Different letters above the bars indicate statistically significant difference at $P < 0.05$ (one-way ANOVA, $N=3$). The error bars were obtained from triplicate experiments.

ค่าพีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นปัจจัยสำคัญอีกอย่างหนึ่งที่ได้ทำการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาและการจับกันของแอนติเจนกับแอนติบอดี ดังแสดงใน Figure 4b พบว่าเมื่อค่าพีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เปลี่ยนไปจากพีเอช 6 ไปจนถึงพีเอช 8 สัญญาณที่ตอบสนองมีการเปลี่ยนแปลงโดยมีค่าดูดกลืนแสงมากขึ้นจนถึงที่ค่าพีเอช 7.4 และมีการดูดกลืนแสงลดลงเมื่อค่าพีเอชมากกว่า 7.4 ค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไปนั้นมีความสัมพันธ์กับกิจกรรมของเอนไซม์ซึ่งเป็นสารชีวโมเลกุลชนิดโปรตีนที่มีความไวต่อสภาพความเป็นกรด-เบส ของสารละลาย เพราะฉะนั้นค่าพีเอชที่ต่ำหรือสูงเกินไป จะส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง จึงส่งผลต่อผลผลิตที่ได้ซึ่งใช้เป็นสัญญาณที่ตอบสนองต่อการตรวจวัดนีโอไมซินด้วยเทคนิคอิมมูโนเซ็นเซอร์แบบแข่งขัน ในครั้งนี้ ดังนั้นพีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ 7.4 นั้นเหมาะสมที่สุดสำหรับการวิเคราะห์

ปัจจัยสุดท้ายที่ทำการศึกษาคือเวลาที่เหมาะสมในการจับกันของแอนติบอดีนีโอไมซินกับนีโอไมซินที่ตรึงไว้ในไมโครเพลต ดังแสดงใน Figure 4c พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มมากขึ้นตามเวลาที่เพิ่มขึ้นจาก 10 นาทีไปจนถึง 40 นาที และลดลงที่เวลา 60 นาที จึงสรุปได้ว่าเมื่อเวลาผ่านไป การจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีนั้นมากขึ้นต่อเนื่องไปจนถึงเวลา 40 นาที การจับกันก็ถึงจุดที่จับกันอย่างสมดุล (equilibrium of immunoreaction) ทำให้หลังจากนั้นที่เวลา 60 นาที ไม่มีการจับกันที่เพิ่มขึ้นอีก ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงไม่เพิ่มขึ้นไปกว่าที่เวลา 40 นาที ดังนั้นที่เวลา 40 นาทีจึงเป็นเวลาที่เหมาะสมในการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี

สรุปสภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ที่ให้สัญญาณตอบสนองต่อการตรวจวัดนีโอไมซินด้วยเทคนิคอิมมูโนเซ็นเซอร์แบบแข่งขันได้ดีที่สุดคือ ตรึงนีโอไมซินที่เชื่อมโพรวินเซิร์มอัลบูมินในไมโครเพลตความเข้มข้น 7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ 7.4 และ 40 นาที เป็นเวลาที่เหมาะสมในการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ซึ่งสภาวะดังกล่าวนี้จะถูกนำไปใช้ในการหาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์และตรวจวัดนีโอไมซินในตัวอย่างน้ำนมดิบต่อไป

3. ประสิทธิภาพของการตรวจวัดนีโอไมซินด้วยเทคนิคอิมมูโนเซ็นเซอร์แบบแข่งขัน

นำเอาสภาวะที่เหมาะสมที่ได้ศึกษาข้างต้นมาทดสอบหาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์นีโอไมซินด้วยเทคนิคอิมมูโนเซ็นเซอร์แบบแข่งขัน โดยทำการศึกษากฎมาตรฐาน ช่วงความเป็นเส้นตรง (standard curve and linearity range) และข้อมูลการถดถอยเชิงเส้น (linear regression) ของความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานนีโอไมซินที่แตกต่างกัน (0 1 5 10 20 30 40 50 100 200

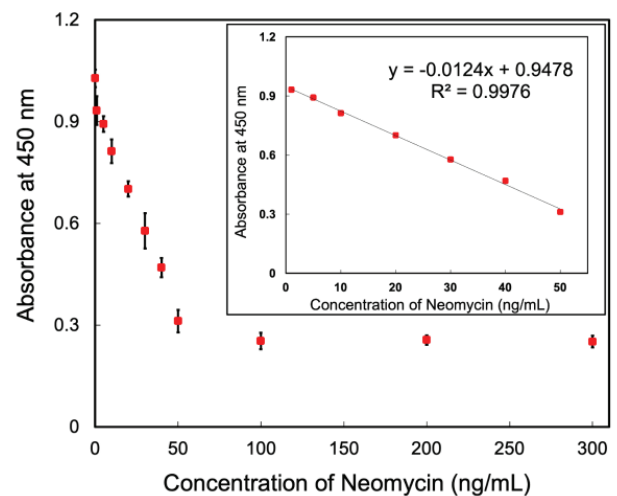


Figure 5 Standard calibration curve of the absorbance at 450 versus different concentration of neomycin and the linear section (inset) of standard curve using the developed competitive immuno- sensor. The error bars were obtained from triplicate experiments.

และ 300 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการวัดด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร เพื่อนำไปหาความเข้มข้นของนีโอไมซินในตัวอย่างน้ำนมดิบ นอกจากนั้นยังนำข้อมูลที่ได้ไปหาขีดจำกัดในการตรวจวัด (Limit of detection, LODs) และขีดจำกัดในการตรวจวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQs) รวมถึง ความแม่นยำในการตรวจวัด (precision)

ผลการศึกษากราฟมาตรฐานและช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์สารตกค้างนีโอไมซินด้วยเทคนิคอิมมูโนเซ็นเซอร์แบบแข่งขัน ดังแสดงใน Figure 5 พบว่า เมื่อความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานนีโอไมซินมากขึ้น ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จะมีการลดลงอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากมีการแข่งขันเพิ่มขึ้นของสารนีโอไมซินอิสระในการจับกับแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยโไบโอดีน ทำให้ปริมาณของแอนติบอดีที่สามารถจับกับนีโอไมซินที่ตรึงอยู่บนไมโครเพลตน้อยลง จึงมีค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงตามลำดับ ดังที่แสดงให้เห็นความเข้มข้นของสีเหลืองเมื่อหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟิวริกที่ลดลงตามความเข้มข้นที่มากขึ้นของสารละลายมาตรฐานนีโอไมซิน จากผลการทดลองสรุปได้ว่า ช่วงความเป็นเส้นตรงในการการตรวจวัดสารตกค้างนีโอไมซินด้วยเทคนิคอิมมูโนเซ็นเซอร์แบบแข่งขัน อยู่ในช่วง 1-50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรและค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.9976

การศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบและขีดจำกัดในการตรวจวัดเชิงปริมาณของวิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนา ทำได้โดยการทดลอง 10 ซ้ำด้วยสารละลายแบบลบล้าง (Blank solution) ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำไปหาค่าส่วนเบี่ยงเบน

มาตรฐาน (Standard deviation, SD) พบว่า มีค่าเท่ากับ 0.018 จากนั้นนำค่า SD มาคำนวณหาขีดจำกัดในการตรวจพบและขีดจำกัดในการตรวจวัดเชิงปริมาณโดยใช้ความสัมพันธ์ $3SD/m$ และ $10SD/m$ ตามลำดับ เมื่อ m คือค่าความชันที่ได้จากสมการเส้นตรง (slope=0.0124) จึงสรุปได้ว่า ขีดจำกัดในการตรวจพบมีค่าเท่ากับ 4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 4 ppb และขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณมีค่าเท่ากับ 14 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 14 ppb ขีดจำกัดในการตรวจวัดนีโอไมซินโดยใช้เทคนิคอิมมูโนเซ็นเซอร์แบบแข่งขันความว่องไวสูง โดยเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคอิมมูโนเซ็นเซอร์ที่ได้รายงานก่อนหน้านี้พบว่า เทคนิคที่พัฒนาครั้งนี้มีความว่องไวเทียบเท่าหรือมากกว่าในบางวิธีที่ผ่านมา (Zhu *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2009; Beloglazova *et al.*, 2016; Luo *et al.*, 2016; Qin *et al.*, 2022)

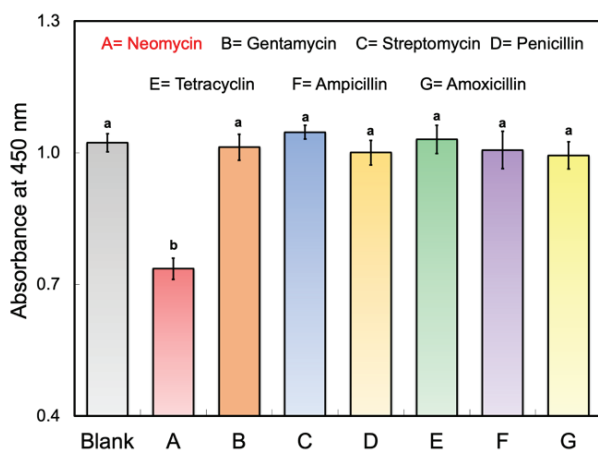


Figure 6 The absorbance at 450 nm of the proposed competitive immunosensor for neomycin and six other interference antibiotics. The antibiotics concentration is 10 ng/mL. Different letters above the bars indicate statistically significant difference at $P < 0.05$ (one-way ANOVA, $N=3$). The error bars were obtained from triplicate experiments.

ความแม่นยำในการ The error bars were obtained from triplicate experiments ตรวจวัดสารตกค้างนีโอไมซินด้วยเทคนิคอิมมูโนเซ็นเซอร์แบบแข่งขัน สามารถทำได้โดยการวิเคราะห์ซ้ำ (Repeatability) โดยเลือกใช้สารละลายมาตรฐานนีโอไมซิน ที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์จำนวน 7 ซ้ำ ภายใต้สภาวะเดียวกัน และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรไปคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative Standard Deviation ; RSD) พบว่า ผลการวิเคราะห์หาปริมาณนีโอไมซิน ที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 3.7 ซึ่งเป็นค่าที่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าวิธีตรวจวิเคราะห์สารตกค้างนีโอไมซินด้วยเทคนิคอิมมูโนเซ็นเซอร์แบบแข่งขันที่พัฒนาขึ้นมานั้นมีความแม่นยำสูงในการวิเคราะห์

4. ความจำเพาะเจาะจงของเทคนิคอิมมูโนเซ็นเซอร์แบบแข่งขันต่อยาปฏิชีวนะนีโอไมซิน

เพื่อให้อิมมูโนเซ็นเซอร์แบบแข่งขันที่ได้พัฒนาขึ้นนั้นมีความจำเพาะเจาะจงต่อยาปฏิชีวนะนีโอไมซินในน้ำนมดิบ จึงได้ทำการตรวจวัดยาปฏิชีวนะชนิดอื่นที่มีโอกาสสูงที่จะพบในน้ำนมดิบซึ่งอาจจะมีผลรบกวนการวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะนีโอไมซินได้ ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกยาปฏิชีวนะกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์มา 2 ชนิด คือ เจนตามัยซิน และสเตรปโตมัยซิน ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับนีโอไมซิน เนื่องจากอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และเลือกยาปฏิชีวนะกลุ่มอื่นที่พบบ่อยในน้ำนมดิบ เช่น เพนนิซิลลิน เตตระไซคลิน แอมพิซิลลิน และ อะม็อกซิซิลลิน มาทดสอบด้วยวิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนา โดยตรวจวัดที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของนีโอไมซินที่ความเข้มข้น 0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (สารละลายแบลนด์) และ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการศึกษาดังแสดงใน Figure 6 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงเมื่อทดสอบด้วยยาปฏิชีวนะที่เลือกมาทดสอบทุกชนิดทั้งในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์และกลุ่มอื่นนั้นไม่มีความต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับสารละลายแบลนด์ เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม one-way ANOVA หมายความว่า ยาปฏิชีวนะชนิดอื่นไม่สามารถรบกวนการวิเคราะห์นีโอไมซินด้วยเทคนิคอิมมูโนเซ็นเซอร์แบบแข่งขันที่ได้พัฒนา ในขณะที่การทดสอบยาปฏิชีวนะนีโอไมซินนั้นค่าการดูดกลืนแสงมีค่าลดลงอย่างเห็นได้ชัดที่ความเข้มข้นเดียวกัน จึงสรุปได้ว่าวิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาในครั้งนี้นี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อยาปฏิชีวนะนีโอไมซินสูง

5. การตรวจวัดการตกค้างของนีโอไมซินในตัวอย่างจริงของน้ำนมดิบ

เมื่อนำตัวอย่างน้ำนมดิบมาทั้ง 3 ชนิดคือ A B และ C ที่ได้จากฟาร์มโคนมของเกษตรกรในจังหวัดสระบุรีและปทุมธานี มาวิเคราะห์หาการตกค้างของยาปฏิชีวนะ นีโอไมซินว่าอยู่ในระดับที่ปลอดภัยหรือไม่ โดยใช้เทคนิคอิมมูโนเซ็นเซอร์แบบแข่งขันที่ได้พัฒนา ผลการศึกษาแสดงดัง Table 1 พบว่า ไม่พบการตกค้างของยาปฏิชีวนะนีโอไมซินในตัวอย่างน้ำนมดิบชนิด A และ C แต่พบการตกค้างในตัวอย่างชนิด B ในปริมาณ 14 ไมโครกรัมต่อลิตร แต่ปริมาณที่พบนั้นยังต่ำกว่า ค่าขีดจำกัดการตรวจพบ (MRLs) ที่กำหนดไว้พบได้ไม่เกิน 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Luan *et al.*, 2020) ในปัจจุบันประเทศไทยยังไม่ได้กำหนดค่าขีดจำกัดการตรวจพบยาปฏิชีวนะนีโอไมซินในน้ำนมดิบ แต่การตรวจวัดการตกค้างของนีโอไมซินมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องดำเนินการเพื่อควบคุมการใช้ยาปฏิชีวนะให้ปลอดภัยต่อผู้บริโภค

Table 1 Neomycin residues detection in raw milk samples using the proposed competitive immuno- sensor ($n=3$).

Raw milk samples	Neomycin concentration ($\mu\text{g/L}$)
A	ND
B	14 ± 1.5
C	ND
Blank	ND

* ND= Not detected

เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขันในการตรวจวัดการตกค้างของนีโอมัยซินในตัวอย่างจริงของน้ำนมดิบ จึงได้ศึกษาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (% Recovery) โดยนำสารละลายมาตรฐาน นีโอมัยซินที่ทราบความเข้มข้นเติมลงในน้ำนมดิบทั้ง 3 ชนิด (Sample Spike) ที่ความเข้มข้น 1 10 และ 30 ไมโครกรัมต่อลิตร จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน

จากการศึกษาพบว่า เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนอยู่ในช่วง 85 ถึง 111 เปอร์เซ็นต์ และค่า %RSD อยู่ในช่วง 2.21 ถึง 11.61 ดังแสดงใน Table 2 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ทางเคมีวิเคราะห์ จึงสรุปได้ว่าเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขันที่ได้พัฒนานั้นมีความแม่นยำ และความถูกต้องสูงในการวิเคราะห์การตกค้างของนีโอมัยซินในน้ำนมดิบ

Table 2 Recovery of neomycin spiked in three raw milk samples by the developed competitive immunosensor ($n=3$).

Raw milk samples	Neomycin concentration ($\mu\text{g/L}$)			Rate of Recovery (%)	RSD (%)
	Native level	Spiked	Found		
A	0	1	0.93	93	9.40
	0	10	10.26	103	9.35
	0	30	28.72	96	2.21
B	14	1	15.11	111	3.27
	14	10	24.77	108	3.77
	14	30	40.80	89	2.96
C	0	1	1.04	104	11.61
	0	10	9.46	94	5.27
	0	30	25.65	85	5.01

Table 3 Comparison with immunosensor and others analytical methods in the determination of neomycin in milk samples.

Methods	Limit of detection LOD ($\mu\text{g/L}$)	Recovery rate (%Recovery)	Reference
Liquid chromatography mass spectroscopy (LC-MS)	50	80-98	Arsand <i>et al.</i> (2016)
Imprinting membrane (MIPs)	7	97-104	Lian <i>et al.</i> (2013)
Surface plasmon resonance sensing (SPR)	6.14	-	de-los-Santos-Alvarez <i>et al.</i> (2009)
Fluorescent polarization immunosensor	4	-	Beloglazova <i>et al.</i> (2016)
Enzyme linked immunosensor	3	87-108	Jin <i>et al.</i> (2009)
Amperometric immunosensor	6.7	95-113	Zhu <i>et al.</i> (2010)
Colorimetric immunosensor	5	75-105	Wang <i>et al.</i> (2009)

Table 3 Comparison with immunosensor and others analytical methods in the determination of neomycin in milk samples. (cont.)

Methods	Limit of detection LOD ($\mu\text{g/L}$)	Recovery rate (%Recovery)	Reference
Chemiluminescent immunosensor	9.4	89-105	Luo <i>et al.</i> (2016)
Antibody-based immunochromatographic	8	-	Qin <i>et al.</i> (2022)
Competitive colorimetric immunosensor	4	85-111	<u>This work</u>

เมื่อทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจวัดการตกค้างของนีโอมัยซินในตัวอย่างน้ำนมด้วยเทคนิคอิมมูโนเซ็นเซอร์แบบแข่งขันที่ได้พัฒนามากับวิธีวิเคราะห์อื่นที่ใช้ LC-MS SPR และ MIPs หรือเปรียบเทียบกับเทคนิคอิมมูโนเซ็นเซอร์ที่ได้พัฒนามาก่อนหน้านี้ ดังแสดงใน Table 3 พบว่าวิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอิมมูโนเซ็นเซอร์แบบแข่งขันนั้นมีความไวในการวิเคราะห์สูงเทียบเท่าและมากกว่าในบางวิธีวิเคราะห์ แต่ถ้าเทียบกับวิธี LC-MS และ SPR นั้นมีข้อได้เปรียบคือมีขั้นตอนในการวิเคราะห์ที่ไม่ยุ่งยาก ผู้ใช้ไม่จำเป็นต้องมีความชำนาญเป็นพิเศษและมีค่าใช้จ่ายที่ไม่แพง รวมทั้งมีศักยภาพที่จะพัฒนาวิธีวิเคราะห์ให้ใช้งานง่ายยิ่งขึ้นไปอีกด้วยการพัฒนาเป็น วิธีทดสอบด้วยสีที่ใช้งานร่วมกับสมาร์ตโฟนในการวิเคราะห์ (Lu *et al.*, 2023) ซึ่งเหมาะกับการใช้งานภาคสนามหรือนำไปให้เกษตรกรใช้ทดสอบเบื้องต้นได้

สรุปผลการทดลอง

การศึกษานี้เป็นการพัฒนาเทคนิคอิมมูโนเซ็นเซอร์แบบแข่งขันที่ให้สัญญาณการวิเคราะห์เป็นสีที่เกิดจากการเร่งของเอนไซม์ HRP ที่ถูกจับอยู่ในไมโครเพลทกับ TMB ในสถานะมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งตอบสนองต่อปริมาณการตกค้างของยาปฏิชีวนะนีโอมัยซินในน้ำนมดิบในแบบผกผัน โดยความเข้มของสีและสัญญาณจะลดลงเมื่อในตัวอย่างน้ำนมดิบมีปริมาณการตกค้างของยาปฏิชีวนะนีโอมัยซินมากขึ้น เมื่อทำการวิเคราะห์ที่สภาวะที่เหมาะสม พบว่า เทคนิคอิมมูโนเซ็นเซอร์แบบแข่งขันที่ได้พัฒนามานั้นมีประสิทธิภาพที่ดีมากในการวิเคราะห์นีโอมัยซิน มีความไวในการวิเคราะห์สูง ปริมาณต่ำสุดที่วัดได้คือ 4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (4 ppb) มีความแม่นยำ มีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อนีโอไมซิน และสามารถวิเคราะห์หาการตกค้างของนีโอมัยซินในตัวอย่างน้ำนมดิบได้แม่นยำและมีความถูกต้อง เพราะฉะนั้นเทคนิคอิมมูโนเซ็นเซอร์แบบแข่งขันที่พัฒนาในครั้งนี้จึงมีความเป็นไปได้และความเหมาะสมที่จะนำไปเป็นวิธีวิเคราะห์การตกค้างของยาปฏิชีวนะ นีโอไมซินในน้ำนมดิบหรือตัวอย่างอาหารจากนม เพื่อควบคุมการใช้ยาปฏิชีวนะให้อยู่ในระดับที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนเงินวิจัยจากกองทุนส่งเสริมงานวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ประเภททุน“นักวิจัยรุ่นใหม่” ประจำปี พ.ศ.2566 (สัญญาเลขที่ NRF66D0601)

เอกสารอ้างอิง

- Abualhasan, M. N., Batrawi, N., Sutcliffe, O. B., & Zaid, A. N. (2012). A validated stability-indicating HPLC method for routine analysis of an injectable lincomycin and spectinomycin formulation. *Scientia pharmaceutica*, 80 (4), 977–986. <https://doi.org/10.379/scipharm.1207-13>
- Arsand, J. B., Jank, L., Martins, M. T., Hoff, R. B., Barreto, F., Pizzolato, T. M., & Sirtori, C. (2016). Determination of amino glycoside residues in milk and muscle based on a simple and fast extraction procedure followed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry and time of flight mass spectrometry. *Talanta*, 154, 38-45. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.03.045>
- Beloglazova, N., Shmelin, P., & Eremin, S. (2016). Sensitive immunochemical approaches for quantitative (FPIA) and qualitative (lateral flow tests) determination of gentamicin in milk. *Talanta*, 149, 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.11.060>
- Cháfer-Pericás, C., Maquieira, Á., & Puchades, R. (2010). Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 29(9), 1038–1049. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.06.004>

- Chen, Y., Shang, Y., Wu, X., Qi, Y., & Xiao, X. (2007). Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of neomycin in milk: effect of hapten heterology on assay sensitivity. *Food and Agricultural Immunology*, 18, 117–128. <https://doi.org/10.1080/09540100701579829>
- Cheubong, C., Sunayama, H., Takano, E., Kitayama, Y., Minami, H., & Takeuchi, T. (2023). A rapid abiotic/biotic hybrid sandwich detection for trace pork adulteration in halal meat extract *Nanoscale*, 15(37), 15171–15178. <https://doi.org/10.1039/d3nr02863a>
- de-los-Santos-Alvarez, N., Lobo-Castañón, M. J., Miranda-Ordieres, A. J., & Tuñón-Blanco, P. (2009). SPR sensing of small molecules with modified RNA aptamers: detection of neomycin B. *Biosensors & bioelectronics*, 24(8), 2547–2553. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.01.011>
- García-Campaña, A. M., Gámiz-Gracia, L., Lara, F. J., del Olmo Iruela, M., & Cruces-Blanco, C. (2009). Applications of capillary electrophoresis to the determination of antibiotics in food and environmental samples. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 395(4), 967–986. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2867-9>
- Giang, N.T., & Huan, L.Q. (2021). Developing an electrochemical aptasensor using a specific aptamer to detect neomycin antibiotic in milk. *Vietnam Journal of Food Control*. 4(3), 239-250. <https://doi.org/10.47866/2615-9252/vjfc.3830>
- Glinka, M., Wojnowski, W., & Wasik, A. (2020). Determination of aminoglycoside antibiotics: Current status and future trends. *Trends in Analytical Chemistry*, 131, 116034. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116034>
- He, J. J., Wang, Y., & Zhang, X. Y. (2016). Preparation of artificial antigen and development of IgY- based indirect competitive ELISA for the detection of kanamycin residues. *Food Analytical Methods*, 9(3), 744–751. <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0248-x>
- Ianni, F., Pucciarini, L., Carotti, A., Saluti, G., Moretti, S., Ferrone, V., Sardella, R., Galarini, R., & Natalini, B. (2018). Hydrophilic interaction liquid chromatography of aminoglycoside antibiotics with a diol-type stationary phase *Analytica chimica acta*, 1044, 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.08.008>
- Jiang, L., Wei, D., Zeng, K., Shao, J., Zhu, F. & Du, D., 2018. An enhanced direct competitive immunoassay for the detection of kanamycin and tobramycin in milk using multienzyme-particle amplification. *Food Analytical Methods*, 11, 2066-2075. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1185-2>
- Jin, Y., Jang, J. W., Lee, M. H., & Han, C. H. (2006). Development of ELISA and immuno chromatographic assay for the detection of neomycin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 364, 260–266. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.07.024>
- Jospe-Kaufman, M., Siomin, L., & Fridman, M. (2020). The relationship between the structure and toxicity of aminoglycoside antibiotics. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 30(13), 127218. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127218>
- Li, J., Luo, M., Jin, C., Zhang, P., Yang, H., Cai, R., & Tan, W. (2022). Plasmon-Enhanced Electrochemiluminescence of PTP-Decorated Eu MOF-Based Pt-Tipped Au Bimetallic Nanorods for the Lincomycin Assay. *ACS applied materials & interfaces*, 14(1), 383–389. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c21528>
- Lian, W., Liu, S., Yu, J., Li, J., Cui, M., Xu, W., & Huang, J. (2013). Electrochemical sensor using neomycin-imprinted film as recognition element based on chitosan-silver nanoparticles/graphene-multiwalled carbon nanotubes composites modified electrode, *Biosensors & bioelectronics*, 44, 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.01.002>
- Liu, C., Jiang, Y. L., Xiu, L. Y., Qian, R. J., Zhao, M. X., Lou, P. J., Ke, Y. B., Li, G. M., & Jiang, W. X. (2021). Ultratrace analysis of neomycin residues in milk at femtogram levels by flow-through immunoaffinity chromatography test. *Food Analytical Methods*, 14(11), 2298–2307. <https://doi.org/10.1007/s12161-021-02058-5>
- Lu, W., Guo, Y., Yue, Y., Zhang, J., Fan, L., Li, F., Zhao, Y., Dong, C. & Shuang, S., 2023. Smartphone-assisted colorimetric sensing platform based on molybdenum-doped carbon dots nanozyme for visual monitoring of ampicillin. *Chemical Engineering Journal*, 468, 143615. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.143615>

- Luan, Y., Wang, N., Li, C., Guo, X., & Lu, A. (2020). Advances in the Application of Aptamer Biosensors to the Detection of Amino- glycoside Antibiotics. *Antibiotics*, 9 (11), 787. <http://doi:10.3390/antibiotics9110787>
- Luo, P. J., Zhang, J. B., Wang, H. L., Chen, X., Wu, N., Zhao, Y. F., Wang, X. M., Zhang, H., Zhang, J. Y., Zhu, L., & Jiang, W. X. (2016). *Rapid and sensitive chemiluminescent enzyme immunoassay for the determination of neomycin residues in milk. Biomedical and Environmental Sciences*, 29(5), 374–378. <https://doi.org/10.3967/bes2016.048>
- Merola, G., Martini, E., Tomassetti, M., & Campanella, L. (2014). New immunosensor for β -lactam antibiotics determination in river waste waters. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 199, 301-313. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.03.083>
- Ogier, J. M., Lockhart, P. J., & Burt, R. A. (2020). Intravenously delivered aminoglycoside antibiotics, tobramycin and amikacin, are not ototoxic in mice. *Hearing research*, 386 107870. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2019.107870>
- Pandey, S., Dhanani, J., Lipman, J., Roberts, J. A., Wallis, S. C., & Parker, S. L. (2020). Development and validation of LC-MS/MS methods to measure tobramycin and lincomycin in plasma, microdialysis fluid and urine: application to a pilot pharma cokinetic research study. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 58(2), 274–284. <https://doi.org/10.1515/cclm-2019-0780>
- Qin, K., Ding, M., Zhang, C., Zhang, X., Mao, Y., Dang, M., & Zhang, X. (2022). Development of a sensitive monoclonal antibody-based immunochromatographic strip for neomycin detection in milk. *Food and Agricultural Immunology*, 33(1), 315–327. <https://doi.org/10.1080/09540105.2022.2070606>
- Rosenberg, C. R., Fang, X., & Allison, K. R. (2020). Potentiating aminoglycoside antibiotics to reduce their toxic side effects. *PloS one*, 15(9), e0237948. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237948>
- Salama, I., & Gomaa, M. S. (2013). Comparative determination of miconazole, nystatin, hydrocortisone and neomycin by HPTLC/HPLC-DAD. *European journal of Chemistry*, 4(1), 29-34. <https://doi.org/10.5155/eurjchem.4.1.29-34.721>
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., & Walsh, T.R. (2016). Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *Int J Antimicrob Agents*, 12, 431–437. [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(01\)00297-7](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(01)00297-7)
- Tzanavaras, P. D., & Themelis, D. G. (2007). *Review of recent applications of flow injection spectrophotometry to pharmaceutical analysis. Analytica Chimica Acta*, 588(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.01.060>
- van Duijkeren, E., Schwarz, C., Bouchard, D., Catry, B., Pomba, C., Baptiste, K. E., Moreno, M. A., Rantala, M., Ružauskas, M., Sanders, P., Teale, C., Wester, A. L., Ignate, K., Kunsagi, Z., & Jukes, H. (2019). The use of aminoglycosides in animals within the EU: development of resistance in animals and possible impact on human and animal health: a review. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 74(9), 2480–2496. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz161>
- Wang, S., Xu, B., Zhang, Y., & He, J. X. (2009). Development of enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA) for the detection of neomycin residues in pig muscle, chicken muscle, egg, fish, milk and kidney. *Meat science*, 82(1), 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.12.003>
- Wang, X., Yang, S., Li, Y., Zhang, J., Jin, Y., Zhao, W., Zhang, Y., Huang, J., Wang, P., Wu, C., & Zhou, J. (2018). Optimization and application of parallel solid-phase extrac- tion coupled with ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of 11 aminoglycoside residues in honey and roya royal jelly. *Journal of chromatography. A*, 1542, 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.02.029>
- Zhang, X. Y., Zhao, F. F., Sun, Y. W., Mi, T. J., Wang, L. Y., Li, Q., Li, J. Y., Ma, W. T., Liu, W. J., Zuo, J. N., Chu, X. Y., Chen, B., Han, W. M., & Mao, Y. X. (2020). Development of a highly sensitive lateral flow immunoassay based on receptor-antibody-amorphous carbon nanoparti- cles to detect 22 β -lactams in milk. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 321, 128458. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128458>

- Zhang, Q., He, L. Y., Rani, K. K., Wu, D. Y., Han, J. J., Chen, Y. H., & Su, W. J. (2021). Colorimetric detection of neomycin sulfate in tilapia based on plasmonic core-shell Au@PVP nanoparticles. *Food Chemistry*, 356, 129612. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129612>
- Zhu, Y., Son, J. I., & Shim, Y. B. (2010). Amplification strategy based on gold nanoparticle-decorated carbon nanotubes for neomycin immunosensors. *Biosensors & Bioelectronics*, 26(3), 1002–1008. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.08.023>
- Zu, M., Jiang, J., Zhao, H., Zhang, S., Yan, Y., Qiu, S., Yuan, S., Han, J., Zhang, Y., Guo, W., & Yang, S. (2018). Rapid analysis of neomycin in cochlear perilymph of guinea pigs using disposable SPE cartridges and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 1093-1094, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.06.055>