การพัฒนาชุดทดสอบอิมมูโนโครมาโทกราฟีชนิดทราบผลเร็ว สำหรับคลอแรมเฟนิคอล ในเภสัชเคมีภัณฑ์

มาศวลัย ลิขิตธนเศรษฐ์ วลัยลักษณ์ เมธาภัทร และสุขศรี อึ้งบริบูรณ์ไพศาล
สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ คลอแรมเฟนิคอลเป็นยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์กว้าง ในประเทศไทยกำหนดเป็นยาที่ห้ามนำมาใช้กับสัตว์เลี้ยงเพื่อการบริโภคตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545 โดยถูกจัดเป็นเภสัชเคมีภัณฑ์ที่ควบคุมการนำเข้าภายในประเทศ การศึกษานี้เป็นการพัฒนาชุดทดสอบอิมมูโนโครมาโทกราฟีสำหรับคลอแรมเฟนิคอล เพื่อตรวจเภสัชเคมีภัณฑ์เบื้องต้นที่ด่านอาหารและยา ชุดทดสอบมีค่าความไวที่ตรวจสอบได้ (Limit of detection) เท่ากับ 1.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และไม่พบปฏิกิริยาข้ามกับไทแอมเฟนิคอล วิธีการเตรียมตัวอย่างสะดวกในขั้นตอนเดียว ด้วยการละลายตัวอย่างในเอทานอลผสมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ pH 8.0 (อัตราส่วน 1:3) และใช้เวลาทดสอบภายใน 10 นาที จากการทดสอบกับตัวอย่างเภสัชเคมีภัณฑ์ ที่เก็บจากด่านอาหารและยาท่าเรือ และสุวรรณภูมิ จำนวน 92 ตัวอย่าง พบว่าให้ผลตรงกันกับวิธีอินฟราเรดสเปกโทรสโคปี ตามวิธีทางห้องปฏิบัติการของสำนักด่านอาหารและยา ชุดทดสอบมีการศึกษาความคงตัว ที่สภาวะการเก็บรักษาอุณหภูมิ 60 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 และ 60 วัน ตามลำดับ พบว่ายังสามารถใช้งานได้ดี ชุดทดสอบนี้สามารถพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้งานเฝ้าระวังคลอแรมเฟนิคอลที่ปนปลอมในอาหารสัตว์

บทนำ

คลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol) เป็นยาปฏิชีวนะ มีทั้งรูปตัวยาพื้น (base form) คุณสมบัติละลายน้ำได้เล็กน้อย (2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส) ละลายได้ดีในเอทานอลและเมทานอล[1] และรูปเกลือ (salt form) เช่น คลอแรมเฟนิคอลโซเดียมซัคซิเนท (chloramphenicol sodium succinate) ละลายน้ำได้ดีมาก ละลายได้ในเอทานอล 1 ใน 1 ส่วน คลอแรมเฟนิคอลออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างโปรตีนของเชื้อแบคทีเรีย ออกฤทธิ์กว้างต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวก (gram positive) แกรมลบ (gram negative) และแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic bacteria) สามารถใช้รักษาการติดเชื้อทั้งในคนและในสัตว์ได้ เนื่องด้วยคุณสมบัติการทำลายเชื้อแบคทีเรียได้กว้าง และราคาไม่แพง จึงมีการลักลอบนำมาใช้เลี้ยงสัตว์ส่งออก เช่น กุ้ง ไก่ เพื่อช่วยให้ได้ผลผลิตดี เมื่อปี พ.ศ. 2544 มีเหตุการณ์เรื่องสหภาพยุโรปตรวจพบยาตกค้างในผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็ง และระงับการนำเข้าสินค้าจากประเทศจีน อินโดนีเซีย และเวียดนาม[2]

คลอแรมเฟนิคอล เป็นยาที่องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (United States Food and Drug Administration : USFDA) ไม่อนุญาตให้ใช้กับสัตว์ที่มนุษย์บริโภคเป็นอาหาร เพราะหากตกค้างในเนื้อสัตว์ อาจก่อให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ที่รุนแรงชนิดไม่ขึ้นกับขนาดยา คือภาวะโลหิตจางจากไขกระดูกฝ่อ (aplastic anemia) และในทารกก่อให้เกิดกลุ่มอาการเกรย์

Accepted for publication, 22 November 2013

(gray syndrome) จนเป็นเหตุให้ถึงขั้นเสียชีวิตได้ สำหรับประเทศไทยได้มีคำสั่งกระทรวงสาธารณสุขให้เพิกถอนใบสำคัญทะเบียนตำรับยาที่มีคลอแรมเฟนิคอล และอนุพันธ์ผสมอยู่ ที่นำมาใช้ในสัตว์ที่มนุษย์ใช้บริโภคทุกรูปแบบมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2531[3] และสั่งห้ามใช้เป็นวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์เมื่อปี พ.ศ. 2545 ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์[4] อย่างไรก็ตามยังคงทะเบียนตำรับยาที่ใช้กับมนุษย์ไว้ เนื่องจากเป็นยาที่มีประสิทธิภาพดี มีข้อบ่งใช้สำหรับโรคติดเชื้อเฉพาะ เช่น ไทฟอยด์ ไข้รากสาดใหญ่[5] คลอแรมเฟนิคอลจึงเป็นยาในบัญชียาหลักแห่งชาติ มีหลายรูปแบบ (dosage form) ได้แก่ ยาหยอด/ป้ายตา ยาหยอดหู และยาฉีด[6] ดังนั้นยังมีการนำเข้าเภสัชเคมีภัณฑ์ เพื่อผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ยาใช้ภายในประเทศ จึงต้องมีมาตรการกำกับดูแลการนำเข้า โดยออกประกาศกระทรวงพาณิชย์ เมื่อปี พ.ศ. 2545[7] ส่งผลให้คลอแรมเฟนิคอล และเภสัชเคมีภัณฑ์อื่น ๆ ตามประกาศฯ ฉบับนี้ เป็นสินค้าที่ต้องขออนุญาตนำเข้ามาในราชอาณาจักร ซึ่งต้องมีการจัดทำเอกสาร หรือหลักฐานประกอบคำขออนุญาตนำเข้าอย่างถูกต้องตามกฎหมาย และเจ้าหน้าที่ด่านอาหารและยาทั่วประเทศต้องเฝ้าระวัง โดยการสุ่มตรวจเภสัชเคมีภัณฑ์เพื่อป้องกันลักลอบนำเข้าโดยการสำแดงเท็จ

วิธีตรวจเอกลักษณ์คลอแรมเฟนิคอลมีระบุไว้ในตำรายา เช่น ตำรายาของสหรัฐอเมริกา (The United States Pharmacopeia 35th: USP 35)[8] กำหนดวิธีทดสอบตัวยาพื้นและเกลือแตกต่างกัน โดยคลอแรมเฟนิคอลใช้วิธีอินฟราเรดสเปกโทรสโคปี (Infrared spectroscopy) หรือวิธีลิควิด โครมาโทกราฟี (Liquid chromato graphy : LC) สำหรับคลอแรมเฟนิคอลโซเดียมซัคซิเนทใช้วิธีอัลตราไวโอเลต สเปกโทรสโคปี (Ultraviolet spectroscopy) ซึ่งวิธีทดสอบเหล่านี้ต้องใช้เครื่องมือตรวจวิเคราะห์ และทำในห้องปฏิบัติการ ใช้ระยะเวลาตรวจสอบและรอคอยผล ไม่เหมาะกับงานตรวจสอบเบื้องต้นสำหรับตัวอย่างจำนวนมาก

สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สนับสนุนการดำเนินงานเฝ้าระวังเพื่อตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอล โดยผลิตชุดทดสอบเบื้องต้นให้สำนักด่านอาหารและยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ใช้สุ่มตรวจเภสัชเคมีภัณฑ์ที่นำเข้า ชุดทดสอบชุดแรกอาศัยหลักการปฏิกิริยาทางเคมีและดูผลจากการเปลี่ยนสี (color test)[9] ปริมาณสารต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้คือ 100 ไมโครกรัม ซึ่งชุดทดสอบที่ตัดสินโดยการดูสีนั้นมีข้อจำกัดเรื่องความจำเพาะประกอบกับความไม่สะดวกในการใช้งาน จึงพัฒนาเป็นชุดทดสอบโดยอาศัยหลักการอิมมูโนโครมาโทกราฟี (Immunochromatography : IC) ด้วยเทคนิคแบบแข่งขัน (competitive binding) ซึ่งเหมาะกับการตรวจสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น ยาและสารพิษบางชนิด ตัวอย่างชุดทดสอบที่อาศัยหลักการนี้ เช่น ชุดทดสอบเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนในยาแผนโบราณ[10] ชุดทดสอบสารพิษเตโตรโดท็อกซินในเนื้อปลาปักเป้า[11] เป็นต้น วิธีอิมมูโนโครมาโทกราฟีเป็นวิธีที่ใช้แพร่หลายสำหรับการตรวจสอบเบื้องต้น เนื่องจากสามารถตรวจตัวอย่างได้ครั้งละจำนวนมาก มีความจำเพาะความไวสูง สามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า การศึกษานี้ได้พัฒนาชุดทดสอบอิมมูโนโครมาโทกราฟีสำหรับคลอแรมเฟนิคอล เพื่อตรวจเภสัชเคมีภัณฑ์เบื้องต้นที่ด่านอาหารและยา และใช้งานภาคสนาม

วัสดุและวิธีการ

วัสดุและสารเคมี :

- Chloramphenicol sodium succinate (CAP-succinate), Bovine serum albumin (BSA), Ovalbumin (OVA), gold (III) chloride trihydrate จาก Sigma Aldrich.
- N-hydroxysuccinimide (NHS), Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) จาก Fluka.
- Chloramphenicol monoclonal antibody จาก Meridian Life Science, Inc.
- Membrane AE 98fast, CF 17, glass fiber 33 และ standard 17 จาก Whatman Inc.

เครื่องมือ

1. Incubator model 800 จาก Memmert, Germany
2. เครื่องฉีดพ่นสารลง membrane รุ่น BJQ 3000 model XYZ 3200 จาก Biodot
3. UV spectrophotometer รุ่น Lambda 2S จาก PerkinElmer

ตัวอย่าง

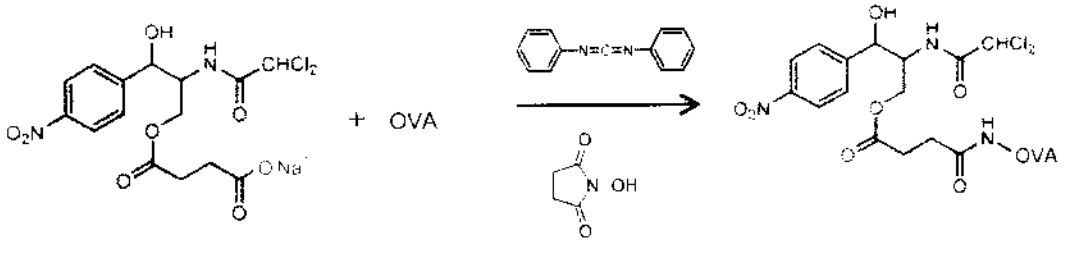
เภสัชเคมีภัณฑ์ที่สุ่มจากด่านอาหารและยา ณ ด่านท่าเรือและด่านสุวรรณภูมิ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ในช่วงเดือนกรกฎาคม ปี พ.ศ. 2555 จำนวน 92 ตัวอย่าง

วิธีการ

1. เตรียมคอนจูเกตคลอแรมเฟนิคอลกับโปรตีน[12]

เตรียมคลอแรมเฟนิคอลโซเดียมซัคซิเนท (CAP-succinate) คอนจูเกตกับ Ovalbumin (OVA) ด้วยวิธี activated ester method ดังนี้ (ภาพที่ 1) หยดสารละลาย DCC (0.07 mmol) และ NHS (0.14 mmol) ลงใน CAP-succinate (0.017 mmol) ที่ละลายใน dimethylformamide ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง และเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง ไปเปตเฉพาะส่วนใสซึ่งเป็น activated CAP-succinate มาทำปฏิกิริยากับ OVA (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในบอเรทบัฟเฟอร์ pH 9.6) ด้วย mole ratio ของ CAP-succinate : OVA เท่ากับ 7 : 1 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 4 ชั่วโมง และเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง กรองและ dialysis ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ครั้งละ 1,000 มิลลิลิตร เปลี่ยนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ วันละ 2 ครั้ง จำนวน 2 วัน ตรวจสอบคุณลักษณะของคอนจูเกตโปรตีนที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคอัลตราไวโอเลต สเปกโทรสโคปี และเก็บรักษาในหลอดทดสอบพลาสติกที่ปิดสนิทที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

2. เตรียม colloidal gold ขนาดอนุภาคเฉลี่ย 40 นาโนเมตร[13]



ภาพที่ 1 การคอนจูเกตคลอแรมเฟนิคอลโซเดียมซัคซิเนทกับ ovalbumin

เตรียมโดยเติม 1% w/v gold chloride 2.1 มิลลิลิตร ลงในน้ำต้มเดือด 200 มิลลิลิตร ในเวลา 2 นาที และเติม 1% w/v sodium citrate จำนวน 3.8 มิลลิลิตรลงไปอย่างเร็ว ต้มต่อนาน 3 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น นำไปตรวจสอบคุณลักษณะด้วยวิธีอัลตราไวโอเลต สเปกโทรสโคปี ซึ่งกำหนดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ที่ยอมรับ อยู่ระหว่าง 521 – 525 นาโนเมตร และ optical density (OD) อยู่ระหว่าง 0.9 – 1.2 เก็บ colloidal gold ที่เตรียมได้ ในภาชนะแก้วปิดสนิทที่อุณหภูมิ 2 – 8 องศาเซลเซียส

3. เตรียมคอนจูเกต colloidal gold กับคลอแรมเฟนิคอลแอนติบอดี

ปรับ pH ของ colloidal gold ที่เตรียมได้จากข้อ 2 ด้วย 0.2 M K_2CO_3 ให้เท่ากับ 8.0 จากนั้นเติมคลอแรมเฟนิคอลแอนติบอดี 5 ไมโครกรัมต่อ 1 มิลลิลิตรของ colloidal gold ผสมให้เข้ากัน เติม 1%w/v BSA ผสมเบา ๆ 30 นาที นำไปปั่นตกตะกอนที่ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที แยกเฉพาะส่วนของตะกอนมาละลายด้วย 1%w/v BSA ใน 0.05 M Na_2HPO_4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร และปรับให้ได้ค่า OD อยู่ในช่วง 10.0 – 10.5 พร้อมนำไปใช้งาน

4. เตรียมชุดทดสอบอิมมูโนโครมาโทกราฟีสำหรับคลอแรมเฟนิคอล

4.1 การเตรียม blocking membrane

- Nitrocellulose membrane : นำ AE98 fast แช่ใน membrane blocking buffer (0.01 M NaH_2PO_4, 0.1%w/v sucrose, 0.1%w/v BSA และ 0.25% w/v PVP) นาน 1 นาที ซับให้แห้ง อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

- Conjugate release pad : นำ glass fiber 33 แช่ใน conjugate pad blocking buffer (0.005 M $B_4Na_2O_7$, 3%w/v BSA, 1% w/v PVP และ 0.25% w/v Triton X-100) นาน 1 นาที ซับให้แห้ง อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง

- Sample pad : นำ standard 17 แช่ใน sample pad blocking buffer (0.25 M Trisaminomethane, 0.1% w/v BSA, 0.1%w/v Tween 20 และ 0.1% w/v sodium azide) นาน 1 นาที ซับให้แห้ง อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง

4.2 การพ่นแถบทดสอบ แถบควบคุม และคอนจูเกตของ colloidal gold

- พ่นแถบควบคุมด้วย anti-mouse Ig ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และพ่นแถบทดสอบด้วยคอนจูเกตโปรตีนที่เตรียมในข้อ 1. ปริมาณ 0.8 ไมโครลิตร/เซนติเมตร ลงบน nitrocellulose membrane อบที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

- พ่นคอนจูเกตของ colloidal gold ที่เตรียมในข้อ 3. ด้วยปริมาณ 10 ไมโครลิตร/เซนติเมตร ลงบน conjugate release pad อบที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง

4.3 การประกอบเป็นชุดทดสอบ

นำ membrane แต่ละส่วนมาประกอบบน backing card โดยใช้ CF17 membrane เป็น absorbent pad ประกอบให้ membrane แต่ละชิ้นเหลื่อมกันประมาณ 1 – 2 มิลลิเมตร เพื่อให้เกิดความต่อเนื่องของการไหล จากนั้นตัดให้มีขนาดกว้างชิ้นละ 4 มิลลิเมตร บรรจุลงตลับและเก็บในซองอะลูมิเนียมฟอยล์ที่ใส่สารดูดความชื้น เก็บรักษาที่ความชื้นสัมพัทธ์ไม่เกิน 30% ตลอดเวลา ก่อนนำไปทดสอบ

5. วิธีเตรียมตัวอย่างเภสัชเคมีภัณฑ์เพื่อทดสอบ

ใส่ตัวอย่างเภสัชเคมีภัณฑ์ในหลอดทดสอบ น้ำหนักประมาณ 20 มิลลิกรัม หรือประมาณปลายหลอดพลาสติกตักตัวอย่างซึ่งเป็นอุปกรณ์ในชุดทดสอบ เติมน้ำยาละลายตัวอย่างซึ่งเป็นสารละลายผสมของเอทานอลในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ pH 8.0 (อัตราส่วน 1:3) ปริมาณ 2.0 มิลลิลิตร เขย่านาน 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนกระทั่งมีน้ำยาส่วนใสแยกชั้น โดยระยะเวลาที่ใช้ขึ้นกับลักษณะของเภสัชเคมีภัณฑ์ หากผงยามีลักษณะเบาฟู จะแขวนตะกอนนาน โดยทั่วไปใช้เวลาประมาณ 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใสมาทดสอบโดยหยดบนช่องรับตัวอย่างของชุดทดสอบจำนวน 3 หยด และอ่านผลภายในเวลา 10 นาที

6. การทดสอบประสิทธิภาพของชุดทดสอบ

6.1 การทดสอบหาปริมาณต่ำสุดที่ตรวจได้โดยชุดทดสอบ (limit of detection : LOD)

เตรียมสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล และคลอแรมเฟนิคอลโซเดียมซัคซิเนท ในน้ำยาละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 0.003, 0.3, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งเป็นช่วงที่ครอบคลุมความเข้มข้นที่คาดว่าชุดทดสอบสามารถตรวจสอบได้ นำไปทดสอบกับชุดทดสอบที่เตรียมได้ตัวอย่างละ 5 ซ้ำ โดยความเข้มข้นของสารน้อยที่สุดที่ให้ผลบวกคือค่าความไวของชุดทดสอบ

6.2 การตรวจสอบความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) และคำนวณค่าความถูกต้องของชุดทดสอบ (accuracy)

ทดสอบกับเภสัชเคมีภัณฑ์ที่สุ่มจากด่านสุวรรณภูมิ และด่านท่าเรือที่ผ่านการตรวจสอบและทราบผลแล้วว่าคือคลอแรมเฟนิคอลหรือไม่ด้วยวิธีอินฟราเรดสเปกโทรสโคปี ซึ่งเป็นวิธีทางห้องปฏิบัติการที่ด่านอาหารและยาใช้ตรวจสอบเภสัชเคมีภัณฑ์ รวมจำนวน 92 ตัวอย่าง

- ตรวจสอบความไวของชุดทดสอบว่าให้ผลบวก เมื่อทดสอบกับตัวอย่างคลอแรมเฟนิคอล และคำนวณค่าความไวชุดทดสอบ คือ [ผลบวกจริง/(ผลบวกจริง + ผลลบปลอม)] × 100

- ตรวจสอบความจำเพาะของชุดทดสอบว่าให้ผลลบ เมื่อทดสอบกับตัวอย่างที่ไม่ใช่คลอแรมเฟนิคอล และคำนวณค่าความจำเพาะชุดทดสอบ คือ [ผลลบจริง/(ผลลบจริง + ผลบวกปลอม)] × 100

- คำนวณค่าความถูกต้องของชุดทดสอบ ดังนี้

$$\text{ร้อยละความถูกต้องของชุดทดสอบ} = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างที่ชุดทดสอบให้ผลตรงกับวิธีมาตรฐาน} \times 100}{\text{จำนวนตัวอย่างที่ทดสอบทั้งหมด}}$$

6.3 การตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reaction)

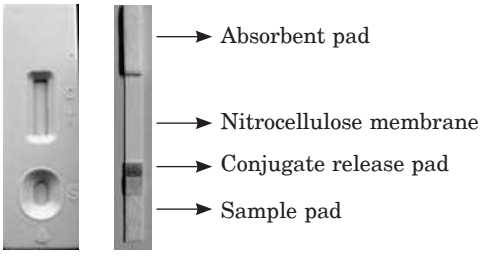
ทดสอบกับไทแอมเฟนิคอล (thiamphenicol) ซึ่งเป็นสารที่โครงสร้างใกล้เคียงกับคลอแรมเฟนิคอล และเภสัชเคมีภัณฑ์ที่มีใช้/ห้ามใช้ในปศุสัตว์บางรายการ เช่น อะมอกซีซิลิน ฟูราโซลิดีน เมโทรนิดาโซล ไนโตรฟูราน นอร์ฟลอกซาซิน ออกซีเตตร้าซัยคลิน ไปเปอราซีน ไพริดอกซีน สเตรปโตมัยซิน ซัลฟาไดอาซีน และเตตร้าซัยคลิน (amoxicillin, furazolidone, metronidazole, nitrofuran, norfloxacin, oxytetracycline, piperazine, pyridoxine, streptomycin, sulfadiazine and tetracycline) รวมจำนวน 12 ตัวอย่าง โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานทดสอบที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

6.4 การศึกษาความคงตัวของชุดทดสอบ (stability test)

เก็บชุดทดสอบในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 45 และ 60 องศาเซลเซียส สุ่มมาทดสอบตามช่วงเวลาที่กำหนด ดังนี้ ชุดทดสอบเก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สุ่มตรวจที่เวลา 1, 3, 7, 14, 30 และ 60 วัน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สุ่มตรวจที่เวลา 1, 3, 5, 7 และ 30 วัน ตามลำดับ ทดสอบด้วยสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ด้วยตัวอย่างที่ให้ผลลบ คือ อะมอกซีซิลิน เมโทรนิดาโซล ไทแอมเฟนิคอล และนอร์ฟลอกซาซิน ทดสอบด้วยตัวอย่างที่ให้ผลบวก คือ คลอแรมเฟนิคอล และคลอแรมเฟนิคอลโซเดียมซัคซิเนท บันทึกผลการทดสอบและสังเกตลักษณะแถบสีที่ปรากฏ

ผล

การศึกษานี้พัฒนาได้ชุดทดสอบอิมมูโนโครมาโทกราฟีสำหรับคลอแรมเฟนิคอล การใช้งานชุดทดสอบถูกบรรจุลงตลับ โดยมีหลุมสำหรับหยดตัวอย่างและช่องหน้าต่างแสดงผล (ภาพที่ 2) เมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพได้ผล ดังนี้

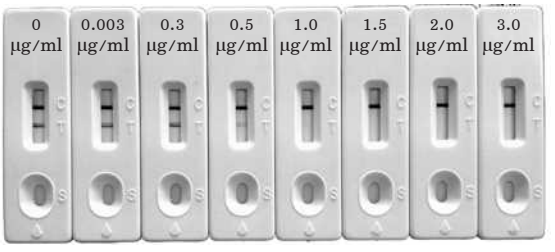


ภาพที่ 2 ชุดทดสอบเมื่อบรรจุลงตลับ และแสดงส่วนประกอบของชุดทดสอบเมื่อประกอบลงบน backing card

1. การทดสอบหาปริมาณต่ำสุดที่ตรวจได้โดยชุดทดสอบ

การทดสอบพบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ชุดทดสอบตรวจพบได้ คือ 1.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ภาพที่ 3) โดยชุดทดสอบปรากฏแถบสีแดง 1 เส้น ที่ตำแหน่ง C คือแถบควบคุม (Control line) เนื่องจากปริมาณคลอแรมเฟนิคอลในตัวอย่าง ได้จับกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อคลอแรมเฟนิคอลที่ถูกติดฉลากด้วยอนุภาคทองคำจนหมด ซึ่งอนุภาคทองคำที่ถูกติดฉลากเป็นตัวทำให้เกิดเส้นสีแดงที่ตำแหน่ง T คือแถบทดสอบ (Test line) เมื่อแอนติบอดีนี้เคลื่อนไปถึงแถบทดสอบ จึงไม่สามารถจับกับแอนติเจนที่พ่นไว้ได้อีก ทำให้ไม่ปรากฏสี แต่แถบควบคุมจะสามารถจับกับแอนติบอดีที่ติดฉลากได้ จึงปรากฏสีทุกครั้ง

ดังนั้น เมื่อปรากฏแถบสีแดง 1 เส้นที่แถบควบคุม คือ ผลเป็นบวก ตรวจพบคลอแรมเฟนิคอล หากปรากฏแถบสีแดง 2 เส้น ที่แถบควบคุมและแถบทดสอบ คือ ผลเป็นลบ ตรวจไม่พบคลอแรมเฟนิคอล หรือมีคลอแรมเฟนิคอลแต่ปริมาณน้อยกว่าค่าความไวของชุดทดสอบสามารถตรวจพบได้ ดังเช่น การทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 1.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่ยังปรากฏแถบสีแดง 2 เส้น



ภาพที่ 3 การทดสอบหาปริมาณต่ำสุดที่ชุดทดสอบตรวจได้

2. การตรวจสอบความไว ความจำเพาะ และค่าความถูกต้องของชุดทดสอบ

การทดสอบกับเภสัชเคมีภัณฑ์ที่สุ่มตรวจโดยเจ้าหน้าที่ด่านอาหารและยาจำนวน 92 ตัวอย่าง

เปรียบเทียบกับผลการทดสอบด้วยวิธีอินฟราเรดสเปกโทรสโคปี ผลการทดสอบไม่พบผลบวกปลอมและผลลบปลอมกับทุกตัวอย่างที่ทดสอบ (ตารางที่ 1) โดยตัวอย่างที่ให้ผลบวกมี 2 ตัวอย่าง คือ คลอแรมเฟนิคอล และคลอแรมเฟนิคอลโซเดียมซัคซิเนท ชุดทดสอบจึงมีค่าความไวเท่ากับ (2/2) × 100 = 100.0% และมีความจำเพาะเท่ากับ (90/90) × 100 = 100.0% ดังนั้นชุดทดสอบจึงมีค่าความถูกต้องร้อยละ 100

		วิธี Infrared spectroscopy:IR		
		ผลบวกจริง	ผลลบจริง	รวม
วิธีชุดทดสอบ	ผลบวก	2	0	2
	ผลลบ	0	90	90
	รวม	2	90	92

ตารางที่ 1 การทดสอบความถูกต้องการตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลด้วยชุดทดสอบเทียบกับวิธี IR spectroscopy

3. การตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามกับไทแอมเฟนิคอลและสารอื่น ๆ

ผลการทดสอบกับเภสัชเคมีภัณฑ์ที่มีใช้และห้ามใช้ในปศุสัตว์ รวมจำนวน 12 ตัวอย่าง พบว่าให้ผลเป็นลบทั้งหมด แสดงว่าชุดทดสอบมีความจำเพาะกับคลอแรมเฟนิคอล ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารที่ทดสอบ จึงไม่เกิดผลบวกลวง แม้ทดสอบกับไทแอมเฟนิคอลซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างคล้ายกัน

4. การศึกษาความคงตัวของชุดทดสอบ

ชุดทดสอบผ่านการทดสอบความคงตัว ในสภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 60 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 และ 60 วัน ตามลำดับ เมื่อสุ่มมาทดสอบตามระยะเวลาที่กำหนด ให้ผลการทดสอบถูกต้องทั้งผลบวกและผลลบ และปรากฏแถบสีชัดเจนสำหรับอ่านผล แสดงว่าสภาวะที่ทดสอบไม่ส่งผลต่อความไวและความจำเพาะของชุดทดสอบ

วิจารณ์

ชุดทดสอบในการศึกษานี้ พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ตรวจเอกลักษณ์สาร จึงเป็นการตรวจสอบเชิงคุณภาพ (qualitative test) ด้วยค่าความไวเท่ากับ 1.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร คือมีปริมาณคลอแรมเฟนิคอลขั้นต่ำ 2 ไมโครกรัม ที่ละลายอยู่ในน้ำยา 2 มิลลิลิตรตามวิธีเตรียมตัวอย่าง จะสามารถตรวจพบได้ จึงมีความไวสูงกว่าชุดทดสอบ color test ของสำนักยาและวัตถุเสพติด และเนื่องด้วยตัวอย่างทดสอบคือสารเคมีความบริสุทธิ์สูง สิ่งเจือปนน้อย จึงสามารถใช้วิธีเตรียมตัวอย่างภายในขั้นตอนเดียว โดยละลายในน้ำยาผสมเอทานอลกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ อัตราส่วน 1:3 โดยปริมาตร ซึ่งสามารถทำละลายได้ทั้งคลอแรมเฟนิคอล และคลอแรมเฟนิคอลโซเดียมซัคซิเนทเพื่อทดสอบได้ และปริมาณแอลกอฮอล์ที่ใช้ไม่ทำลายส่วนประกอบที่เป็นโปรตีนของชุดทดสอบ ให้การปรากฏแถบสีแดงชัดเจนไม่แตกต่างกับการทดสอบด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์อย่างเดียว การใช้สารละลายผสมแอลกอฮอล์และบัฟเฟอร์เพื่อเตรียมตัวอย่างนั้นพบได้ในชุดทดสอบอิมมูโนโครมาโทกราฟีอื่น ๆ เช่น ชุดทดสอบเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนในยาแผนโบราณ ใช้เอทานอลและฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ pH 7.4 ในอัตราส่วน 1:3 โดยปริมาตร[10] และชุดตรวจสอบสารพิษ deoxynivalenol ใช้สารละลายเมทานอล 33% โดยปริมาตรในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์[14] เป็นต้น ชุดทดสอบนี้สามารถพัฒนาเป็นชุดทดสอบสำเร็จรูป ทดแทนชุดทดสอบ color test และใช้งานภาคสนาม เนื่องจากการเตรียมตัวอย่างสะดวก อ่านผลได้ด้วยตาเปล่า และทราบผลทันที อย่างไรก็ตามสำหรับการ

ตรวจยืนยันผล ยังคงต้องใช้วิธีทางห้องปฏิบัติการ เนื่องจากการใช้ชุดทดสอบเป็นวิธีการตรวจสอบเบื้องต้น

จากการสืบค้นทางอินเทอร์เน็ต เพื่อสำรวจข้อมูลชุดทดสอบอิมมูโนโครมาโทกราฟีตรวจคลอแรมเฟนิคอลที่มีจำหน่ายในท้องตลาด พบว่ามีเฉพาะผลิตภัณฑ์จากต่างประเทศ[15,16] เป็นชุดตรวจสอบเชิงปริมาณ (quantitative test) ใช้ตรวจการปนปลอมในผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์ (feed animal) ค่า LOD 100 ppb (part per billion) และตรวจสารตกค้างในผลิตภัณฑ์จากนม ไข่ เนื้อสัตว์ และน้ำผึ้ง ค่า LOD 0.1 ppb – 0.3 ppb ซึ่งค่า LOD ของชุดตรวจปริมาณสารตกค้างสอดคล้องกับข้อกำหนด Minimum required performance limits (MRPLs) ของสหภาพยุโรปกำหนดคือ 0.3 ไมโครกรัม/กิโลกรัม (0.3 ppb)[17] ซึ่งชุดทดสอบในการศึกษานี้ มีระดับการตรวจพบได้ไม่เพียงพอใช้ตรวจสารตกค้าง แต่สามารถพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้ตรวจการปนปลอมคลอแรมเฟนิคอลในอาหารสัตว์ได้ เนื่องจากเป็นการตรวจสารที่เจตนาใส่ลงไป เพื่อให้มีผลป้องกันหรือรักษาโรค ซึ่งต้องใส่ปริมาณมาก

สรุป

ชุดทดสอบอิมมูโนโครมาโทกราฟีสำหรับคลอแรมเฟนิคอลที่พัฒนาขึ้น มีประสิทธิภาพเพียงพอเพื่อใช้ตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลเบื้องต้นในตัวอย่างเภสัชเคมีภัณฑ์ ปริมาณสารต่ำสุดที่ตรวจสอบได้คือ 2 ไมโครกรัม ไม่พบปฏิกิริยาข้ามกับไทแอมเฟนิคอล ซึ่งเป็นสารที่โครงสร้างคล้ายกัน การใช้งานภาคสนามทำได้สะดวก ด้วยวิธีการเตรียมตัวอย่างในขั้นตอนเดียว ทราบผลภายใน 10 นาที ชุดทดสอบมีการศึกษาความคงตัวโดยเก็บที่อุณหภูมิ 60 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 และ 60 วัน ตามลำดับ ซึ่งยังคงประสิทธิภาพดี ชุดทดสอบนี้สามารถพัฒนาต่อยอด เพื่อใช้งานเฝ้าระวังคลอแรมเฟนิคอลที่ปนปลอมในอาหารสัตว์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นายชาญชัย เอื้อชัยกุล ผู้อำนวยการสำนักด่านอาหารและยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างเภสัชเคมีภัณฑ์และอนุญาตให้ทดสอบการใช้งานโดยเจ้าหน้าที่ด่านอาหารและยา

เอกสารอ้างอิง

1. Budavari S, editor. The Merck index. 11th ed. New Jersey: Merck & Co., Inc.; 1989. p. 318–319.
2. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข. ปัญหายาตกค้างในเนื้อสัตว์และแนวทางแก้ไข. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์องค์การทหารผ่านศึก; 2545. หน้า 2.
3. คำสั่งกระทรวงสาธารณสุขที่ 678/2531 เรื่องเพิกถอนทะเบียนตำรับยา. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 106 ตอนที่ 16 (ลงวันที่ 31 มกราคม 2532).
4. ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่องกำหนดชื่อ ประเภท ชนิด ลักษณะ คุณภาพ และมาตรฐานของอาหารสัตว์ พ.ศ. 2545 ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 119 ตอนพิเศษ 85 ง (ลงวันที่ 11 กันยายน 2545)
5. McEvoy GK, editors. AHFS drug information 2008. Bethesda, MD: American Society of Health-System Pharmacists; 2008.
6. บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2556. [ออนไลน์]. 2556; [สืบค้น 30 ก.ย. 2556]. เข้าถึงได้จาก URL: http://www.nlem.in.th/medicine/essential/list
7. ประกาศกระทรวงพาณิชย์ เรื่อง การนำยา เภสัชเคมีภัณฑ์ เกลือของเภสัชเคมีภัณฑ์ และเภสัชเคมีภัณฑ์กึ่งสำเร็จรูป เข้ามาในราชอาณาจักร พ.ศ. 2545 ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 119 ตอนพิเศษ 45 ง (ลงวันที่ 24 พฤษภาคม 2545)

8. The United States Pharmacopeia. The National Formulary. 35th ed. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention; 2013. p. 2606, 2614.
9. ชุดทดสอบคลอแรมเฟนิคอล 2. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.
10. วลัยลักษณ์ เมธาภัทร, มาศวลัย ลิขิตธนเศรษฐ์. ชุดทดสอบอิมมูโนโครมาโทกราฟีสำหรับเดกซ์ซาเมธาโซนและเพร็ดนิโซโลนในผลิตภัณฑ์สมุนไพร. วิชาการสาธารณสุข 2553; 19(1): 59-70.
11. อารี ทัตติยพงศ์, ดารินี พูลโสภา, นันทวรรณ เมฆา, จิราภา อุณหเลขกะ, ลัดดาวัลย์ โรจนพรรณทิพย์, พนาวัลย์ กลึงกลางดอน และคณะ. การพัฒนาชุดทดสอบสารพิษเตโตรโดท็อกซิน. ว กรมวิทย พ 2553; 52(3-4): 67-77.
12. มาศวลัย ลิขิตธนเศรษฐ์, วลัยลักษณ์ เมธาภัทร, สุขศรี อึ้งบริบูรณ์ไพศาล. การพัฒนาเทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนแอสเซย์เพื่อการตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลในอาหารกุ้งและอาหารลูกไก่. วารสารตำรายา 2553; 17(2): 44-53.
13. พิไลลักษณ์ อัคคไพบูลย์โอกาดะ. การเตรียม Colloidal Gold ขนาดอนุภาค 40 นาโนเมตร. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2554.
14. Kolosova Ay, Sibanda L, Dumoulin F, Lewis J, Duveiller E, Van Peteghem C, *et al.* Lateral-flow colloidal gold-based immunoassay for the rapid detection of deoxynivalenol with two indicator ranges. Anal Chim Acta 2008; 616(2): 235-44.
15. Hangzhou Nankai Biotech Co., Ltd., Chloramphenicol Rapid Test Kit. [online]. 2012; [cited 2013 Apr 12]. Available from: URL: http://www.tjskl.org.cn/company/hangzhou_nankai_biotech_co_ltd-lz-50bc4d3/page2.html.
16. Rapid immunological detection systems. [online]. 2012; [cited 2013 Apr 12]. Available from: URL: http://www.antiprot.com/pdf3/Rapid_test_strip.pdf.
17. Commission Decision 2003/181/EC: of 13 March 2003 amending Decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin.

Rapid Immunochromatographic (IC) Test for Chloramphenicol in Pharmaceutical Chemicals

Maswalai Likitthanasrat Waliluk Matapatara and Sooksri Ungboriboonpisal

Bureau of Drug and Narcotic, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi, 11000 Thailand.

ABSTRACT Chloramphenicol is a broad spectrum antibiotic, which is banned for use in food producing animals in Thailand since 2002. It is classified as a pharmaceutical chemical with strict control of import. The objective of this study was to develop a rapid immunochromatographic test for screening chloramphenicol in pharmaceutical chemicals at food and drug checkpoints. The limit of detection (LOD) of the test was 1.0 μg/ml with no cross-reaction with thiamphenicol. One-step sample preparation was required for this test using mixture of ethanol and phosphate buffer saline pH 8.0 (1:3) and the assay time took only 10 minutes. Ninety-two pharmaceutical chemical samples obtained from food and drug checkpoints at the Port authority of Thailand and Suvarnabhumi airport were evaluated using this test and the results were in agreement with the laboratory method, infrared spectroscopy method by the Import and Export Inspection Bureau. The test also studied storage stability test under condition at 60°C and 45°C for 30 and 60 days, respectively. It was found that the test strips remained functional and stable during storage. This test can be further developed for screening of adulterated chloramphenicol in animal feeds.

Key words: Chloramphenicol, immunochromatography, pharmaceutical chemicals