การประยุกต์ใช้อิมมูโนเซนเซอร์สำหรับการวิเคราะห์ทางอาหาร

Applications of Immunosensors for Food Analysis

ศิริวรรณ ตี้ภู่*

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

Siriwan Teepoo*

Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi.

บทคัดย่อ

อิมมูโนเซนเซอร์เป็นวิธีวิเคราะห์ที่อาศัยการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน ข้อดีของวิธีนี้คือ มีความจำเพาะสูง ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยและราคาถูก จากข้อดีดังกล่าวจึงทำให้ในปัจจุบันได้ประยุกต์อิมมูโนเซนเซอร์มาใช้สำหรับตรวจหาแบคทีเรียก่อโรคและสารเคมีอันตรายที่ตกค้างในอาหาร บทความนี้จะกล่าวถึงหลักการและการพัฒนาอิมมูโนเซนเซอร์สำหรับการวิเคราะห์ทางอาหาร

คำสำคัญ : อิมมูโนเซนเซอร์ อาหาร แบคทีเรียก่อโรค สารเคมีอันตราย

Abstract

Immunosensor is analytical method. It is based on the binding interaction between antibody and antigen. This method plays advantages in term of high specificity, short analytical time and low cost. For these reasons, the immunosensor has been applied to detect pathogenic bacteria and hazard chemicals contaminated in food. The present review deals the principle and novel immunosensors developments for application in food analysis.

Keywords : Immunosensor, food, pathogenic bacteria, hazard chemicals

***E-mail:** siriwan@mail.rmutt.ac.th

บทนำ

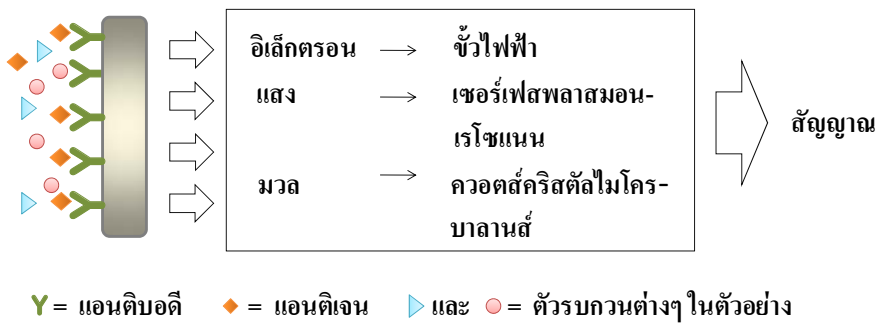
ปัจจุบันอุตสาหกรรมอาหาร โดยเฉพาะวงการอุตสาหกรรมอาหารส่งออกได้มีการตื่นตัวเรื่องการประกันคุณภาพอาหาร ทั้งนี้เนื่องมาจากองค์การการค้าโลก ได้มีข้อกำหนดให้ประเทศสมาชิกมีมาตรฐานการผลิตอาหารให้ปลอดภัยบนพื้นฐานเดียวกัน ดังนั้นระบบคุณภาพของอุตสากรรมอาหารในประเทศไทยจึงนำหลักเกณฑ์และวิธีการที่ดีในการผลิตอาหาร (Good Manufacturing Practice: GMP) มาใช้ในการผลิตอาหาร และบางบริษัทได้นำระบบการวิเคราะห์อันตรายและจุดวิกฤตที่ต้องควบคุม (Hazard Analysis and Critical Control Point: HACCP) มาใช้เพื่อควบคุมอันตรายจากกายภาพ (Physical hazard) สารชีวภาพ (Biological hazard) และจากสารเคมี (Chemical hazard) ที่ปนเปื้อนในอาหาร เพื่อให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและเพื่อยกระดับการส่งออกของประเทศ อันตรายจากสารชีวภาพ เช่นแบคทีเรียที่ก่อโรคในอาหาร วิธีทั่วไปที่ใช้สำหรับการตรวจหาปริมาณแบคทีเรียคือวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ ถึงแม้ว่าวิธีดังกล่าวจะมีความจำเพาะ (Selectivity) แต่มีขั้นตอนการวิเคราะห์หลายขั้นตอน ต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน 4-5 วันและผู้วิเคราะห์ต้องมีเทคนิค และความชำนาญในการทำการวิเคราะห์ ส่วนวิธีวิเคราะห์สารเคมีอันตรายที่ปนเปื้อนในอาหาร ทั่วไปใช้วิธีที่ต้องอาศัยเครื่องมือขั้นสูง เช่น เครื่องโครมาโทกราฟชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) (Won *et al*., 2011) แต่พบว่าวิธีที่ใช้เครื่องมือดังกล่าว จะต้องมีการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์เพื่อเพิ่มความเข้มข้นและลดผลของตัวรบกวนต่างๆ ทำให้สิ้นเปลืองสารเคมีและใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน จึงทำให้ได้มีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์อิมมูโนเซนเซอร์ (Immunosensor)

อิมมูโนเซนเซอร์

อิมมูโนเซนเซอร์เป็นวิธีวิเคราะห์ที่อาศัยการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน ถ้าต้องการตรวจหาแอนติเจน จะตรึงแอนติบอดีไว้บนตัวตรวจวัด ผลจากการจับกันทำให้สมบัติทางกายภาพหรือทางเคมีเปลี่ยนไป เช่น สมบัติทางมวล และตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นด้วยตัวตรวจวัด (Detector) สัญญาณตอบสนองที่วัดได้จะสัมพันธ์กับปริมาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ดังภาพที่ 1

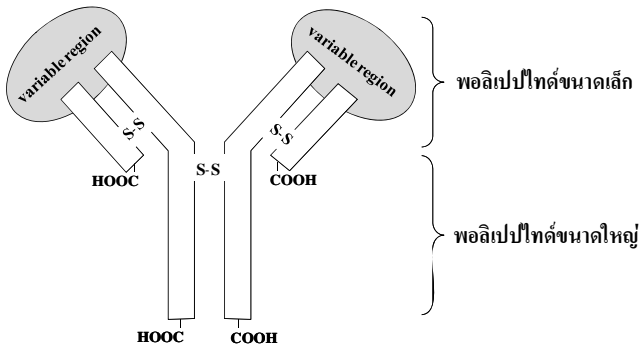
การจับกันระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจน

แอนติบอดี หรือ อิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin) เป็นโปรตีนขนาดใหญ่ที่พบได้ในเลือดและส่วนน้ำอื่นๆ ของร่างกาย แอนติบอดีมีทั้งหมด 5 ชนิด คือ IgA IgD IgE IgG และ IgM ส่วนใหญ่ในอิมมูโนเซนเซอร์ใช้แอนติบอดีประเภท IgG (Killard *et al*., 1995) ส่วนประกอบพื้นฐานของแอนติบอดี ดังภาพที่ 2 มีรูปร่างคล้ายตัววาย (Y shape) ประกอบด้วยสายพอลิเปปไทด์ 4 สาย คือ พอลิเปปไทด์ที่มีขนาดใหญ่ (Heavy chain) 2 สาย และพอลิเปปไทด์ที่มีขนาดเล็ก (Light chain) 2 สาย แต่ละสายเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (Disulfide bond) ส่วนโคนของตัววายในโมเลกุลแอนติบอดี เรียกว่า Constant region จะบ่งบอกถึงชนิดของแอนติบอดี และส่วนปลายของตัววาย เรียกว่า Variable region เป็นตำแหน่งที่ใช้จับกับแอนติเจนจะมีความหลากหลายมากไม่เหมือนกัน ทำให้แอนติบอดีจำเพาะต่อแอนติเจนแต่ละชนิด แอนติเจนและแอนติบอดีจับกันด้วยแรงอ่อนๆ ซึ่งไม่ใช่พันธะโควาเลนต์ (Non-covalent) ได้แก่ แรงจากประจุไฟฟ้า (Electrostatic force) แรงจากพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bond) แรงผลักระหว่างโมเลกุลที่ไม่มีขั้วกับโมเลกุลของน้ำ (Hydrophobic



ภาพที่ 1 หลักการของอิมมูโนเซนเซอร์ แอนติเจนจับกับแอนติบอดี ผลทำให้สมบัติทางกายภาพและทางเคมีเปลี่ยนไป และตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวด้วยตัวตรวจวัด (Luppa *et al*., 2001)

interaction) และแรงวานเดอร์วาลส์ (Van der Waals force) นอกจากเกิดจากแรง 4 อย่างที่กล่าวมาแล้ว การจับกันระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนยังขึ้นอยู่กับลักษณะโครงสร้างของแอนติบอดีและแอนติเจน ถ้าโครงสร้างโมเลกุลตรงส่วนที่ใช้จับกันของทั้งแอนติบอดีและแอนติเจนเข้ากันได้ดี (Complementary) แอนติบอดีและแอนติเจนก็จะจับกันได้แน่นยิ่งขึ้นเรียกการจับกันแบบนี้ว่าแม่กุญแจและลูกกุญแจ (Lock and key) จึงทำให้อิมมูโนเซนเซอร์มีความจำเพาะสูง (Killard *et al*., 1995) การที่แอนติเจนและแอนติบอดีจับกันด้วยพันธะที่ไม่ใช่โควาเลนต์ ซึ่งเป็นพันธะที่อ่อนสามารถทำลายได้ด้วยสารละลายเบส กรด หรือเกลือ ทำให้สามารถกำจัดแอนติเจนออกจากแอนติบอดีได้ ยังคงเหลือเฉพาะแอนติบอดีที่ถูกตรึงไว้บนตัวตรวจวัด เพราะแอนติบอดีถูกตรึงบนตัวตรวจวัดด้วยพันธะโควาเลนต์ ซึ่งเป็นพันธะที่แข็งแรงไม่สามารถทำลายได้ด้วยสารเคมี เมื่อแอนติเจนหลุดออกไป จึงทำให้สามารถนำแอนติบอดีมาใช้ซ้ำได้ (Reuse) เพื่อตรวจหาแอนติเจนในครั้งต่อๆ ไปได้อีก (Sardinha *et al*., 2002)



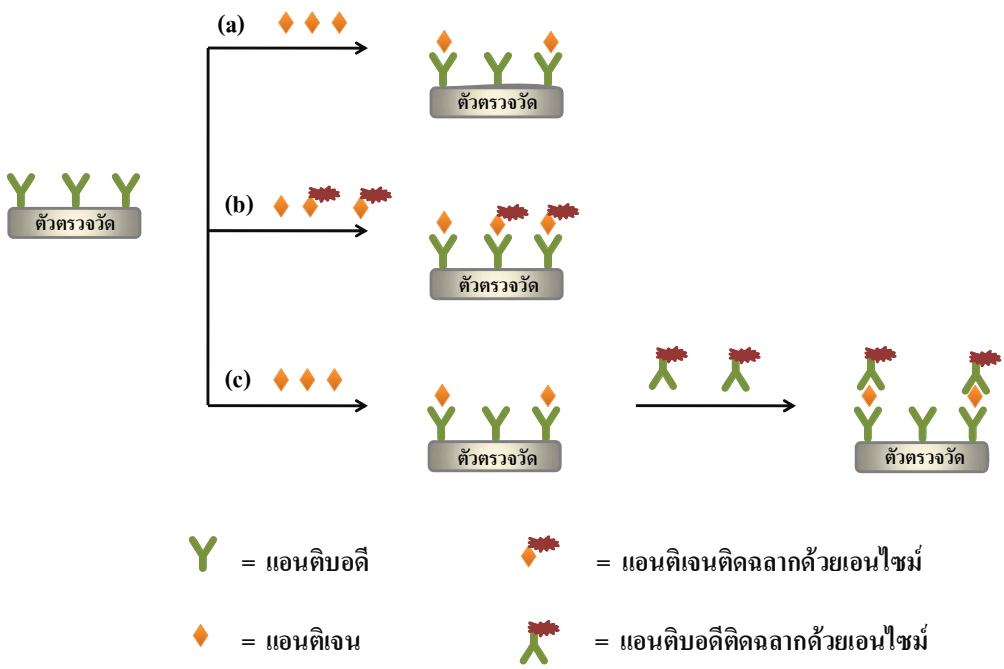
ภาพที่ 2 โครงสร้างของแอนติบอดี ประกอบด้วยสายพอลิเปปไทด์ขนาดใหญ่ 2 สายและพอลิเปปไทด์ที่มีขนาดเล็ก 2 สาย (ที่มา: Killard *et al*., 1995)

ประเภทของอิมมูโนเซนเซอร์ (Jiang *et al*., 2008)

อิมมูโนเซนเซอร์สามารถแบ่งประเภทหลักๆ ได้ 3 ประเภท

1. **อิมมูโนเซนเซอร์แบบตรง (Direct immunosensor)**

อิมมูโนเซนเซอร์แบบตรง อาศัยหลักการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน ทำให้สมบัติทางกายภาพ เช่น ค่าดัชนีหักเหของแสง หรือมวลเปลี่ยนไป และวัดการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวด้วยตัวตรวจวัดที่เหมาะสม ดังภาพที่ 3a ข้อดีของอิมมูโนเซนเซอร์แบบตรงคือ เป็นวิธีที่ง่าย แต่มีข้อจำกัด คือตัวตรวจวัดจะต้องมีความไวของการวิเคราะห์สูง เพราะการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนน้อย ตัวตรวจวัดต้องมีประสิทธิภาพสูงพอที่จะตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวที่



ภาพที่ 3 ประเภทของอิมมูโนเซนเซอร์ โดยตรึงแอนติบอดีไว้บนตัวตรวจวัด เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณแอนติเจน (a) แบบตรง สามารถวิเคราะห์หาแอนติเจนได้โดยตรง (b) แบบแข่งขัน โดยใช้แอนติเจนติดฉลากด้วยเอนไซม์ และ (c) แบบแซนด์วิช อาศัยการตรวจวัดจากแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (Ricci *et al*., 2007)

เกิดขึ้นได้ หรือสารที่ต้องการวิเคราะห์ต้องมีมวลโมเลกุลสูงเพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงมากขึ้น เช่น การวิเคราะห์หาปริมาณ *Salmonella typhimurium* ในน้ำนม (Pournaras *et al*., 2008)

2. อิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน (Competitive immunosensor)

หลักการของอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน (ภาพที่ 3b) ตรึงแอนติบอดีไว้บนตัวตรวจวัด จากนั้นเติมแอนติเจน (สารที่ต้องการวิเคราะห์) และแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยสารติดฉลาก เช่น เอนไซม์ ทั้งแอนติเจนและแอนติเจนที่ติดฉลากจะแข่งขันกันเพื่อเข้าจับกับแอนติบอดีที่ถูกตรึงอยู่บนตัวตรวจวัด สามารถหาปริมาณแอนติเจนที่ต้องการวิเคราะห์ได้จากสารติดฉลากที่ติดอยู่กับแอนติเจน สัญญาณที่ได้จะแปรผกผันกับปริมาณของแอนติเจนที่ต้องการวิเคราะห์ที่มีอยู่ในตัวอย่าง ข้อดีของอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขันเหมาะสำหรับวิเคราะห์หาแอนติเจนที่มีมวลโมเลกุลน้อย เช่น การวิเคราะห์หาปริมาณยาฆ่าแมลงในไวน์แดง (Valera *et al*., 2010)

3. อิมมูโนเซนเซอร์แบบแซนด์วิช (Sandwich immunosensor)

อิมมูโนเซนเซอร์แบบแซนด์วิช เป็นการตรวจวัดทางอ้อม โดยตรึงแอนติบอดีไว้บนตัวตรวจวัดเพื่อจับกับแอนติเจน จากนั้นเติมแอนติบอดีที่ถูกติดฉลากด้วยสารติดฉลาก แอนติบอดีนี้จะไปจับกับปลายอีกข้างหนึ่งของแอนติเจนอีกครั้งหนึ่ง ดังภาพที่ 3c ลักษณะการจับของแอนติเจนกับแอนติบอดีสองตัว จึงเรียกอิมมูโนเซนเซอร์ประเภทนี้ว่า แซนด์วิช และตรวจหาสารที่ต้องการวิเคราะห์โดยติดตามจากสารติดฉลากซึ่งจะสัมพันธ์กับปริมาณแอนติเจน อิมมูโนเซนเซอร์ประเภทนี้จะให้ความไวของการวิเคราะห์สูงและสามารถตรวจหาสารที่มีมวลโมเลกุลต่ำได้ เช่นการวิเคราะห์หาปริมาณ Staphylococcal Enterotoxin B ในน้ำผลไม้ (Yang *et al*., 2008)

ตัวตรวจวัด (Detector)

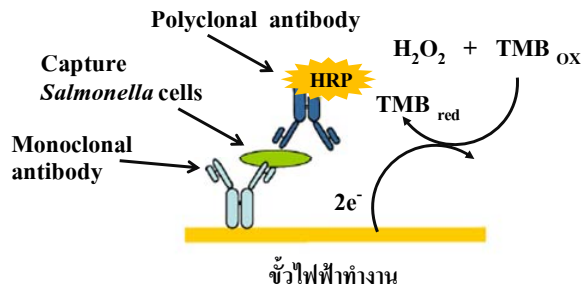
ตัวตรวจวัดทำหน้าที่ตรวจวัดสมบัติทางกายภาพหรือทางเคมีที่เปลี่ยนไป เมื่อแอนติบอดีจับกับแอนติเจน ตัวตรวจวัดที่ดีต้องมีความไวของการวิเคราะห์ (Sensitivity) และความจำเพาะสูง ตัวตรวจวัดที่นิยมใช้ในอิมมูโนเซนเซอร์ได้แก่ ตัวตรวจทางเคมีไฟฟ้า ทางแสง และทางมวล

1. ตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า

ตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า เป็นเทคนิคที่วัดศักย์ไฟฟ้าหรือกระแสไฟฟ้าที่เปลี่ยนไป เมื่อเกิดการจับกันของแอนติเจนกับแอนติบอดี เทคนิคทางเคมีไฟฟ้าที่นำมาประยุกต์ใช้เป็นตัวตรวจวัดสำหรับอิมมูโนเซนเซอร์ เช่น เทคนิคแอมเพอร์โรเมตริก (Amperometric) และโพเทน-ชิโอเมตริก (Potemtiometric) ส่วนใหญ่เทคนิคแอมเพอร์โรเมตริกเป็นตัวตรวจวัดที่นิยมใช้ในอิมมูโนเซนเซอร์ เพราะให้ความไวของการวิเคราะห์สูง มีความจำเพาะและราคาถูก (Ricci *et al*., 2007) เทคนิคแอมเพอร์โรเมตริกเป็นการให้ศักย์ไฟฟ้าเฉพาะตัว เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือรีดักชัน ผลทำให้มีอิเล็กตรอนเคลื่อนที่ระหว่างสารละลายกับผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าทำงาน วัดค่ากระแสไฟฟ้า (i) ที่เกิดขึ้น จะสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ (C) ดังสมการที่ 1 (Jiang *et al*., 2008)

$$i = ZFk_mC \qquad (1)$$

เมื่อ Z และ F คือค่าคงที่ และ k_m คือ สัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวล เทคนิคแอมเพอร์โรเมตริกจะต้องอาศัยสารติดฉลาก เช่น เอนไซม์ Horseradish peroxidase (HRP) และตรวจวัดผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยใช้สารช่วยส่งผ่านอิเล็กตรอน เช่น 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidine dihydrochloride (TMB) เพื่อส่งผ่านอิเล็กตรอนจากสารละลายไปยังขั้วไฟฟ้าทำงาน (Salam *et al*., 2009) ดังภาพที่ 4

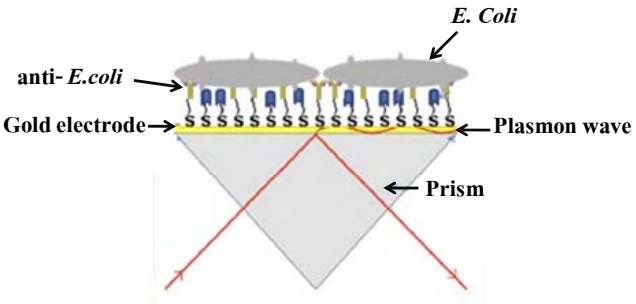


ภาพที่ 4 อิมมูโนเซนเซอร์แบบแซนด์วิช เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ *Salmonella* โดยติดฉลากแอนติบอดีด้วยเอนไซม์ HRP และใช้ H_2O_2 เป็นสารซับสเตรต ผลจากปฏิกิริยาของเอนไซม์จะได้กระแสไฟฟ้าเกิดขึ้น และสามารถตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมตริก (ที่มา: Salam *et al*., 2009)

2. ตัวตรวจวัดทางแสง

เซอร์เฟสพลาสมอลเรโซแนนซ์ (Surface plasmon resonance; SPR) เป็นตัวตรวจวัดทางแสงที่วัดการเปลี่ยนแปลงดัชนีหักเหของแสงบนผิวของแผ่นทองบาง ถ้าต้องการตรวจหาแอนติเจนจะตรึงแอนติบอดีไว้บนผิวทองบางซึ่งเคลือบบนปริซึม (Prism)

ดังภาพที่ 5 เมื่อแอนติเจนจับกับแอนติบอดีที่บริเวณผิวหน้าของตัวตรวจวัด ทำให้ดัชนีหักเหของแสงเปลี่ยนไป ซึ่งเกิดจากมวลที่เพิ่มขึ้นหลังจากแอนติเจนจับกับแอนติบอดี ดัชนีหักเหของแสงจะแปรผันตรงตามความเข้มข้นของสารที่ต้องการตรวจวัด



ภาพที่ 5 อิมมูโนเซนเซอร์แบบตรง เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ *E. coli* โดยตรึงแอนติบอดีของ *E. c oli* ไว้บนผิวหน้าของแผ่นทอง เมื่อมีการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี ทำให้ค่าดัชนีหักเหของแสงเพิ่มขึ้น ด้วยเทคนิคเซอร์เฟสพลาสมอลเรโซแนนซ์ (ที่มา: Baccar *et al*., 2010)

3. ตัวตรวจวัดทางมวล

ตัวตรวจวัดที่ตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงทางมวล เช่น ควอตส์คริสตัลไมโครบาลานส์ (Quartz crystal microbalance ; QCM) นำมาใช้เป็นตัวตรวจวัดในอิมมูโนเซนเซอร์ (ภาพที่ 6) ใช้หลักการตรึงแอนติบอดีบนผลึกควอตส์ เพื่อตรวจหาแอนติเจน เมื่อให้พลังงานภายนอกแก่ผลึกควอตส์ทำให้เกิดการสั่น โดยความถี่ของการสั่นจะขึ้นอยู่กับมวล เมื่อแอนติเจนจับกับแอนติบอดีที่ถูกตรึงอยู่บนผลึกควอตส์ ทำให้มวลเพิ่มขึ้น ความถี่ของการสั่นก็จะเปลี่ยนไปด้วย ความสัมพันธ์ระหว่างมวลกับความถี่ ดังสมการที่ 2 (Lin & Tsai, 2003)

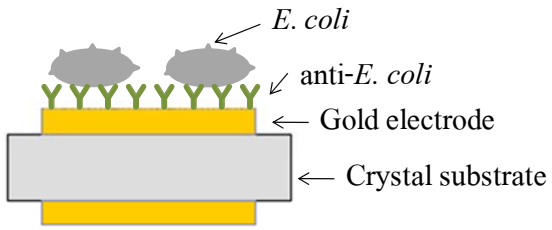
$$\Delta F = (-2.3\times10^{-6}) f_0^2 \frac{\Delta M}{A} \qquad (2)$$

F คือ ความถี่ที่เปลี่ยนไปเมื่อแอนติเจนจับกับแอนติบอดี f_0 คือ ความถี่ของควอตส์ M คือมวลที่เปลี่ยนไปหลังแอนติเจนจับกับแอนติบอดี และ A คือ พื้นที่ผิวของควอตส์

การประยุกต์อิมมูโนเซนเซอร์สำหรับตรวจหาจุลินทรีย์และสารพิษที่เกิดจากจุลินทรีย์

Escherichia coli

Escherichia coli หรือ *E. coli* เป็นแบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์ม



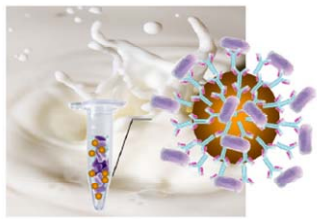
ภาพที่ 6 อิมมูโนเซนเซอร์แบบตรงโดยใช้เทคนิค ควอตส์คริสตัลไมโครบาลานส์ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ *E. coli* (ที่มา: Kin & Park, 2003)

พบได้ทั่วไปโดยเฉพาะในทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์จึงใช้ *E. coli* เป็นแบคทีเรียเพื่อชี้บ่งสุขลักษณะของอาหารและเครื่องดื่ม วิธีตรวจวัดหาปริมาณ *E. coli* ที่ใช้ทั่วไปคือวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ ประกอบด้วยหลายขั้นตอนใช้เวลาในการวิเคราะห์ 4-5 วัน จึงได้มีการประยุกต์ใช้อิมมูโนเซนเซอร์เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ *E. coli* ในตัวอย่างอาหารต่างๆ เช่น การวิเคราะห์หา *E. coli* (แอนติเจน) ในตัวอย่างอาหาร ได้แก่ ตัวอย่างนม เนื้อหมู เนื้อวัว และข้าว ด้วยอิมมูโน-เซนเซอร์แบบตรง พบว่าให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.7×10^5 - 8.7×10^7 CFU/ml ให้ขีดจำกัดการตรวจวัดที่ความเข้มข้น 1.7×10^5 CFU/ml และใช้เวลาในการวิเคราะห์เพียง 20-30 นาที แต่ยังมีข้อจำกัดคือให้ขีดจำกัดการตรวจวัดสูง (Kim & Park, 2003)

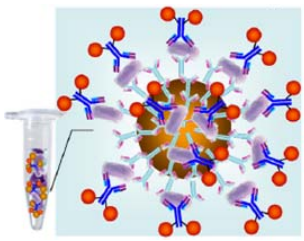
Salmonella

Salmonella เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ที่ก่อโรคแก่มนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น เช่น โรคระบบทางเดินอาหาร ไข้ไทฟอยด์ หรือติดเชื้อในกระแสเลือด (Yan *et al*., 2003) เป็นต้น Su และคณะ (2001) ได้วิเคราะห์หา *Salmonella enteritidis* ในเนื้อไก่และไข่ขาว โดยใช้เทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบตรงและใช้ตัวตรวจวัดทางแสง พบว่าวิธีนี้มีความจำเพาะสูง ไม่มีผลรบกวนจาก *Salmonella* สายพันธุ์อื่นๆ เช่น *S. java, S. hadar* และ *S. haardt* และผลการทดลองที่ได้จากวิธีนี้สอดคล้องกับชุดทดสอบ IDEXX แต่วิธีนี้มีข้อดีกว่าคือใช้เวลาวิเคราะห์น้อย (15 นาที) และราคาถูกกว่า นอกจากนี้ได้มีการนำอนุภาคเหล็กมาพัฒนาเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์เพื่อตรวจหา *Salmonella* ในนม (Liebana *et al*., 2009) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังภาพที่ 7 ขั้นที่หนึ่ง (a) ขั้นแยก *Salmonella* ออกจากนม โดยตรึง anti-*Salmonella* ไว้บนอนุภาคเหล็ก จากนั้นนำไปใส่ในตัวอย่างนม *Salmonella* ในนมจะไปจับกับ anti-*Salmonella* ที่ถูกตรึงอยู่บนอนุภาคเหล็ก ขั้นที่สอง (b) ขั้นการจับกันระหว่าง *Salmonella* กับ anti-*Salmonella* ที่ติดฉลากด้วย HRP แยกอนุภาคเหล็กที่ได้จาก

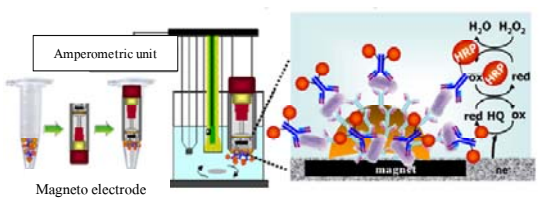
ขั้นที่หนึ่งออกจากนมโดยใช้แม่เหล็กภายนอกดูดออก แล้วเติม anti-*Salmonella* ที่ติดฉลากด้วย HRP เพื่อไปจับกับ *Salmonella* ที่อยู่บนอนุภาคเหล็ก ขั้นที่สาม (c) ขั้นการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า โดยเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เพื่อใช้เป็นสารซับสเตรตในการเกิดปฏิกิริยา และใช้ hydroquinone (HQ) เป็นตัวช่วยส่งผ่านอิเล็กตรอน ให้ศักย์ไฟฟ้าที่ -100 mV แก่ขั้วไฟฟ้าทำงาน วัดค่ากระแสที่เกิดขึ้นจะสัมพันธ์กับปริมาณของ *Salmonella* ในนม วิธีนี้ให้ช่วงความเข้มข้น 5×10^3 - 7.5×10^3 CFU/ml และขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำมากเพราะในขั้นที่หนึ่งเป็นทั้งขั้นแยกและเพิ่มความเข้มข้น *Salmonella* ในตัวอย่างก่อนวิเคราะห์ ถ้าใช้เวลาในการแยก 6 ชั่วโมง จะได้ขีดจำกัดการตรวจวัดคือ 1.45 CFU/ml และถ้าใช้เวลาในการแยก 8 ชั่วโมง จะให้ขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำถึง 0.108 CFU/ml แต่วิธีนี้ยังมีข้อจำกัดคือมีขั้นตอนการวิเคราะห์ที่ซับซ้อน จึงทำให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน



(a) ขั้นแยก *Salmonella* ออกจากนม



(b) ขั้นการจับกันระหว่าง *Salmonella* กับ anti-*Salmonella* ที่ติดฉลากด้วย HRP



(c) ขั้นการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า

ภาพที่ 7 เทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์สำหรับตรวจหา *Salmonella* ในนมโดยอาศัยอนุภาคเหล็ก (ที่มา: Liebana *et al*., 2009)

Staphylococcal enterotoxin

Staphylococcal enterotoxin (SE) เป็นสารพิษประเภทพอลีเปปไทด์สายโซ่เดียว มีมวลโมเลกุลต่ำ (M_r = 27.5-30 kDa) (Strachan *et al*., 1997) ที่เกิดจากแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทนความร้อนได้สูง ความร้อนที่ใช้ปรุงอาหารไม่สามารถทำลายได้ SE มีหลายชนิด เช่น SEA, SEB และ SEC เป็นต้น การประยุกต์อิมมูโนเซนเซอร์เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ SE เช่น การตรวจหา SEB ในตัวอย่างนมสด นมไขมันต่ำและนมที่ไม่มีไขมันด้วยอิมมูโนเซนเซอร์แบบตรง ใช้ควอตส์คริสตัลไมโครบาลานส์เป็นตัวตรวจวัด (Lin & Tsai, 2003) ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น 2.5 - 60 µg/ml ให้ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ที่ความเข้มข้น 2.5 µg/ml และให้เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน 111% แต่พบว่างานวิจัยนี้ยังให้ขีดจำกัดการตรวจวัดที่สูง เพราะอิมมูโนเซนเซอร์แบบตรง ไม่เหมาะสำหรับตรวจวัดสารที่มีมวลโมเลกุลต่ำ

การประยุกต์อิมมูโนเซนเซอร์สำหรับตรวจหาสารเคมีอันตราย

ยาปฏิชีวนะ

ยาปฏิชีวนะใช้สำหรับรักษาสัตว์ที่เป็นโรคที่เกิดหรือใช้เพื่อชะลอการเน่าเปื่อยของเนื้อสัตว์ ซึ่งปริมาณยาที่ตกค้างอยู่ในกล้ามเนื้อหรือนมของสัตว์ อาจทำให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ ถ้าได้รับเข้าสู่ร่างกายในปริมาณที่มากเกินกว่าเกณฑ์ที่กำหนด ตัวอย่างการประยุกต์ใช้อิมมูโนเซนเซอร์เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณยาปฏิชีวนะ ในงานวิจัยนี้สามารถตรวจหายาปฏิชีวนะ ได้แก่ florefenicol amine, florefenicol, thiamphenicol และ chloramphenicol ในเนื้อกุ้ง ได้พร้อมกันในเวลาเดียวกัน (Dumont *et al*., 2006) ใช้เซอร์เฟสพลาสมอลเรโซแนนซ์เป็นตัวตรวจวัด ซึ่งประกอบด้วยช่องตรวจวัด 4 ช่อง ในแต่ละช่องตรึงยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดไว้ เมื่อแอนติเจนและแอนติบอดีของยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดจับกัน สามารถวัดสัญญาณตอบสนองของยาปฏิชีวนะในแต่ละช่อง ทำให้สามารถวิเคราะห์ปริมาณหรือตรวจสอบยาปฏิชีวนะทั้ง 4 ชนิดได้ในเวลาเดียวกัน โดยใช้เวลาวิเคราะห์เพียง 10 นาที

ยาฆ่าแมลง

ปัจจุบันได้มีการนำยาฆ่าแมลงมาใช้ในการเกษตรเพิ่มขึ้น ทำให้มีการตกค้างในผลผลิตที่ได้ อะทราซีน (Atrazine) เป็นสารเคมีสังเคราะห์ที่ใช้สำหรับกำจัดวัชพืชในไร่ข้าวโพด อ้อย หรือสับปะรด ได้มีการนำอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน มาใช้ในการตรวจหาอะทราซีนที่ตกค้างในไวน์ผลไม้ โดยใช้หลักการของอิมมูโนเซนเซอร์

แบบแข่งขัน ใช้อนุภาคนาโนทองเป็นสารติดฉลาก และตรวจวัดด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า วัดค่าการนำไฟฟ้าที่เปลี่ยนไป (Valera *et al*., 2008) ให้ช่วงความเข้มข้นที่ 0.1-1 µg/l ได้มีการกำหนดความเข้มข้นสูงสุดที่ตกค้างในไวน์ได้ไม่เกิน 100 µg/l จึงทำให้สามารถเจือจางตัวอย่างก่อนวิเคราะห์ได้ ถึง 50 เท่า ทำให้ไม่มีผลรบกวนจากสารอื่นๆ ที่มีอยู่ในไวน์ขาว แต่ยังมีข้อจำกัดสำหรับไวน์แดงพบว่าสารอื่นๆ ที่มีอยู่ในไวน์แดงสามารถส่งผลรบกวนต่อวิธีวิเคราะห์นี้ได้

อะฟลาทอกซิน (Aflatoxins)

อะฟลาทอกซินเป็นสารพิษที่สร้างจากเชื้อรา อันได้แก่ เชื้อรากลุ่ม *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* (Scott, 1995) เกิดขึ้นตามธรรมชาติ และปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ของพืชและสัตว์ ทนต่ออุณหภูมิสูงถึง 250°C เมื่อนำมาปรุงอาหารจึงไม่สามารถทำลายพิษของอะฟลาทอกซินได้ จึงทำให้อะฟลาทอกซินสามารถตกค้างเป็นอันตรายต่อตับและก่อพิษแก่ผู้บริโภคได้ เป็นสาเหตุให้เกิดมะเร็งตับ อะฟลา-ทอกซินแบ่งออกได้หลายชนิด เช่น อะฟลาทอก-ซิน บี1 บี2 จี1 และ เอ็ม1 เป็นต้น Micheli และคณะ (2005) ได้วิเคราะห์หาอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ในนม โดยใช้อิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขันและใช้เทคนิคแอมเพอร์โรเมตริกเป็นตัวตรวจวัด และมีเอนไซม์ HRP เป็นสารติดฉลาก พบว่าในการวิเคราะห์หาอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ในตัวอย่างนม ไม่ต้องมีขั้นตอนการสกัด สามารถนำตัวอย่างนมมาวิเคราะห์ได้โดยตรง ผลการวิเคราะห์ที่ได้เมื่อเปรียบกับวิธีทั่วไป พบว่าให้ผลสอดคล้องกัน แต่วิธีนี้มีข้อดีกว่าวิธีทั่วไปคือให้ขีดจำกัดการตรวจวัดที่ดีกว่าและใช้เวลาการวิเคราะห์น้อยกว่า

สรุป

จากข้อดีของอิมมูโนเซนเซอร์ประกอบกับการพัฒนางานวิจัยด้านอิมมูโนเซนเซอร์ทำให้อิมมูโนเซนเซอร์ประสบความสำเร็จเป็นอย่างยิ่งในการประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์ต่างๆ ในอาหาร เพื่อควบคุมคุณภาพอาหาร และแนวโน้มการพัฒนางานวิจัยในอนาคตพยายามที่จะทำให้เครื่องตรวจวัดมีขนาดเล็กลง เพื่อลดปริมาณของสารเคมีและตัวอย่าง ลดขั้นตอนการวิเคราะห์ เพื่อทำให้ลดเวลาในการวิเคราะห์และลดค่าใช้จ่ายได้ และยังมุ่งเน้นที่จะเพิ่มความไวของการวิเคราะห์ให้สูงขึ้น เพื่อให้สามารถวิเคราะห์ปริมาณสารได้ต่ำถึงความเข้มข้นตามเกณฑ์มาตรฐานปริมาณที่หน่วยงานต่างๆ กำหนดไว้

เอกสารอ้างอิง

Baccar, H., Mejri, M.B., Hafaiedh, I., Ktari, T., Aouni, M. & Abdelghani, A. (2010). Surface plasmon resonance immunosensor for bacteria detection. *Talanta, 82*, 810-814.

Dumont, V., Huet, A.C., Traynor, I., Elliott, C. & Delahaut, P. (2006). A surface plasmon resonance biosensor assay for the simultaneous determination of thiamphenicol, florefenicol, florefenicol amine and chloramphenicol residues in shrimps. *Analytica Chimica Acta, 567*, 179-183.

Jiang, X., Li, D., Xu, X., Ying, Y., Li, Y., Ye, Z. & Wang, J. (2008). Immunosensors for detection of pesticide residues. *Biosensors and Bioelectronics, 23*, 1577-1587.

Killard, A.J., Deasy, B., Kennedy, R.O. & Smyth, M.R. (1995). Antibodies: production, functions and applications in biosensors. *Trends in analytical chemistry, 14*, 257-266.

Kim, N. & Park, I.S. (2003). Application of a flow-type antibody sensor to the detection of *Escherichia coli* in various foods. *Biosensors and Bioelectronics, 18*, 1101-1107.

Liebana, S., Lermo, A., Campoy, S., Corets, M.P., Alegret, S. & Pividori, M. I. (2009). Rapid detection of *Salmonella* in milk by electrochemical magneto-immunosensing. *Biosensors and Bioelectronics, 25*, 510-513.

Lin, H.C. & Tsai, W.C. (2003). Piezoelectric crystal immunosensor for the detection of *staphylococcal enterotoxin B. Biosensors and Bioelectronics, 18*, 1479-1483.

Luppa, P.B., Sokoll, L.J. & Chan, D.W. (2001). Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta, 314*, 1-26.

Micheli, L., Grecco, R., Badea, M., Moscone, D. & Palleschi, G. (2005). An electrochemical immunosensor for aflatoxin M1 determination in milk using screen-printed electrodes *Biosensors and Bioelectronics, 21*, 588-596.

Pournaras, A.V., Koraki, T.& Prodromidis, M.I. (2008). Development of an impedimetric immunosensor based on electropolymerized polytyramine films for the direct detection of Salmonella typhimurium in pure cultures of type strains and inoculated real samples. *Analytica Chimica Acta, 624*, 301-307.

Ricci, F., Volpe, G., Micheli, L. & Palleschi, G. (2007). A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis. *Analytica Chimica Acta, 605*, 111-129.

Salam, F. & Tothill, I.E. (2009). Detection of *Salmonella typhimurium* using an electrochemical immunosensor. Biosensors and Bioelectronics, 24, 2630-2636.

Sardinha, J.P.M., Gil, M.H., Mercader, J.V. & Montoya, A. (2002). Enzyme linked immunofiltration assay used in the screening of solid supports and immunoreagents for the development of an azinphos-methyl flow immunosensor. *Journal of Immunology Methods, 260*, 173-182.

Scott, P.M. (1995). Mycotoxin methodology. *Food Additives & Contaminants., 12*, 395-403.

Strachan, N.J.C., John, P.G. & Millar, I.G. (1997). Application of a rapid automated immunosensor for the detection of *Staphylococcus aureus enterotoxin B* in cream. *International Journal of Food Microbiology, 35*, 293-297.

Su, X., Low, S., Kwang, J., Chew, V.H.T. & Li, S.F.Y. (2001). Piezoelectric quartz crystal based veterinary diagnosis for *Salmonella enteritidis* infection in chicken and egg. *Sensors and Actuators B, 75*, 29-35.

Valera, E., Ramon-Azcon, J., Sanchez, F.J., Marco, M.P. & Rodriguez, A. (2008). Conductimetric immunosensor for atrazine detection based on antibodies labelled with gold nanoparticles. *Sensors and Actuators B, 134*, 95-103.

Valera E., Ramon-Azcon J., Barranco A., Alfaro B., Sanchez-Baeza F., Marco M.P.& Rodr̊guez, Angel. (2010). Determination of atrazine residues in red wine samples. A conductimetric solution. *Food Chemistry, 122*, 888-894.

Won, S.Y., Lee, C.H., Chang, H.S., Kim, S.O., Lee, S.H. & Kim, D.S. (2011). Monitoring of 14 sulfonamide antibiotic residues in marine products using HPLC-PDA and LC-MS/MS. *Food Control, 22*, 1101-1107.

Yan S. S., Pendrak M.L., Abela-Ridder B., Punderson J.W., Fedorko D.P., Foley S.L. (2003). An overview of *Salmonella* typing Public health perspectives. *and Applied Immunology Reviews, 4*, 189-204.

Yang, M., Kostov, Y. & Rasooly, A. (2008). Carbon nanotubes based optical immunodetection of *Staphylococcal* Enterotoxin B (SEB) in food. *International Journal of Food Microbiology, 127*, 78-83.