

การสำรวจปริมาณสารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ตกค้างในเนื้อหมู โดยวิธี Enzyme Linked Immunosorbent Assay, พ.ศ. 2548 - 2549

เฉลิมพร ควรหา ลัดดา แก้วกล้าปัญญาเจริญ และกนกพร อธิสุข

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ สำรวจปริมาณสารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ตกค้างในเนื้อหมูที่จำหน่ายในเขตภาคกลางและกรุงเทพมหานคร ระหว่าง พ.ศ. 2548-2549 โดยวิธี Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งได้ปรับปรุงวิธีโดยเพิ่มขั้นตอน ทำให้บริสุทธิ์ และทำการทวนสอบความถูกต้องวิธี วิธีดังกล่าวมีความแม่นยำ ความเที่ยง และค่าความไม่แน่นอนของการวัดที่ยอมรับได้และเหมาะสมกับวัตถุประสงค์ ผลการสำรวจเนื้อหมู จำนวน 1,932 ตัวอย่าง ตรวจพบสารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ตกค้าง จำนวน 240 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 12.4 ปริมาณที่ตรวจพบอยู่ระหว่าง 1.0-26.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่าเฉลี่ยและค่ามัธยฐานเท่ากับ 2.7 และ 2.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยปริมาณที่ตรวจพบของปี พ.ศ. 2548 กับปี พ.ศ. 2549 พบว่าค่าเฉลี่ยลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ซึ่งเป็นความสำเร็จของนโยบายรณรงค์การเลิกใช้สารเคมีกลุ่มนี้ของรัฐบาล ที่ดำเนินการโดยกระทรวงสาธารณสุขร่วมกับกระทรวงเกษตรและสหกรณ์

บทนำ

สารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ (Beta-agonists) เช่น เคลนบิวเทอรอล (clenbuterol) และ ซาลบูตามอล (salbutamol) มีฤทธิ์ขยายหลอดลม แต่มีผู้นำไปใช้ในทางผิดกฎหมายเพื่อเพิ่มปริมาณเนื้อแดงและลดไขมันเมื่อนำไปใช้ผสมอาหารเลี้ยงสัตว์ เริ่มพบปัญหาตั้งแต่ พ.ศ. 2533 ในประเทศสเปนและฝรั่งเศส เมื่อผู้บริโภคได้รับพิษจากสารตกค้างของ clenbuterol เกิดอาการใจสั่นกล้ามเนื้อสั่น ปวดกล้ามเนื้อและปวดศีรษะ⁽¹⁾ พ.ศ. 2535 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้ศึกษาปริมาณ clenbuterol ตกค้างในเนื้อหมูและตับหมู จำนวน 42 ตัวอย่าง โดยวิธี HPLC ซึ่งมีค่า Limit of Detection (LOD) เท่ากับ 0.4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ผลตรวจไม่พบการตกค้างทุกตัวอย่าง⁽²⁾ หลังจากมีการควบคุมการนำเข้าสารดังกล่าวอย่างเข้มงวด ทำให้ไม่พบว่ามี การนำกลับมาใช้อีก แต่พบว่าการเปลี่ยนไปใช้

salbutamol แทน ในปี พ.ศ. 2541 และ 2544 มีรายงานการตรวจพบสาร salbutamol ตกค้างในเนื้อหมูแช่แข็งที่ฮ่องกงนำเข้าจากประเทศไทย ทำให้ ฮ่องกงห้ามนำเข้าเนื้อหมูแช่แข็งของไทย⁽¹⁾ ใน พ.ศ. 2543 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้ศึกษาวิธีวิเคราะห์ salbutamol ใน เนื้อ ตับ และไตหมู โดยวิธี HPLC สามารถวิเคราะห์ได้ค่าต่ำกว่าเดิม คือ มีค่า LOD สำหรับเนื้อหมูเท่ากับ 0.003 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนตับและไตหมูเท่ากับ 0.006 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

พ.ศ. 2546 กระทรวงสาธารณสุข ได้ออกประกาศกระทรวง ฯ ฉบับที่ 269 เรื่องมาตรฐานอาหารที่มีการปนเปื้อนสารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์⁽⁴⁾ กำหนดให้อาหารทุกชนิดมีมาตรฐานโดยตรวจไม่พบการปนเปื้อนของสารกลุ่มนี้ และสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ได้ออกประกาศเรื่อง

หลักเกณฑ์ เงื่อนไข และวิธีการตรวจวิเคราะห์ กำหนดว่าต้องใช้วิธีตรวจและห้องปฏิบัติการที่มีความสามารถในการตรวจพบสารกลุ่มนี้ได้อย่างน้อยต่ำกว่า 1.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม⁽⁵⁾ ดังนั้น สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร จึงได้ศึกษาวิธี Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ของ Euro-Diagnostica B.V. มาใช้ตรวจวิเคราะห์ เพราะเป็นเทคนิคที่สะดวก รวดเร็ว สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ครั้งละหลายๆ (high through-put) มีความจำเพาะและความไวสูงโดยค่า LOD เท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม แต่วิธีตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิคนี้ยังถือว่าเป็นเพียงการตรวจเบื้องต้น (screening test) เท่านั้น หากต้องการนำผลวิเคราะห์ไปใช้ดำเนินการตามกฎหมาย จำเป็นต้องตรวจยืนยันด้วยเทคนิคอื่น

บทความนี้นำเสนอวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์โดยเทคนิค ELISA ที่ได้ปรับปรุงขั้นตอนการสกัดโดยเพิ่มขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วย solid phase extraction (SPE) ซึ่งได้มีการทวนสอบความถูกต้อง และการประมาณค่าความไม่แน่นอนของวิธีแล้ว พร้อมทั้งผลการสำรวจเนื้อหมูที่จำหน่ายในภาคกลางและกรุงเทพมหานครรวม 12 จังหวัด ข้อมูลผลการวิเคราะห์ที่ได้นำไปใช้ในการพิจารณาให้การรับรองป้ายของอาหารปลอดภัย และคุ้มครองผู้บริโภค

วัสดุและวิธีการ

วัสดุ

สารมาตรฐาน

สาร clenbuterol, minimum 95%, Sigma Chemical Co.

สารเคมี

Calcium chloride AR, disodium hydrogen phosphate AR, hydrochloric acid AR, isobutyl alcohol AR, methanol HPLC grade, potassium

chloride AR, potassium dihydrogen phosphate AR, pronase E, sodium chloride AR, sodium dihydrogen phosphate AR, sodium hydroxide AR, trizma base, Tween 20 และ Water Oasis HLB extraction cartridges 3 cc/60 mg

เครื่องมือ

เครื่องบดเนื้อ, เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง, automated strip washer (BIO-TEX ELx50), autopipet 10-100 ไมโครลิตร, 100-1000 ไมโครลิตรและ 10-200 ไมโครลิตร, centrifuge, microplate reader (BIO-TEX ELx808 IU), multichannel pipet (8/12 channel) 10-200 ไมโครลิตร, SPE vacuum manifold, vortex mixer และ water bath อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

ชุดตรวจ β -agonists-EIA (Euro-Diagnostica B.V.)

Concentrated rinsing buffer, dilution buffer, lyophilised antibody, lyophilised conjugate, microtiter plate, zero standard solution, standard salbutamol solution 0.062, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร, substrate solution และ stopping solution (ชุดตรวจต้องเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส)

ตัวอย่างเนื้อหมู

เนื้อหมูส่วนสะโพก น้ำหนักประมาณ 300-500 กรัม เก็บจาก 12 จังหวัด คือ กรุงเทพมหานคร นนทบุรี ปทุมธานี สมุทรปราการ ออยุธยา อ่างทอง สิงห์บุรี สุพรรณบุรี ลพบุรี นครนายก ชัยนาท และสระบุรี โดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และสำนักงานสาธารณสุขจังหวัด ในปี พ.ศ. 2548 จำนวน 1,213 ตัวอย่าง และปี พ.ศ. 2549 จำนวน 719 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 1,932 ตัวอย่าง

วิธีการ

การเตรียมตัวอย่าง

นำเนื้อหมูมาตัดส่วนที่เป็นไขมันทิ้งไป หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดเนื้อ ซึ่งตัวอย่าง 1 กรัม ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 35 มิลลิลิตร ส่วนที่เหลือเก็บไว้เป็น reserved portion ที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส

การทดสอบความถูกต้องของวิธี

วิเคราะห์ method blank และ matrix blank, linearity ของ standard curve, spiked matrix โดยเติมสารมาตรฐาน clenbuterol และ salbutamol เพื่อยืนยันค่า LOD และทดสอบความเที่ยงและความแม่นยำระดับ LOQ และที่ 2.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

การสกัด

ดำเนินการตามวิธีในคู่มือของชุดตรวจ β -agonists-EIA⁽⁶⁾ ดังนี้ ละลาย pronase E 1.25 มิลลิกรัม ด้วย tris buffer 4 มิลลิลิตร เติมนลงในหลอดตัวอย่างที่เตรียมไว้แล้วนำไป incubate ใน water bath นาน 16-18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำหลอดตัวอย่างมาปั่นด้วย vortex mixer 30 นาที แล้ว centrifuge ด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ปิเปตสารละลายส่วนใส 2 มิลลิลิตร ลงใน centrifuge tube ขนาด 20 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 9.4 ± 0.2 โดยเติม 10 M NaOH เติม isobutyl alcohol 4 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วย vortex mixer 30 วินาที ตั้งทิ้งไว้จนสารละลายแยกชั้น ปิเปตสารชั้น isobutyl alcohol 2 มิลลิลิตร ใส่ใน vial ขนาด 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปประเหยจนแห้งด้วย nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ละลายส่วนที่เหลืออยู่ด้วยน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วย vortex mixer 30 วินาที

การทำให้บริสุทธิ์

เนื่องจากพบปัญหาการรบกวนจาก matrix จึงได้เพิ่มขั้นตอนนี้จากคู่มือของชุดตรวจเพื่อให้ตัวอย่างบริสุทธิ์ขึ้น นำสารสกัดที่ได้ผ่านลงใน Oasis SPE ที่ล้างไว้ก่อนด้วย MeOH 2 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร elute SPE cartridge ด้วย MeOH 3 มิลลิลิตรด้วยอัตราไหลประมาณ 2 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บ eluate ที่ได้ใน vial ขนาด 8 มิลลิลิตร แล้วนำไปประเหยจนแห้งด้วย nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ละลายส่วนที่เหลืออยู่ด้วย dilution buffer 500 ไมโครลิตร

การตรวจหาปริมาณ

ดำเนินการตามวิธีในคู่มือของ ชุดตรวจ β -agonists-EIA ดังนี้

สร้าง calibration curve ระหว่าง % maximal absorbance (%B/Bo) กับ log ของความเข้มข้นของสารมาตรฐาน salbutamol ที่ 0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารมาตรฐานลงใน microtiter well 50 ไมโครลิตร ความเข้มข้นละ 2 หลุม

ตรวจปริมาณในตัวอย่าง โดยปิเปต 50 ไมโครลิตรของสารละลายตัวอย่างที่สกัดและทำให้บริสุทธิ์แล้วลงใน microtiter well ตัวอย่างละ 2 หลุม ทุกหลุมเติมสารละลายผสมของ lyophilized conjugate, lyophilized antibody และ dilution buffer 4 มิลลิลิตร หลุมละ 25 ไมโครลิตร ปิด plate ด้วย parafilm แล้วเขย่าเบาๆ นำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้าง plate โดยใช้ automated washer ทำให้ plate แห้งแล้วเติม substrate solution หลุมละ 100 ไมโครลิตร ปิด plate ด้วย parafilm แล้วเขย่าเบาๆ นำไปเก็บในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 25 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปิเปต stopping solution 100 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุมแล้วเขย่าเบาๆ นำไปอ่านค่า Absorbance ทันที ด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

การควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์

Standard curve ต้องมีค่า correlation coefficient (r) มากกว่าหรือเท่ากับ 0.98 และทุกรุ่นการวิเคราะห์ จะต้องวิเคราะห์ method blank, duplicate sample (สกัด 2 ซ้ำ) อย่างน้อยร้อยละ 10 ของจำนวนตัวอย่างในรุ่น ค่า relative percent difference (RPD) ไม่เกิน 30% และ spiked sample ที่ระดับ 2.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม อย่างน้อย 1 ตัวอย่าง ค่า % recovery ต้องอยู่ในช่วง 60–120%

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด

ประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดโดยคำนึงถึงแหล่งที่มาของความไม่แน่นอน รวมค่าความไม่แน่นอนทั้งหมดแล้วคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ค่า $k = 2$

ผล

ผลการตรวจวิเคราะห์เนื้อหมูจากจังหวัดในเขตภาคกลาง 12 จังหวัด ในปี พ.ศ. 2548 และ พ.ศ. 2549 จำนวนรวม 1,932 ตัวอย่าง ตรวจพบสารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ตกค้าง จำนวน 240 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 12.4 ปริมาณที่ตรวจพบอยู่ระหว่าง 1.0–26.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่าเฉลี่ยและค่า median ของปริมาณที่ตรวจพบเท่ากับ 2.7 และ 2.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ โดยในปี 2548 ทำการวิเคราะห์ 1,213 ตัวอย่าง ตรวจพบ 137 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 11.3 ปริมาณเฉลี่ยเท่ากับ 3.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และในปี พ.ศ. 2549 ทำการวิเคราะห์ 719 ตัวอย่าง ตรวจพบ 103 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 14.3 ปริมาณเฉลี่ยเท่ากับ 2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างเนื้อหมูที่ตรวจวิเคราะห์สารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ พ.ศ. 2548–2549

จังหวัด	พ.ศ. 2548					พ.ศ. 2549				
	จำนวนตัวอย่าง		ปริมาณที่พบ			จำนวนตัวอย่าง		ปริมาณที่พบ		
			(ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)					(ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)		
	วิเคราะห์	พบ	ค่าต่ำสุด-ค่าสูงสุด	ค่าเฉลี่ย	ค่ามัธยฐาน	วิเคราะห์	พบ	ค่าต่ำสุด-ค่าสูงสุด	ค่าเฉลี่ย	ค่ามัธยฐาน
กรุงเทพมหานคร	250	42	1.6-15.8	2.8	2.2	200	44	1.0-4.5	1.6	1.3
นนทบุรี	137	9	1.6-2.9	2.2	2.2	113	29	1.6-6.7	2.3	2.1
พระนครศรีอยุธยา	55	0	0	0	0	75	2	2.0-2.9	2.4	2.4
อ่างทอง	65	0	0	0	0	57	2	1.1-1.6	1.4	1.4
สิงห์บุรี	25	2	1.9-2.6	2.2	2.2	45	3	1.1-2.3	1.9	2.2
สุพรรณบุรี	55	7	1.7-3.4	2.6	2.5	0	0	0	0	0
ลพบุรี	78	11	2.3-26.5	10.3	7.9	60	3	1.6-4.9	3.5	4.1
นครนายก	60	5	1.7-2.2	1.9	1.9	40	3	1.3-1.7	1.5	1.4
ชัยนาท	35	2	2.3-2.7	2.5	2.5	0	0	0	0	0
สระบุรี	131	40	1.6-12.9	3.2	2.3	20	1	6.5	6.5	6.5
ปทุมธานี	246	12	1.7-9.2	3.2	2.6	89	11	1.2-2.1	1.6	1.6
สมุทรปราการ	76	7	1.6-8.4	3.2	2.5	20	5	1.5-4.5	2.6	2.6
รวม	1,213	137	1.6-26.5	3.3	2.3	719	103	1.0-6.7	2.0	1.7

การวิเคราะห์สารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ โดยชุดตรวจ β -agonists-EIA (Euro-Diagnostica B.V.) เมื่อทดลองนำวิธีการสกัดที่กำหนดไว้ในคู่มือมาใช้ พบว่ามีปัญหาการรบกวนของ matrix จึงได้ปรับปรุงวิธีโดยเพิ่มขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ SPE พบว่าสามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้ เมื่อปรับปรุงวิธีแล้วได้ทำการทวนสอบความถูกต้องของวิธีตาม Eurachem⁽⁷⁾ โดยวิเคราะห์ method blank และ matrix blank ที่ใช้เนื้อหมูอนามัยที่ได้รับการรับรองจากกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พบว่าให้สัญญาณ %B/Bo น้อยกว่าค่า LOD ทำการทดสอบ linearity ของ standard curve ได้ค่า Correlation coefficient (r) มากกว่า 0.98 และพบว่าค่า LOD เท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

และค่า LOQ เท่ากับ 1.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ทำการยืนยันค่า LOD โดยวิเคราะห์ตัวอย่าง spiked matrix ด้วยสารมาตรฐาน clenbuterol และ salbutamol ที่ระดับ LOD จำนวน 7 ซ้ำ ผลตรวจพบทุกตัวอย่าง ทำการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงที่ระดับ LOQ และ 2.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ระดับละ 7 ซ้ำ พบว่าที่ระดับ LOQ มี % recovery เฉลี่ยของ clenbuterol และ salbutamol เท่ากับ 110.5 และ 105.2 โดยมีค่า RSD เท่ากับ 12.3 และ 6.0 ตามลำดับ และที่ระดับ 2.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มี % recovery เฉลี่ยของ clenbuterol และ salbutamol เท่ากับ 80.5 และ 89.1 โดยมีค่า RSD เท่ากับ 10.8 และ 11.4 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การทดสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์สารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ในเนื้อหมู

สาร	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	% Recovery (n = 7)	
		Mean $\pm$ SD	RSD
Clenbuterol	1.0	110.5 $\pm$ 13.6	12.3
	2.5	80.5 $\pm$ 8.7	10.8
Salbutamol	1.0	105.2 $\pm$ 6.3	6.0
	2.5	89.1 $\pm$ 10.1	11.4

เพื่อยืนยันความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ จึงได้ประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด พบว่าแหล่งที่มาของความไม่แน่นอน ได้แก่ การชั่งน้ำหนักตัวอย่าง, ปริมาตรสุดท้ายของสารสกัด, ค่า C_0 ที่อ่านได้จาก standard curve, ค่า bias และ precision ได้ค่า relative standard uncertainty,

$u(x)/x$ พบว่า แหล่งของความไม่แน่นอนที่สำคัญคือ precision และค่า C_0 เมื่อนำค่าความไม่แน่นอนจากทุกแหล่งมารวมกันจะได้ค่า combined standard uncertainty เท่ากับ $\pm 14.8\%$ และนำมาขยายให้เป็น Expanded uncertainty, U จะได้ค่าความไม่แน่นอนเท่ากับ $\pm 29.6\%$ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ค่า Relative standard uncertainty, combined standard uncertainty และ expanded uncertainty ของวิธีวิเคราะห์สารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์

Component	Value x	Standard uncertainty u	Relative standard uncertainty u(x)/x
sample weight	1 g	0.00176 g	0.00176
volume	500 µl	0.54 µl	0.00077
Co	0.542 ng/ml	0.047 ng/ml	0.08672
Bias	100%	2.26%	0.02263
repeatability	1	0.12	0.11831
Combined standard uncertainty			0.14844
Expanded uncertainty U			$r \times 2 \times 0.14844$
(Result, $r = 1.84 \mu\text{g/kg}$)			0.55 µg/kg

(Co คือค่าความเข้มข้นที่อ่านได้จาก standard curve)

วิจารณ์

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์โดยชุดตรวจ β -agonists-EIA ใช้หลักการ competitive enzyme immunoassay มีความจำเพาะ กับสาร clenbuterol และ salbutamol โดยค่า cross activity เท่ากับ 100% ผู้วิจัยได้เพิ่มขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ SPE และได้ทวนสอบความถูกต้อง พบว่ามีค่า LOD, LOQ, ความเที่ยงและความแม่นยำเหมาะสมกับวัตถุประสงค์ของวิธี และวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวยังมีข้อควรระวังคือตัวอย่างที่ส่งตรวจควรมีสภาพปกติ เนื้อหามีสภาพสด สีไม่เปลี่ยนเขียวคล้ำ เพราะจะทำให้ผลวิเคราะห์เป็นค่าบวกปลอม (false positive) ได้ ในช่วงขั้นตอนการสกัด หลังจาก incubate ด้วย enzyme เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมงแล้ว ควรสกัดและผ่าน SPE ให้เสร็จภายในวันเดียว สารละลายที่อยู่ใน dilution buffer สามารถเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ได้นาน 1 สัปดาห์ จุดวิกฤติอีกจุดหนึ่งคือขั้นตอนการปรับ pH ด้วยต่างให้ได้ค่า

pH 9.4 ± 0.2 ต้องใช้ กระดาษ pH ที่มีความละเอียดพอเพื่อให้ได้ค่า pH ที่ต้องการ จุดที่ควรระวังมากคือขั้นตอนการระเหยแห้งด้วย nitrogen evaporator ต้องไม่ให้แห้งเกินไป หากไม่ระเหยในขั้นตอนที่กล่าวมาจะทำให้ประสิทธิภาพการวิเคราะห์ลดลง และ % recovery ของ spiked matrix ต่ำกว่าเกณฑ์กำหนด

จากผลการสำรวจสารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ตกค้างในเนื้อหมูในปี พ.ศ. 2548 และ พ.ศ. 2549 ที่ได้ดำเนินการ พบว่าในปี 2549 ค่าเฉลี่ยปริมาณตกค้างที่พบลดลง และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ส่วนอัตราการตรวจพบมากขึ้น เนื่องจาก ปี พ.ศ. 2549 สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดเลือกเก็บตัวอย่างเฉพาะจากร้านค้าที่มีประวัติการตรวจพบจากปี พ.ศ. 2548 อีกทั้งการนำโครงการป้ายทองอาหารปลอดภัยมาใช้รับรองคุณภาพอาหารที่จำหน่ายในตลาดสดและซูเปอร์มาร์เก็ต ทำให้

ประชาชนและผู้จำหน่ายเนื้อหมู ทราบถึงคุณภาพเนื้อหมูที่รับมาจำหน่าย และมีผลกดดันให้ฟาร์มเลี้ยงที่มีการลักลอบใช้สารเคมีดังกล่าว ไม่สามารถจำหน่ายเนื้อหมูได้ การนำเทคนิค ELISA มาใช้ตรวจคุณภาพอาหารนั้นมีประโยชน์เนื่องจากเทคนิคนี้มีความไวและความจำเพาะสูง แต่ยังมีข้อจำกัดและข้อควรระวังในขั้นตอนการวิเคราะห์ ผู้วิเคราะห์จำเป็นต้องมีความเข้าใจและใส่ใจในการควบคุมคุณภาพผลการวิเคราะห์อย่างเข้มงวด อย่างไรก็ตามการนำผลการวิเคราะห์ไปใช้ดำเนินการทางกฎหมาย จำเป็นต้องมีการตรวจยืนยันด้วยวิธีอื่น เช่นการใช้เครื่องมือ LC-MS/MS ที่มีความจำเพาะและความไวสูงมีความมั่นใจผลการตรวจพบนั้นถูกต้องและแม่นยำ เพื่อความเป็นธรรมแก่ผู้ประกอบการและผู้บริโภค

สรุป

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ตกค้างในเนื้อหมูโดยเทคนิค ELISA ที่ได้ปรับปรุงโดยการเพิ่มขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วย SPE ซึ่งลดปัญหาการรบกวนจาก matrix ของตัวอย่าง ผลการทวนสอบความถูกต้องของวิธีพบว่าเหมาะสมกับวัตถุประสงค์ เมื่อนำวิธีมาใช้สำรวจเนื้อหมูที่จำหน่ายในกรุงเทพมหานครและจังหวัดในเขตภาคกลางในปี พ.ศ. 2548 และ พ.ศ. 2549 จำนวนทั้งสิ้น 1,932 ตัวอย่างพบว่าค่าเฉลี่ยปริมาณการตรวจพบลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ข้อมูลจากการวิเคราะห์ได้นำไปใช้ในการพิจารณาให้การรับรองป้ายทองอาหารปลอดภัย เพื่อให้ผู้บริโภคมั่นใจในความปลอดภัยในการบริโภคเนื้อหมู

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข. ปัญหาตกค้างในเนื้อสัตว์และแนวทางแก้ไข. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก; 2545. หน้า 1-2.
2. จารุณี โลกสุวรรณ. การตรวจหาสารคลอนิโดเทอรอลตกค้างในเนื้อและตับหมู. วกรรม วิทย พ 2537; 36(3) : 185-90.
3. ลัดดา แก้วกล้าปัญญาเจริญ. การวิเคราะห์ปริมาณซาลบูตามอลตกค้างในเนื้อ ตับ และไตสุกร โดยวิธี HPLC. วกรรม วิทย พ 2544; 43(3) : 215-20.
4. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ.2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 269 (พ.ศ.2546) เรื่องมาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อนสารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 120 ตอนพิเศษ 47ง (ลงวันที่ 23 เมษายน 2546) หน้า 12.
5. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่องหลักเกณฑ์ เงื่อนไข และวิธีการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารเคมีบางชนิดในอาหาร ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 120 ตอนพิเศษ 508 (ลงวันที่ 24 เมษายน 2546) หน้า 28.
6. Anonymous. A microtiter plate based competitive enzyme immunoassay for analysis and screening of urine, feces, feed, bile, tissue, plasma, hair and choroids/retina samples. Beijerinckweg (The Netherlands) Euro-Diagnostica B.V. Euro-Diagnostica 5061BAG1p[18]07.05.
7. Eurachem. The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics. Teddington (UK) : LGC; 1998. (Eurachem Guide).
8. Eurachem. Quantifying uncertainty in analytical measurement. 2 nd ed. Teddington (UK) : LGC; 2000. (EURACHEM/CITAC Guide CG4).

Survey of Beta-agonists Residue in Pork by Enzyme Linked Immunosorbent Assay, 2005 - 2006

Chalearmphorn Kuanha Ladda Kaewklapanyachareon and Kanokporn Atisook

Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road. Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Survey of Beta-agonists residue in pork sold in central area including Bangkok during 2005-2006 by Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) technique was carried out. The method was modified by adding clean-up step and modified method was verified. The verification data showed that accuracy, precision and uncertainty of measurement were accepted and fitted-for-purpose. From 1,932 pork samples, the beta-agonists residue was found in 240 samples (12.4%). The range of residue found was 1.0-26.5 µg/kg with mean and median of 2.7 and 2.1 µg/kg, respectively. Comparing the mean level of contamination of pork samples collecting in 2005 and 2006, they are significantly decreased ($p < 0.01$). The result of this survey can declare the success of government policy, by Ministry of Public Health cooperated with Ministry of Agriculture and Cooperatives, for stopping the misuse of these compounds.

Key words: Beta-agonists, pork, ELISA