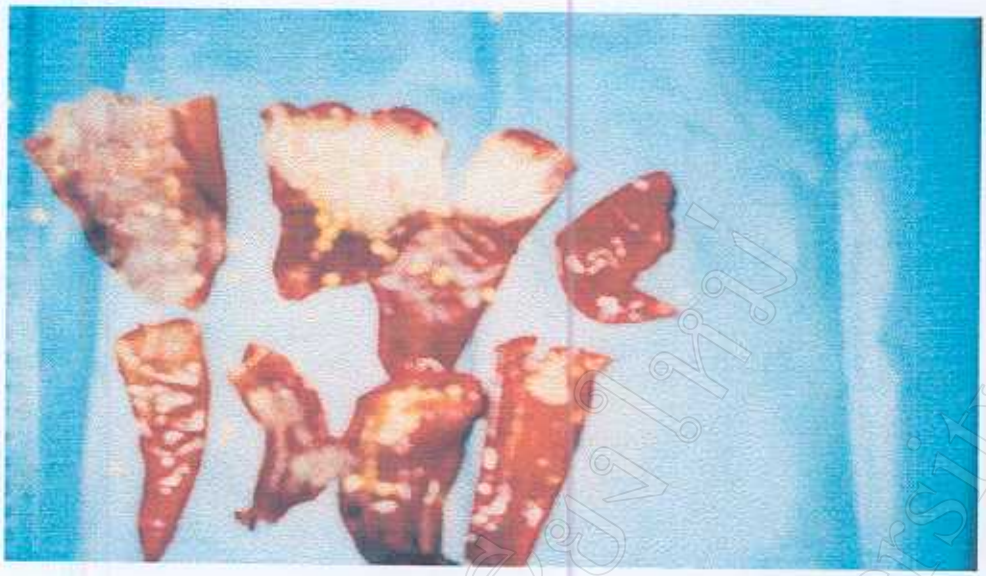
ภาคผนวก ก

ภาพตัวอย่างพริกแห้งในภาชนะบรรจุแบบต่างๆ

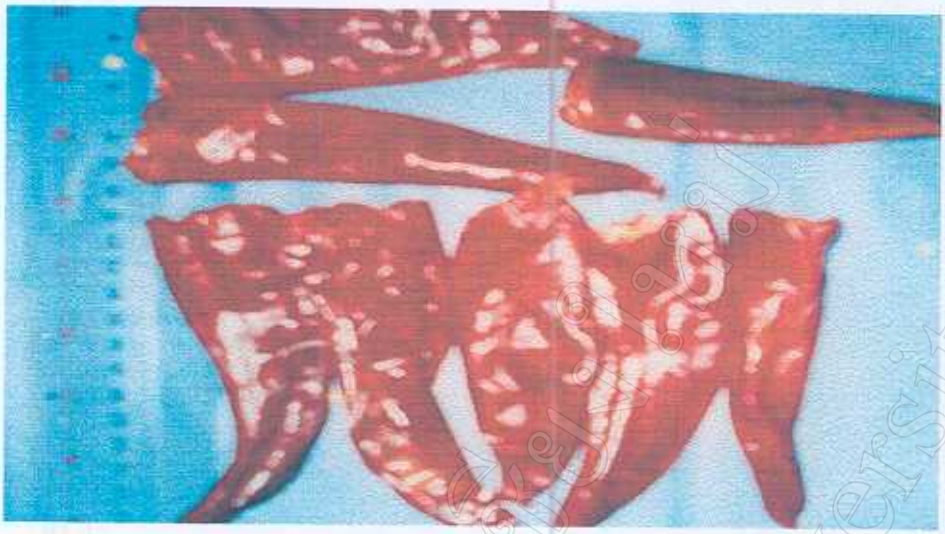
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



รูปที่ 1 พริกหยวกหรือพริกอุ้งน้ำที่มีเชื้อรา

รูปที่ 2 พริกหยวกหรือพริกอุ้งน้ำทั่ว ๆ ไป

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

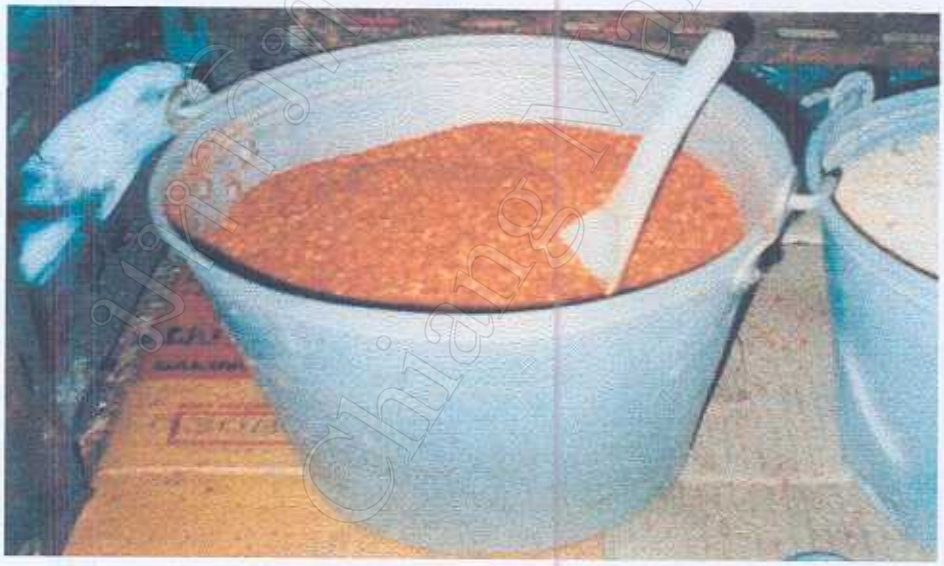


รูปที่ 3 พริกหยวกหรือพริกอุ้งน้ำที่คัดแล้ว

รูปที่ 4 พริกแห้งป่น แบบมัดปากถุงด้วยยางรัด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

รูปที่ 5 พริกแห้งป่น แบบเชื่อมปิดถุงด้วยความร้อน



รูปที่ 6 พริกแห้งป่น แบบตักแบ่งขาย (ภาชนะบรรจุ ถังอลูมิเนียม)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

รูปที่ 7 ชุดวิเคราะห์หา อะฟลาทอกซิน

รูปที่ 8 ชุดวิเคราะห์หา อะฟลาทอกซิน

1. Red – Stopping บรรจุในขวดที่ติดฉลากสีแดง
2. Conjugate บรรจุในขวดติดฉลากสีฟ้า
3. Substrate บรรจุในขวดที่ติดฉลากสีเขียว
4. Control ความเข้มข้น ของอะฟลาทอกซิน 0, 5, 15 ,50 ppb.ฉลากสีเหลือง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

รูปที่ 9 ชุดวิเคราะห์หา อะฟลาทอกซิน

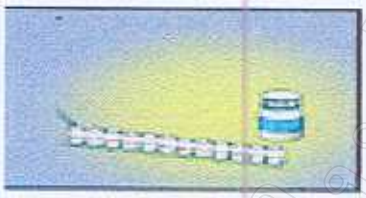
1. Antibody – coated Microwell
2. Red – Marked Mixing Well

รูปที่ 10 ชุดวิเคราะห์หา อะฟลาทอกซิน

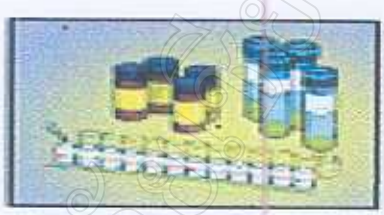
(เก็บรักษาในสภาพแช่เย็น)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

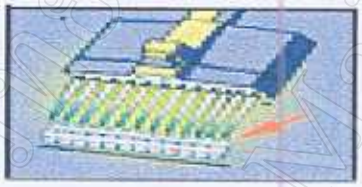
รูปที่ 11 ขั้นตอนการวิเคราะห์ อะฟลาทอกซิน



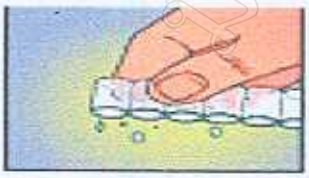
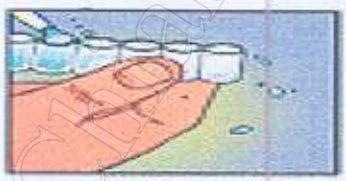
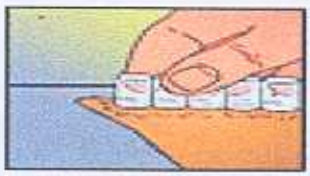
1. CONJUGATE SOLUTION



2. STANDARD SOLUTION AND SAMPLE



3. TRANSFERING TO ANTIBODY - COATED WELL

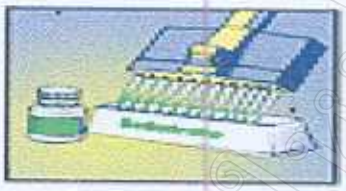




4. WASHING – STEP

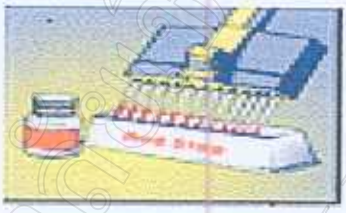
ที่มา : Aflatoxin and Carcinogenesis Through Alkation of Vitaletheiene Modulaters

[ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา **http :// www.vitaletherapeutic.org/vtalaflatoxin.htm**

(13 /04/2543)



5. SUBSTRATE SOLUTION

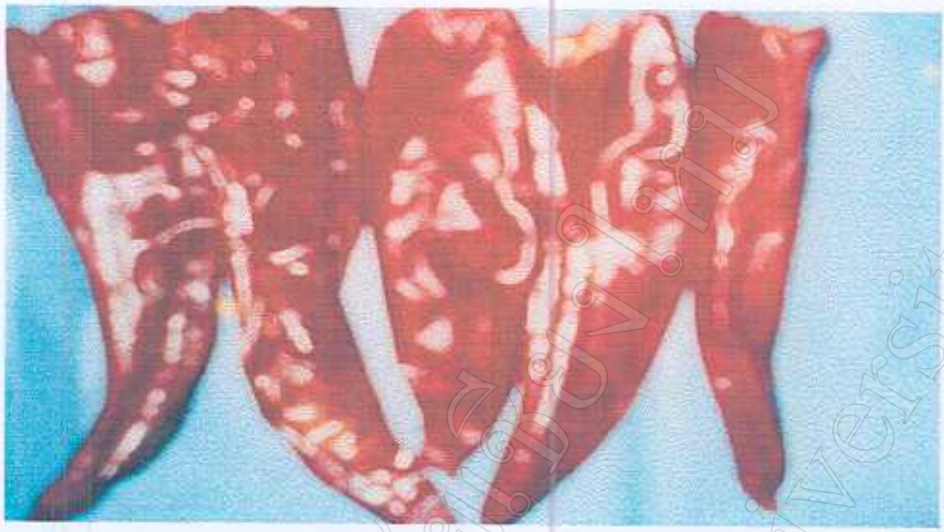


6. RED STOP SOLUTION

รูปที่ 12 การเปรียบเทียบสีในการตรวจสอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

การวิเคราะห์หา Aflatoxin ในห้องปฏิบัติการ



รูปที่ 13 พริกแห้งก่อนทำพริกแห้งป่น

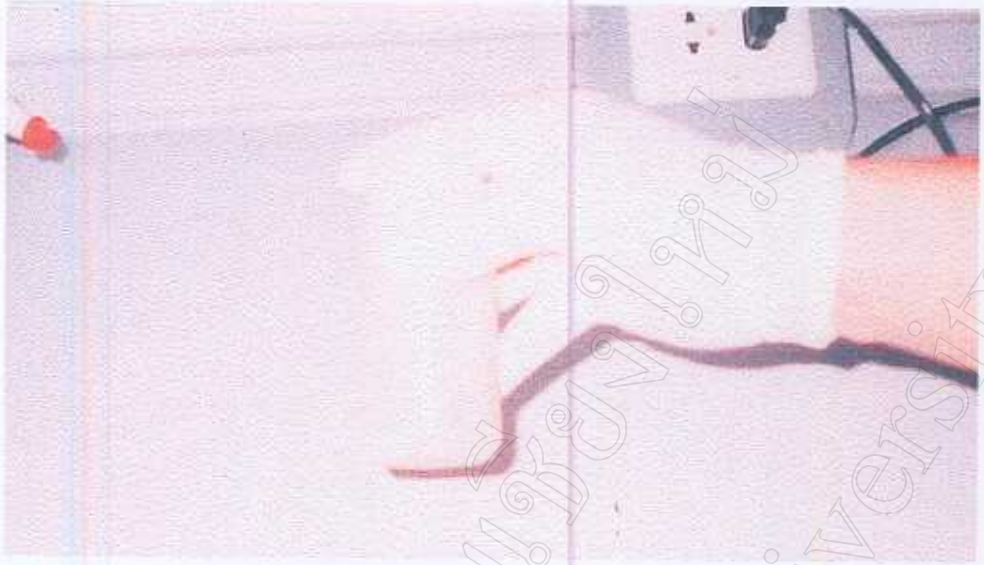
รูปที่ 14 พริกแห้งป่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

รูปที่ 15 การชั่งตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์

รูปที่ 16 น้ำกลั่น 3 ส่วน : เมทธานอล 7 ส่วน

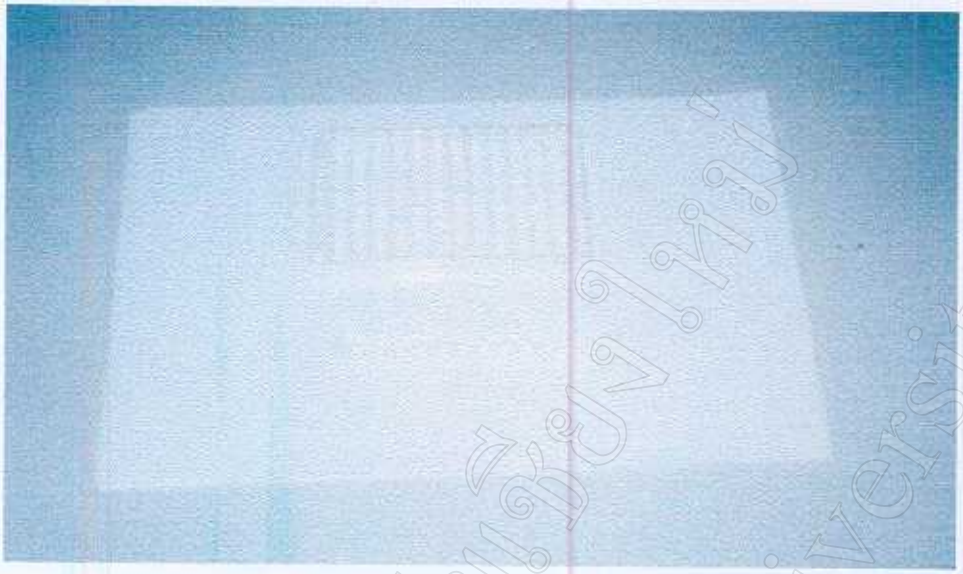
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



รูปที่ 17 พริกแห้งป่น 50 กรัม : เมทธานอล 70% 250 ml

รูปที่ 18 กรองด้วยกระดาษกรอง 5- 15 ml.

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University



รูปที่ 19 ชุดวิเคราะห์หา อะฟลาทอกซิน

1. Microwell Holder
2. Antibody – Coated Microwell

รูปที่ 20 ใส่ Conjugate ลงใน Mixing Well

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

รูปที่ 21 ใส่ Control ลงใน Mixing Well

รูปที่ 22 เปลี่ยนทิปใหม่ทุกครั้งที่ดูด Control ลงใน Mixing Well

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

รูปที่ 23 ย้ายส่วนผสมจาก Mixing Well ลงใน Antibody – Coated Well

รูปที่ 24 เทส่วนผสมทิ้งแล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

รูปที่ 25 เคาะเบา ๆ ให้หยดน้ำหมด

รูปที่ 26 ใส่ Substrate ลงใน Antibody – Coated Well

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

รูปที่ 27 เขย่าเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที

รูปที่ 28 ใส่ Red Stopping ลงใน Antibody – Coated Well

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

(1) (2)

รูปที่ 29 การเปรียบเทียบสีในการตรวจสอบ

(1) สีของตัวอย่างเข้มกว่าสีของชุดควบคุม

(2) สีของตัวอย่างอ่อนกว่าสีของชุดควบคุม

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ภาคผนวก ข

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม พริกแห้ง

1. ขอบข่าย

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้กำหนด ชนิด คุณลักษณะที่ต้องการสุขลักษณะ ภาชนะบรรจุ ปริมาณ เครื่องหมายและฉลาก การชักตัวอย่างและเกณฑ์ตัดสิน และมีการตรวจสอบและการวิเคราะห์พริกแห้ง

2. บทนิยาม

ความหมายของคำที่ใช้ในมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้ มีดังต่อไปนี้

2.1 พริกแห้ง หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากผลพืชสกุลพริก (*Capsicum sp.*) เช่น พริกขี้หนูสวน (*Capsicum minimum Roxb.*) พริกขี้หนู (*Capsicum frutescens Linn.*) และพริกอ่อนหรือพริกชี้ฟ้า (*Capsicum annuum Linn.*) ที่สุกหรือแก่จัด นำมาทำให้แห้ง อาจมีก้านผลติดอยู่หรือไม่ก็ได้

2.2 ผลที่มีตำหนิ (Unripe or marked berries) หมายถึง พริกแห้งที่มีสีเขียวหรือสีเหลืองอ่อนเนื่องจากผลยังไม่สุก หรือแก่จัดหรือผลที่ไม่สมบูรณ์ หรือ ผิดปกติ เนื่องจากถูกแมลงหรือโรคคุกคาม

2.3 ผลที่แตกหัก (Broken berries) หมายถึง พริกแห้งที่ไม่สมบูรณ์เนื่องจากแตกหัก

2.4 สิ่งเจือปน (Extraneous matter) หมายถึง ส่วนต่าง ๆ ของต้นพริก เช่น กิ่ง ก้าน ใบ เมล็ด หรือช่อดอกของพริก (ยกเว้นก้านที่ติดมากับผล) และสิ่งปะปนอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ส่วนประกอบตามธรรมชาติของพริก

3. ชนิด

3.1 พริกแห้งแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

3.1.1 ชนิดผลเล็ก โดยทั่วไปมีความยาวของผลน้อยกว่า 6 เซนติเมตร

3.1.2 ชนิดผลใหญ่ โดยทั่วไปมีความยาวของผลตั้งแต่ 6 เซนติเมตรขึ้นไป

4. คุณลักษณะที่ต้องการ

4.1 ลักษณะทั่วไป

4.1.1 ผลที่มีลักษณะแบนเล็กน้อยและมีสีแสดถึงแดงแก่ ภายในผลมีเมล็ดสีเหลือง

4.1.2 ผลพริกชนิดเดียวกันต้องมีลักษณะรูปร่างคล้ายคลึงกัน(Uniform in shape)

4.1.3 ต้องมีกลิ่นและรสชาติตามธรรมชาติของพริก ไม่มีกลิ่นหืน กลิ่นอับหรือกลิ่นรสแปลกปลอมอื่นใด

4.1.4 ต้องไม่มีรา แมลง ชิ้นส่วนของแมลงหรือมูลสัตว์ ที่สังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า

4.2 การปราศจากข้อบกพร่อง

4.2.1 ผลที่มีตำหนิ จะมีได้ไม่เกินร้อยละ 5

4.2.2.1 ผลที่แตกหัก

4.2.2.1.1 ชนิดของผลเล็ก จะมีได้ไม่เกินร้อยละ 5

4.2.2.1.2 ชนิดผลใหญ่ จะมีได้ไม่เกินร้อยละ 10

4.2.2.2 สิ่งเจือปน จะมีได้ไม่เกินร้อยละ 2

การตรวจสอบให้ปฏิบัติตามข้อ 10.2

4.3 คุณลักษณะทางเคมีให้เป็นไปตามที่กำหนดในตารางที่ 1 การวิเคราะห์ให้ปฏิบัติตามข้อ 10.3

5. สุขลักษณะ

5.1 สุขลักษณะในการทำพริกแห้ง ให้เป็นไปตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กำหนดสุขลักษณะของอาหาร มาตรฐานเลขที่ มอก.34

6. ภาชนะบรรจุ

6.1 ภาชนะที่ใช้บรรจุพริกแห้งต้องสะอาด ถูกสุขลักษณะ และไม่ขัดกับประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่องภาชนะบรรจุ

ตารางที่ 1 คุณลักษณะทางเคมีของพริกแห้ง

ลำดับที่	คุณลักษณะ	เกณฑ์ที่กำหนด
1.	ความชื้น ร้อยละ ไม่เกิน	13
2.	เถ้าทั้งหมด ร้อยละของน้ำหนักอบแห้งไม่เกิน	8
3.	เถ้าที่ไม่ละลายในกรด ร้อยละของน้ำหนักอบแห้ง ไม่เกิน	1.25
4.	ส่วนที่ไม่ระเหยที่สกัดได้ด้วยอีเทอร์ ร้อยละของน้ำหนักอบแห้ง ไม่น้อยกว่า	
	ชนิดผลเล็ก	15
	ชนิดผลใหญ่	12
5.	กาก ร้อยละของน้ำหนักอบแห้ง ไม่เกิน	28
6.	อะฟลาทอกซิน ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมของตัวอย่าง ไม่เกิน	20

7. ปริมาณ

น้ำหนักสุทธิของพริกแห้งในแต่ละภาชนะบรรจุต้องไม่น้อยกว่าที่ระบุไว้ที่ฉลาก

8. เครื่องหมายและฉลาก

8.1 ฉลากให้เป็นไปตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม คำแนะนำทั่วไปเกี่ยวกับฉลากสำหรับผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มาตรฐานเลขที่ มอก. 31 และไม่ขัดกับประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่องฉลาก

8.2 ที่ภาชนะบรรจุพริกแห้งทุกหน่วย อย่างน้อยต้องมีเลข อักษร หรือเครื่องหมายแจ้งรายละเอียดต่อไปนี้ให้เห็นได้ง่าย ชัดเจน

(1) คำว่า " พริกแห้ง "

(2) ชนิด

(3) น้ำหนักสุทธิ เป็น กรัมหรือกิโลกรัม

(4) เดือนปีที่ทำ

(5) ชื่อผู้ทำ หรือโรงงานที่ทำ หรือเครื่องหมายการค้า หรือชื่อผู้บรรจุ หรือชื่อผู้จัดจำหน่าย พร้อมสถานที่ตั้ง

(6) ประเทศที่ทำ

ในกรณีที่ใช้ภาษาต่างประเทศด้วย ต้องมีเครื่องหมายตรงกับภาษาไทย

8.3 ผู้ทำผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมที่เป็นไปตามมาตรฐานนี้ จะแสดงเครื่องหมายมาตรฐานกับผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนั้นได้ ต่อเมื่อได้รับใบอนุญาตจากคณะกรรมการมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมแล้ว

การชักตัวอย่างและเกณฑ์การตัดสิน

9.1 ความหมายของคำที่ใช้

พริกแห้งชนิดเดียวกัน บรรจุและเก็บรักษาในสภาพและภาวะเดียวกัน

บรรจุและเก็บรักษาในสภาพและภาวะเดียวกัน

ขนาดของรุ่น หมายถึง จำนวนภาชนะบรรจุพริกแห้งในรุ่นหนึ่ง ๆ

9.1.3 ขนาดตัวอย่าง หมายถึง จำนวนภาชนะบรรจุพริกแห้งที่ชักตัวอย่างเพื่อการตรวจสอบและวิเคราะห์ในรุ่นนั้น

9.2 การชักตัวอย่างและเกณฑ์การตัดสินให้เป็นไปตามแผนการชักตัวอย่างที่กำหนดต่อไปนี้ หรืออาจใช้แผนการชักตัวอย่างอื่นที่เทียบเท่ากันทางวิชาการกับแผนที่กำหนดไว้

9.2.1 การชักตัวอย่าง

ให้ทำโดยวิธีสุ่มจากผลิตภัณฑ์ที่ทำขึ้นในรุ่นเดียวกัน ตามแผนการชักตัวอย่างในตารางที่ 2

9.2.1.1 การเก็บตัวอย่างเพื่อการตรวจสอบและวิเคราะห์

ให้ตรวจสอบภาชนะบรรจุ ปริมาณ เครื่องหมายและฉลากที่ 2 ก่อนดำเนินการเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจสอบและวิเคราะห์ดังนี้

(1) ใช้เครื่องมือที่เหมาะสม ชักตัวอย่างพริกแห้งปริมาณเท่า ๆ กัน จากแต่ละภาชนะ นำตัวอย่างที่ชักได้ทั้งหมดมาผสมรวมกันโดยต้องได้น้ำหนักไม่น้อยกว่า 1500 กรัม

(2) แบ่งตัวอย่างตามข้อ (1) ออกเป็นสามส่วน เท่า ๆ กัน บรรจุตัวอย่างแต่ละส่วนลงในภาชนะที่สะอาด ปิดผนึก ลงลายมือชื่อผู้ชักตัวอย่างพร้อมทั้งวันเดือนปีที่ชักตัวอย่าง นำตัวอย่างส่วนหนึ่งไปใช้ในการตรวจสอบและการวิเคราะห์ อีกสองส่วนที่เหลือให้ผู้เกี่ยวข้องเก็บไว้เป็นหลักฐาน

9.2.2 เกณฑ์การตัดสิน

ผลการตรวจสอบและวิเคราะห์ตัวอย่าง ต้องเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดทุกรายการ จึงจะถือว่าพริกแห้งรุ่นนั้นเป็นไปตามมาตรฐานนี้

ตารางที่ 2 แผนการชักตัวอย่าง

ขนาดรุ่นภาชนะบรรจุ	ขนาดตัวอย่างภาชนะบรรจุ
1 ถึง 5	ทุกหน่วย
6 ถึง 49	5
50 ถึง 100	ร้อยละ 10 ของขนาดรุ่น *
ตั้งแต่ 101 ขึ้นไป	รากที่ 2 ของขนาดรุ่น *

หมายเหตุ * ถ้ามีเศษ ให้ปัดเป็นเลขจำนวนเต็มตามกฎการปัดเศษ

การตรวจสอบและการวิเคราะห์

ลักษณะทั่ว ไป

ให้ตรวจสอบลักษณะทั่วไปตามข้อ4 ก่อนตรวจสอบและวิเคราะห์คุณลักษณะต่างๆ

ผลที่มีตำหนิ ผลที่แตกหัก และสิ่งเจือปน

เครื่องมือ

(1) กระจกนาฬิกา

(2) เครื่องชั่งอย่างละเอียด

วิธีตรวจสอบ

ชั่งตัวอย่างประมาณ 100 กรัม ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน (M_1) แยกผลที่มีตำหนิ ผลที่แตกหักและสิ่งเจือปนออกจากกันให้หมด แล้วแยกแต่ละรายการใส่ลงในกระจกนาฬิกาที่สะอาด แห้ง และทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว (M_0) นำไปชั่งครั้งหนึ่ง (M_2)

วิธีคำนวณ

$$C = \frac{M_2 - M_0}{M_1} \times 100$$

เมื่อ C คือ ผลที่มีตำหนิหรือผลที่แตกหักหรือสิ่งเจือปนเป็นร้อยละของน้ำหนัก

M_2 คือ น้ำหนักกระจกนาฬิกาและผลที่มีตำหนิ หรือน้ำหนักกระจกนาฬิกาและสิ่งเจือปน (แล้วแต่กรณี) เป็นกรัม

M_0 คือ น้ำหนักกระจกนาฬิกา เป็นกรัม

M_1 คือ น้ำหนักตัวอย่าง เป็นกรัม

คุณลักษณะทางเคมี

การเตรียมตัวอย่าง

ชักตัวอย่างประมาณ 300 กรัม นำมาบดให้ละเอียด

การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น ปริมาณเถ้าทั้งหมด ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด ส่วนที่ไม่ระเหยที่สกัดได้ด้วยอีเทอร์และปริมาณกาก ให้ใช้วิธีวิเคราะห์ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม พริกไทย มาตรฐานเลขที่ มอก.297

การวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซิน ให้วิเคราะห์ตามวิธีที่กำหนดใน AOAC (1980) วิธีตรวจแบบคอลัมน์ขนาดเล็ก (Minicoluum Detection method) หรือวิธีโครมาโตกราฟี (Chromatographic methods) ในกรณีที่มีปัญหาให้ใช้เดนซิโตมิเตอร์ (Densitometer) ตัดสิน

ภาคผนวก ค

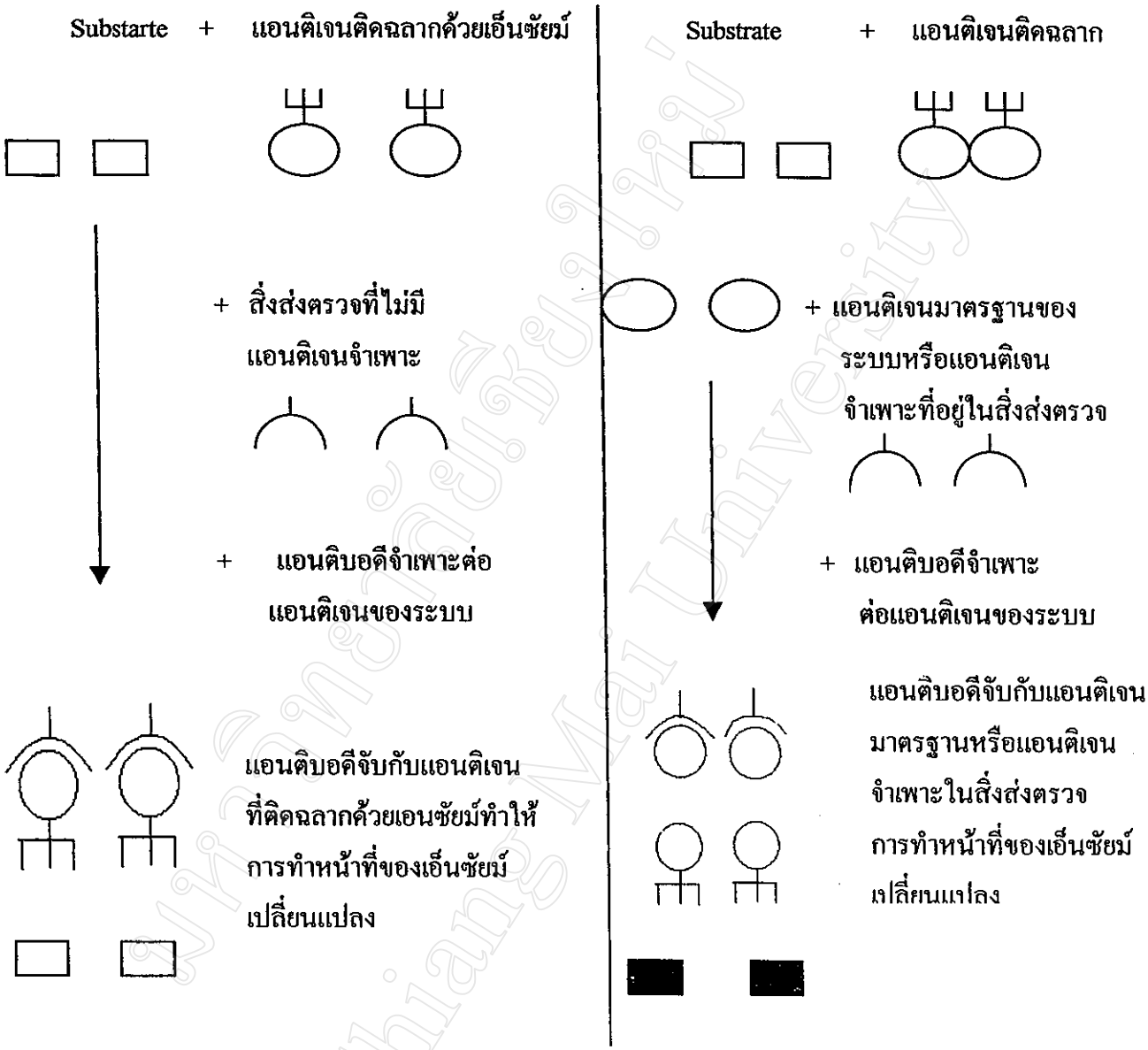
หลักการของ Enzyme Immunoassay (ELISA)

เนื่องจากเอนซัยม์หนึ่งโมเลกุลสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ substrate ได้หลายโมเลกุล ดังนั้นการใช้เอนซัยม์เป็นสารติดฉลากจึงช่วยขยายความสามารถในการตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่เกิดขึ้นในการทดสอบนั้น นอกจากนี้เอนซัยม์ที่นำมาใช้ในการทดสอบยังมีความคงทนสามารถเก็บไว้ได้นานในสภาวะต่าง ๆ เอนซัยม์ที่นำมาใช้มีหลายชนิดปฏิกิริยาของเอนซัยม์กับ substrate ทำให้เกิดผลิตผลที่มีสีซึ่งสามารถมองเห็นได้ง่ายชัดเจนโดยไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือพิเศษ และเมื่อต้องการบันทึกผลการทดสอบโดยละเอียดก็สามารถทำได้โดยใช้เครื่องมือสำหรับวัดความเข้มของสี ซึ่งอาจใช้เพียงเครื่องมือชนิดธรรมดา ๆ หรืออาจใช้เครื่องมืออัตโนมัติเพื่อความสะดวกรวดเร็วในการทำงานก็ได้ สำหรับเวลาที่ต้องใช้ในการทดสอบนี้มีรายงานกล่าวว่าสามารถลดเวลาที่ใช้ให้เหลือเพียงภายใน 30 นาที โดยที่การทดสอบนั้นมีความไวพอเพียงที่จะใช้ประโยชน์ในแง่ของการวินิจฉัยโรคได้

การทดสอบที่ใช้เอนซัยม์เป็นสารติดฉลากมีชื่อเรียกว่า Enzyme Immunoassay (EIA) ซึ่งสามารถแบ่งออกตามหลักการของวิธีการทดสอบได้เป็น 2 แบบ คือ Heterogeneous EIA และ Homogeneous EIA

การทดสอบแบบ heterogeneous EIA มีหลักการเหมือน radioimmunoassay กล่าวคือ เมื่อให้แอนติเจนและแอนติบอดีทำปฏิกิริยากันแล้ว จะแยกแอนติเจนที่จับอยู่กับแอนติบอดี (Antigen – Antibody complex) ออกจากแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่อยู่เป็นอิสระ แล้ววัดปริมาณของเอนซัยม์ที่อยู่ในส่วนใดส่วนหนึ่งที่แยกออกจากกันแล้วนั้น โดยอาศัยดูการทำหน้าที่ของเอนซัยม์ดังกล่าวในการเปลี่ยนแปลง substrate

สำหรับการทดสอบแบบ Homogeneous EIA ในวิธีการทำไม่ต้องแยกแอนติเจนส่วนที่จับอยู่กับแอนติบอดีออกจากแอนติเจนหรือแอนติบอดีอิสระ ก็สามารถจะตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่เกิดในการทดสอบนั้นได้ วิธีการหนึ่งในกลุ่ม Homogeneous EIA คือ Enzyme multiplied immunoassay technique (EMIT) ในวิธีการนี้เอนซัยม์ที่นำมาใช้เป็นสารติดฉลากจะเกิดการเปลี่ยนแปลงในการทำหน้าที่เมื่อแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนซัยม์นี้ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี ถ้าในการทดสอบนั้นมีแอนติบอดีมีผลทำให้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนซัยม์ยังคงอยู่เป็นอิสระได้ ดังนั้น เอนซัยม์ก็จะทำหน้าที่ได้ตามปกติ เอนซัยม์ที่ใช้ได้แก่ Glucose – 6 - phosphate dehydrogenase , Malate dehydrogenase , β - galactiosidase และ lysozyme (รูปที่ 1)



Substrate ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

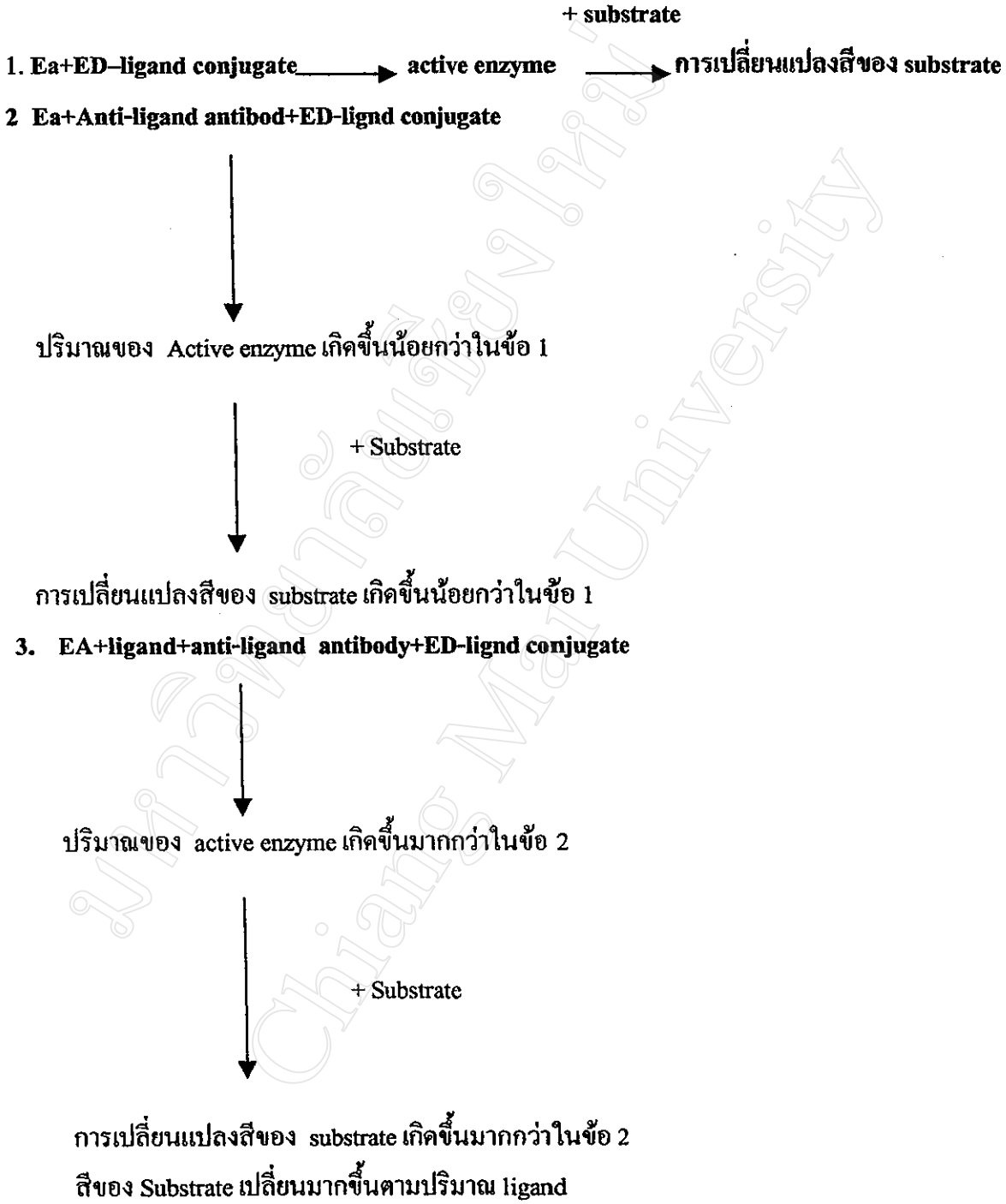
Substrate เกิดการเปลี่ยนแปลงโดยเอ็นซัยม์

รูปที่ 1 Homogeneous Enzyme – Immunoassay แบบ EMIT

อีกวิธีหนึ่งที่จัดอยู่ในกลุ่ม Homogeneous EIA คือ combined enzyme donor immunoassay (CEDIA) ซึ่งอาศัยการนำเอาชิ้นส่วนของเอนซัยม์ที่เตรียมโดย recombinant DNA technology มาใช้ในการทดสอบ โดยการใช้เทคโนโลยีนี้ทำให้สามารถผลิต poly – peptide fragment 2 ส่วนของเอนซัยม์ β - galactiosidase ซึ่งอยู่แยกจากกันได้ ส่วนหนึ่งเป็น enzyme donor (ED) และอีกส่วนหนึ่งเป็น enzyme acceptor (EA) ชิ้นส่วนทั้งสองของเอนซัยม์นี้สามารถรวมกันได้เองและเกิดเป็น β - galactiosidase สามารถนำเอา ligand มีผลในการควบคุมระดับการรวมตัวระหว่าง ED กับ EA .ในการเกิดเป็น Active Enzyme วิธีการทดสอบนี้ได้รับการคิดค้นขึ้นเพื่อให้เหมาะสำหรับการนำเอา enzyme immunoassay มาใช้กับเครื่องมือที่ทำการทดสอบโดยอัตโนมัติในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์เพื่อการวินิจฉัยโรค

หลักการของ CEDIA คือเมื่อผสม EA กับ ED – ligand conjugate เกิด Active Enzyme ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลง substrate ได้ แต่ถ้าผสม anti – ligand antibody ลงไปด้วย แอนติบอดีจำเพาะนี้จะจับกับ ED – ligand conjugate มีผลทำให้เหลือ ED – ligand conjugate ที่จะไปจับกับ EA และเกิดเป็น Active Enzyme ได้น้อยลง ดังนั้นก็จะทำให้ substrate ที่เติมลงไปเกิดการเปลี่ยนแปลงได้น้อยลงด้วย ในกรณีที่นำสิ่งส่งตรวจจะจับกับ anti – ligand antibody ทำให้เหลือแอนติบอดีที่จะไปจับกับ ED – ligand conjugate น้อยลง ดังนั้นจึงยังคงมี ED – ligand conjugate ที่สามารถจับ EA และเกิดเป็น Active Enzyme ได้มากกว่ากรณีที่ไม่ได้สิ่งส่งตรวจที่มี ligand ชนิดนี้ลงไปด้วย ดังนั้น จึงสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ substrate จะเกิดขึ้นได้มากในกรณีที่สิ่งส่งตรวจมี ligand นั้นมาก (รูปที่ 2)

วิธีการทดสอบที่จะกล่าวถึงต่อไปโดยรายละเอียดคือ วิธีการซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Heterogeneous EIA วิธีการทดสอบนี้มีชื่อเรียกว่า **Enzyme – linked Immunosorbent assay (ELISA)** ซึ่งแบ่งตามลักษณะของกลไกการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่เกิดในการทดสอบได้เป็น 2 พวก คือ Competitive ELISA และ Non - competitive ELISA



รูปที่ 2 ไดอะแกรมแสดงหลักการของ Homogeneous enzyme - immunoassay แบบ CEDIA

Competitive ELISA

Competitive ELISA เป็นวิธีการทดสอบที่มักจะใช้สำหรับการตรวจหาแอนติเจนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลน้อย โดยอาศัยหลักการใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนซัยม์ (Antigen – enzyme conjugate) หรือใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนซัยม์ (Antibody – enzyme conjugate) เป็นตัวกระทำ (reagent) ในการทดสอบก็ได้

ก. Competitive ELISA ซึ่งใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนซัยม์

วิธีการทดสอบนี้มีหลักการดังแสดงรูปที่ 3 กล่าวคือ เคลือบ Solid phase เช่น ผิวด้านในของหลอดทดลองหรือหลุมในถาดพลาสติกด้วยแอนติบอดีปริมาณจำกัดคงที่ปริมาณหนึ่ง เติมแอนติเจนที่จำเพาะกับแอนติบอดีนี้และได้ติดฉลากด้วยเอนซัยม์แล้วลงในหลอดทดลองนั้นเพียงอย่างเดียว หรือเติมพร้อมกับสิ่งส่งตรวจที่ต้องการตรวจหาปริมาณแอนติเจนหรือเติมพร้อมกับแอนติเจนมาตรฐานซึ่งทราบว่าจำเพาะกับแอนติเจนมาตรฐานนั้นเช่นเดียวกัน แต่ไม่ได้ติดฉลากด้วยเอนซัยม์และใช้แอนติเจนมาตรฐานนี้ในปริมาณต่าง ๆ เมื่อทิ้งไว้ให้ปฏิกิริยาจนถึงสภาพคงที่ (equilibrium) แล้วล้างแอนติเจนส่วนที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีออก วัดการทำหน้าที่ของเอนซัยม์ที่ยังคงติดอยู่กับพื้นผิวหลอดทดลองนั้นโดยการเติม Substrate ลงไป และดูการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น จะพบว่าในหลอดทดลองที่มีแอนติเจนมาตรฐานหรือแอนติเจนที่ต้องการตรวจหาปริมาณ มีการเปลี่ยนแปลงของ substrate น้อยกว่า ทั้งนี้เนื่องจากแอนติเจนดังกล่าวแย่งจับแอนติบอดีที่เคลือบอยู่บนผิวด้านในของหลอดทดลอง ทำให้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนซัยม์จับกับแอนติบอดีนั้นได้น้อยลง ดังนั้นเมื่อเติม substrate จึงเกิดขึ้นเป็นสัดส่วนกลับปริมาณของแอนติเจนมาตรฐานหรือแอนติเจนที่ต้องการตรวจหาปริมาณที่เติมลงไปในหลอดทดลองนั้น

ข. Competitive ELISA ซึ่งใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนซัยม์

วิธีการทดสอบนี้มีหลักการดังแสดงรูปที่ 4 ขั้นตอนแรกคือเคลือบ Solid phase ด้วยแอนติเจน เติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนซัยม์ลงไปในปริมาณจำกัดและคงที่แต่เพียงอย่างเดียว หรือเติมสิ่งส่งตรวจที่ต้องการตรวจหาปริมาณแอนติเจน หรือแอนติเจนมาตรฐานปริมาณต่าง ๆ ลงไปด้วยพร้อมกับแอนติบอดีนั้น ในหลอดทดลองที่เติมแอนติเจนลงไปด้วย แอนติเจนจะแย่งจับกับกับแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนซัยม์ ทำให้แอนติบอดีนั้นจับกับแอนติเจนที่เคลือบอยู่บน solid phase ได้น้อยลง ดังนั้นเมื่อล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกจากหลอดทดลองนั้นแล้วและเติม substrate ลงไป การเปลี่ยนแปลงของ substrate จะเป็นสัดส่วนกลับกับปริมาณของแอนติเจนในสิ่งส่งตรวจหรือแอนติเจนมาตรฐานที่เติมลงไปนั้น

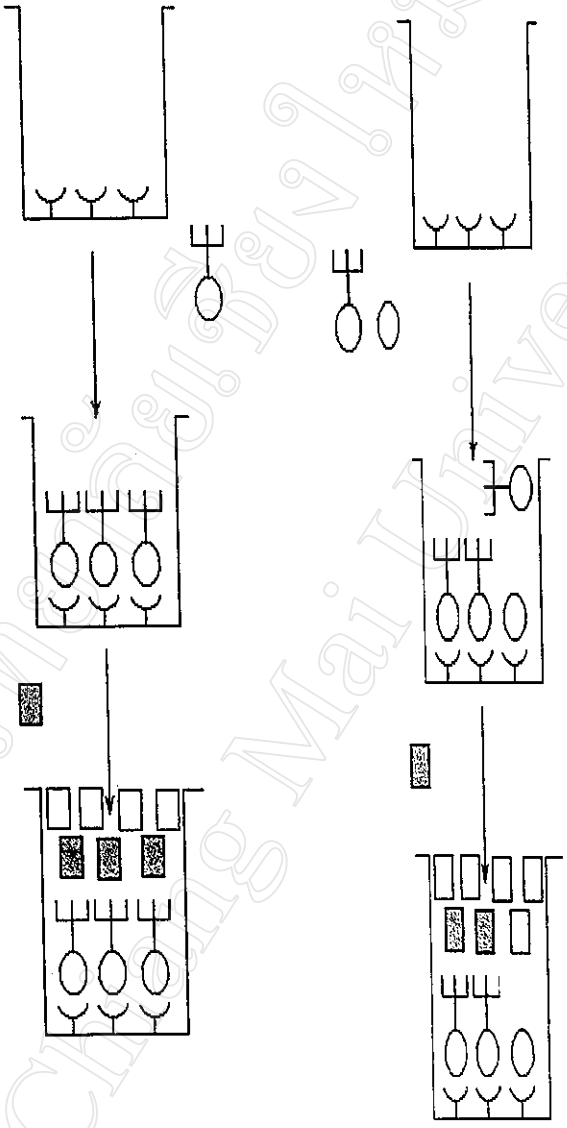
1 ก – ข เคลือบ Solid Phase ด้วยแอนติบอดี

2 ก ล้าง
อบกับแอนติเจน
ที่ติดฉลากด้วย
เอ็นซัยม์
(ปริมาณคงที่)

3 ก

4 ก ล้าง
และเติม Substrate

5 ก



2 ข ล้าง
อบกับแอนติเจนที่ติด
ฉลากด้วย เอ็นซัยม์
(ปริมาณคงที่) พร้อมกับ
แอนติเจนที่ไม่ได้ติด
ฉลาก
(แอนติเจนมาตรฐานที่มี
อยู่ในสิ่งที่ส่งตรวจ)

3 ข แอนติเจนที่ไม่
ได้ติดฉลากแย่งจับกับ
แอนติบอดี

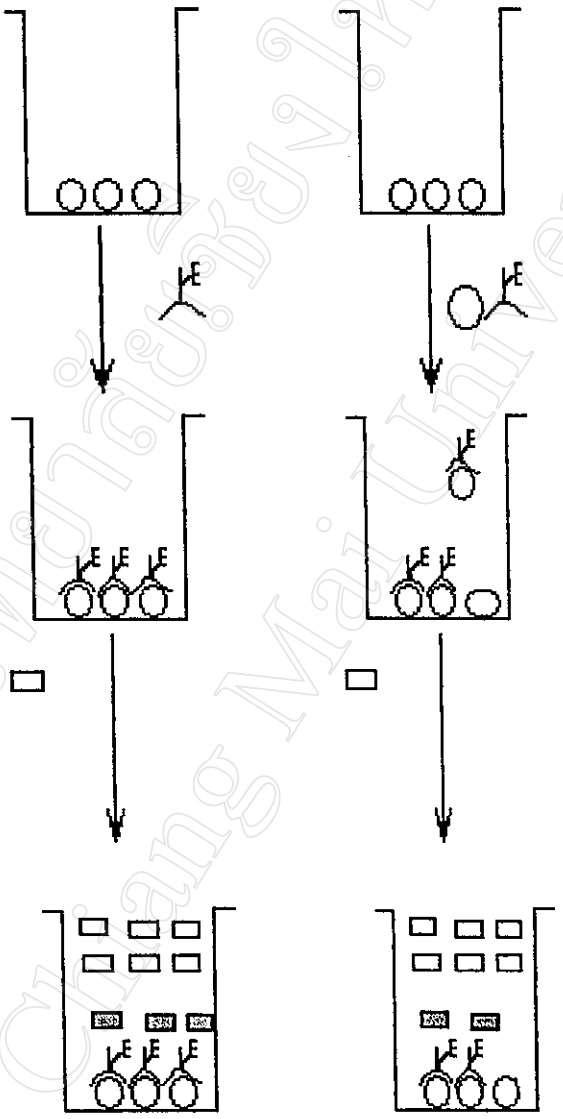
4 ข ล้าง
และเติม Substrate

5 ข

Substrate ใน 5 ข เปลี่ยนแปลงน้อยกว่าใน 5 ก
ความแตกต่างของ substrate ที่เปลี่ยนแปลงระหว่าง 5ก และ 5 ข
เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของแอนติเจนที่ไม่ได้ติดฉลากซึ่งมีอยู่ในรูป 5ข
(แอนติเจนมาตรฐานหรือแอนติเจนจำเพาะในสิ่งที่ส่งตรวจ)

รูปที่ 3 Competitive ELISA ซึ่งใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนซัยม์

1 ก – ข เคลือบ Solid Phase ด้วยแอนติเจน



2 ก ล้างและอบกับแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอ็นซัยม์ (ปริมาณคงที่)

2 ข ล้างและอบกับแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอ็นซัยม์ (ปริมาณคงที่) พร้อมกับแอนติเจนจำเพาะ (แอนติเจนมาตรฐาน ปริมาณต่างๆที่มีอยู่ในสิ่งที่ส่งตรวจ)

3 ก

3 ข แอนติเจนที่เติมลงไปด้วย แย่งจับกับแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอ็นซัยม์

4 ก ล้าง และเติม Substrate

4 ข ล้าง และเติม Substrate

5 ก

5 ข

Substrate 5 ข เปลี่ยนแปลงน้อยกว่าใน 5 ก

ความแตกต่างของ substrate ที่เปลี่ยนแปลงระหว่าง 5ก และ 5 ข เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของแอนติเจนจำเพาะที่เติมลงไป (แอนติเจนมาตรฐานหรือแอนติเจนในสิ่งที่ส่งตรวจ)

รูปที่ 4 Competitive ELISA ซึ่งใช้แอนติบอดีติดฉลากด้วยเอนซัยม์

Non – competitive ELISA

การทดสอบนี้มีใช้ทั้งในการตรวจหาแอนติเจนและแอนติบอดี

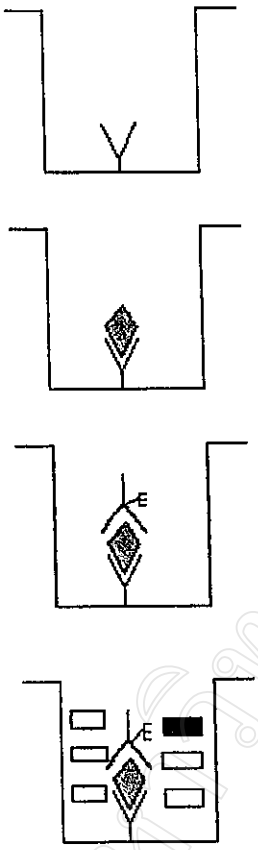
ก. การตรวจหาแอนติเจนด้วยวิธี Non – competitive ELISA เพื่อการตรวจหาแอนติเจนนั้นอาจทำได้ 3 แบบ คือ Direct ELISA , Indirect ELISA และ C1q ELISA

Direct ELISA

หลักการของการทดสอบคือ เคลือบ Solid phase ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการตรวจหาในสิ่งส่งตรวจ เมื่อเติมสิ่งส่งตรวจที่มีแอนติเจน แอนติเจนนั้นก็จะจับกับแอนติบอดีดังกล่าวหลังการล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกแล้ว เติมแอนติบอดีตัวที่สองซึ่งมีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการตรวจเช่นกันและได้ติดฉลากด้วยเอนซัยม์แล้ว (conjugate) ลงไปในปริมาณมากเกินพอ conjugate นี้จะทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่จับอยู่กับแอนติบอดีตัวแรก เมื่อล้าง conjugate ส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกแล้วจึงเติม substrate ลงไป การเปลี่ยนแปลงของ substrate จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของแอนติเจนที่ตรวจหา (รูปที่ 5) วิธีการทดสอบนี้อาจเรียกว่า Double antibody sandwich assay technique หรือ sandwich assay ก็ได้

Indirect ELISA

วิธีนี้เป็นการทดสอบที่ดัดแปลงวิธี Direct ELISA ให้มีความสะดวกในทางปฏิบัติมากขึ้น โดยใช้แอนติบอดีจำเพาะตัวที่สองที่ไม่ได้ติดฉลากด้วยเอนซัยม์ และใช้เอนซัยม์จำเพาะต่ออิมมูโนโกลบุลินติดฉลากด้วยเอนซัยม์ (conjugate) เป็นตัวกระทำเพิ่มเติมในการทดสอบเพื่อวัดปริมาณของแอนติบอดีตัวที่สองซึ่งจับกับแอนติเจนที่ต้องการตรวจหา (รูปที่ 6) ซึ่งจะเป็นการวัดปริมาณของแอนติเจนในสิ่งส่งตรวจโดยทางอ้อม การทดสอบแบบนี้อาจเรียกชื่อว่า Double antibody sandwich antiglobulin ELISA



1. เคลือบ Solid phase ด้วยแอนติบอดี

↓

ล้าง

↓

2. เติมสิ่งส่งตรวจ แอนติเจนในสิ่งส่งตรวจซึ่งจำเพาะกับแอนติบอดีจะจับกับแอนติบอดีที่เคลือบบนsolid phase

↓

ล้าง

↓

3. เติมแอนติบอดีจำเพาะที่ติดฉลากด้วยเอ็นซัยน์

↓

ล้าง

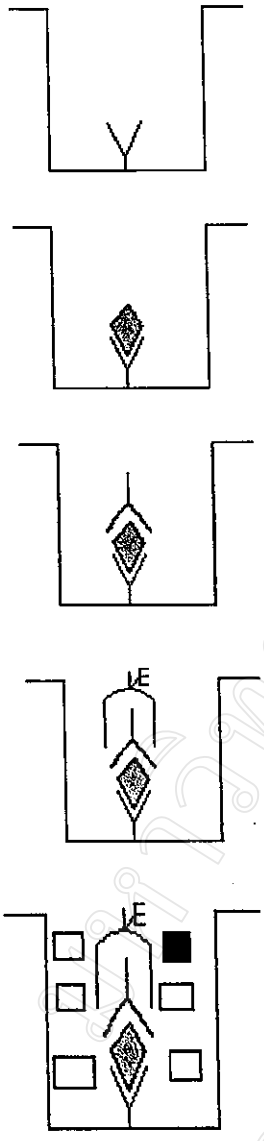
↓

4. เติม substrate

ปริมาณของ substrate ที่เปลี่ยนแปลงไปจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของแอนติเจนที่มีอยู่ในสิ่งส่งตรวจ

รูปที่ 5 การตรวจหาแอนติเจน วิธี Direct ELISA (Double antibody sandwich assay technique)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University



1. เคลือบ Solid phase ด้วยแอนติบอดี

↓

ล้าง

↓

2. เติมสิ่งส่งตรวจ แอนติเจนในสิ่งส่งตรวจซึ่งจำเพาะกับแอนติบอดีจะจับกับแอนติบอดีที่เคลือบบนsolid phase

↓

ล้าง

↓

3. เติมแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนและเป็นแอนติบอดีที่เตรียมขึ้นในสัตว์ชนิดที่ 2

↓

ล้าง

↓

4. เติม anti – immunoglobulin ที่มีความจำเพาะต่ออิมมูโนโกลบุลินของสัตว์ชนิดที่ 2 ซึ่งได้ติดฉลากไว้ด้วยเอนซัยม์ลงไป

↓

ล้าง

↓

5. เติม substrate

ปริมาณของ substrate ที่เปลี่ยนแปลงไปจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของแอนติเจนที่มีอยู่ในสิ่งส่งตรวจ

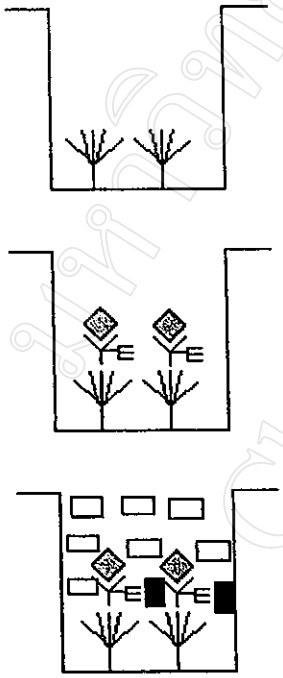
รูปที่ 6 การตรวจหาแอนติเจนวิธี Indirect ELISA(Double antibody sandwich antiglobulin ELISA)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

C1q ELISA

การทดสอบนี้อาศัยประโยชน์จากการทำปฏิกิริยาระหว่าง C1q และแอนติบอดีที่จับอยู่กับแอนติเจนเป็นหลัก (รูปที่ 7) ขั้นตอนแรกของการทดสอบ คือ การเคลือบ solid phase ด้วย C1q ผสมสิ่งส่งตรวจที่ต้องการตรวจหาแอนติเจนกับแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนซัยม์เข้าด้วยกัน แล้วจึงเติมลงไปให้ทำปฏิกิริยากันและมีผลทำให้แอนติบอดีดังกล่าวจับกับ C1q ได้ แอนติบอดีที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาอยู่กับแอนติเจนซึ่งจับกับ C1q การตรวจดูปริมาณของแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนซัยม์ซึ่งจับอยู่กับ C1q ทำได้ด้วยการเติม substrate ลงไป การเปลี่ยนแปลงของ substrate ที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของแอนติบอดีดังกล่าว ซึ่งจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของแอนติเจนที่ตรวจหานั่นเอง

เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง Competitive ELISA กับ Non – competitive ELISA สำหรับการตรวจหา multivalent antigen แล้วมีรายงานว่าวิธีหลังมีความไวและเหมาะสมสำหรับใช้ในงานประจำมากกว่า



1. เคลือบ Solid Phase ด้วย C1q

↓

ล้าง

↓

2. เติมสิ่งส่งตรวจซึ่งผสมกับแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอ็นซัยน์ จำเพาะที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนในสิ่งส่งตรวจจับกับ C1q

↓

ล้าง

↓

3. เติม Substrate

ปริมาณ Substrateที่เปลี่ยนแปลงไปจะเป็นสัดส่วนโดยตรง
กับปริมาณของแอนติบอดีในสิ่งที่ส่งตรวจ

รูปที่ 7 การตรวจหาแอนติเจนด้วยวิธี C1q ELISA

ข. การตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี Non – competitive ELISA

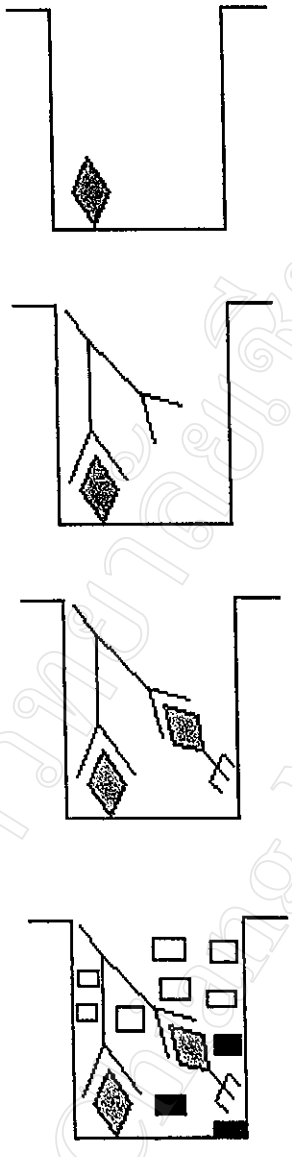
สำหรับการตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี Non – competitive ELISA นี้โดยทั่วไปแล้วใช้วิธีการทดสอบชนิด Indirect ELISA แต่ก็อาจจะใช้ Direct ELISA หรือใช้ antibody capture ELISA ได้

Direct ELISA

การตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธีนี้ไม่เป็นที่นิยมเท่ากับ Indirect ELISA แต่ก็เป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถทำได้ เนื่องจากพบว่าส่วนมากแล้วแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนซึ่งเคลือบอยู่บน solid phase จะยังมีส่วนของโมเลกุลเหลืออยู่ซึ่งสามารถจับกับแอนติเจนที่เติมลงไปทีหลังได้หลักการของการทดสอบคือ เคลือบ solid phase ด้วยแอนติเจนที่จำเพาะกับแอนติบอดีที่ต้องการตรวจหา เติมสิ่งส่งตรวจลงไปเพื่อให้แอนติบอดีในสิ่งส่งตรวจนั้นทำปฏิกิริยากับแอนติเจน ตรวจวัดปริมาณแอนติบอดีดังกล่าว ด้วยการเติมแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนซัยม์ลงไป แล้ววัดการทำหน้าที่ของเอนซัยม์ในการเปลี่ยนแปลง substrate (รูปที่ 8) การเปลี่ยนแปลงของ substrate จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณแอนติบอดีที่ตรวจสอบนั้น

Indirect ELISA

เมื่อใช้ ELISA ในการตรวจหาแอนติบอดี โดยปกติแล้ว จะใช้วิธี indirect ELISA นี้ หลักการของการทดสอบคือเคลือบ solid phase ด้วยแอนติเจน เติมสิ่งส่งตรวจที่ต้องการตรวจหาแอนติบอดีลงไปตรวจดูแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนด้วยแอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบูลิน ซึ่งติดฉลากด้วยเอนซัยม์ โดยอาศัยดูการเปลี่ยนแปลงของ substrate ที่เติมลงไปในขั้นตอนสุดท้าย (รูปที่ 8) การเปลี่ยนแปลงของ substrate จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณแอนติบอดีตรวจสอบนั้น เมื่อพิจารณาถึงความไวของการทดสอบ Indirect ELISA ให้ผลดีกว่า Direct ELISA



1. เคลือบ Solid Phase ด้วยแอนติเจน

↓

ล้าง

↓

2. เติมสิ่งส่งตรวจ แอนติบอดีจำเพาะซึ่งมีอยู่ในสิ่งที่ส่งตรวจจับกับแอนติเจนที่เคลือบบน Solid Phase

↓

ล้าง

↓

3. เติมแอนติเจนซึ่งติดฉลากด้วยเอ็นซัยม์

↓

ล้าง

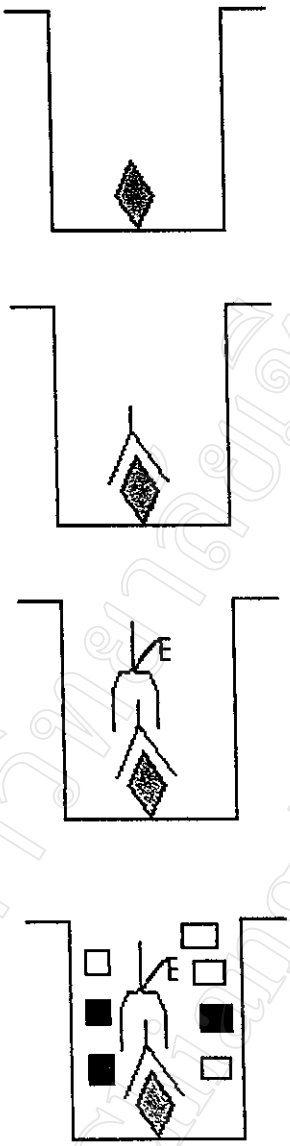
↓

4. เติม Substrate

ปริมาณ Substrate ที่เปลี่ยนแปลงไปจะเป็นสัดส่วนโดยตรง
กับปริมาณของแอนติบอดีในสิ่งที่ส่งตรวจ

รูปที่ 8 การตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี Direct ELISA

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University



5. เคลือบ Solid Phase ด้วยแอนติเจน

↓

ล้าง

↓

6. เติมสิ่งส่งตรวจ แอนติบอดีจำเพาะซึ่งมีอยู่ในสิ่งที่ส่งตรวจจับกับแอนติเจนที่เคลือบบน Solid Phase

↓

ล้าง

↓

7. เติม Anti – Immunoglobulin ติดฉลากด้วยเอ็นซัยม์(มีความจำเพาะต่อ Immunoglobulin ในสิ่งที่ส่งตรวจ

↓

ล้าง

↓

4. เติม Substrate

ปริมาณ Substrate ที่เปลี่ยนแปลงไปจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของแอนติบอดีในสิ่งที่ส่งตรวจ

รูปที่ 9 การตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี Indirect ELISA

Conjugate

Conjugate ที่ใช้ใน ELISA อาจเป็นอิมมูโนโกลบุลินที่ติดฉลากด้วยเอนซัยม์ ซึ่งเป็น Conjugate ที่ใช้กันทั่วไป นอกจากนี้ยังมีการนำเอนซัยม์มาติดฉลากกับแอนติเจน *Staphylococcal protein A* , avidin เพื่อใช้เป็น Conjugate อีกด้วย

เอนซัยม์ที่ดีเหมาะสำหรับใช้ติดฉลาก ควรเป็นเอนซัยม์ที่มีความคงทนและมีความไวในการทำปฏิกิริยาสูง สามารถนำมาใช้ในการติดฉลากได้โดยที่เอนซัยม์นั้นและแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ใช้จะมีการสูญเสียหน้าที่เกิดขึ้นน้อยที่สุด Conjugate ที่เตรียมขึ้นจากเอนซัยม์นั้นจะต้องมีความคงทน นอกจากนี้เอนซัยม์ที่จะนำมาใช้ควรเป็นชนิดที่ไม่มีอยู่ในสารน้ำต่าง ๆ ของร่างกาย ราคาถูก หาง่าย การตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นกับ substrate ทำได้ง่าย อีกประการหนึ่งก็คือ ทั้งเอนซัยม์ substrate ของเอนซัยม์นั้น

เอนซัยม์ที่มีผู้ลองใช้แล้วสำหรับการทำ conjugate ได้แก่ acetylcholinesterase , cytochrome , β - D – galactosidase , glucoamylase , glucose oxidase , β - D – glucoronidase , lactate dehydrogenase , lactopexroxidase , ribonuclease , tyrosinase , alkaline phosphatase และ horseradish peroxidase อย่างไรก็ตาม เอนซัยม์ที่นิยมใช้มากในปัจจุบันคือ alkaline phosphatase , horseradish peroxidase,และ β - D – galactosidase

การเลือกเอนซัยม์ชนิดใดสำหรับการทดสอบระบบไหนต้องคำนึงถึงว่าในสิ่งส่งตรวจที่นำมาใช้ในระบบไม่ควรมีสารซึ่งจะรบกวนปฏิกิริยาของเอนซัยม์ หรือการวัดปฏิกิริยาของเอนซัยม์ที่ใช้ โดยเฉพาะเมื่อจะต้องทำการทดสอบซึ่งจำเป็นต้องอบ conjugate ร่วมกับสิ่งส่งตรวจ

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ – สกุล	นายสุรจิต ธรรมาเจริญราช
วัน เดือน ปีเกิด	1 เมษายน 2519
ประวัติการศึกษา	มัธยมศึกษาตอนต้น – ปลาย โรงเรียนประจวบวิทยาลัย จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ปีการศึกษา 2538 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี -อุตสาหกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ปีการศึกษา 2541
ประวัติการทำงาน	บริษัท เชียงใหม่ ซันนี่ฟิลด์ จำกัด จังหวัดเชียงใหม่ ตำแหน่ง หัวหน้าฝ่ายผลิต ปี พ.ศ. 2541 – 2544 บริษัท ลำปางฟู้ดโปรดักส์ จำกัด จังหวัดลำปาง ตำแหน่ง หัวหน้าส่วนโรงขวดแก้ว – ถุง Pouch ปี พ.ศ. 2544 - ปัจจุบัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University