



รายการอ้างอิง

- [1] Wasch, K.D., Okerman, L., Brabander, H.D., Hoof, J.V., Croubels, S., and Backer, P.D.1998. Detection of residues of tetracycline antibiotics in pork and chicken meat: correlation between results of screening and confirmatory tests. *The Analyst*. 123(12): 2737-2741.
- [2] กระทรวงสาธารณสุข. 2550. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 303) พ.ศ. 2550 เรื่อง อาหารที่มียาสัตว์ตกค้าง [ออนไลน์], แหล่งที่มา: <http://www.fda.moph.go.th/fdanel/html/product/food/ntfmoph/ntf231.htm>. [2552, มกราคม 6]
- [3] สุรัตวิศิ ภาควิทยและกนกวรรณ ศรีงาม. 2547. การวิเคราะห์คุณภาพและสารตกค้างในผลิตภัณฑ์ผึ้ง [ออนไลน์], แหล่งที่มา <http://www.thaibeas.com/papers/paper005.php>. [2552, มกราคม 6]
- [4] Vinas, P., Balsalobre, N., Lopez-Erroz, C., and Hemdez-Cardoba, M. 2004. Liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the analysis of tetracycline residues in honey. *J. Chromatogr A*. 1022(1-2): 125-129.
- [5] Cinquina, A.L., Longo, F., Anastasi, G., Giannetti, L., and Cozzani, R. 2003. Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. *J. Chromatogr A*. 987(1-2): 227-233.
- [6] สถาบันอาหาร. 2553. Thailand: Food safety testing equipment [ออนไลน์], แหล่งที่มา: <http://www.nfi.or.th/our-services/our-services-thai6.html>. [2552, มกราคม 6]
- [7] Koesukwiwat, U., Jayanta, S., and Leepipatpiboon, N. 2007. Validation of a liquid chromatography-mass spectrometry multi-residue method for the simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in milk. *J. Chromatogr A*. 1140(1-2): 147-156.
- [8] Levy, S.B. 1992. The antibiotic paradox: how miracle drugs are destroying the miracle. New York: Plenum Publishing.
- [9] Okerman, L., Hoof, J.V., and Debeuckelaere, W. 1998. Evaluation of the European four-plate test as a tool for screening antibiotic residues in meat samples from retail outlets. *J. AOAC*. 81: 51-56.

- [10] Lec, H.J., Lee, M.H., Ryu, P.D., Lee, H., and Cho, M.H. 2001. Enzyme - linked immunosorbent assay for screening the plasma residues of tetracycline antibiotics in pigs. *J. Vet. Med. Sci.* 63: 553–556.
- [11] Draisci, R., Quadri, F.D., Achene, L., Volpe, G., Palleschiand, L., and Palleschi, G. 2001. A new electrochemical enzyme-linked immunosorbent assay for the screening of macrolide antibiotic residues in bovine meat. *Analyst.* 126: 1942–1946.
- [12] Faraj, B.A. and Ali, F.M. 1981. Development and application of a radioimmunoassay for tetracycline. *JPET.* 217(1): 10.
- [13] Pastor-Navarro, N., Morais, S., Maquieira, A., and Puchades, R. 2007. Synthesis of haptens and development of a sensitive immunoassay for tetracycline residues: application to honey samples. *Anal Chim Acta.* 594(2): 211-218.
- [14] มาลินี ลิ้ม โภคา. 2527. การใช้ยาต้านจุลชีพในสัตว์ (ยาปฏิชีวนะ ยาฆ่าพยาธิและสารปฏิชีวนะ) พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ. ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- [15] ชมพูนิกข์ กาญจนพงศ์. 2551. การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Streptococcus*. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท. หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย .
- [16] สุวรรณ เหลืองชลธาร. 2536. การวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะโดยวิธีเคมี. คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- [18] ชารัตน์ ชารากุล. 2545. ชุดตรวจสอบวินิจฉัยโดยหลักการวิทยาภูมิคุ้มกัน: การวิจัยและพัฒนาชุดตรวจสอบสำเร็จรูป. คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล กรุงเทพฯ.
- [17] กมลชัย ตรงวานิชนาม. 2547. การใช้ยาต้านจุลชีพในสัตว์. ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- [19] ปริญญา มาสวัสดิ์. 2550. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราไซคลินที่ตกค้างในนม โดยวิธี SPE-FIA. วารสารเพื่อห้องปฏิบัติการ วัด/ทดสอบ วิเคราะห์/วิจัยและควบคุมคุณภาพ LAB. TODAY. 6, 42.
- [20] นรินทร์ ท้าวแก่นจันทร์และสุภาพร แสงศรีจันทร์. การวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะในกลุ่มเตตราไซคลินที่ตกค้างในน้ำผึ้งของภาคเหนือโดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลว สมรรถภาพสูง. ในงานประชุมวิชาการ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 34. 31 ตุลาคม 2551 ณ ศูนย์การประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ กรุงเทพฯ.

- [21] Silva, L.S., Trevisan, M.G., Rath, S., Poppi, R. J., and Reyes, FG. R. 2005. Chromatographic determination of riboflavin in the presence of tetracyclines in and full cream milk using fluorescence detection. *J. Braz. Chem. Soc.* 16(6A): 1174-1178.
- [22] Pancorbo, A.C., Terrones, S.C., Carretero, A.S., and Gutierrez, A.F. 2008. Reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to ultraviolet and electrospray time-of-flight mass spectrometry on-line detection for the separation of eight tetracyclines in honey samples. *J. Chromatogr A.* 1195: 107-116.
- [23] Thompson, H.M., et al. 2005. Effects of European foulbrood treatment regime on oxytetracycline levels in honey extracted from treated honeybee (*Apis mellifera*) colonies and toxicity to brood. *Food Addit Contam.* 22(6): 573-578.
- [24] Geertsen, G., and Pedersen, B. n.d. Determination of residual tetracycline in honey by HPLC-UV: Optimizing and validation. Danish Veterinary and Food Administration, Denmark: Søndervang 4, DK-4100 Ringsted.
- [25] Wen, Y., Wang, Y., and Feng, Y.Q. 2006. Simultaneous residue monitoring of four tetracycline antibiotics in fish muscle by in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Talanta.* 70(1): 153-159.
- [26] Unisensor, S.A. Tetrasensor [online], source: <http://www.thaibeas.com/papers/paper005.php>. [2009, January 6]
- [27] Capezzuto, A., Chelini, M.O., Felipe, E.C., and Oliveira C.A. 2006. Correlation between serum and fecal concentrations of reproductive steroids throughout gestation in goats. *Anim Reprod Sci.* (11): 001.
- [28] Nakao, T. 1980. Practical procedure for enzyme immunoassay of progesterone in bovine serum. *Acta Endocrinol.* 93(2): 223-227.
- [29] R-Biofarm. RIDASCREEN® Tetracycline [online], source: <http://www.biokits.com/productinfo/912/RIDASCREEN-reg-Tetracycline.html>. [2009, January 6]
- [30] Bioo, C.S. Tetracycline (TET) ELISA Test Kit Manual [online], source: www.Bioscientific.com. [2009, January 6]

- [31] ไพศาล สิทธีกรกุล. 2548. วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จัดทำขึ้นสำหรับการสอนและการวิจัย. กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.
- [32] Bogdanov, S. 2006. Contaminant of bee products. *Apidologie*. 37: 1-18.
- [33] Aranda, M. and Cisternas, E., and Villegas, R. 2006. Determination of oxytetracycline in honey by ion-pair HPLC by cationic-SPE. *EJFPC*. 1(1): 12-15.
- [34] Jeon, M., Kim, J., Paeng, K.J., Park, S.W. and Paeng, I.R. 2008. Biotin-avidin mediated competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residues of tetracyclines in milk. *MICJAN*. 88(1): 26-31.
- [35] Yalow, R.S., and Berson, S.A. 1978. Radioimmunoassay. A probe for the fine structure of biologic systems. 200: 1236-45.
- [36] Zhang, Y., Lui, W., Zhao, C., and Xi, R. 2007. Preparation of anti-tetracycline antibodies and development of direct heterologous competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residues of tetracycline in milk. *J. Agric. Food Chem*. 55: 211-218.
- [37] Jeon, M. and Paeng, I.R. 2008. Quantitative detection of tetracycline residues in honey by a simple sensitive immunoassay. *Anal Chim Acta*. 626(2): 180-185.
- [38] Kumar, K.T., Singh, A., Chander, A.K., Gupta, Y., and Satish, C. 2004. Enzyme-linked immunosorbent assay for ultratrace determination of antibiotics in aqueous samples. *J Environ Qual*. 33(1): 250-256.
- [39] Hermanson, G.T. 2008. Bioconjugate techniques. U.K: Academic Press.
- [40] Hudson, L., and Hay, F.C. 1980. Practical immunology. London: Blackwell Scientific Publication.
- [41] Johnstone, A., and Thrope, R. 1987. Immunochemistry in practice. Cambridge: Cambridge University Press.
- [42] Harlow, E., and Lane, D.P. 1988. Antibodies a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- [43] Hammock, B.D., and Schneider, P. 1992. Influence of the ELISA format and the hapten-enzyme conjugate on the sensitivity of an immunoassay for s-triazine herbicides using monoclonal antibodies *J. Agric. Food Chem*. 40: 525-530.

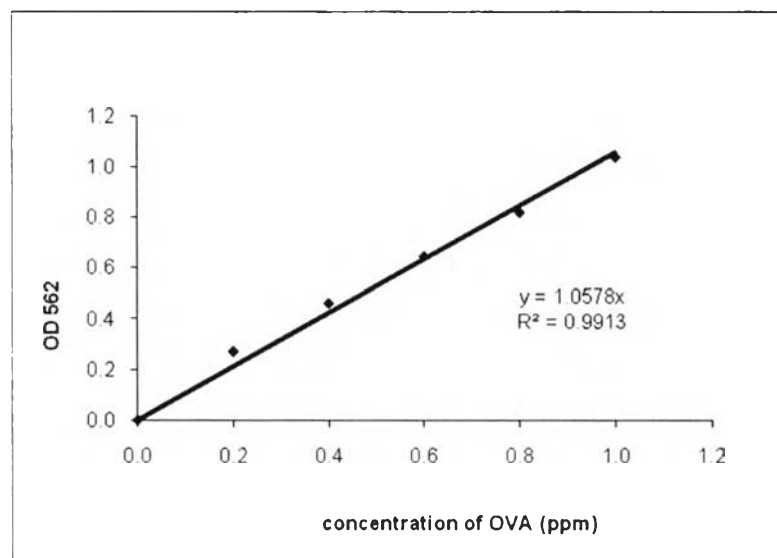
- [44] Tsipi, D., Triantafyllou, M., and Hiskia, A. 1999. Determination of organochlorine pesticide residues in honey, applying solid phase extraction with RP-C18 material. Analyst. 124(4): 473-475.
- [45] Krotzky, A.J., and Zeeh, B. 1995. Immunoassays for residue analysis of agrochemicals: proposed guidelines for precision, standardization and quality control. Pure Appl. Chem. 67(12): 2065–2088.
- [46] Khong, S.P., Hammel, Y.A., and Guy, P.A. 2005. Analysis of tetracyclines in honey by high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Rapid Comm Mass Spectrom. 19(4): 493-502.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตารางที่ ก.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน OVA โดยวิธี BCA

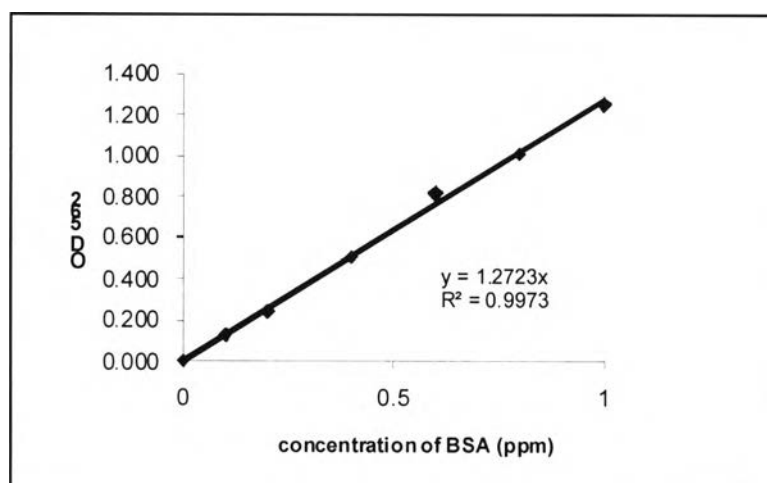
ความเข้มข้นของ OVA (ppb)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตร
0	0.000
0.2	0.272
0.4	0.463
0.6	0.647
0.8	0.822
1	1.042



รูปที่ ก.1 กราฟของโปรตีนมาตรฐาน OVA โดยวิธี BCA

ตารางที่ ก.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA โดยวิธี BCA

ความเข้มข้นของ BSA (ppb)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตร
0	0.000
0.2	0.125
0.4	0.242
0.6	0.505
0.8	0.818
1	1.008



รูปที่ ก.2 กราฟของโปรตีนมาตรฐาน BSA โดยวิธี BCA

ตารางที่ ก.3 ความจำเพาะของแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ต่อเทระไซคลิกด้วยวิธี Indirect competitive ELISA

ความเข้มข้นเทระไซคลิกในรูปอิสระ ที่ใช้แข่งขัน (ppb)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นา โนเมตร
0	1.589
0.01	1.382
0.05	1.326
0.1	0.932
0.5	0.858
1	0.705
5	0.293
10	0.165
50	0.115
100	0.095
500	0.089
1,000	0.077

หมายเหตุ เคลือบหลุมด้วย TC-OVA 5 ppm และแอนติบอดีความเข้มข้น 2 ppm

ตารางที่ ก. 4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ของการใช้เวลาที่แตกต่างกันในการทำ
ปฏิกิริยาระหว่าง TC- OVA กับ Ab-biotin ด้วยวิธี semi-direct cELISA

ความเข้มข้นของเทอระไซคลิน ในรูปอิสระที่ใช้แข่งขัน (ppb)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร		
	1 ชม.	1.5 ชม.	2 ชม.
0	1.122	1.523	1.726
0.01	1.077	1.470	1.694
0.05	0.927	1.424	1.521
0.1	0.965	1.174	1.649
0.5	0.731	1.050	1.242
1	0.621	0.771	1.165
5	0.313	0.405	0.629
10	0.264	0.255	0.582
100	0.137	0.243	0.273
1,000	0.103	0.250	0.255

ตารางที่ ก.5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของการใช้ blocking solution ชนิดต่าง

ความเข้มข้นของเทตระไฮคลิน ในรูปอิสระที่ใช้แข่งขัน (ppb)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร		
	1% OVA	1% BSA	5% skimmed milk
0.00	1.759	1.615	1.412
0.01	1.700	1.636	1.482
0.05	1.730	1.667	1.281
0.10	1.738	1.600	1.340
0.50	1.544	1.630	0.765
1	1.530	1.614	0.554
5	1.500	1.226	0.233
10	1.404	1.063	0.454
100	0.627	0.298	0.174
1000	0.176	0.135	0.113

ตารางที่ ก.6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรของ TC ในสารละลาย
0.1% EDTA, 1% EDTA และ 3.35% EDTA เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน TC ใน PBS

ความเข้มข้นของแอนติบอดี (ppb)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร			
	PBS	0.1% EDTA	1% EDTA	3.35% EDTA
0.000	0.212	0.129	0.136	0.129
0.025	0.273	0.245	0.149	0.171
0.050	0.508	0.436	0.338	0.211
0.100	0.999	0.293	0.243	0.323
0.250	1.194	0.517	0.460	0.536
0.500	2.158	1.001	0.852	0.966
1.000	2.651	1.301	1.027	1.160
2.500	2.613	2.294	1.994	2.316
5.000	2.865	2.682	2.584	2.854

หมายเหตุ ค่าที่แสดงโดยตัวเลขทึบ คือ ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ที่เคลือบหลุมด้วย TC-OVA 0.125 ppm และแอนติบอดีความเข้มข้น 0.25 ppm

ตารางที่ ก.7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของน้ำฝิ่งในสารละลาย
PBS, PBST และ PBS ที่เติม 10% เมทานอล เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน TC ใน PBS

ความเข้มข้นของเทอร์ไฮคลิน ในรูปอิสระที่ใช้แข่งขัน (ppb)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร			
	standard TC	PBS	PBST	PBS ที่เติม 10% MeOH
0	1.247	1.253	1.580	1.239
0.25	1.246	1.211	1.331	1.290
0.5	1.238	0.904	1.274	1.156
1	1.228	0.895	1.171	1.088
2.5	0.873	0.689	0.937	0.810
5	0.680	0.379	0.559	0.617
10	0.482	0.332	0.498	0.582
20	0.313	0.311	0.351	0.382
40	0.293	0.340	0.319	0.634

ตารางที่ ก.8 แสดงข้อมูลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำผิวด้วย LC-MS-MS ของบริษัท Central lab

Compound name: TTC

Correlation coefficient: $r = 0.998065$, $r^2 = 0.996133$

Calibration curve: $2.50522 \cdot x + -6.44413$

Response type: Internal Std (Ref 5), Area * (IS Conc / IS Area)

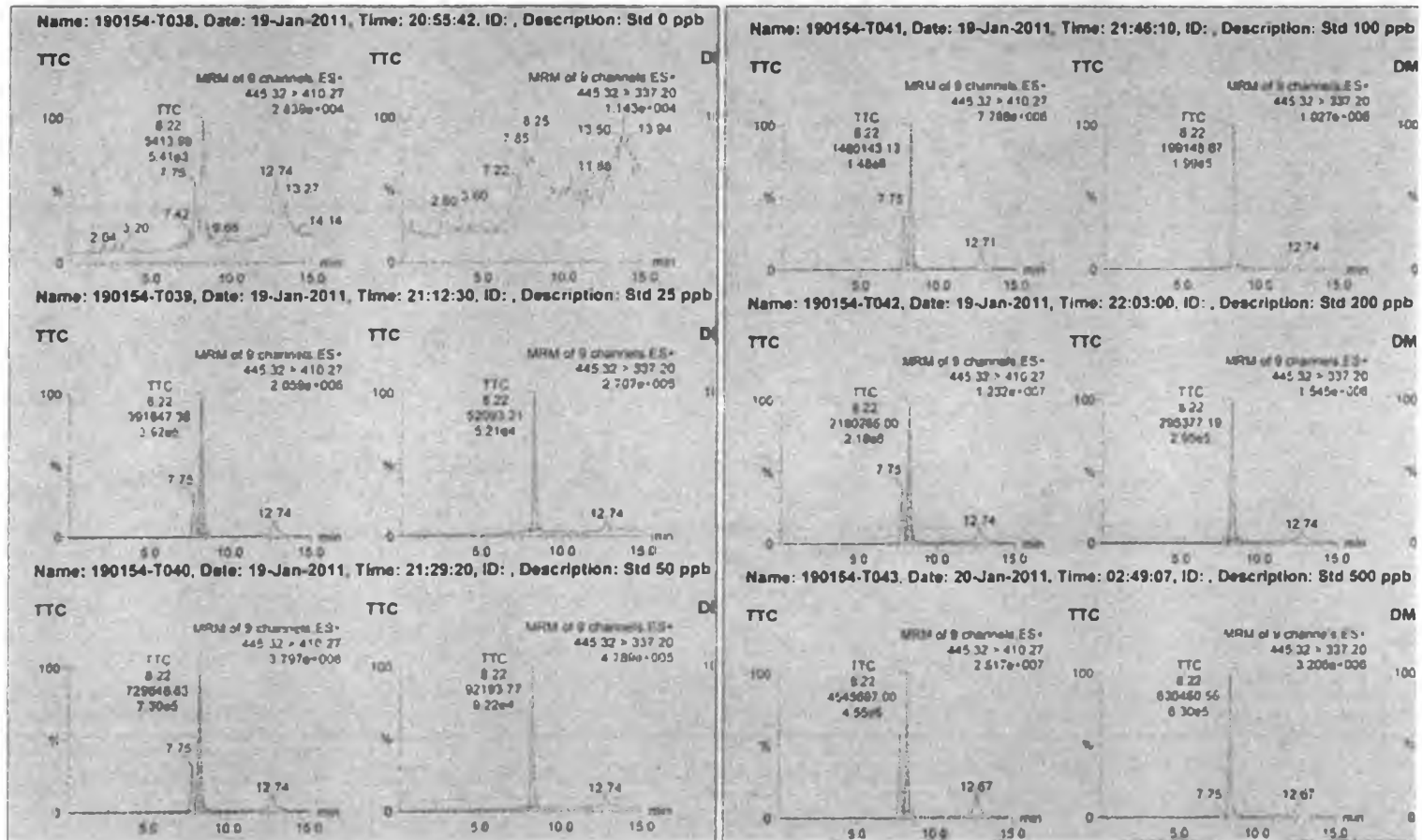
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

	Name	Sample Text	Type	Std. ...	RT	Area	1° Area	IS RT	IS Area	ppb	%Rec	S/N	1° S/N	1° Rati...
1	190154-T038	Std 0 ppb	Sta...	0.00				8.88	373892					
2	190154-T039	Std 25 ppb	Sta...	25.00	8.22	391847	52093	8.88	364416	24.03	96	2144	316	7.52
3	190154-T040	Std 50 ppb	Sta...	50.00	8.22	729649	92194	8.88	311070	49.39	99	6726	552	7.91
4	190154-T041	Std 100 ppb	Sta...	100.00	8.22	1480143	199149	8.88	310475	97.72	98	3699	1257	7.43
5	190154-T042	Std 200 ppb	Sta...	200.00	8.22	2180265	295377	8.88	199023	221.21	111	13008	1054	7.36
6	190154-T043	Std 500 ppb	Sta...	500.00	8.22	4545697	630461	8.85	185897	490.61	98	25078	3697	7.21
7	190154-T044	ACN	Ana...											
8	190154-T045	Reagent blank	Ana...					8.88	939015					
9	190154-T046	Sample blank	Ana...					8.88	274104					
10	190154-T047	54/00882-001 A	Ana...		8.22	3208192	383953	8.88	709456	92.82		13781	1617	8.36
11	190154-T048	54/00882-001 B	Ana...		8.22	3171357	369380	8.88	688566	94.50		10829	2095	8.59
12	190154-T049	54/00882-002 A	Ana...		8.22	890433	101339	8.88	712739	27.51		4167	596	8.79
13	190154-T050	54/00882-002 B	Ana...		8.22	831348	97355	8.88	695231	26.44		3899	1078	8.54
14	190154-T056	Rec 1	QC	50.00	8.22	414321	52772	8.88	162054	53.60	107	4728	629	7.85

หมายเหตุ LOD for TC = 10 ppb LOQ = 20 ppb

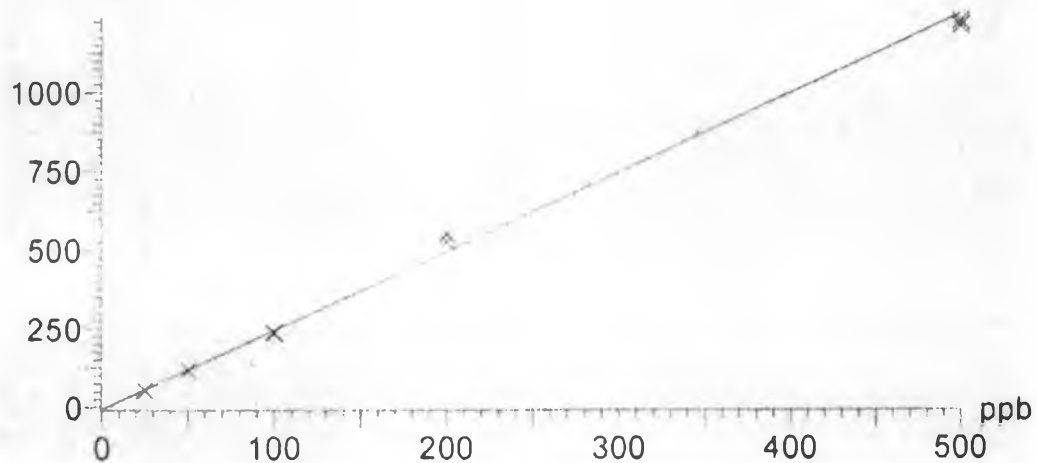
เมื่อ 001A-001B = ตัวอย่างน้ำผิวดที่เติม TC ความเข้มข้น 100 ppb

002A-002B = ตัวอย่างน้ำผิวดที่เติม TC ความเข้มข้น 25 ppb

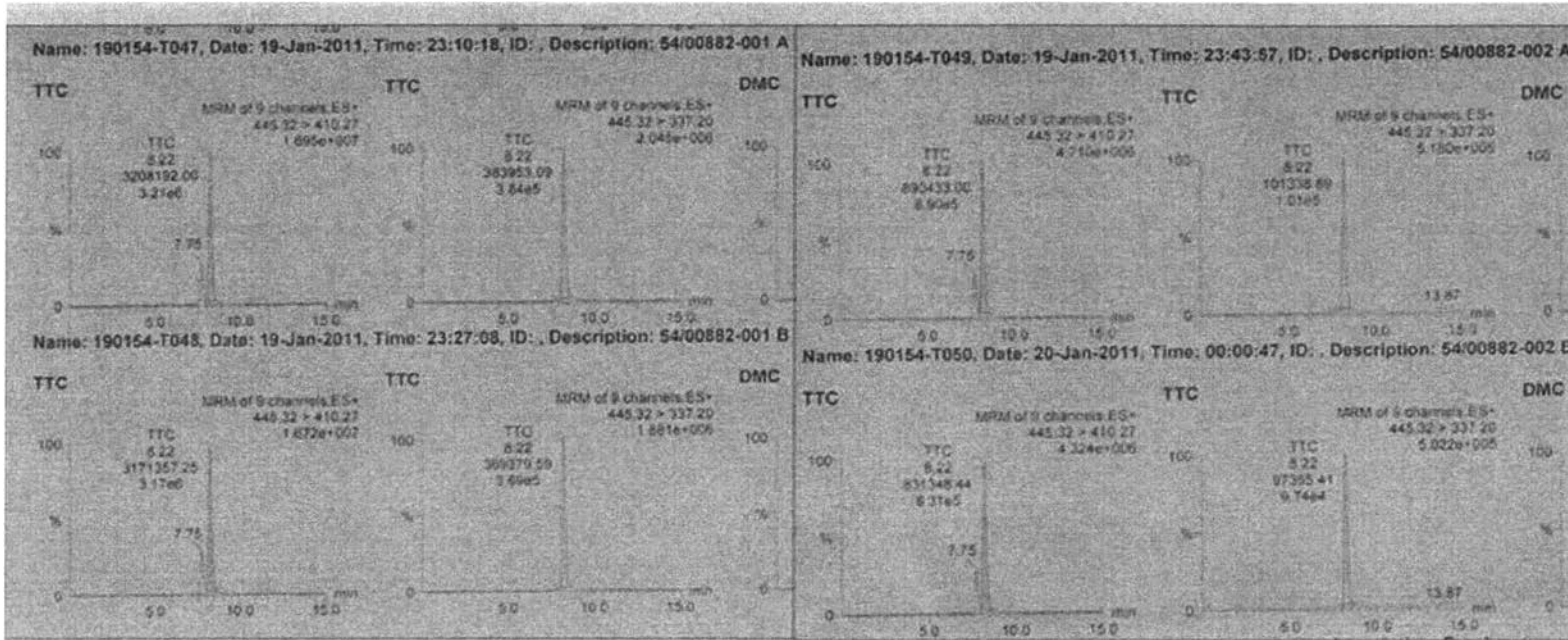


รูปที่ ก.3 แสดงโครมาโตแกรมของ TC ที่ความเข้มข้นที่ 0-500 ppb โดยวิธี LC-MS-MSของบริษัท Central lab

Compound name: TTC
Correlation coefficient: $r = 0.998065$, $r^2 = 0.996133$
Calibration curve: $2.50522 * x + -6.44413$
Response type: Internal Std (Ref 5), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



รูปที่ ก.4 แสดงกราฟมาตรฐานของ TC ที่ความเข้มข้นที่ 0-500 ppb โดยวิธี LC-MS-MS ของ
บริษัท Central lab



รูปที่ ก.5 แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างที่ความเข้มข้นที่ 25 และ 100 ppb โดยวิธี LC-MS-MS ของบริษัท Central lab
 เมื่อ 001A-001B = ตัวอย่างน้ำฝิ่งที่เติม TC ความเข้มข้น 100 ppb
 002A-002B = ตัวอย่างน้ำฝิ่งที่เติม TC ความเข้มข้น 25 ppb

ตารางที่ ก.9 แสดงข้อมูลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำผึ้งด้วย LC-MS-MSของบริษัท ALS

Sample No.	Result TTC (µg/kg)	Mean	%RPD	%R
11-0106-001 (A)	69.86	68.72	3.33	-
11-0106-001 (B)	67.57			
11-0106-001 (R1)	111.40	111.17	-	106.7
11-0106-001 (R2)	110.94			105.6
11-0106-002 (A)	18.97	19.420	4.69	-
11-0106-002 (B)	19.88			
11-0106-002 (R1)	52.73	52.91	-	83.3
11-0106-002 (R2)	53.08			84.2

หมายเหตุ 001A-001B = ตัวอย่างน้ำผึ้งที่เติม TC ความเข้มข้น 100 ppb

002A-002B = ตัวอย่างน้ำผึ้งที่เติม TC ความเข้มข้น 25 ppb

การคำนวณ % RPD = (Max-Min)/Mean x 100 : เกณฑ์การยอมรับ % RPD < 10

เกณฑ์การยอมรับ % recovery อยู่ในช่วง 60-120

การคำนวณ % recovery = (ความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้- ความเข้มข้นที่มีอยู่เดิม) x 100/ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงไป

Quant Calibration Report (ISTD)

Batch Info

Batch Data Path D:\MassHunter\Data\DATA_2011\TC_OTC\TC110117\QuantResults\TC110117.batch.xml

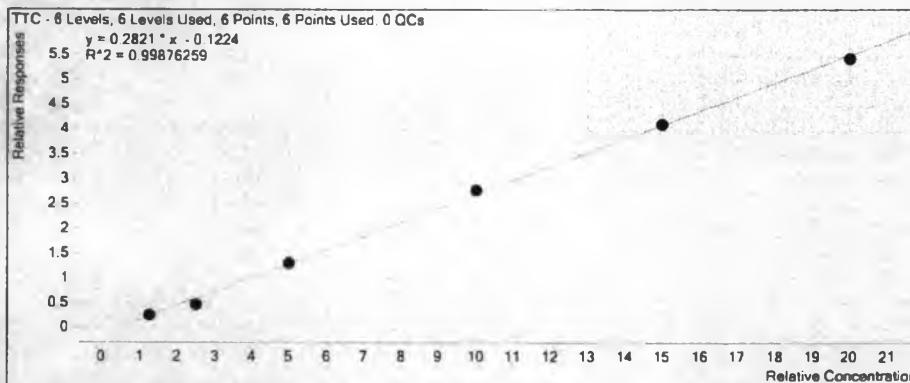
Analysis Time 2011-01-18 08:54 **Analyst Name** Administrator
Report Time 2011-01-18 08:55 **Reporter Name** Administrator
Last Calib Update 2011-01-18 08:49 **Batch State** ResultsDirty

Calibration Info

ISTD Compound DMC

Calibration STD	Cal Type	Level	Enabled	Response	Exp Conc	RF
TC110117_012.d	Calibration	1	<input checked="" type="checkbox"/>	354468	4.0000	88617.0000
TC110117_013.d	Calibration	2	<input checked="" type="checkbox"/>	401014	4.0000	100253.5000
TC110117_014.d	Calibration	3	<input checked="" type="checkbox"/>	347118	4.0000	86779.5000
TC110117_015.d	Calibration	4	<input checked="" type="checkbox"/>	265477	4.0000	66369.2500
TC110117_016.d	Calibration	5	<input checked="" type="checkbox"/>	327203	4.0000	81800.7500
TC110117_017.d	Calibration	6	<input checked="" type="checkbox"/>	409135	4.0000	102283.7500

Target Compound TTC



Calibration STD	Cal Type	Level	Enabled	Response	Exp Conc	RF
TC110117_012.d	Calibration	1	<input checked="" type="checkbox"/>	89223	5.0000	0.2014
TC110117_013.d	Calibration	2	<input checked="" type="checkbox"/>	187941	10.0000	0.1875
TC110117_014.d	Calibration	3	<input checked="" type="checkbox"/>	460218	20.0000	0.2652
TC110117_015.d	Calibration	4	<input checked="" type="checkbox"/>	740941	40.0000	0.2791
TC110117_016.d	Calibration	5	<input checked="" type="checkbox"/>	1350765	60.0000	0.2752
TC110117_017.d	Calibration	6	<input checked="" type="checkbox"/>	2234360	80.0000	0.2731

รูปที่ ก.6 แสดงกราฟมาตรฐานของ TC ที่ความเข้มข้นที่ 5-80 ppb โดยวิธี LC-MS-MS ของบริษัท ALS

ตารางที่ ก.10 แสดงข้อมูลของกราฟมาตรฐาน TC และการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำผึ้งด้วย LC-MS-MS ของบริษัท ALS

		Sample			TTC Method		TTC Results			Qualifier (428.0) Results			Qualifier (154.0) Results			DMC (ISTD)...		
🔍	📄	Data File	Name	Type	Level	Exp. Conc.	RT	Resp.	Calc. Conc.	RRT	Area	RT	Ratio	Area	RT	Ratio	RT	Resp.
		TC110117_007.	TCs 20 ppb	Sample			6.981	427616	20.6403	0.950	86488.0757	7.022	20.2	167241.940	7.014	39.1	7.386	320771
		TC110117_008.	TCs 20 ppb	Sample			6.981	461380	19.5519	0.947	89875.6620	7.004	19.5	175769.307	7.005	38.1	7.386	367242
		TC110117_009.	TCs 20 ppb	Sample			6.981	460288	19.5915	0.950	88116.6057	7.013	19.1	168005.745	7.009	36.5	7.386	365559
🔍	📄	TC110117_010.	Mb	Sample			6.981	342680	1765.1509	0.967				1184.4619	7.027	0.3	7.267	2756
🔍	📄	TC110117_011.	TCs 0 ppb	Sample			6.981	211068	10.2414	1.013				753.1383	7.002	0.4	7.371	351894
		TC110117_012.	TCs 5 ppb	Cal	1	5.0000	6.981	89223	5.3049	0.949	17887.7613	6.997	20.0	32671.4813	6.996	36.6	7.370	354468
		TC110117_013.	TCs 10 ppb	Cal	2	10.0000	6.981	187941	8.3816	0.949	33936.7673	6.995	18.1	66151.0540	6.992	35.2	7.370	401014
		TC110117_014.	TCs 20 ppb	Cal	3	20.0000	6.981	460218	20.5373	0.947	85102.5601	6.991	18.5	175293.327	6.989	38.1	7.370	347118
		TC110117_015.	TCs 40 ppb	Cal	4	40.0000	6.981	740941	41.3151	0.949	148134.586	6.980	20.0	303339.322	6.975	40.9	7.353	265477
		TC110117_016.	TCs 60 ppb	Cal	5	60.0000	6.981	135076	60.2789	0.947	266379.170	6.972	19.7	529342.374	6.963	39.2	7.353	327203
		TC110117_017.	TCs 80 ppb	Cal	6	80.0000	6.981	223436	79.1821	0.945	399702.788	6.966	17.9	817071.991	6.967	36.6	7.370	409135
	📄	TC110117_018.	ACN	Sample			6.981	0	1.7353	1.298	1143.2075	10.457		210.2405	10.080		7.348	6208
		TC110117_019.	11-0106-001A	Sample			6.981	145999	69.8551	0.947	293993.000	6.980	20.1	540873.326	6.971	37.0	7.370	303946
		TC110117_020.	11-0106-001B	Sample			6.981	138313	67.5703	0.946	278260.000	6.964	20.1	510667.277	6.964	36.9	7.359	297936
		TC110117_021.	11-0106-001R1	Sample			6.981	206012	111.4043	0.945	409778.920	6.950	19.9	741883.942	6.942	36.0	7.353	266396
		TC110117_022.	11-0106-001R2	Sample			6.981	231530	110.9430	0.942	474158.100	6.917	20.5	837724.552	6.914	36.2	7.337	300658
🔍	📄	TC110117_023.	ACN	Sample			6.981	0	1.7353	1.241	444.6675	6.958		1524.1760	10.184		7.375	1439
		TC110117_024.	11-0106-002A	Sample			6.981	299228	18.9668	0.945	60603.0000	6.914	20.3	110965.856	6.917	37.1	7.320	246262
		TC110117_025.	11-0106-002B	Sample			6.981	364579	19.8796	0.945	70366.0000	6.980	19.3	137908.176	6.966	37.8	7.386	284950
		TC110117_026.	11-0106-002R1	Sample			6.981	993955	52.7339	0.945	199208.000	6.947	20.0	377719.627	6.950	38.0	7.353	276392
		TC110117_027.	11-0106-002R2	Sample			6.981	106687	53.0804	0.947	206818.000	6.964	19.4	410928.972	6.960	38.5	7.352	294668
		TC110117_028.	TCs 20 ppb	Sample			6.981	415793	20.6754	0.949	84661.1193	6.996	20.4	140882.517	6.992	33.9	7.370	311324

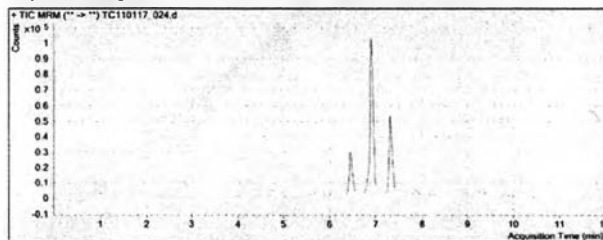
Quant Sample Report (ISTD)

Batch Info
 Batch Data Path D:\MassHunter\Data\DATA_2011\TC_OTC\TC110117\QuantResults\TC110117_batch.xml

Analysis Time 2011-01-18 08:54 **Analyst Name** Administrator
Report Time 2011-01-18 08:55 **Reporter Name** Administrator
Last Callb Update 2011-01-18 08:49 **Batch Starts** ResultsDiry

Analysis Info
Acq Time 2011-01-17 22:37
Data File TC110117_024.d
Acq Method File TCM.m
Sample Name 11-000002A
Sample Info
Sample Type Sample
Level

Sample Chromatogram



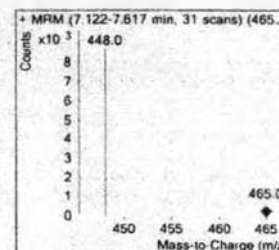
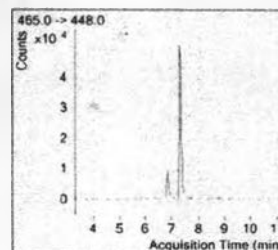
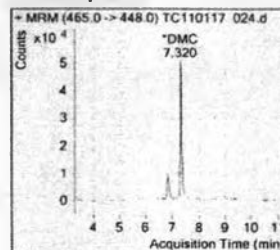
Quantitation Results

Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	Resp Ratio	Final Conc
TTC	DMC	6.814	299228	246262	1.2	18.9668

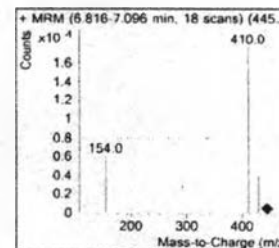
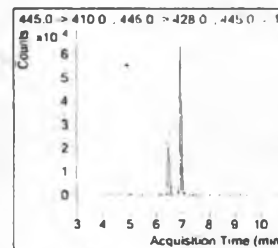
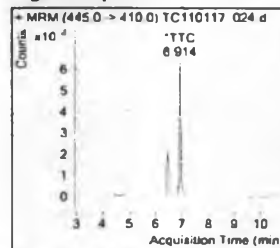
Quant Sample Report (ISTD)

Compound Graphics

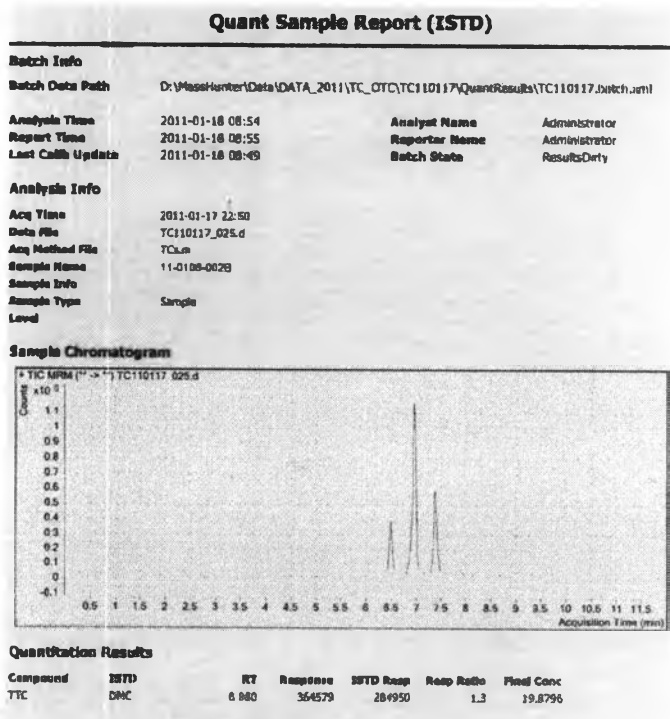
ISTD Compound **DMC**



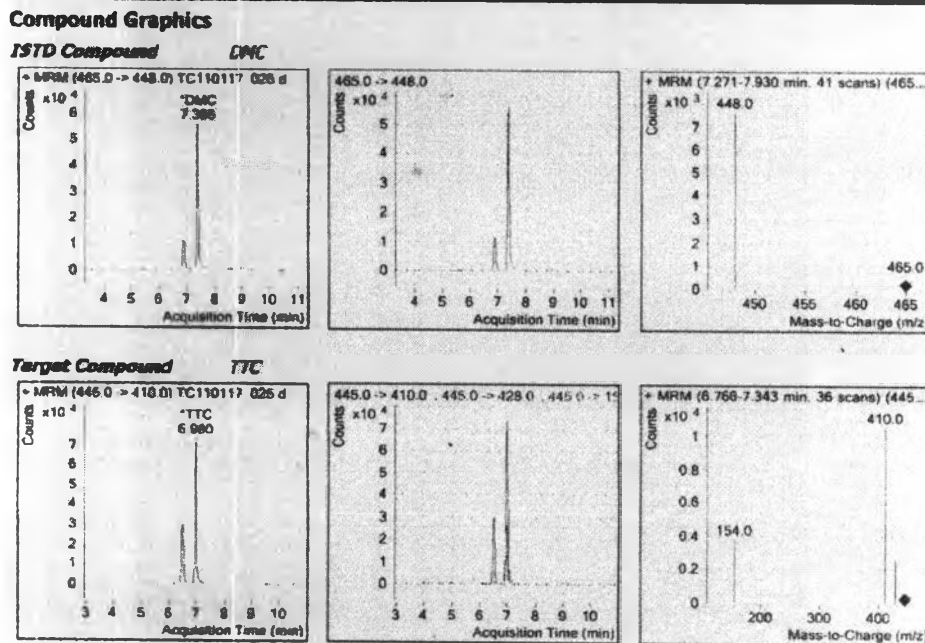
Target Compound **TTC**



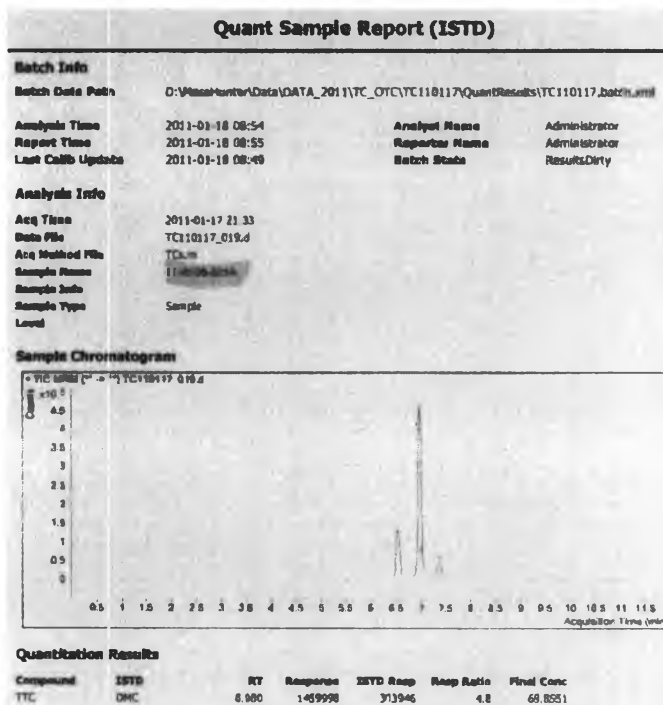
รูปที่ ก.7 แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่าง เมื่อ 002A คือตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของ TC ที่ 25 ppb โดยวิธี LC-MS-MS ของบริษัท ALS โดยใช้ DMC = internal standard



Quant Sample Report (ISTD)



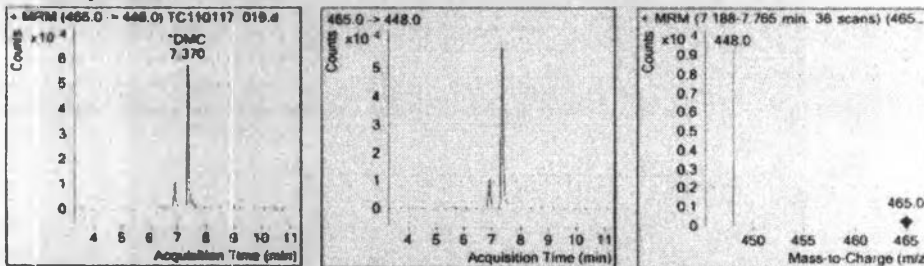
รูปที่ ก.8 แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่าง เมื่อ 002B คือตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของ TC ที่ 25 ppb โดยวิธี LC-MS-MS ของบริษัท ALS โดยใช้ DMC = internal standard



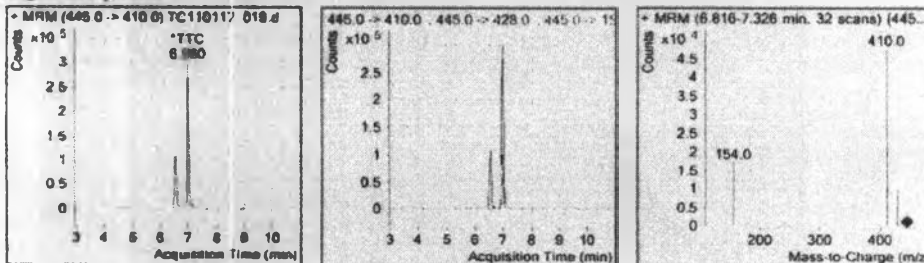
Quant Sample Report (ISTD)

Compound Graphics

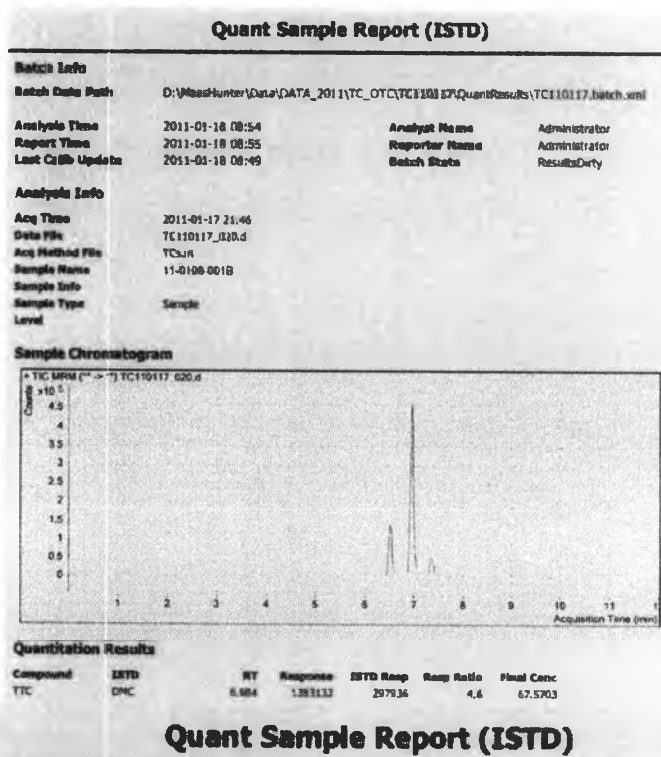
ISTD Compound **DMC**



Target Compound **TTC**



รูปที่ ก.9 แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่าง เมื่อ 001A คือตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของ TC ที่ 100 ppb โดยวิธี LC-MS-MS ของบริษัท ALS โดยใช้ DMC = internal standard

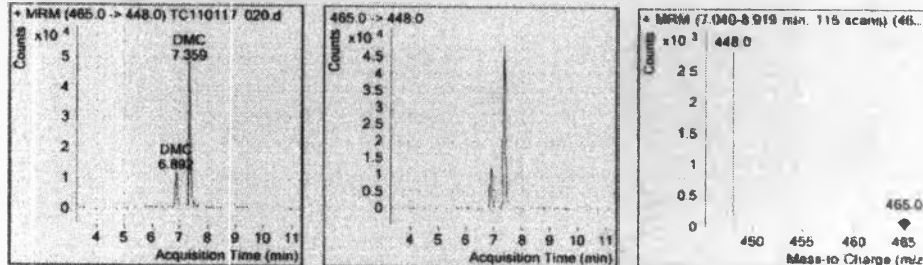


Quant Sample Report (ISTD)

Compound Graphics

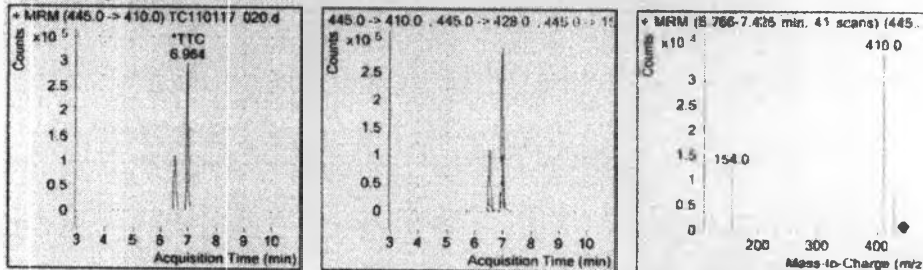
ISTD Compound

DMC



Target Compound

TTC



รูปที่ ก.10 แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่าง เมื่อ 001B คือตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของ TC ที่ 100 ppb โดยวิธี LC-MS-MS ของบริษัท ALS โดยใช้ DMC = internal standard

ภาคผนวก ข

การเตรียมสาร

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640

ซัง	RPMI 1640	10.4	กรัม
	NaHCO ₃	2	กรัม
	L-glutamin	0.1	กรัม
	glucose	2	กรัม
	pyruvic acid	0.11	กรัม
	น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายสารทุกอย่างในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวดๆ ละ 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมน้ำยาเก็บเซลล์อย่างถาวรในสภาวะแช่แข็ง (freezing medium)

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	65	มิลลิลิตร
fetal bovine serum	25	มิลลิลิตร
dimethyl sulfoxide (DMSO)	10	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส (ขณะที่ใช้งานควรแช่ในน้ำแข็ง)

3. การเตรียมสารละลายที่ใช้วิเคราะห์ BCA protein assay

สารละลายโปรตีนมาตรฐาน

bovine serum albumin (BSA)	1	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1	มิลลิลิตร

นำมาเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ ก่อนนำไปวิเคราะห์ BCA protein assay เพื่อทำการฟ
มาตรฐาน

BCATM reagent A และ BCATM reagent B (BCATM protein assay kit ของบริษัท Pierce)

ก่อนใช้ผสม Reagent A: B ในอัตราส่วน 50: 1

4. การเตรียมสารละลาย สำหรับใช้ในการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

1. 0.1 M citrate buffer, pH 6, 4.5, 3.5 และ 3

citric acid 0.1 โมลลาร์ (M)

Na₂HPO₄ 0.1 โมลลาร์ (M)

ไตเตรตกรดด้วยด่างจนได้ pH 6, 4.5, 3.5 และ 3 แล้วจึงนำไปกรองด้วย millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

2. 0.1 M phosphate buffer, pH 8ชั่ง NaH₂PO₄ 13.8 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตรชั่ง Na₂HPO₄ 35.8 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ไตเตรตต่างด้วยกรด จนได้ pH 8 แล้วจึงนำไปกรองด้วย millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

3. 1 M Tris HCl buffer, pH 9

Tris (hydroxymethyl) aminomethane 121 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

hydrochloric acid (HCl) 1 M

ไตเตรตต่างด้วยกรด จนได้ pH 9.0 แล้วจึงนำไปกรองด้วย millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

5. การเตรียมสารสำหรับการทำ SDS-PAGE

1. stacking gel and separating gel

reagent	stacking gel	separation gel
	(5%)	(10%)
sterile distilled water (ml)	1.46	3.84
40% acrylamide gel (ml)	0.25	2.0
1.5 M Tris, pH 8.8 (ml)	-	2.0
1.0 M Tris, pH 6.8 (ml)	0.25	-
10% SDS (ml)	0.02	0.08
10% APS (ml)	0.02	0.08
TEMED (ml)	0.002	0.0032
final volume (ml)	2	8

2. sample buffer

SDS	2%
60 mM Tris (pH 6.8)	
bromophenol blue	0.01%
glycerol	10%
beta-mercaptoethanol	10%

3. running buffer (1X) 1 L

Tris	3.02 กรัม
glycine	18.8 กรัม
SDS	1.0 กรัม

4. coomassie brilliant blue (250 ml)

coomassie brilliant blue R-250	0.25%
methanol	50%
acetic acid	10%

5. destaining solution (1 L)

methanol	5%
acetic acid	10%

6. การเตรียมสารละลายสำหรับวัดประสิทธิภาพการเชื่อมต่อเทอระไซคลิกกับโปรตีนพาหะ

1. 0.1 M sodium bicarbonate buffer, pH 8.5

Na_2CO_3	0.027	โมลลาร์ (M)
NaHCO_3	0.063	โมลลาร์ (M)
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

2. 0.05% TNBS (picrylsulfonic acid)

stock 5% TNBS (w/v) ละลายใน methanol

- picrylsulfonic acid	5	กรัม
- methanol	100	มิลลิลิตร

เจือจาง stock 5% TNBS เป็น 0.05% TNBS ในสารละลาย บัฟเฟอร์ 0.1 M sodium bicarbonate, pH 8.5

3. 10% SDS (sodium dodecyl sulphate)

SDS	1	กรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

4. 1 N HCl

Conc. HCl	7.7	มิลลิลิตร
-----------	-----	-----------

ปรับด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 250 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

- นำสารละลาย 0.05% TNBS ปริมาตร 75 ไมโครลิตร
- เติมตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ หรือ สารละลายมาตรฐาน ที่ความเจือจางต่างๆ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- เติมสารละลาย 10% SDS ปริมาตร 75 ไมโครลิตร
- เติมสารละลาย 1 N HCl ปริมาตร 37.5 ไมโครลิตร
- นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 335 นาโนเมตร
- นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาค่าร้อยละของการเชื่อมติด

$$\% \text{ การเชื่อมติด} = \frac{[\text{ค่าดูดกลืนแสงโปรตีนพาหะ} - \text{ค่าดูดกลืนแสงสารที่เชื่อมติดกับโปรตีน}] \times 100}{\text{ค่าดูดกลืนแสงของโปรตีนพาหะ}}$$

7. การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในเทคนิค ELISA

1. 0.2 M phosphate buffer, pH 7.4 (stock reagent)

ชั่ง NaH_2PO_4 27.6 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ชั่ง Na_2HPO_4 71.63 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ไตเตรตต่างด้วยกรด จนได้ pH 7.4 แล้วเก็บเป็น stock

2. 0.01 M phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4

0.2 M phosphate buffer, pH 7.4 1,000 มิลลิลิตร

NaCl 175.2 กรัม

น้ำกลั่น 18 ลิตร

ผสมให้เข้ากัน

3. PBS-Tween 20 (ใช้ Tween 20 ความเข้มข้น 0.05%)

Twcen 20	500	ไมโครลิตร
PBS	1000	มิลลิลิตร

4. 5% นมพร่องมันเนย

นมพร่องมันเนย ยี่ห้อแอนลิน	5	กรัม
PBS	100	มิลลิลิตร

ละลายนมพร่องมันเนยใน PBS (เตรียมใหม่ก่อนใช้งาน)

5. 0.1 M sodium acetate buffer, pH 6.0

$C_2H_3O_2 Na \cdot 3H_2O$	27.2	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
----------------------------	------	------	-------------------	------	-----------

ไตเตรตด้วย glacial acetic acid จนได้ pH 6.0 แล้วเก็บใส่ขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. substrate TMB

3, 3', 5, 5'- tetramethylbenzidine	1	มิลลิกรัม
0.15 M phosphate citrate buffer	10	มิลลิลิตร
DMSO	100	ไมโครลิตร
30% H_2O_2	3.4	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันในขวดสีชา (เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง)

7. 1 M H_2SO_4 (stopping reagent)

H_2SO_4 (96%)	102	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	898	มิลลิลิตร

ค่อยๆ เทกรดลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน

หมายเหตุ ควรนำขวดไปแช่ในน้ำประปาจนกว่าจะหายร้อน (เนื่องจากจะเกิดความร้อนเมื่อกรดผสมกับน้ำ)

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสุภาภรณ์ เทศวิเชียร เกิดเมื่อวันที่ 13 มีนาคม พ.ศ. 2528 ที่จังหวัด ร้อยเอ็ด สำเร็จ การศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ สงขลา ในปีการศึกษา 2549 และเข้าศึกษาต่อปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตร เทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2550 และได้นำเสนอผลงานเรื่อง Development of Tetracycline test kit using enzyme-linked immunosorbent assay technique ในการประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับนานาชาติ ในรูปแบบการ oral presentation ในงาน The 3rd Technology and Innovation for Sustainable Development International Conference (TISD2010), Faculty of Engineering, Khon Kaen University, Thailand, 4-6 March 2010 ณ โรงแรมรอยัล แม่โจ้ หนองคาย จังหวัดหนองคาย เมื่อวันที่ 4-6 มีนาคม 2553

