ผลการทดลองและอภิปราย

ประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 264/2545 ห้ามการนำปลาปักเป้ามาใช้เป็นวัตถุดิบในอาหารมีผลบังคับใช้เมื่อวันที่ วันที่ 19 ธันวาคม 2545 ทำให้การตรวจวิเคราะห์อาหารที่มีโอกาสปนด้วยวัตถุดิบเป็นรายการที่จำเป็นต้องดำเนินการตามกฎหมาย ในทางปฏิบัติการตรวจสอบทางกายภาพ ไม่สามารถระบุการปนได้ การตรวจสอบส่วนใหญ่จึงมุ่งเน้นไปที่การตรวจทางชีวเคมี ได้แก่การตรวจขนาดและรูปแบบของโปรตีนโดยเทคนิค polyacryamide gel electrophoresis และตรวจสอบทางเซรั่มวิทยา ซึ่งทั้งสองเทคนิคมีทั้งข้อจำกัดในการตรวจสอบในผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปไปจากวัตถุดิบเดิม ทำให้โปรตีนเสียสภาพ และความไวและความแม่นยำ การวิเคราะห์บนพื้นฐานของโมเลกุลดีเอ็นเอที่มีเสถียรภาพกว่าแม้เนื้ออาหารจะผ่านการแปรรูปก็ไม่มีผลกระทบต่อการตรวจจึงมีบทบาทสำคัญ อย่างไรก็ดีแม้ต่อมามีผู้พัฒนาเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ที่อยู่บนพื้นฐานการตรวจยีนในบริเวณ 16S RNA แต่ด้วยข้อจำกัดในเรื่องข้อมูลชนิดปลาที่ต่างกันในแต่ละประเทศและรายละเอียดทางเทคนิคที่ต้องพึ่งพาเครื่องมือโดยเฉพาะเครื่อง thermocycler และความชำนาญการของเจ้าหน้าที่ทางเทคนิค ทำให้การตรวจโดยเทคนิคนี้ทำได้เฉพาะในห้องปฏิบัติการที่มีความพร้อมเท่านั้น

สำหรับประเทศไทย ปลาปักเป้าส่วนใหญ่ที่นำมาใช้ประโยชน์และมีการลักลอบนำมาใช้เป็นวัตถุดิบเป็นชนิด *Lagocephalus lunaris*, *L. inermis* และ *L. spadiceus* โดยการปะปนมักเกิดขึ้น ณ ต้นทางการผลิต ทั้งจากแพและล้ง และจากโรงงานแปรรูปอาหารขนาดเล็ก ทำให้ยากต่อการควบคุมกำกับดูแลโดยเจ้าพนักงาน และเงื่อนไขดังกล่าวทำให้จะต้องตรวจสอบการปนในบริเวณแพปลา ล้ง หรือโรงงานในภาคสนาม ซึ่งเป็นข้อจำกัด ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องพัฒนาวิธีการตรวจให้สามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว โดยไม่ต้องอาศัยความชำนาญการและไม่พึ่งพาห้องปฏิบัติการ เพื่อช่วยให้การตรวจสามารถทำได้ในภาคสนาม ณ จุดที่ต้องการโดยตรง

การพัฒนาการตรวจชนิดการปนของเนื้อสัตว์ในอาหารให้ง่ายมีขั้นตอนหลัก 3 ขั้นตอนได้แก่การพัฒนาวิธีการสกัดดีเอ็นเออย่างง่าย การพัฒนาเทคนิคการเพิ่มสัญญาณดีเด็นเอที่มีประสิทธิภาพและการตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอ

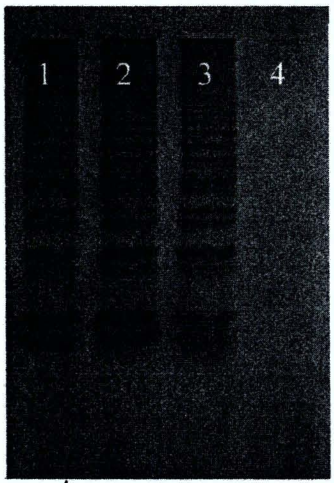
การศึกษาในครั้งนี้ได้นำทั้ง 3 ขั้นตอนมาดำเนินการในห้องปฏิบัติการแบบย่อส่วน (Lab on a chip) ใช้ชิป PDMS ขนาด 76 x 26 ม.ม. โดยได้พัฒนาวิธีการสกัดดีเอ็นเออย่างง่ายและรวดเร็ว วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจงต่อปลาปักเป้าทั้ง 3 ชนิดบนพื้นฐานของยีนsagitoxin binding protein ซึ่งเป็นยีนสร้างโปรตีนจับตัวกับพิษ และการพัฒนาระบบการตรวจสอบสัญญาณโดยอาศัยการจับตัวของโมเลกุลดีเอ็นเอไบน์เดอร์ การตรวจโดยชิปดังกล่าวสามารถตรวจการปนของปลาปักเป้าทั้ง 3 ชนิดได้ง่ายและ มีประสิทธิภาพ

ที่ผ่านมาโครงสร้างชิป PDMS ได้ถูกนำมาดัดแปลงใช้กับการดำเนินปฏิกิริยา PCR ทั้งในรูปแบบ 2 step และ 3 step (Prakash et al., 2006) อย่างไรก็ดีด้วยข้อจำกัดทางเทคนิคที่ปฏิกิริยาอยู่บนการใช้ไพรเมอร์พื้นฐานเพียง 1 คู่ จึงทำให้การปรับปฏิกิริยาเพื่อความจำเพาะทำได้ยาก นอกจากนี้การปรับให้การไหลของน้ำยาสัมพันธ์กันกับจำนวนรอบ ทำให้ การควบคุมปฏิกิริยาทำได

ยาก จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในรูปการประยุกต์อย่างง่ายและรวดเร็วแต่จะเหมาะกับการประยุกต์ในรูปแบบอัตโนมัติ (automate) อย่างไรก็ดี เมื่อปฏิกิริยาที่ใช้ในการตรวจดีเอ็นเออยู่บนพื้นฐานของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิระนาบเดียว ทำให้ไม่จำเป็นต้องปรับการไหลของน้ำยาในปฏิกิริยสัมพันธ์กับอุณหภูมิ การทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิเดียวจึงทำได้โดยง่าย

นอกจากนี้ด้วยคุณสมบัติสำคัญของการใช้ไพรเมอร์มากกว่า 2 คู่ในปฏิกิริยาทำให้ปฏิกิริยามีความจำเพาะสูง แม้จะทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิคงที่เพียงอุณหภูมิเดียวเหล่านี้ ยังผลให้การปรับประยุกต์หลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออุณหภูมิระนาบเดียวในรูปแบบชิป ทำได้ง่าย

โครงสร้างของระบบปฏิบัติการสมบูรณ์อย่างง่าย ช่วยให้สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างอาหารได้ภายใน 8-10 นาที และจากการทดสอบเบื้องต้น โดยใช้เนื้ออาหารที่มีการปนของเนื้อปลาปักเป้าในระดับตั้งแต่ 0.1 0.5 และ 1% พบว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ ferrous oxide resin สามารถสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบการปนในระดับ 0.1% ได้ด้วย (ภาพที่ 2)



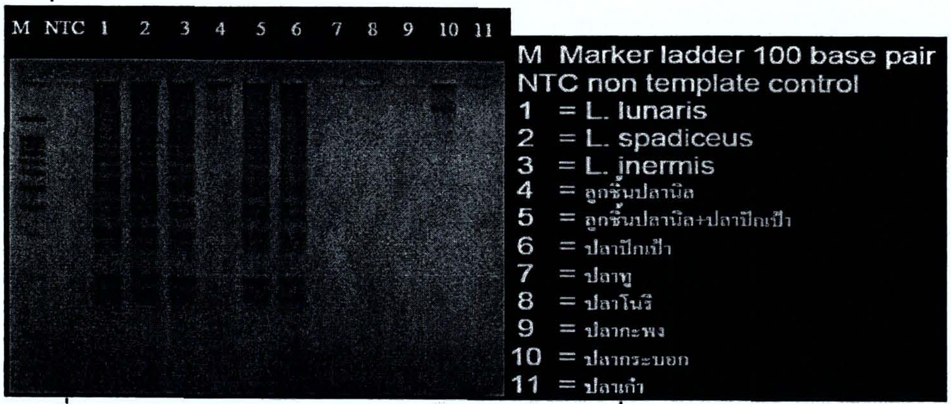
ภาพที่ 2 การตรวจสอบประสิทธิภาพในการสกัดดีเอ็นเอจาก matrix ตัวอย่างที่มีเนื้อปลาปักเป้าปนในระดับต่างกัน โดยเทคนิค isothermal DNA amplification เลน 1 ได้แก่ ดีเอ็นเอจาก matrix ปลาปักเป้าใน matrix ไก่ 1% เลน 2 ดีเอ็นเอจาก matrix ปลาปักเป้าใน matrix ไก่ 0.5% เลน 3 ดีเอ็นเอจาก matrix ปลาปักเป้าใน matrix ไก่ 0.1% และเลน 4 ดีเอ็นเอจาก matrix ปลาปักเป้าใน matrix ไก่ 0.01%

การทดสอบปฏิกิริยาเมื่อไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน พบว่าไพรเมอร์สามารถให้รูปแบบดีเอ็นเอเฉพาะตัว ขนาดที่เป็น ผลคูณของดีเอ็นเอขนาด 180 nt การทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา (specificity) กับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเนื้ออาหาร ที่เป็นปลา 9 ชนิด ได้แก่ ปลา *L. lunaris, L. spadiceus, L. inermis* ปลานิล ปลาทู ปลาโนรี ปลากะพง ปลากระบอก ปลาเก๋า พบว่าชุดไพรเมอร์ให้ความจำเพาะต่อปลา *Lagocephalus lunaris*, *L. inermis* และ *L. spadiceus* เท่านั้น (ภาพที่3)

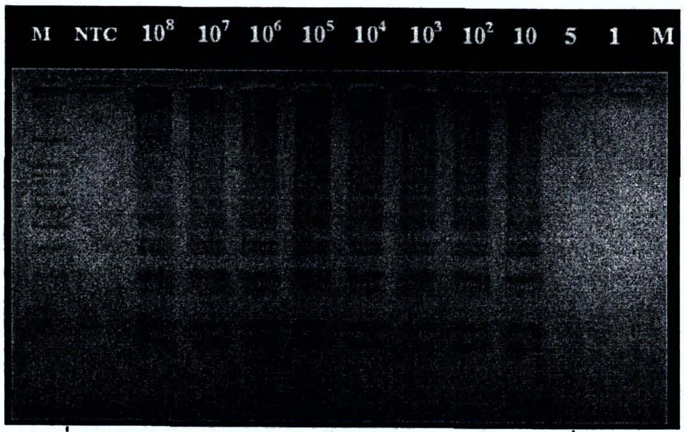
การทดสอบความไวของปฏิกิริยาโดยใช้ดีเอ็นเอที่ทราบจำนวนในรูปแบบ copy number จาก 10^5 $10^4$$10^3$ 10^2 10 5 และ 1 ชุด พบว่าชุดไพรเมอร์และปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ สามารถตรวจสอบการปนของปลาปักเป้าในตัวอย่างได้ในระดับ 10 copy ของดีเอ็นเอได้ (ภาพที่ 4)

การตรวจการปนของเนื้อปลาปักเป้าในอาหารโดยใช้เนื้ออาหารหลากชนิด พบว่า สามารถจำแนกการปนของเนื้อปลาผ่านความสามารถในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยตรวจสอบจากแถบดีเอ็น

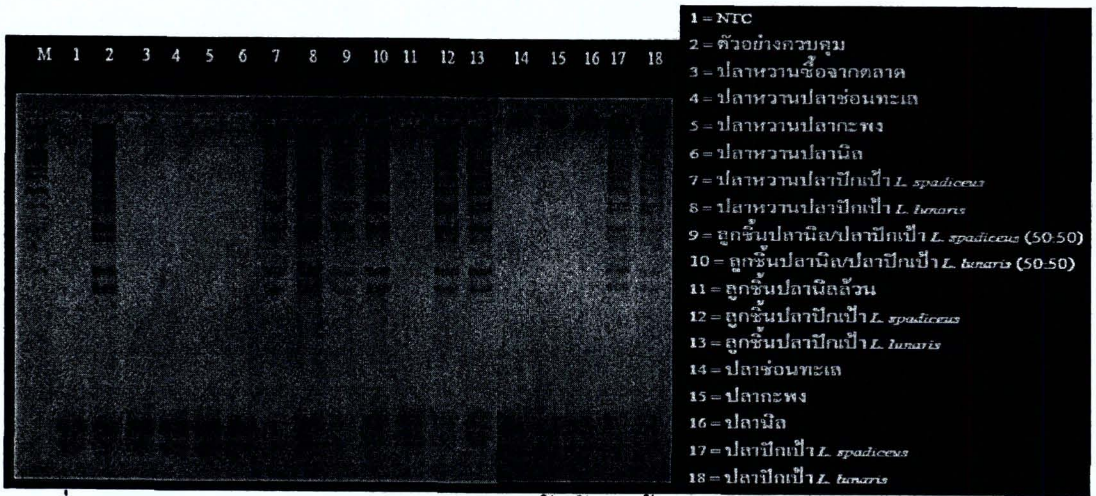
เอได้โดยเฉพาะในเนื้ออาหารที่มีการปนและไม่พบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอในอาหารที่ไม่มีการปนของวัตถุดิบปลาปักเป้าแต่อย่างใด (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 3 การตรวจสอบความจำเพาะของไพร์เมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เลน 1-11 เป็นตัวอย่างดีเอ็นเอจากปลาต่างชนิด ntc แสดงตัวควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอ

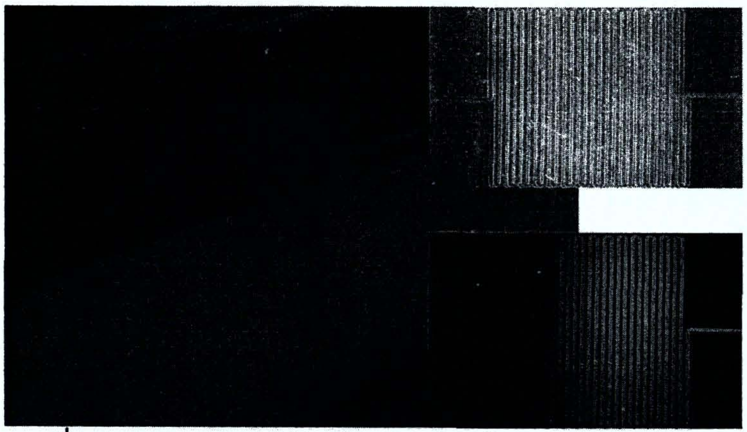


ภาพที่ 4 การตรวจสอบความไวของปฏิกิริยาในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เลน 1-11 เป็นตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทราบจำนวนชุดจาก 100,000,000 ถึง 1 ชุดตามลำดับ ntc แสดงตัวควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอ



ภาพที่ 5 การตรวจสอบการปนของวัตถุดิบจากปลาปักเป้าในเนื้ออาหารชนิดต่างๆ ntc แสดงตัวควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอ ตัวอย่างควบคุมเป็นดีเอ็นเอผสมจากปลาทั้ง 3 ชนิด

การแสดงผลของปฏิกิริยาตรวจสอบจาก การเร่งของปฏิกิริยาเมื่อส่องดูด้วยแหล่งกำเนิดแสง UVในที่มืด และเนื่องจากความสามารถในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแม้ในระบบ 10 ชุด ที่ให้ปริมาณดีเอ็นเอที่มากกว่า ปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR จึงทำให้การเรืองแสงเมื่อทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอไบนด์เดอร์ มีความสว่างมากพอที่จะตรวจสอบได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งทำให้การตรวจมีประสิทธิภาพ (ภาพที่ 6.)



ภาพที่ 6 การตรวจสอบปฏิกิริยาโดยดูจากการเรืองแสงบนชิปบนแหล่งกำเนิดแสง UV ความยาวคลื่น 312 nm และภาพถ่ายมุมไกล้ภายมนบริเวณปฏิกิริยาเปรียบเทียบระหว่างไม่เรืองแสง (-) ด้านบนขวา และเรืองแสง (+) ด้านล่างขวา

ด้วยผลการตรวจสอบทั้งความสามารถในการสกัดดีเอ็นเอจำเพาะ ความไวของปฏิกิริยา ทำให้การตรวจการผนของเนื้อปลาปักเป้าในอาหาร สามารพทำได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในเวลา 40 นาที

การคำนวณต้นทุน พบว่าโครงสร้างชิป มีต้นทุน 250 บาทและต้นทุนของสารเคมี ปฏิกิริยา 150 บาท และหากไม่นับต้นทุนค่าแรงในการดำเนินการและการลงทุนด้านเครื่องมือมากนัก การใช้ระบบปฏิบัติการสมบูรณ์อย่างง่ายนี้ จะช่วยตอบคำถามในการตรวจสอบการปนของปลาปักเป้าในภาคสนามได้เป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

1. Nakayama T., Kurosawa, Y., Furui, S., Kerman, K., Kobayashi, M., Rao., S.R., Yonezawa., Y., Nakano., K., Hino, A., Yamamura., S., Takamura, Y., and Tamiya, E.. 2006. Circumventing air bubbles in microfluidic systems and quantitative continuous-flow PCR applications. Anal Bioanal Chem 386: 1327–1333.
2. Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. and Hase, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Research 28:e63.

3. Prakash, R., Adamia, S., Sieben, V., Pilarski, P., Pilarski, L.M. and Backhouse, C.J. 2006. Small volume PCR in PDMS biochips with integrated fluid control and vapour barrier. Sensors and Actuators B: Chemicals 113:398-409.

ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) **การศึกษาและพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอนมอนอกไซด์ในเนื้อสัตว์แช่แข็งในบรรจุภัณฑ์**

(ภาษาอังกฤษ) **The study and development of the determination methods of carbon monoxide in packaged frozen meat**

ผู้วิจัย 1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์พรพรรณ อุดมกาญจนนันท์*
2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จูอนุวัฒนกุล
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้นำน้ำเลือดของสัตว์เนื้อแดงประเภทเนื้อปลาทูน่า เนื้อหมู ละเนื้อวัว มาตรวจวิเคราะห์ปริมาณก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ เพื่อเป็นตัวบ่งชี้ร่องรอยว่าเนื้อสัตว์เหล่านั้นผ่านการบรรจุในบรรจุภัณฑ์แบบดัดแปรบรรยากาศโดยใช้ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์หรือไม่ โดยใช้เทคนิควิเคราะห์ 2 วิธีคือ เทคนิคเฮดสเปซแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรี และเทคนิควิสิเบิลสเปกโทรเมตรี สำหรับเทคนิคเฮดสเปซแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรีนั้นได้พัฒนาการเตรียมตัวอย่างโดยใช้โพแทสเซียมเฮกซาไซยาโนเฟอร์เรต(III) เพื่อปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ออกจากน้ำเลือดภายใต้สุญญากาศ ตรวจวัดโดยเครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์ระบบ SIM ที่ m/z 32 (0-5 นาที) และ m/z 28 (5.01-10 นาที) ได้ผลการวิเคราะห์ที่มีความเที่ยงสูง สำหรับเทคนิควิสิเบิลสเปกโทรเมตรี ได้พัฒนาการตรวจวัดปริมาณคาร์บอกซีไมโอโกลบินในน้ำเลือดที่ค่าความยาวคลื่น 2 ค่าคือ 420 นาโนเมตร และ 431 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับการดูดกลืนแสงของคาร์บอกซีไมโอโกลบินและดีออกซีไมโอโกลบินตามลำดับ โดยใช้สารละลายโซเดียมไดไทโอไนต์เป็นตัวรีดิวซ์ ผลวัดได้นำมาคำนวณเป็นปริมาณร้อยละของคาร์บอกซีไมโอโกลบินในปริมาณไมโอโกลบินทั้งหมด วิธีนี้มีการรบกวนจากเมทริกซ์สูง และเหมาะกับการวิเคราะห์เนื้อปลาทูน่าเท่านั้น

คำสำคัญ: คาร์บอนมอนอกไซด์ , ไมโอโกลบิน

Abstract

The meat drips from frozen tuna, beef and pork were analyzed for the trace of carbon monoxide treated-modified atmosphere packaging by using the headspace gas chromatography-mass spectrometry with SIM mode at m/z 32 (0-5 min) and m/z 28 (5.01-10 min), as potassium hexacyanoferrate (III) as a gas-releasing agent. The results had high precision. Another technique used was the visible absorption spectrometry at 420 and 431 nanometer to determine the percentage of carboxymyoglobin in myoglobin solution, using sodium dithionite solution as a reducing agent. The calculated results showed high matrix interferences and this technique was suitable for tuna meat only.

Keywords: carbon monoxide, myoglobin