บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรม

สารต้านจุลชีพหรือสารปฏิชีวนะต่าง ๆ เกษตรกรนิยมใส่ในอาหารสัตว์เพื่อใช้เลี้ยงสัตว์ในฟาร์มเพื่อเพิ่มผลผลิตให้ทันต่อความต้องการของตลาด ทั้งนี้เนื่องจากในปัจจุบันจำนวนประชากรโลกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วทำให้ความต้องการอาหารเพิ่มขึ้น อันเป็นที่มาของการทำฟาร์มแบบใหม่หรือ modern farming system ซึ่งระบบการทำฟาร์มแบบใหม่จะมีการเลี้ยงสัตว์เป็นจำนวนมากในพื้นที่จำกัดทำให้มีการหมักหมมของของเสียมากขึ้น กล่าวคือหากสัตว์ในฟาร์มเริ่มเป็นโรคแม้เพียงตัวเดียวก็จะทำให้เกิดการระบาดไปยังสัตว์ตัวอื่นได้อย่างรวดเร็วจนรักษาไม่ทัน ดังนั้นเกษตรกรจึงนิยมใส่สารต้านจุลชีพในอาหารสัตว์เพื่อเป็นการป้องกันล่วงหน้า หากใช้สารต้านจุลชีพเหล่านี้ในปริมาณที่ไม่เหมาะสม หรือทิ้งระยะเวลาหลังให้ยากับเวลาที่ฆ่าสัตว์สั้นเกินไปอาจทำให้ปัญหาการตกค้าง (residue) ของยาในส่วนต่าง ๆ และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เช่น เนื้อ นม ไข่ เป็นต้น ซึ่งจะเป็นสาเหตุให้เกิดปัญหาทั้งทางด้านสาธารณสุขของคนภายในประเทศ และทางด้านเศรษฐกิจการส่งออกสินค้าเกษตรกรรมจำพวกเนื้อสัตว์ตามมา

2.1 สารต้านจุลชีพ

สารต้านจุลชีพหรือสารปฏิชีวนะ คือ สารที่ได้มาจากการสังเคราะห์ขึ้นโดยวิธีทางเคมี หรือสารที่สร้างมาจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและทำลายจุลินทรีย์ได้ สารต้านจุลชีพนั้นมีผลต่อจุลชีพเพียงสองประเภท คือ ไปทำลายหรือฆ่าจุลชีพ เรียกว่า แบคเทอริโอซิดอล (bacteriocidal) และมีผลไปยับยั้งการเจริญหรือการขยายตัวของจุลชีพ เรียกว่า แบคเทอริโอสแตติก (bacteriostatic) การใส่สารต้านจุลชีพในอาหารสัตว์นั้นมีจุดประสงค์เพื่อควบคุม ป้องกัน และรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมลบ แกรมบวก และโปรโตซัวในสัตว์ หรือบางชนิดใช้เป็นสารเร่งการเจริญเพื่อเป็นการเพิ่มผลผลิตให้มากขึ้น

สำหรับการจำแนกสารต้านจุลชีพจะจำแนกตามกลไกวิธีการขัดขวางการเจริญของจุลชีพหรือแบคทีเรียซึ่งสามารถจำแนกได้ 4 ประเภท (Michele,2005) (ดังแสดงในรูปที่ 2.1) คือ

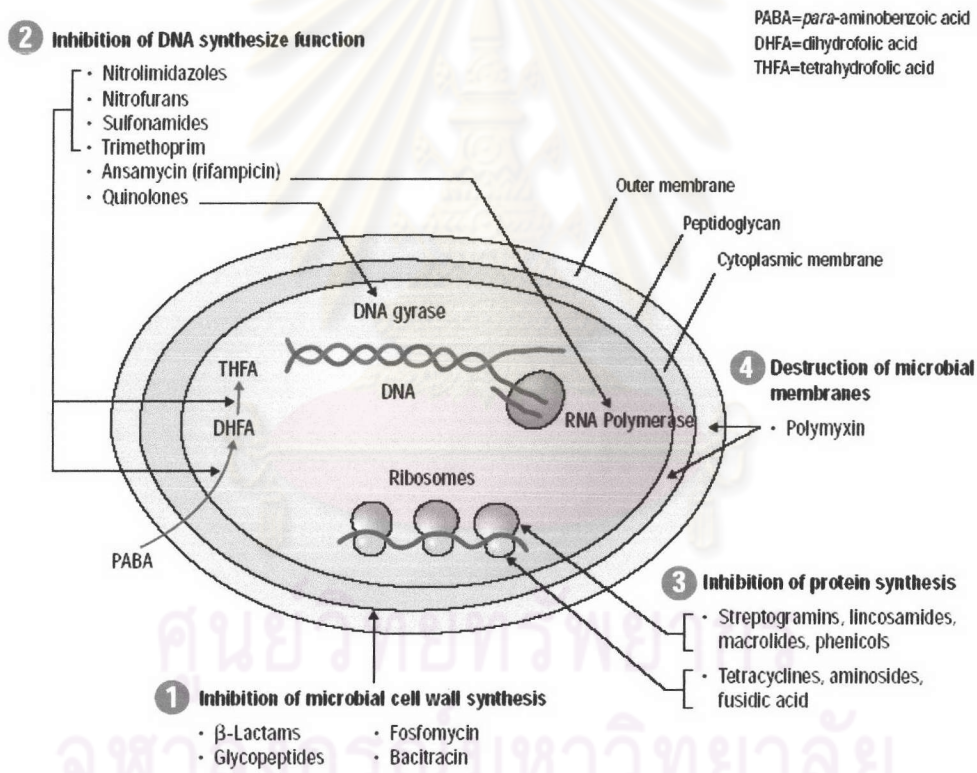
1. กลุ่มยาที่ทำหน้าที่ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ ได้แก่ ยาในกลุ่มเบต้า-แลกแทม (Beta-lactam) เช่น เพนนิซิลิน (Penicillin) และยาในกลุ่มไกลโคเปปไทด์ (Glycopeptide) เช่น

แวนโคมัยซิน (vancomycin) และ ไทโคพลานิน (teicoplanin) นอกจากนี้ยังรวมถึง ฟอสโฟมัยซิน (fosfomycin) และ เบซิตราซิน (bacitracin) เป็นต้น

2. กลุ่มยาที่ทำหน้าที่ขัดขวางเมตาบอลิซึมของ DNA ได้แก่ ไรฟามพิซิน (rifampicin), ยากลุ่มควิโนโลน (quinolone), ไนโตรอิมิดาโซล (nitroimidazole), ไนโตรฟูแรน (nitrofuran) และยากลุ่มซัลโฟนาไมด์ (sulfonamides)

3. กลุ่มยาที่ทำหน้าที่ยับยั้งการสร้างโปรตีน ได้แก่ ยาในกลุ่มมาโครไลด์ (macrolides) อะมิโนไกลโคไซด์ (aminoglycosides) เตตราซัยคลิน (tetracycline) และคลอแรมฟินิคอล (chloramphenicol)

4. กลุ่มยาที่ทำหน้าที่ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ได้แก่ โพลิมิซิน บี (polymixin B)



รูปที่ 2.1 แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพต่อจุลินทรีย์ (Michele, 2005)

การใช้สารต้านจุลชีพนั้นมีประโยชน์ในการป้องกัน และรักษาการติดเชื้อของสัตว์ แต่ถ้าไม่มีแนวทางการควบคุมการใช้สารต้านจุลชีพที่ถูกต้องก็อาจส่งผลให้มีสารตกค้างในเนื้อสัตว์หรือผลิตภัณฑ์ที่กินได้จากสัตว์ที่ได้รับสารต้านจุลชีพนั้น ซึ่งสารตกค้างนั้นอาจเป็นอันตรายกับผู้บริโภค

ได้ โดยแบ่งแนวทางที่อาจทำให้เกิดความเสี่ยงของการตกค้างของสารปนเปื้อนได้เป็น 2 ประการ คือ

1. ความเสี่ยงที่เกิดจากสารปนเปื้อนโดยตรง

1.1 ความเป็นพิษของสารปนเปื้อน

1.2 ก่อให้เกิดอาการแพ้ เช่น เพนนิซิลิน

1.3 สารก่อให้เกิดมะเร็ง เช่น ยากลุ่มไนโตรฟูแรน

2. ความเสี่ยงที่อาจทำให้เกิดการดื้อยาของแบคทีเรียที่ส่งผลต่อการรักษาในมนุษย์

2.1 การดื้อยาของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการตกค้างของยาในอาหาร

2.2 การเปลี่ยนแปลงของเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ที่มีผลโดยอ้อมกับระบบทางเดินอาหาร

2.3 ทำให้เกิดการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปกติในธรรมชาติที่อาจถ่ายทอดการดื้อยาทางพลาสมิด ส่งผลต่อเชื้อในลำไส้ของคน

สาเหตุของปัญหาสารตกค้างในเนื้อสัตว์สรุปได้ 3 ประการ (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2545) คือ

1. มีความจำเป็นต้องใช้ยา

เพื่อการป้องกันและรักษาโรค เร่งการเจริญ และเพื่อปรับปรุงคุณภาพตามที่ตลาดต้องการ เช่น กรณีการใช้สารเร่งเนื้อแดงในหมู เป็นต้น

2. การใช้ยาในทางที่ผิด

2.1 มีการใช้ยาอย่างผิดกฎมาย

มีการนำเภสัชเคมีภัณฑ์ฯ ไปผลิตยาสัตว์โดยผิดกฎมาย ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการดำเนินการโดยสัตวแพทย์หรือสัตวบาล และราวครึ่งหนึ่งทำในโรงงานผลิตอาหารสัตว์ที่ได้รับอนุญาต ที่เหลือทำในบ้านหรือห้องแถวที่ไม่ถูกสุขลักษณะ เป็นต้น

มีการนำเภสัชภัณฑ์ฯ ไปผสมอาหารโดยผิดกฎมาย เพื่อวัตถุประสงค์ในการป้องกันโรคหรือเพื่อเร่งการเจริญหรือปรับปรุงคุณภาพให้ได้ตามที่ต้องการ เช่น การนำเภสัชเคมีภัณฑ์สารต้านจุลชีพไปผสมในอาหารสัตว์ เป็นต้น

2.2 มีการใช้ยาในทางที่ไม่เหมาะสม

มีการนำยาที่ใช้ในมนุษย์ไปใช้ไม่ถูกต้องในสัตว์ เช่น มีการนำยาคลอแรมฟินิคอลแคปซูลสำหรับมนุษย์ไปถอดแคปซูลใช้ในสัตว์ในกรณีหาไม่ได้ เป็นต้น

2.3 มีการใช้ยาไม่ถูกวิธี

2.4 ไม่หยุดใช้ยาตามระยะเวลาที่กำหนด

มียาหลายชนิดเป็นยาที่อนุญาตให้ใช้ในสัตว์เพื่อการบริโภคตามกฎหมาย แต่ต้องมีระยะเวลาหยุดยานานเพียงพอตามกำหนดก่อนฆ่า เพื่อให้ไม่มีสารตกค้างเกินปริมาณขีดสูงสุดที่อนุญาตให้ตรวจพบได้ (Maximum Residue Limit : MRL)

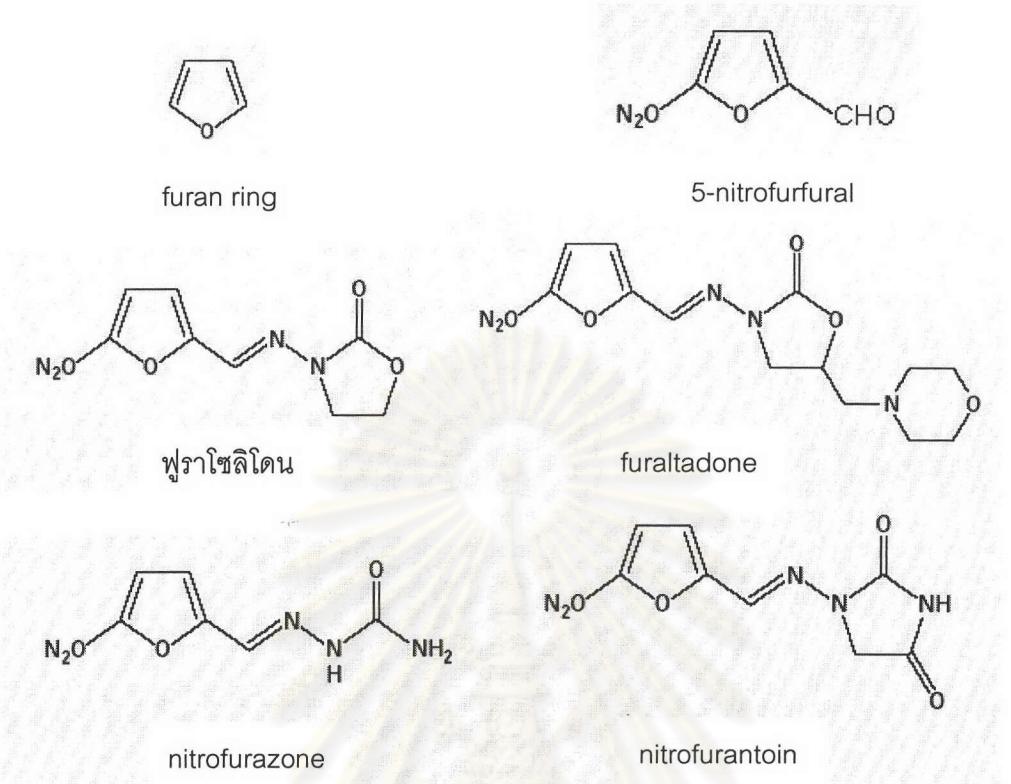
3. การไม่ตรวจสารตกค้างหรือตรวจอย่างไม่มีประสิทธิภาพ เช่น ไม่มีการตรวจก่อนส่งออกจำหน่ายในประเทศและส่งไปจำหน่ายต่างประเทศ

ซึ่งในกรณีที่เกิดปัญหาประเทศสมาชิกสหภาพยุโรปตรวจพบไนโตรฟูแรนในกุ้งและไก่ของประเทศไทยเกิดจากปัญหาทั้ง 3 ขั้นตอนนี้

2.2 ไนโตรฟูแรน (nitrofurans)

ไนโตรฟูแรนเป็นสารกลุ่มที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้นในปี ค.ศ. 1944 และใช้กันอย่างแพร่หลายในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ เพื่อป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อในลำไส้ (Gastrointestinal tract infection) และโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ (Urinary tract infection) ที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ และโปรโตซัว เช่น *Salmonella* spp., *Escherichia coli, Giardia* spp. และ *Coccidia* spp. เป็นต้น โดยไปออกฤทธิ์ขัดขวางการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิค นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารเร่งการเจริญเพื่อเพิ่มผลผลิตให้มากขึ้นอีกด้วย สารในกลุ่มนี้สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (bacteriostatic) และฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (bactericidal) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ใช้ โครงสร้างของสารกลุ่มไนโตรฟูแรนจะประกอบด้วยวงแหวนฟูแรนเชื่อมกับหมู่ไนโตร เรียกว่า 5–ไนโตรฟูรัลดีไฮด์ (5–nitrofuraldehyde) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และมีหมู่อะโซเมทิน (azomethine, -CN=N-) เชื่อมระหว่างวงแหวนฟูแรนกับ side chain ดังแสดงสูตรโครงสร้างในรูปที่ 2.2 5–ไนโตรฟูรัลดีไฮด์ (5–nitrofuraldehyde) มีคุณสมบัติไม่เสถียร ไวต่อแสง และถูกออกซิไดซ์ได้ง่ายเมื่อสัมผัสอากาศเป็นเวลานาน ๆ (Nikolaos and Dimitrios, 2001; Hugo and Russell, 1998) การสูญเสียความสามารถในการออกฤทธิ์ต่อจุลชีพของสารกลุ่มนี้เกิดจากสองสาเหตุคือ (Hugo และ Russell, 1998)

1. วงแหวนฟูแรนถูกรีดิวซ์ หรือ
2. เกิดการแตกหักของหมู่ azomethine (-CH=N-)

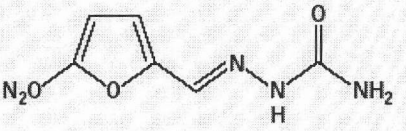


รูปที่ 2.2 แสดงสูตรโครงสร้างหลักของสารกลุ่มไนโตรฟูแรน ซึ่งจะประกอบด้วยหมู่ไนโตรเกาะอยู่กับวงแหวนฟูแรน และไนโตรฟูแรน (parent drugs) ชนิดต่าง ๆ (Hugo และ Russell, 1998 ; Masahiko, 2003)

อนุพันธ์ของยาในกลุ่มไนโตรฟูแรนมีหลายชนิดแต่มีเพียง 4 ชนิดที่แนะนำให้ใช้ในการรักษาและป้องกันโรคติดเชื้อในสัตว์ ได้แก่

1. ไนโตรฟูราโซน (Nitrofurazone, NF)

ไนโตรฟูราโซนเป็นสารประกอบของ 5-nitro-2-furaldehyde semicarbazone สูตรโครงสร้างทางเคมีแสดงดังรูป 2.3



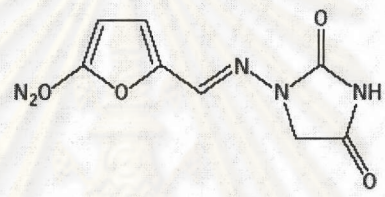
รูปที่ 2.3 แสดงสูตรโครงสร้างของไนโตรฟูราโซน (Masahiko, 2003)

ไนโตรฟูราโซนมีลักษณะเป็นผงผลึกสีเหลืองมะนาว ไม่มีรส ไม่มีกลิ่น ละลายน้ำได้เพียงเล็กน้อย และทนทานต่อความร้อนได้ดี

ไนโตรฟูราโซนเป็นสารที่ใช้เฉพาะที่เพื่อรักษาแผลที่ติดเชื้อและโรคติดเชื้อที่บริเวณผิวหนัง หู ตา และระบบสืบพันธุ์ นอกจากนี้ยังนิยมใช้ในสัตว์ปีกเพื่อป้องกันโรคติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อบิด (coccidia) ในลำไส้ส่วน cecum ของไก่เนื่องจากออกฤทธิ์ทำลายโปรโตซัวได้ดี และใช้เป็นอาหารเสริมด้วย โดยนิยมใช้ผสมในอาหารสัตว์ (feed additive) ในขนาด 50-500 กรัมต่อน้ำหนักอาหาร 900 กิโลกรัม

2. ไนโตรฟูแรนโทอิน (Nitrofurantoin, NT)

ไนโตรฟูแรนโทอินเป็นสารประกอบของ N-(5-nitro-2-furaldehyde)-1-aminohydantoin สูตรโครงสร้างทางเคมีแสดงดังรูป 2.4



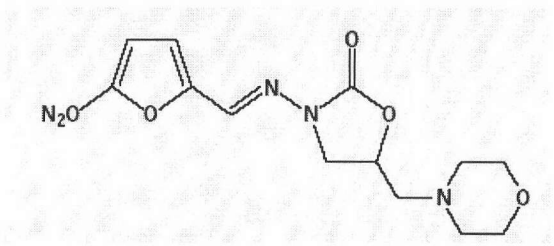
รูปที่ 2.4 แสดงสูตรโครงสร้างของไนโตรฟูแรนโทอิน (Masahiko, 2003)

ไนโตรฟูแรนโทอินมีลักษณะเป็นผลึกสีเหลือง รสขม มีกลิ่นเล็กน้อย และไม่ละลายน้ำ ไนโตรฟูแรนโทอินเป็นสารที่ดูดซึมได้ดีและรวดเร็วจากทางเดินอาหารจึงไม่มีผลต่อแบคทีเรียที่อยู่ตามปกติในลำไส้ (intestinal bacterial flora) ประมาณ 40% ของยาที่ดูดซึมจะถูกขับออกอย่างรวดเร็วออกมากับปัสสาวะ การที่ยานี้ถูกขับออกมากกับปัสสาวะด้วยความเข้มข้นสูงจึงเกิดฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (bacteriocidal) ในระบบทางเดินปัสสาวะได้

ไนโตรฟูแรนโทอินให้ได้ทั้งฉีดเข้าหลอดเลือดดำ ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ยาจะมีความเข้มข้นสูงในปัสสาวะที่เป็นกรด พบว่าที่ pH 5 ปัสสาวะจะอิ่มตัว (supersaturate) ไปด้วยไนโตรฟูแรนโทอินโดยไม่เกิดการตกตะกอน ซึ่งที่ระดับ pH นี้ยาจะออกฤทธิ์ได้ดีที่สุด

3. ฟูราลทาโดน (Furaltadone, FD)

เป็นสารประกอบของ 3-(5-nitrofurfurylidoneamino)-5-(4-morpholinomethyl)-2-oxazolidinone มีสูตรโครงสร้างทางเคมีดังรูป 2.5 ฟูราลทาโดนเป็นสารที่เกิดการดูดซึมได้จากทางเดินอาหาร การแพร่กระจายตัวของยายังไม่ทราบแน่ชัด แต่พบยาได้น้อยในปัสสาวะ

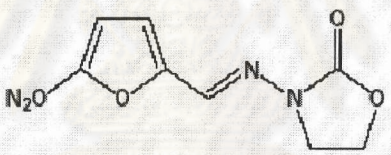


รูปที่ 2.5 แสดงสูตรโครงสร้างของฟูราลทาโดน (Masahiko, 2003)

ฟูราลทาโดนเป็นสารที่ออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียปานกลาง (medium spectrum activity) ส่วนใหญ่จะใช้รักษาสัตว์ปีกที่ได้รับเชื้อ *Salmonella* Gallinarum หรือ *Salmonella* Typhimurium (salmonellosis) การติดเชื้อ *Escherichia coli* (colibacillosis) ข้อเท้าอักเสบจากการติดเชื้อ (infectious synovitis) นอกจากนี้ยังใช้รักษาโรคเต้านมอักเสบในโคนมได้

4. ฟูราโซลิโดน (ฟูราโซลิโดน, FZ)

ฟูราโซลิโดนเป็นสารประกอบของ N-(5-nitro-2-furfurylidene)-3-amino-2-oxazolidinone มีสูตรโครงสร้างทางเคมีดังรูป 2.6



รูปที่ 2.6 แสดงสูตรโครงสร้างของฟูราโซลิโดน (Masahiko, 2003)

ฟูราโซลิโดนเป็นยาที่นิยมใช้ในสัตว์ปีก สุกร และสัตว์น้ำ เพื่อเป็นการป้องกันโรคติดเชื้อในกระเพาะอาหารและลำไส้ ปกติแนะนำให้ผสมฟูราโซลิโดนในอาหารสุกร และสัตว์ปีก ขนาด 10-200 กรัมต่อน้ำหนักอาหาร 1 ตัน

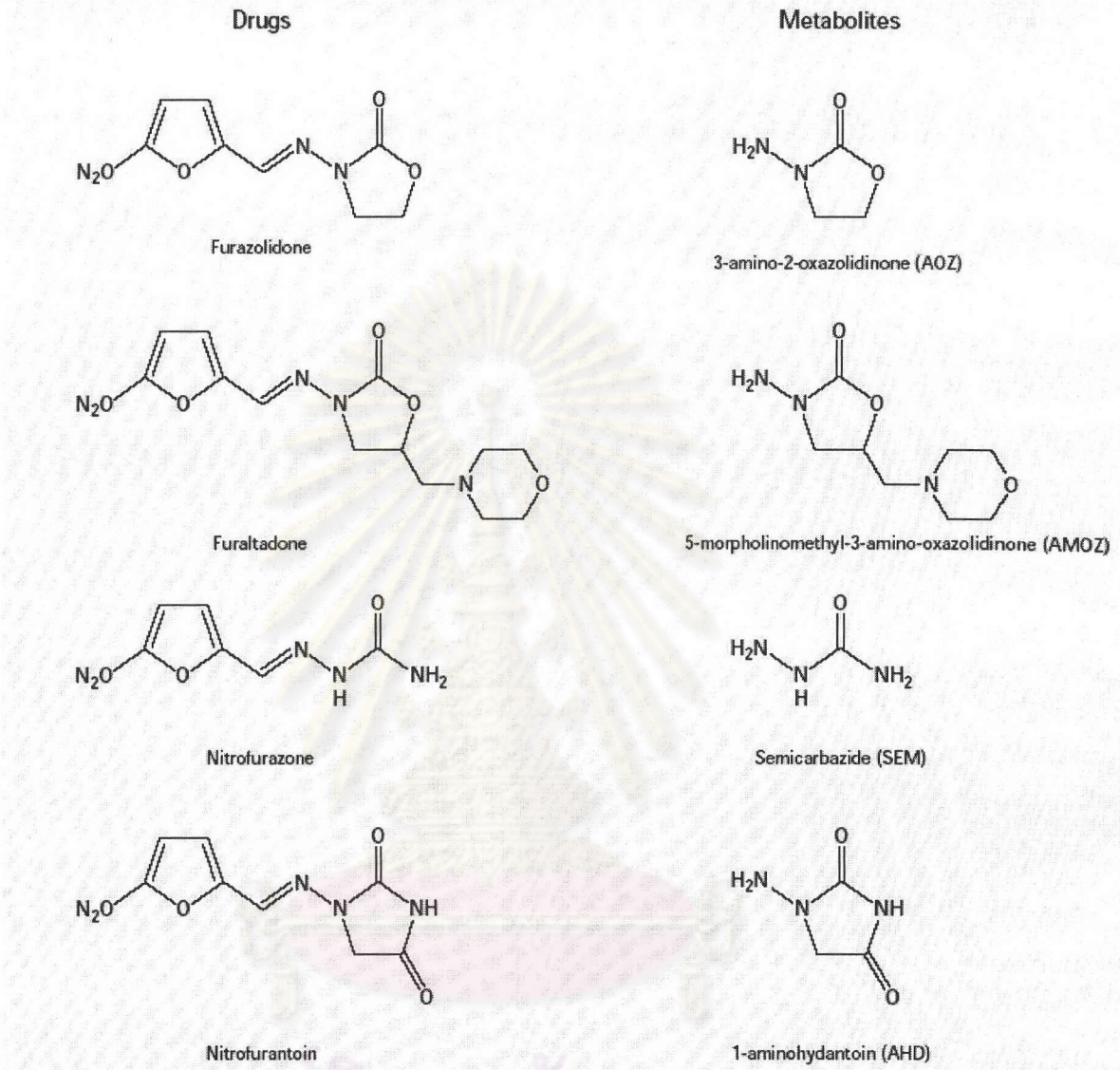
เมื่อสารไนโตรฟูราโซน ไนโตรฟูแรนโทอิน ฟูราลทาโดน หรือ ฟูราโซลิโดน เข้าสู่ร่างกายของสัตว์ไม่ว่าจะโดยการฉีด หรือการกินเข้าไปก็ตามจะเกิดกระบวนการเมตาบอลิซึมอย่างรวดเร็วทำให้เกิดเป็นสารเมตาบอไลต์ของแต่ละตัว ได้แก่ semicarbazide (SEM), 1-aminohydantoin (AHD), 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone (AMOZ) และ 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ) ตามลำดับ (Leitner และคณะ, 2001) ดังแสดงในรูปที่ 2.7 ซึ่งสารเมตาบอไลต์เหล่านี้จะไปจับกับเนื้อเยื่อทางเดินอาหารและกล้ามเนื้อส่วนต่าง ๆ ของสัตว์ เรียกว่า protein-bound

metabolite หรือ tissue-bound metabolite โดยการตกค้างของสารกลุ่มนี้ในเนื้อสัตว์หรือผลิตภัณฑ์จากสัตว์มีแนวโน้มทำให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคเนื้อสัตว์เหล่านี้

ภายหลังได้มีการศึกษาพบว่าสารกลุ่มไนโตรฟูแรนมีผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคจึงทำให้ภาครัฐบาล เอกชน รวมถึงผู้บริโภคตระหนักถึงการควบคุมการใช้สารกลุ่มนี้เพื่อใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ เพื่อเป็นการลดการตกค้างของสารกลุ่มนี้ในเนื้อสัตว์ที่ใช้เพื่อการบริโภค

ในด้านของการเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) และสารก่อการกลายพันธุ์ (mutanogen) (McCraken และคณะ, 1997) ในปี ค.ศ. 1989 Committee for Veterinary Medicinal Products (CVMP) ของ European Agency for the Evaluation of Medicines (EMEA) ได้ทำการศึกษาและประเมินผลกระทบของสารกลุ่มไนโตรฟูแรนต่อสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ พบว่าสารกลุ่มนี้มีคุณสมบัติเป็นสารก่อมะเร็งและสารก่อการกลายพันธุ์จริง จึงถูกเสนอชื่อเข้าใน Annex IV of Council Regulation (EEC) No 2377/90 ในปี ค.ศ. 1993 ยกเว้นฟูราโซลิโดนเนื่องจากยังมีข้อมูลทางด้านพิษวิทยา (toxicity) ไม่เพียงพอ ดังนั้นจึงมีการศึกษาคุณสมบัติในการเป็นสารก่อมะเร็งและสารก่อการกลายพันธุ์ของฟูราโซลิโดน และ/หรือ เมตาบอไลต์ของฟูราโซลิโดน (AOZ) รวมถึงศึกษาความเป็นพิษของ protein-bound residue ด้วย ซึ่งจากการทดลองสามารถสรุปได้ว่า ฟูราโซลิโดนและ AOZ เป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารก่อมะเร็งหรือเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมในสัตว์ทดลองได้ จากข้อพิสูจน์ดังกล่าวทำให้ฟูราโซลิโดนถูกเติมชื่อเข้าใน Annex IV of Council Regulation (EEC) No 2377/90 ในปี ค.ศ. 1995 นั่นแสดงว่าสารทุกตัวในกลุ่มไนโตรฟูแรนถูกยกเลิกมิให้ใช้ในการผสมในอาหารสัตว์ที่ใช้เพื่อการบริโภคโดยเด็ดขาด (http://www.emea.com)

เนื่องจากความเสี่ยงที่จะเกิดจากการใช้สารในกลุ่มไนโตรฟูแรนในสัตว์ทดลองทำให้มีการจำกัดการใช้สารกลุ่มนี้เพื่อเป็นการป้องกันการปนเปื้อนในหลาย ๆ ประเทศ โดยมีการร่วมมือกันตั้ง Codex Committee on Residue of Veterinary Drugs in Foods (CCRVDF) ขององค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (USFDA) องค์การอาหารและเกษตรกรรมของสหประชาชาติ (FAO) และองค์การอนามัยโลก (WHO) เพื่อกำหนดค่าระดับสารตกค้างสูงสุดที่ยอมรับให้มีได้ (Maximum Residue Limit, MRL) ในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่เป็นสากล โดยกำหนดให้อยู่ที่ระดับ zero tolerance คือต้องไม่มีสารกลุ่มไนโตรฟูแรนอยู่ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์เลย (เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต, 2544) ส่งผลให้ประเทศต่าง ๆ ทั่วโลกสั่งห้ามไม่ให้มีการนำเข้าสารชนิดนี้และห้ามมิให้ใช้ยาชนิดนี้ในการรักษาสัตว์อีกด้วย และพยายามพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์และกำหนดค่าขีดจำกัดต่ำสุดของเครื่องมือในการวิเคราะห์สารกลุ่มไนโตรฟูแรนโดยเฉพาะ "**ฟูราโซลิโดน**" เนื่องจากเกษตรกรนิยมใช้มากที่สุด เพราะหาซื้อได้ง่าย ราคาถูก และประสิทธิภาพสูงเมื่อเทียบกับอนุพันธ์ตัวอื่น ๆ ในกลุ่มเดียวกัน (Cooper และคณะ, 2004)



รูปที่ 2.7 แสดงสูตรโครงสร้างของสารกลุ่มไนโตรฟูแรน (parent drugs) และเมตาบอไรต์ (metabolites) ของแต่ละตัว (Masahiko, 2003)

2.3 ฟูราโซลิโดน (furazolidone)

2.3.1 ความรู้ทั่วไป

ฟูราโซลิโดนเป็นสารต้านจุลชีพที่สังเคราะห์จาก furfural, hydrocyethylhydrazine และ diethyl carbonate มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลือง ไม่มีรส ไม่มีกลิ่น น้ำหนักโมเลกุล 225.16

จุดหลอมเหลว 275 องศาเซลเซียส สีของฟูราโซลิโดนจะเข้มขึ้นเมื่ออยู่ภายใต้แสงที่แรง ๆ มีความไวต่อแสง สามารถสลายตัวภายใต้สภาวะแวดล้อมที่เป็นด่าง และถูกออกซิไดซ์ได้ง่ายเมื่อสัมผัสกับอากาศเป็นเวลานาน สารประกอบชนิดนี้มีความสามารถในการละลายน้ำน้อย คือ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ppm) ที่ pH 6.0 หรือคิดเป็นร้อยละ 0.004 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ฟูราโซลิโดนมีชื่อทางการค้ามากมาย อาทิเช่น NF180, Furovag, Furoxane, Neftin, Nifulidon และ Topazone เป็นต้น

ฟูราโซลิโดนผลิตครั้งแรกในปี ค.ศ. 1953 เพื่อใช้ในการรักษาโรค และเสริมการเจริญเติบโตของสัตว์ ในปี ค.ศ. 1957 เริ่มมีการนำฟูราโซลิโดนมาใช้กับมนุษย์ และใช้กันกว้างขวางมากขึ้นโดยถูกนำมาใช้ในลักษณะการรักษาแบบครอบคลุม (broad spectrum) กล่าวคือในช่วงแรกของการผลิตใช้รักษาโรค fowl thyroid, parathyroid, blackhead, non-specific enteritis และ ulcerative enteritis synovitis ในไก่งวง โรคติดเชื้อ vibrio (vibrionic dysentery) ในหมู และใช้รักษาโรค bacillary dysentery, typhoid fever, paratyphoid fever, giardiasis, brucellosis และโรคติดเชื้อในลำไส้มนุษย์ เมื่อฟูราโซลิโดนเข้าสู่ร่างกายของมนุษย์หรือสัตว์จะถูกดูดซึมและเมตาบอไลซ์ภายใต้สภาวะกรดอ่อน ๆ อย่างรวดเร็ว ไปเป็นสารเมตาบอไลต์ของมันภายในเวลา 2-3 ชั่วโมง สารเมตาบอไลต์ของฟูราโซลิโดนมีหลายชนิด เช่น 5-nitro-2-fureic acid, 4-hydroxyfurazolidone และ 3-amino-2-oxazolidinone เป็นต้น แต่สารเมตาบอไลต์ที่พบมากที่สุด คือ 3-amino-2-oxazolidinone หรือ AOZ ซึ่ง AOZ นี้จะกระจายไปตามเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของร่างกาย ได้แก่ ตับ ไต หัวใจ กล้ามเนื้อ อัณฑะ และ ไขมัน จากมากไปหาน้อยตามลำดับ ในรูปของ tissue bound metabolite และสามารถคงอยู่ในเนื้อเยื่อได้นานถึง 6 เดือน (McCraken และคณะ, 1997) จะมีเมตาบอไลต์บางส่วนที่ถูกขับออกทางปัสสาวะและอุจจาระ

2.3.2 กลไกการออกฤทธิ์ของฟูราโซลิโดน

ฟูราโซลิโดนจะแพร่ผ่านเซลล์ของจุลชีพโดย passive diffusion และเกิดปฏิกิริยา reduction โดยหมู่ไนโตรจะถูกรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์ nitroreductase อัตราการเกิดปฏิกิริยานี้จะขึ้นกับจำนวนของอิเล็กตรอน (e^-) ในการดำเนินปฏิกิริยาแบบสมบูรณ์ที่จะเปลี่ยน nitro (NO_2) ให้เป็น amine หรือ amino group ($-NH_2$) ต้องใช้ e^- จำนวน 6 ตัว และต้องผ่านตัวกลาง ได้แก่ nitroso ($2e^-$) และ hydroxylamino ($4e^-$) ดังสมการต่อไปนี้

$$R\text{-}NO_2 \xrightarrow{1e^-} R\text{-}NO_2^{\cdot} \xrightarrow{1e^-} R\text{-}NO \xrightarrow{2e^-} R\text{-}NHOH \xrightarrow{2e^-} R\text{-}NH_2$$

ตัวกลางของปฏิกิริยานี้ทั้งสองตัวจัดว่าเป็น short life reaction product ($1e^-$ nitro radical anion ที่ได้รับโปรตอน) จะไปออกซิไดซ์ดีเอ็นเอซึ่งเป็นต้นเหตุให้เกิดการแตกหักของสายดีเอ็นเอของจุลชีพหรือสัตว์ที่มีเอ็นไซม์ nitroreductase ได้ (Edward, 1993) นอกจากนี้ฟูราโซลิโดนนั้นจะมีผลในการทำลายจุลชีพในโดยมีฤทธิ์ไปยังยั้งระบบเอนไซม์อีกด้วย รวมไปถึงยับยั้งการเผาผลาญคาร์โบไฮเดรต กระบวนการหายใจ หน้าที่ของไรโบโซม ซึ่งจะส่งผลให้ไม่เกิดการเริ่มต้นการถ่ายทอดรหัสทางพันธุกรรม เป็นต้น (Nilkolase, 2001)

2.3.3 ความเป็นพิษของฟูราโซลิโดน

ในปี ค.ศ. 1989 Committee for Veterinary (EMEA) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับความเป็นพิษของฟูราโซลิโดน โดยศึกษาพิษวิทยาของฟูราโซลิโดน AOZ และ tissue bound metabolite

การศึกษาความเป็นพิษของฟูราโซลิโดน

โดยให้หนู Swiss MBR/ICR mice กินยาขนาด 12 24 และ 47 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยน้ำหนักต่อวัน เป็นเวลา 13 เดือน พบว่ามีหนูเป็น bronchial adenocarcinomas ทั้งสองเพศ และหนูตัวผู้มีแนวโน้มเกิด lymphosacomas สูงขึ้น นอกจากนี้ยังทดลองให้หนู rat กินอาหารที่มีฟูราโซลิโดนความเข้มข้น 0.5-50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยน้ำหนักต่อวัน จะเหนี่ยวนำให้เกิด hypertrophy ของเซลล์ตับ ในการทดลองเดียวกันให้สุนัขกินอาหารที่มีฟูราโซลิโดนความเข้มข้น 5-25 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยน้ำหนักต่อวัน จะทำให้เกิดอาการทางประสาท มีการเปลี่ยนแปลงทางด้านเซลล์วิทยาของ basal ganglia และมีการลดลงของอสุจิ นอกจากนี้ฟูราโซลิโดนยังให้ผลบวก (positive results) ในการทดสอบต่าง ๆ ได้แก่ sex-linked recessive lethal test ใน *Drosophila melangaster*, gene mutation assay ในเซลล์เพาะเลี้ยงของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และ sister chromatid exchange test เป็นต้น

การศึกษาความเป็นพิษของ AOZ และ/หรือ tissue bound metabolite

โดยการทำ micronucleus test ในหนู mice ที่ได้รับ AOZ โดยการฉีดเข้าทางช่องท้อง พบว่า AOZ จะเหนี่ยวนำให้เกิดเม็ดเลือดแดงตัวอ่อน (micro nucleated polychromatic erythrocytes) เพิ่มสูงขึ้นในหนู mice ทั้งสองเพศ นอกจากนี้ยังศึกษาโดยทำ human peripheral lymphocyte test พบว่า AOZ เหนี่ยวนำให้เกิด dose-dependent sister chromatid exchange

(SDE's) ได้ และยังพบอีกว่า AOZ จะทำให้สุนัขที่ได้รับ AOZ ในอาหารเป็นเวลา 3 เดือน เกิดอาการซีด เลือดหยุดไหลช้ากว่าปกติเมื่อเกิดบาดแผล มีการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ต่าง ๆ ที่ผลิตจากตับ และมีผลให้ระดับไตรกลีเซอไรด์ในกระแสเลือดเพิ่มมากขึ้น เป็นต้น สำหรับ tissue bound metabolite นั้น AOZ ที่เกาะอยู่กับโปรตีนของเนื้อเยื่อต่าง ๆ จะถูกตัดออกภายใต้สภาวะกรดอ่อน ๆ เกิดเป็น AOZ เดี่ยว ๆ ซึ่งมีคุณสมบัติทางพิษวิทยาเช่นเดียวกับ AOZ

ดังนั้นจากการศึกษาเกี่ยวกับความเป็นพิษของฟูราโซลิโดน AOZ และ/หรือ tissue bound metabolite ของ CVMP สรุปได้ว่า ฟูราโซลิโดน AOZ และ tissue bound metabolite มีคุณสมบัติเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogenicity) และสารก่อการกลายพันธุ์ (mutagenicity) ในสัตว์ทดลอง นอกจากนี้ฟูราโซลิโดนยังไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์หลายชนิด และเป็นอันตรายต่อระบบต่างๆ ของร่างกาย เช่น

มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase (MAO inhibitor)

MAO เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการไปทำลาย amine ที่เป็นอันตราย ได้แก่ สารสื่อประสาทในสมอง (neurotransmitters เช่น serotonin และ norepinephrine) ถ้ามนุษย์หรือสัตว์ได้รับฟูราโซลิโดนเข้าไปซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็น MAO inhibitor ดังแสดงกลไกการเปลี่ยนแปลงในรูปที่ 2.8 ก็จะทำให้เกิดการสะสมของสารสื่อประสาทเพิ่มมากขึ้นจึงทำให้เกิดอาการทางประสาท และยังทำให้เกิดการสะสมของสาร tyramine ด้วย เนื่องจาก MAO ยังมีหน้าที่ในการทำลายสารพวก tyramine ด้วย ซึ่งการที่ tyramine เพิ่มสูงขึ้นจะส่งผลให้เกิดภาวะความดันเลือดสูง และอาจนำไปสู่การเป็นโรคหัวใจได้ (heart attack)

มีผลทำให้เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอ

AOZ จะหลุดจากโครงสร้างหลักของฟูราโซลิโดนและจากเนื้อเยื่อโปรตีนสามารถเปลี่ยนแปลงไปอยู่ในรูปของไฮดรอกซีเอทิลไฮดราซีน (hydroxyethylhydrazine, HEH) ซึ่งจะเป็นพิษต่อยีนโดยการไปรวมตัวกับดีเอ็นเอภายในเซลล์ (Homogenboom และคณะ, 2002) ดังแสดงกลไกการเปลี่ยนแปลงในรูปที่ 2.8 จากข้อพิสูจน์ดังกล่าวทำให้ฟูราโซลิโดนถูกเติมชื่อเข้าใน Annex IV of council Regulation (EEC) No.2377/90 ในปี ค.ศ. 1995 (http://www.emea.com)

มีผลต่อต่อมหมวกไต

มีรายงานว่าฟูราโซลิโดนจะเปลี่ยนเป็นเมตาบอไลต์ที่มีพิษโดยไซโตโครม P450 ภายในไมโตคอนเดรียของต่อมหมวกไต ซึ่งเมตาบอไลต์เหล่านี้จะทำลายเซลล์ไต ทำให้เกิดการยัง

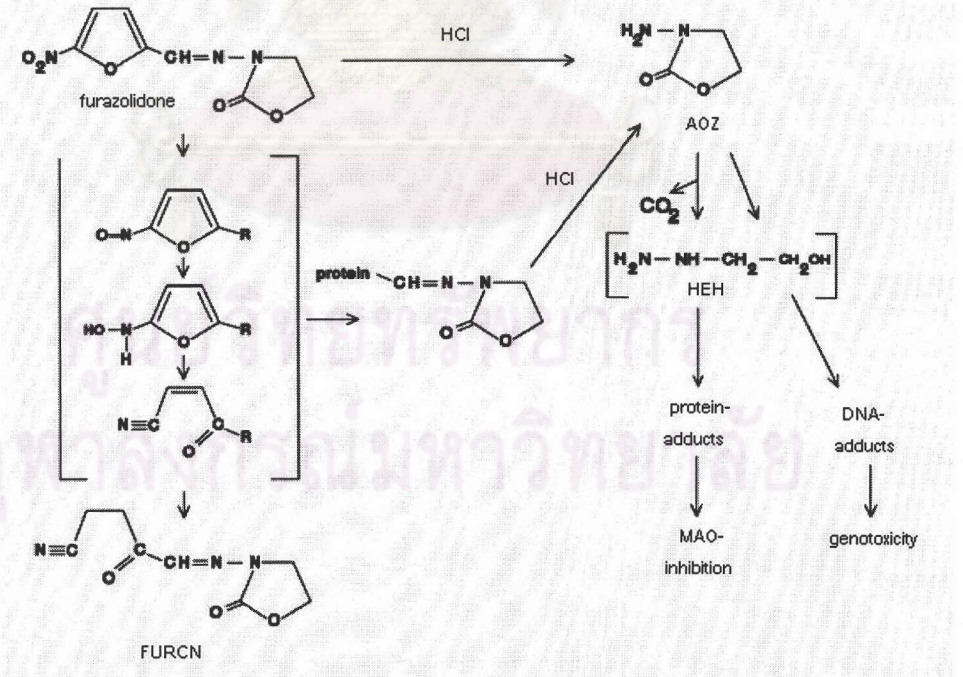
ยั้งการสร้างและการหลั่งของฮอร์โมนจากต่อมหมวกไตซึ่ง ได้แก่ ฮอร์โมน aldosterone ส่งผลให้ร่างกายขาดสมดุลของแร่ธาตุ นอกจากนี้ฟูราโซลิโดนยังมีผลไปรบกวนการควบคุมเกี่ยวกับ steroid hormone เช่น ฟูราโซลิโดนจะไปลดระดับของ testosterone ในอัณฑะและพลาสมาของสัตว์ทดลอง เป็นต้น (Ali, 1983)

มีผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์

ฟูราโซลิโดนจะไปมีผลให้ขนาดและน้ำหนักของอัณฑะของสัตว์ทดลองลดลง และยังไปทำลายโครงสร้างของ leydig cell และ siminiferous tubules ซึ่งอาจทำให้เกิดการเป็นหมันในสัตว์ทดลองได้แต่เมื่อหยุดให้สัตว์ทดลองกินอาหารที่มีฟูราโซลิโดนเป็นเวลาสามสัปดาห์เซลล์ต่าง ๆ ก็จะเข้าสู่สภาพปกติได้ (reversible) (Veterinary Research Communications, 1999)

มีผลต่ออนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ

ฟูราโซลิโดนจะเป็นตัวไปกระตุ้นการสร้าง superoxides และ hydrogen peroxide ทำให้ไปลดปริมาณ reduced glutathione (GSH) ซึ่งเป็นสารที่ผลิตโดยเซลล์ตับเพื่อทำหน้าที่จับกับอนุมูลอิสระ (anionic radical) และวิตามินซี (ascorbic acid) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ



รูปที่ 2.8 แสดงกลไกการเปลี่ยนแปลงของฟูราโซลิโดนทั้งในรูปสารเดี่ยวและ protein-bound metabolite ไปเป็นสารไฮดราซีน (Homogenboom และคณะ, 2002)

2.3.4 สถานการณ์สารตกค้างฟูราโซลิโดนและแนวทางการแก้ไขของประเทศไทย

สารกลุ่มไนโตรฟูแรนเป็นสารปฏิชีวนะที่ยังใช้ได้ผลดีและราคาถูกทั้งในคนและในสัตว์ โดยมียาที่ใช้ในคนหลายรายการ ต่อมามีการศึกษาพบว่ายากลุ่มนี้อาจก่อให้เกิดมะเร็ง สหภาพยุโรปจึงห้ามใช้ยาทุกตัวในกลุ่มนี้ในสัตว์ที่นำมาใช้เป็นอาหารตั้งแต่ปี พ.ศ. 2538 ส่วนสหรัฐอเมริกาได้ห้ามใช้ยากลุ่มนี้ในสัตว์ที่นำมาใช้เป็นอาหารตั้งแต่ต้นปี พ.ศ. 2545

ปัญหาไนโตรฟูแรนส่งผลกระทบต่อประเทศไทยโดยตรง เมื่อไอร์แลนด์เหนือและเนเธอร์แลนด์ตรวจพบสารไนโตรฟูแรนตกค้างในไก่และกุ้งที่ส่งจากประเทศไทย และได้สั่งเข้มงวดสินค้าไก่และกุ้งจากประเทศไทยโดยให้มีการตรวจหาสารตกค้างในสินค้าทุกรายการที่นำเข้า (consignment) หากตรวจพบอีกจะพิจารณาระงับสินค้าดังกล่าวจากประเทศไทย ซึ่งจะกระทบการส่งออกมูลค่าหลายแสนล้านบาท เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศผู้ผลิตสินค้าส่งออกจำพวกเนื้อสัตว์ทั้งในรูปเนื้อสัตว์แช่แข็ง ต้มสุก และแปรรูป ลำดับต้น ๆ ของโลก ดังนั้นในเรื่องความปลอดภัยจากสารกลุ่มไนโตรฟูแรนโดยเฉพาะฟูราโซลิโดนจึงเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึง จึงต้องมีมาตรการการแก้ไขที่จริงจัง โดยแบ่งการแก้ปัญหาเป็น 2 ส่วนใหญ่ ๆ คือ การแก้ปัญหาภายในประเทศ และการแก้ปัญหากับต่างประเทศ ดังนี้

1. การแก้ปัญหาภายในประเทศ โดยจะมีผู้เกี่ยวข้องหลายฝ่าย ทั้งภาครัฐและภาคประชาชน และเป็นปัญหาที่มีขอบเขตกว้างขวาง ควรดำเนินการโดยครอบคลุมมาตรการหลัก 4 มาตรการ ดังนี้

1.1 มาตรการการศึกษาประชาสัมพันธ์และการรณรงค์ เป็นมาตรการพื้นฐานที่จำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อให้ทุกฝ่ายทั้งภาครัฐ ภาคเอกชน สมาคม ชมรมที่เกี่ยวข้อง เกษตรกรและประชาชนทั่วไปตระหนักถึงปัญหา ความสำคัญของปัญหา บทบาทหน้าที่และการมีส่วนร่วมในการแก้ปัญหา

1.2 มาตรการทางเทคนิค เป็นมาตรการสำคัญที่ผู้เกี่ยวข้องโดยตรงจะต้องดำเนินการ ได้แก่

- จะต้องส่งเสริมการเลี้ยงสัตว์ที่ถูกต้อง ให้ฟาร์มต่าง ๆ ยึดถือ และปฏิบัติตามมาตรฐานฟาร์มและ Code of conduct เพื่อลดความจำเป็นหรือความต้องการใช้ยาให้เหลือน้อยที่สุด บทบาทนี้เป็นของหน่วยงานในกระทรวงเกษตรและสหกรณ์

- บริษัทยาและนักวิจัยจะต้องศึกษา พัฒนายาที่ใช้ได้ผลดีปลอดภัยและราคาไม่แพงให้เกษตรกรสามารถเข้าถึงและนำไปใช้ได้ตามความจำเป็น

- มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเรื่อง "ข้อกำหนดการควบคุมการใช้ยาสำหรับสัตว์" (มอก. 7001 – 2540) เป็นมาตรฐานสากลซึ่งรับมาจาก Code of Practice for Control of the Use of Veterinary Drugs ของโคเด็กซ์ (Codex Alimentarius Volume 3 – 1995, Section 2 Control of Use : Recommended International Code of Practice for Control of the Use of Veterinary Drugs) (CAC/RCP 38 – 1993) เป็นมาตรฐานที่ดี สมควรที่ทุกหน่วยงานที่เกี่ยวข้องจะต้องส่งเสริมให้มีการถือปฏิบัติโดยเข้มงวด

- จะต้องติดตามความก้าวหน้าทางวิทยาการด้านต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องอย่างใกล้ชิด เช่น ติดตามเรื่องการปรับเปลี่ยนสถานะของยาสัตว์จากที่อนุญาตให้ใช้ เป็นจำกัดขอบเขตการใช้หรือห้ามใช้ รวมทั้งติดตามเทคโนโลยีการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างของประเทศต่าง ๆ ในประเทศที่เจริญก้าวหน้าทางเทคโนโลยี เป็นต้น

- หน่วยงานตรวจวิเคราะห์ จะต้องได้รับการสนับสนุนเครื่องมือ อุปกรณ์ และบุคลากรอย่างพอเพียง ให้สามารถทำหน้าที่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้จะต้องพิจารณาลงทุนเพื่อส่งเสริมประสิทธิภาพซึ่งกันและกัน มากกว่าการแข่งขันกัน

1.3 มาตรการทางเศรษฐกิจ เช่นการส่งเสริมการลงทุนเพื่อให้เกษตรกรทั้งรายใหญ่และรายย่อยสามารถปรับปรุงการเลี้ยงให้ได้มาตรฐาน มาตรการทางภาษีอากรสำหรับเครื่องมืออุปกรณ์ ที่นำเข้ามาเพื่อตรวจสารตกค้าง หรือมาตรการเก็บภาษีนำเข้ากุ้งจากต่างประเทศที่กำเนินการไปแล้วเมื่อปลายปี พ.ศ. 2544 เป็นต้น

1.4 มาตรการทางกฎหมาย แบ่งได้เป็น 2 ส่วน ได้แก่

1) การปรับปรุงแก้ไขหรือเพิ่มเติมกฎหมาย เช่น การออกประกาศกระทรวงพาณิชย์เข้มงวดการนำเข้ายาและเภสัชเคมีภัณฑ์ที่เป็นปัญหา เพื่อควบคุมมิให้มีการนำยาและเภสัชเคมีภัณฑ์ ไปใช้ในทางที่ผิด การประกาศกำหนดปริมาณสูงสุดที่ยอมให้มีตกค้างได้ (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 231 พ.ศ. 2544 เรื่องอาหารที่มียาสัตว์ตกค้าง) และการประกาศห้ามมีสารตกค้างในกุ้งและผลิตภัณฑ์จากกุ้ง (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 250 พ.ศ. 2545 เรื่องมาตรฐานกุ้งและกุ้งแปรรูป) การปรับปรุงแก้ไขกฎกระทรวงตามพระราชบัญญัติยาให้สามารถควบคุมเภสัชเคมีภัณฑ์ได้ด้วย การยกสถานะ การควบคุมการใช้ยาที่เป็นปัญหาจากยาอันตรายที่ขายได้ในร้านขายยาที่มีเภสัชกรเป็นยาควบคุมพิเศษที่ต้องสั่งขายโดยผู้ประกอบวิชาชีพเวชกรรมหรือผู้ประกอบการบำบัดโรคสัตว์ เป็นต้น

2) การบังคับใช้กฎหมาย ได้แก่การเข้มงวด จับกุมผู้กระทำผิดกฎหมายโดยเน้นที่ผู้เป็นต้นตอหลักของปัญหา เป็นต้น

2. การแก้ปัญหากับต่างประเทศ จะต้องจัดตั้งทีมงานถาวรขนาดกะทัดรัดที่มีตัวแทนผู้เกี่ยวข้องทุกฝ่ายอย่างเหมาะสมมีภารกิจหลัก 2 ด้านคือ

2.1 การดำเนินการกับประเทศคู่ค้า

2.2 การผนึกกำลังกับประเทศที่ประสบปัญหาร่วมกัน

จะต้องติดตามสถานการณ์อย่างใกล้ชิดและต่อเนื่อง เมื่อเกิดปัญหาจะต้องมีการประชุมปรึกษาหารือเพื่อแก้ไขอย่างทันเหตุการณ์

สาเหตุหลักของปัญหาสารตกค้างในเนื้อสัตว์อยู่ที่เกษตรกรส่วนใหญ่ขาดความรู้ความสามารถในการพัฒนาการเลี้ยงสัตว์ให้ได้มาตรฐาน หน่วยงานหลักที่รับผิดชอบในส่วนนี้ไม่สามารถเข้าถึงหรือแก้ปัญหาให้แก่เกษตรกรได้ ทำให้มีการใช้ยาสัตว์ที่ไม่เป็นไปตามข้อกำหนดการควบคุมการใช้ยาสำหรับสัตว์ของสำนักงานมาตรฐานผลิตอุตสาหกรรม การแก้ปัญหาจำเป็นต้องแก้ปัญหาอย่างครบวงจร ทั้งนี้เพราะโดยธรรมชาติเกษตรกรจำเป็นต้องใช้ยาเพื่อวัตถุประสงค์ต่าง ๆ ดังได้กล่าวแล้ว หากไม่มุ่งเน้นให้มีการใช้ยาเท่าที่จำเป็นอย่างถูกต้องแล้ว ไม่มีทางจะแก้ปัญหาอย่างได้ผลและยั่งยืนได้

สำหรับเรื่องการตรวจสารตกค้างก่อนส่งออก เป็นสิ่งจำเป็นแต่ต้องมีการลงทุนสูงมาก และต้องพัฒนาเทคโนโลยีอย่างต่อเนื่อง จึงเป็นมาตรการแก้ปัญหาที่มีราคาแพงมาก จำเป็นต้องพิจารณาเรื่องประสิทธิภาพอย่างเข้มงวด ทั้งนี้หากมุ่งเน้นการแก้ปัญหาที่สาเหตุหลักจนได้ผล จะทำให้ความจำเป็นในการลงทุนด้านนี้ลดลง

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาได้ศึกษารวบรวมข้อมูลทางวิชาการและจัดประชุมคณะอนุกรรมการพิจารณาตำรายาแผนปัจจุบันสำหรับสัตว์มาตรฐานการใช้ยาในอาหารสัตว์และคณะกรรมการยา เพื่อให้เพิกถอนยาที่มีปัญหา มติที่ประชุมคณะกรรมการยาเพื่อวันที่ 26 มีนาคม พ.ศ. 2545 ให้คำแนะนำต่อรัฐมนตรีว่าการกระทรวงสาธารณสุขให้มีคำสั่งเพิกถอนทะเบียนตำรับยาสำหรับสัตว์ที่มีตัวยา ไนโตรฟูราโซน (Nitrofurazone) ฟูราโซลิโดน (furazolidone) ไดเมไทรดาโซน (Dimetridazole) และ โรไนดาโซน (Ronidazole) เป็นส่วนประกอบ และในวันที่ 24 เมษายน พ.ศ. 2546 สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาได้ออกประกาศเรื่อง หลักเกณฑ์ เงื่อนไข และวิธีการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารเคมีบางชนิดในอาหาร โดยกำหนดให้อาหารที่จัดได้ว่าได้มาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขนั้นจะต้องพบปริมาณสารปนเปื้อนน้อยกว่าปริมาณที่กำหนดในตารางที่ 2.1

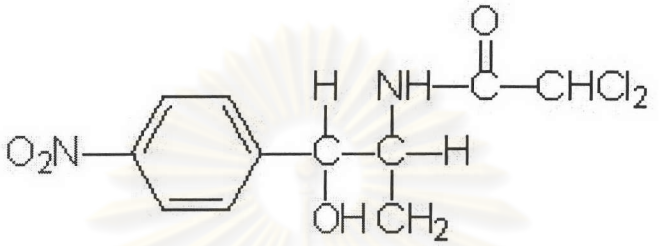
ตารางที่ 2.1 แสดงมาตรฐานสารปนเปื้อนในอาหารตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2546)

ชนิดสารเคมี	ปริมาณสารเคมี (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
1. คลอแรมฟินิคอล และเกลือของสาร และสารในกระบวนการสร้างและสลาย	0.3
2. สารในกระบวนการสร้างและสลายของกลุ่มไนโตรฟูแรน ได้แก่	
(1) 3-amino-2-oxazolidinone หรือ AOZ สารในกระบวนการสร้างและสลายของฟูราโซลิโดน	0.3
(2) 5-Methylmorpholino-3-amino-2-oxazolidinone หรือ AMOZ สารในกระบวนการสร้างและสลายของฟูราลทาโดน	
(3) Aminohydantoin หรือ AHD สารในกระบวนการสร้างและสลายของไนโตรฟูแรนโทอิน	1.0
(4) Semicarbazide หรือ SEM สารในกระบวนการสร้างและสลายของไนโตรฟูราโซน	
3. เบต้าอะโกนิสต์ และเกลือของสาร และสารในกระบวนการสร้างและสลาย	1.0

นอกจากฟูราโซลิโดนแล้วยังมีสารปฏิชีวนะอีกหลายตัวที่ถูกระงับมิให้ใช้ในการผสมในอาหารสัตว์ (ตารางที่ 2.1) หรือมีขีดจำกัดในการใช้ เช่น คลอแรมฟินิคอล แอมพิซิลิน และเตตร้าไซคลิน เป็นต้น

คลอแรมฟินิคอล (chloramphenicol) เป็นสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาโรคทั้งคนและสัตว์ แยกได้จากเชื้อ *Streptomyces venezuelae* ตั้งแต่ ค.ศ. 1947 มีฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกหลายชนิดรวมทั้งริคเกทเซียด้วย โดยจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เปปทิดิลทรานสเฟอเรส (peptidyltransferase) ทำให้ aminoacyl - tRNA เข้าจับที่บริเวณ A ของไรโบโซม 50s ไม่ได้ แบคทีเรียบางตัวสามารถต้านยาคลอแรมฟินิคอลได้โดยมียีนสร้างเอนไซม์

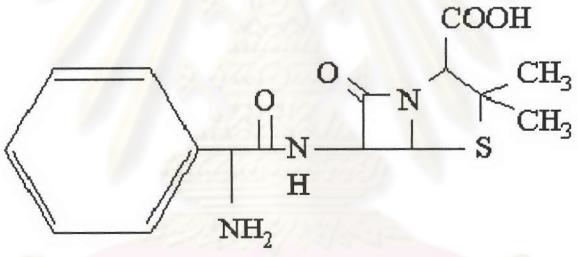
คลอแรมฟินิคอล อะซิทิลทรานสเฟอเรส (chloramphenicol acetyltransferase, CAT) ซึ่ง CAT มักจะถูกสร้างในแบคทีเรียเกรมบวก แต่จะพบส่วนน้อยในแบคทีเรียแกรมลบ (Singleton, 2004) ในปัจจุบันยาคลอแรมฟินิคอลทั้งหมดได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีโดนตรง โครงสร้างทางเคมีของยาประกอบด้วยกรดไดคลอโรอะซิติก โพรพิลินไกลคอล อะเซทตาไมด์ รวมตัวกันไนโตรเบนซิน (Anadon, 1994) ดังแสดงในรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 แสดงโครงสร้างทางเคมีของยาคลอแรมฟินิคอล (http://opbs.okstate.edu)

คลอแรมฟินิคอลมีลักษณะเป็นผลึกสีขาว มีรสขม มีความทนทานต่อความร้อนสูง (เช่นจากการต้ม) ยานี้มีเสถียรภาพสูงในสารละลายที่มี pH 2.0-9.0 สำหรับขนาดและวิธีใช้ยานั้นขึ้นกับชนิดของสัตว์ โดยจะผสมในอาหารในปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (วรา และคณะ, 2546) คลอแรมฟินิคอลเป็นสารปฏิชีวนะที่มีการกระจายตัวไปยังเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ได้อย่างรวดเร็วและตกค้างในอวัยวะส่วนต่าง ๆ ของสัตว์ ซึ่งถ้ามนุษย์ได้รับเข้าไปบ่อย ๆ จะมีผลกระทบต่อการสร้างเม็ดเลือดแดงที่ไขกระดูก และยังมีผลต่อกระบวนการสร้างโปรตีนในไมโตคอนเดรียภายในเซลล์กระดูกมนุษย์เกิดอาการที่เรียกว่า Gray syndrome ซึ่งจะนำไปสู่การเป็นโรคโลหิตจางชนิด aplastic anemia ดังนั้นจึงทำให้มีการห้ามใช้ยาคลอแรมฟินิคอลในสัตว์ที่ใช้เป็นอาหารในประเทศสหรัฐอเมริกา แคนาดา และประเทศในกลุ่มยุโรป (กมลชัย ตรงวานิชนาม, 2547) สำหรับประเทศไทยนั้นได้มีการยกเลิกตำรับยาที่ใช้ในสัตว์ที่นำมาบริโภคตั้งแต่ปลายปี พ.ศ. 2531 ปัจจุบันกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ประกาศห้ามนำเข้าอาหารสัตว์ที่มีคลอแรมฟินิคอลและห้ามใช้คลอแรมฟินิคอลในการผลิตอาหารสัตว์ ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่องกำหนดชื่อ ประเภท ชนิด หรือลักษณะของอาหารสัตว์ที่ไม่อนุญาตให้นำเข้าเพื่อขาย และกำหนด ชื่อ ประเภท ชนิด ลักษณะ คุณสมบัติ และส่วนประกอบของวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ที่ห้ามใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารสัตว์ตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ 2525 ฉบับปรับปรุง 2542 แสดงรายชื่อยาตามตารางที่ 2.2 ยาดังกล่าวทั้งสหรัฐอเมริกา และสหภาพยุโรปห้ามใช้ในสัตว์ที่นำมาบริโภคมานานแล้วเช่นกัน

แอมพิซิลิน (ampicillin) เป็นยาที่จัดเป็น penicillin ที่ออกฤทธิ์ได้ดีต่อแบคทีเรียแกรมบวก เช่นเดียวกับ penicillin G แล้วยังออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิดรวมถึง *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Escherichia coli*, *Klepsiella*, *Shigella*, *Salmonella*, *Proteus*, *Brucella* และ *Pasteurella* โดยออกฤทธิ์ขัดขวางการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย โดยจะไปยับยั้งและทำให้เอนไซม์ transpeptidase หมดฤทธิ์ลง จึงไม่สามารถเชื่อมต่อสาย peptidoglycan สองสายเข้าด้วยกันได้ มีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2.10 ยาสามารถกระจายตัวได้ดีในตับ น้ำดี กล้ามเนื้อ ไต กระเพาะบด (crop) และไขมัน มีการใช้ยานี้กับสัตว์หลายชนิดในขนาด 2 – 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ระดับของยาในเลือดขึ้นกับขนาดยาที่ให้ แอมพิซิลินนั้นไม่ได้ถูกห้ามให้ใช้กับสัตว์ที่นำมาบริโภค แต่มีข้อจำกัดในการใช้เกี่ยวกับสารตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ กล่าวคือ อนุญาตให้มีปริมาณยาตกค้างในสัตว์ได้ไม่เกิน 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (มนตรี กฤษณีไพบูลย์, สมพงษ์ และอธิภู, 2547) ดังแสดงในตารางที่ 2.3



รูปที่ 2.10 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของยา ampicillin (http://en.wikipedia.org)

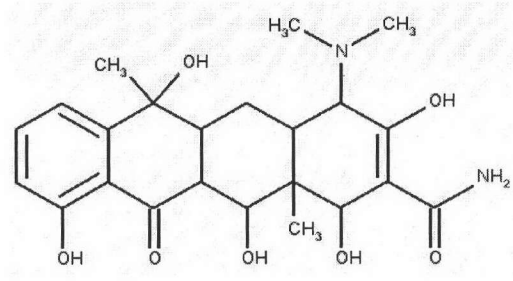
เตตร้าไซคลิน (tetracycline) เป็นยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างโปรตีนของเซลล์แบคทีเรียที่กำลังเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ โดยยาจะไปเกาะกับส่วน 30S ribosome subunit ของ 70S ribosome ทำให้ aminoacyl - tRNA เข้าจับที่บริเวณ A ของ mRNA ribosome complex ไม่ได้ ทำให้แบคทีเรียหยุดการเจริญและแบ่งเซลล์ ยากลุ่มนี้จะออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ เช่น β-hemolytic *Streptococci* non-hemolytic *Streptococci spp. Clostridium spp. Brucella spp. Hemophilus spp.* และ *Klebsiella spp.* เป็นต้น ยานี้เป็นยาที่มีลักษณะเป็นผงผลึกสีเหลือง มีรสขม และไม่มีกลิ่น ละลายน้ำได้ดี ถูกทำลายได้ง่ายโดยสารละลายด่างแก่ และ

สารละลายกรดที่มี pH ต่ำกว่า 2 (กมลชัย ตรงวานิชนาม, 2547) และมีสูตรโครงสร้างทางเคมีดังแสดงในรูปที่ 2.11

ตารางที่ 2.2 แสดงรายชื่อยาที่ห้ามใช้ในการผสมในการผลิตอาหารสัตว์ตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ 2525 ฉบับปรับปรุงปี 2542 (http://www.dld.go.th)

ลำดับที่	รายชื่อสารที่ห้ามใช้ในการผสมในการผลิตอาหารสัตว์
1	คลอแรมฟินิคอล (Chloramphenicol)
2	อะโพวาร์ซิน (Avoparcin)
3	คาร์บาดอกซ์ (Carbadox)
4	โอลาควินดอกซ์ (Olaquindoz)
5	ไดเอทิลสติลเบสโทรล (Diethylstilbestrol หรือ DES)
6	เบตาอะโกนิสท์ (Beta – agonist) มี 5. Salbutamal 6. Clenbuterol
7	กลุ่มไนโตรฟูแรน (Nitrofuran) มี 7. ไนโตรฟูราโซน (Nitrofurazone) 8. ฟูราโซลิโดน (ฟูราโซลิโดน) 9. ไนโตรฟูแรนโตอิน (Nitrofurantoin) 10. ไนโตรวิน (Nitrovin) 11. ไนโตรเฟอพิรินอล (Nitrofurpirinol) 12. ไนฟูราลดิโซน (Nifuraldezone) 13. ไนเฟอฟราซีน (Nifurprazine)
8	กลุ่มไนโตรอิมิดาโซน (Nitroimidazone) มี 14. อิโพรนิดาโซน (Ipronidazone) 15. โรนิดาโซล (Ronisazole) 16. ไดมิไตรดาโซล (Dimetridazole) 17. เมโทรนิดาโซน (Metronidazone)

หมายเหตุ ยาในกลุ่มดังกล่าวไม่มีการกำหนด MRLs ได้



รูปที่ 2.11 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของยา tetracycline (http://en.wikipedia.org

การให้ยานี้โดยวิธีการให้กินนิยมมากในการรักษาสัตว์เล็ก จะให้ในขนาด 30-60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ต่อวัน และแบ่งให้วันละ 2-3 ครั้ง นอกจากนี้ยังใช้กับสัตว์เศรษฐกิจ เช่น สุกร ด้วย แต่จะให้ในรูปยาเติมในอาหาร (feed additive) เพื่อให้สัตว์กินอาหารและน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น และยังช่วยป้องกันโรคติดเชื้ออีกด้วย

ตารางที่ 2.3 แสดงกลุ่มสารปฏิชีวนะที่อนุญาตให้ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (สมพงษ์ และอธิภู, 2547)

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	ปริมาณที่อนุญาตให้มีได้ไม่เกิน (MRLs) (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	เนื้อเยื่อเป้าหมาย
Penicillins		
18. Benzylpenicillin	0.05	ตับ
19. Ampicillin	0.05	ไต
20. Amoxicillin	0.05	กล้ามเนื้อ
21. Oxacillin	0.3	ไขมัน
22. Cloxacillin	0.3	
23. Dicloxacillin	0.3	
Tetracycline		
24. Oxytetracyclin	0.10	กล้ามเนื้อ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3.5 ผลกระทบของฟูราโซลิโดนต่อสิ่งมีชีวิต สิ่งแวดล้อม และเศรษฐกิจ

ต่อมนุษย์

เมื่อคนได้รับยาชนิดนี้เข้าไปจะมีผลต่อระบบทางเดินอาหาร ที่พบบ่อยคืออาการคลื่นไส้อาเจียน หรืออาจจะมีอาการปวดท้อง และท้องเสียบ้าง ในผู้ป่วยบางรายอาจเกิดอาการภูมิแพ้ รวมถึงความดันเลือดต่ำ angioedema เป็นไข้ arthralgia urticaria มีผื่นแดงบนผิวหนัง เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ (hypoglycemia) เม็ดเลือดขาวชนิดไม่มีกรานูสูง (agranulocytosis) หรือในผู้ป่วยบางรายจะมีอาการหูหนวก มีอาการปอดอักเสบ เจ็บหน้าอก ถ้าไม่ได้รับการรักษาจะทำให้เกิดพังผืดที่ปอดอย่างถาวร สำหรับผู้ป่วยที่เป็นโรคทางพันธุกรรม glucose-6-phosphate-deficient (G6PD) จะเกิดอาการซีดเนื่องจากเม็ดเลือดแดงแตก (hemolytic anemia) ในผู้ชายเมื่อได้รับฟูราโซลิโดนในปริมาณมากจะไปกดกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศชาย (spermatogenesis) โดยจะส่งผลกระทบต่อ seminiferous tubules ที่อยู่ในถุงอัณฑะ และจากการศึกษาความเป็นพิษของฟูราโซลิโดน และสารเมตาบอไลท์ของมันในสัตว์ทดลอง และเซลล์เพาะเลี้ยงของคน พบว่าคนได้รับฟูราโซลิโดน หรือสารในรูป tissue bound metabolites จากผลิตภัณฑ์จากสัตว์จะทำให้เกิดความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งสูง (www.trimed.com.au)

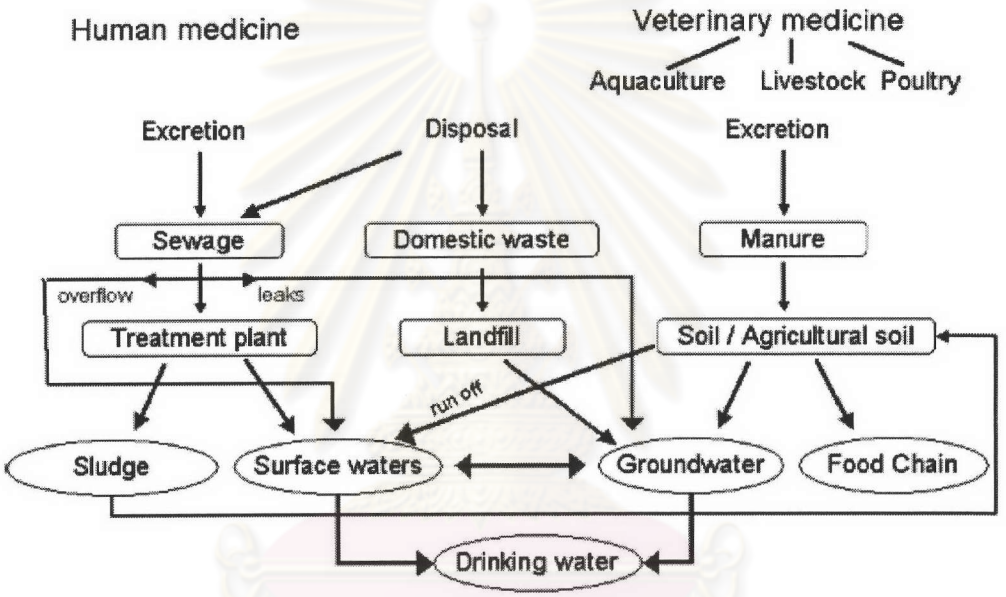
ต่อสัตว์

ฟูราโซลิโดนเป็นยาที่ต้องใช้อย่างระมัดระวัง เพราะมีรายงานว่าเมื่อให้ฟูราโซลิโดนขนาด 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ร่วมกับ ไดไนทอลไมด์ (dinitolmide) ขนาด 1-5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือแอมโปรเลี่ยม (amprolium) ขนาด 125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำให้เกิดอาการทางประสาท (neurological symptom) ได้ในไก่กระทง เมื่อให้ฟูราโซลิโดนร่วมกับไดไนทอลไมด์ พบว่าไก่เกิดความผิดปกติ (abnormal posture) และสูญเสียการทรงตัว (loss of balance) ในฝรั่งเศสมีรายงานว่า เมื่อใส่คลอแรมฟินิคอลร่วมกับฟูราโซลิโดนในอาหารแทนนมให้ลูกโคและลูกสุกรกิน พบว่าเกิดความผิดปกติของโครโมโซม (chromosome anomalies) (กมลชัย ตรงวานิชนาม, 2547)

ต่อระบบนิเวศน์และสิ่งแวดล้อม

ฟูราโซลิโดนหรือสารปฏิชีวนะต่าง ๆ ที่ใช้ในการรักษาสัตว์โดยไม่มีการควบคุมที่ดีจะนำไปสู่ปัญหาการดื้อยาของแบคทีเรียก่อโรค (pathogenic bacteria) ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการรักษาโรคด้วยยาดังกล่าวในมนุษย์และสัตว์ลดลง ซึ่งแบคทีเรียนั้น ๆ อาจจะมีการถ่ายทอดคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะสู่กันละกันจากสิ่งแวดล้อมหนึ่งไปสู่สิ่งแวดล้อมอีกที่หนึ่ง จึงเกิดการแพร่กระจาย

ของแบคทีเรียดื้อยาได้ ดังแสดงในรูปที่ 2.11 จะเห็นว่าสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาสัตว์ทั้งสัตว์น้ำและสัตว์ปีกจะแพร่กระจายสู่สิ่งแวดล้อมในรูปของปัสสาวะและอุจจาระ จากการนำมาทำเป็นปุ๋ยจะทำให้ยาแพร่เข้าสู่ดิน สู่แหล่งน้ำบนดิน หรือซึมลงสู่น้ำใต้ดิน และอาจเข้าสู่ระบบสายใยอาหาร (food chain) ทำให้เกิดการกระจายของยาไปทั่ว เมื่อแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ได้สัมผัสกับยาก็จะมีการสร้างกลไกต่าง ๆ ขึ้นมาเพื่อต้านให้มันสามารถมีชีวิตอยู่ได้ และแบคทีเรียบางสายพันธุ์ยังมีความสามารถถ่ายทอดคุณสมบัติต้านยาไปสู่แบคทีเรียบริเวณข้างเคียงได้ทำให้เกิดการดื้อยาอย่างกว้างขวางมากขึ้นได้



รูปที่ 2.12 แสดงเส้นทางสำคัญที่สิ่งแวดล้อมจะสัมผัสกับยาที่ใช้ในการรักษามนุษย์และสัตว์ (Silvia และคณะ, 2003)

ต่อเศรษฐกิจ

เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศผู้ผลิตสินค้าส่งออกจำพวกเนื้อสัตว์เป็นลำดับต้น ๆ ของโลก ดังนั้นเมื่อมีปัญหาทางด้านการตรวจพบสารตกค้างต้องห้าม หรือสารตกค้างที่ถูกจำกัดด้านปริมาณสารก็จะส่งผลกระทบทางด้านการเชื่อมั่นของประเทศคู่ค้า ซึ่งอาจจะยกเลิกการนำเข้าสินค้าจำพวกเนื้อสัตว์จากประเทศเราก็ได้ ซึ่งจะส่งผลให้เกษตรกรที่เกี่ยวข้องเกิดปัญหาขาดทุน รวมทั้งส่งผลให้เกิดการขาดดุลการค้าของประเทศอีกด้วย เช่นจากเหตุการณ์วันที่ 14 มีนาคม 2545 คณะกรรมาธิการยุโรปได้ตรวจพบฟูราโซลิโดนในเนื้อไก่จากไทยที่ด่านประเทศเนเธอแลนด์โดยก่อน

หน้านี้มีการพบสารไนโตรฟูแรนและคลอแรมฟินิคอลจากกุ้งไทยที่ด่านเดียวกันและที่ประเทศอังกฤษ สหภาพยุโรปได้ออกมาตรการดังนี้ (กรมปศุสัตว์)

1. สหภาพยุโรปจะทำการตรวจสารตกค้างรวมทั้งไนโตรฟูแรนในสินค้ากุ้ง และไก่ทุก shipment และทุกด่านที่นำเข้าจากไทย หากพบสารตกค้างก็จะทำลายสินค้า shipment นั้นทันที

2. หากยังตรวจพบอีกภายใน 4-6 สัปดาห์ สหภาพยุโรปจำเป็นต้องห้ามนำเข้ากุ้งและไก่จากไทยทั้งหมด

3. คณะกรรมาธิการยุโรปขอหารือเกี่ยวกับความคืบหน้าในการแก้ไขปัญหาของไทยภายใน 2-4 สัปดาห์

4. คณะกรรมาธิการยุโรปเริ่มเคร่งครัดในการตรวจสอบอาหารแปรรูปจากไทยที่มีส่วนผสมของกุ้งปลาไก่ เช่น ขนมจีบ เป็นต้น

2.3.6 วิธีการตรวจวิเคราะห์ฟูราโซลิโดน หรือสารกลุ่มไนโตรฟูแรนตัวอื่น ๆ

ในปัจจุบันนี้ฟูราโซลิโดน และสารในกลุ่มไนโตรฟูแรนตัวอื่น ๆ ได้ถูกระงับใช้ในการผสมในอาหารและใช้ในการรักษาสัตว์ แต่ก็มักจะมีการลักลอบใช้เสมอจึงส่งผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภคและด้านเศรษฐกิจของประเทศ ดังนั้นวิธีการที่เชื่อถือได้ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ และการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารกลุ่มนี้ทั้งที่อยู่ในรูปของ parent drug และสารเมตาบอไลต์จึงเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่งในการตรวจสอบสารตกค้างที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหารสัตว์และเนื้อสัตว์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งวิธีการวิเคราะห์สารกลุ่มนี้จะต้องเลือกใช้ให้เหมาะสมกับสารที่จะวิเคราะห์หา เช่นถ้าตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์เป็นอาหารสัตว์ หรือผลิตภัณฑ์จากสัตว์จะต้องวิเคราะห์สารในรูปของ parent drug แต่ถ้าตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์เป็นเนื้อเยื่อก็จะต้องวิเคราะห์หาสารในรูปของเมตาบอไลต์ ซึ่งการวิเคราะห์สารทั้งสองรูปดังกล่าวก็จะใช้วิธีการหรือใช้เครื่องมือในการวิเคราะห์และสภาวะที่แตกต่างกัน ดังนี้

การวิเคราะห์หาฟูราโซลิโดนในรูปของ parent drug

เนื่องจากฟูราโซลิโดนจะถูกเมตาบอไลซ์อย่างรวดเร็วในร่างกายของสัตว์ดังนั้นการตรวจหาฟูราโซลิโดนในรูปของ parent drug จึงนิยมตรวจในอาหารสัตว์ โดยในปี 1978 Cieri และคณะ ได้ทำการวิเคราะห์หาฟูราโซลิโดนในอาหารสัตว์โดยใช้วิธี thin layer chromatography หรือ TLC เริ่มจากการนำอาหารสัตว์มาสกัดด้วย acetone แล้วนำมาทำ TLC โดยใช้ chloroform-methanol (1:9) เป็น mobile phase ซึ่งพบว่าวิธีการนี้จะสามารถวิเคราะห์สารได้เมื่อสารนั้นมีความเข้มข้นสูงกว่า 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือวิธี TLC มีค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์สารอยู่ที่ 50

ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เท่านั้น ดังนั้นจะเห็นว่าวิธีการนี้ถึงจะเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว แต่มีค่าความเที่ยงและความแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์สารต่ำ และไม่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารกลุ่มไนโตรฟูแรนที่มีปริมาณน้อย ๆ ซึ่งอาจจะสรุปได้ว่าวิธี TLC ไม่ใช่วิธีที่ดีที่สุดที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาการปนเปื้อนของฟูรา-โซลิโดนในอาหารสัตว์ ได้มีการนำเอา high performance liquid chromatography หรือ HPLC มาใช้ในการวิเคราะห์หารสารปนเปื้อนในรูปของ parent drug โดยในปี ค.ศ. 1979 Cieri และคณะ ได้วิเคราะห์หาฟูราโซลิโดนในอาหารหมูและไก่โดยใช้เทคนิค HPLC รวมกับ UV-visible detector (360 นาโนเมตร) พบฟูราโซลิโดนที่ระดับ 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นอกจากมีการศึกษาหาสารตกค้างชนิดไนโตรฟูแรนโทอิน ฟูราโซลิโดน และฟูราลทาโดนในน้ำนมโดยใช้ HPLC ร่วมกับวิธีทางไฟฟ้าเคมี พบว่าสามารถวิเคราะห์ปริมาณและแยกอนุพันธ์ทั้งสามชนิดได้อย่างชัดเจน (Galeano และคณะ, 1996) ต่อมาในปี ค.ศ.1997 Rosa และคณะได้วิเคราะห์หาฟูราโซลิโดน ฟูราลทาโดน และไนโตรฟูราโซน ในไข่ไก่ด้วยวิธี HPLC ร่วมกับ UV photodiode array พบว่าฟูราโซลิโดนและไนโตรฟูราโซนมีค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์สารเท่ากับ 2.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนฟูราลทาโดนเท่ากับ 5 ไมโครกรัม/กิโลกรัม และนำตัวอย่างเดิมมาวิเคราะห์เทียบกับวิธี HPLC ร่วมกับ mass spectrometer หรือ HPLC-MS โดยมีค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์สารอยู่เท่ากับ 1.6 3.2 และ 1 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ จากการที่ HPLC เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรวจวิเคราะห์และแยกสารกลุ่มไนโตรฟูแรนในรูปของ parent drug จึงนิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในการวิเคราะห์หาฟูราโซลิโดนและอนุพันธ์ตัวอื่น ๆ ข้อได้เปรียบของเทคนิค HPLC ที่เหนือกว่าเทคนิค TLC คือใช้เวลาในการวิเคราะห์สารปริมาณน้อย ๆ ได้ดี มีค่าความเที่ยงและค่าความแม่นยำที่ดีกว่าและเป็นวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสมที่สุดในการหาปริมาณฟูราโซลิโดนที่ตกค้างในอาหารสัตว์ในปัจจุบันนี้ แต่อย่างไรก็ตามเครื่องมือ HPLC มีค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ค่อนข้างสูงและไม่สามารถนำเครื่องมือไปใช้ในภาคสนามได้ จึงมีนักวิจัยบางกลุ่มสร้างชุดตรวจสอบฟูราโซลิโดนและอนุพันธ์อื่น ๆ ซึ่งจะอาศัยหลักการการทำให้เกิดสีหรือ colorimetric method โดยใช้สารกลุ่มไนโตรฟูแรนทำปฏิกิริยากับสารเคมีบางชนิด เช่น phenyldrazine หรือ hydrochloride แล้วเกิดสารเชิงซ้อนที่มีสีซึ่งดูดกลืนแสงได้ในช่วง visible ความเข้มของสีสามารถวัดได้เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณสารที่นำมาวิเคราะห์ วิธีการนี้เป็นวิธีการที่ง่ายและให้ค่าความเที่ยง ความแม่นในการตรวจวิเคราะห์ที่ดี แต่ใช้เวลาในการวิเคราะห์ค่อนข้างนาน เพราะทำได้ทีละตัวอย่าง สำหรับประเทศไทยใช้วิธีการนี้เป็นการตรวจสอบเบื้องต้น (screening test) ในการหาสารไนโตรฟูแรนในอาหารและยาสัตว์ เช่น กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์และกรมปศุสัตว์ได้ทำการสร้างชุดตรวจสอบสารกลุ่มไนโตรฟูแรนอย่างง่ายโดยอาศัยหลักการการเกิดสีโดยปฏิกิริยาเคมีมาใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนสารกลุ่มไนโตรฟูแรนในอาหารสัตว์

เบื้องต้น ซึ่งมีความสะดวกในการใช้งาน แต่ก็มีข้อจำกัดคือ ไม่สามารถวิเคราะห์สารที่มีความเข้มข้นต่ำ ๆ ได้ โดยมีค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์สารอยู่ที่ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2545 และ กรมปศุสัตว์, 2544) นอกจากนี้ในปี 2547 ยังมีงานวิจัยของคุณวัชรพรรณ ที่ศึกษาและพัฒนาชุดตรวจสอบสารกลุ่มไนโตรฟูแรนโดยใช้หลักการทางเคมี ให้ค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์สารเท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

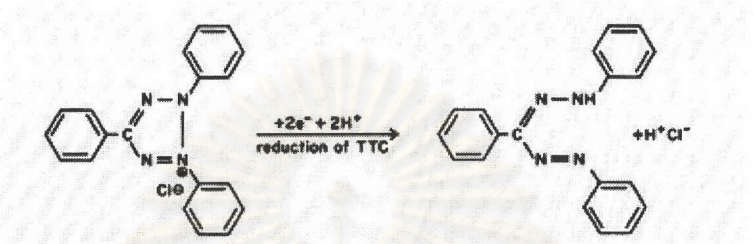
การวิเคราะห์หาฟูราโซลิโดนในรูปของเมตาบอไลต์

การวิเคราะห์หาสารเมตาบอไลท์ของฟูราโซลิโดนนิยมตรวจในตัวอย่างที่เป็นเนื้อสัตว์ เนื่องจากเมื่อสัตว์ได้รับฟูราโซลิโดนเข้าไปในร่างกายจะถูกเปลี่ยนเป็นสารเมตาบอไลท์ หรือ AOZ ซึ่งจะจับกับเนื้อเยื่อได้นานหลายสัปดาห์ สารเมตาบอไลท์เหล่านี้จะตกค้างในเนื้อเยื่อของสัตว์ในปริมาณน้อยมากทำการตรวจวิเคราะห์ทำได้ยาก ดังนั้นวิธีการตรวจวิเคราะห์สารเมตาบอไลท์จะต้องมีความละเอียดสูงรวมทั้งการเก็บรักษาตัวอย่างก่อนการนำมาสกัดแยกสารตกค้างนั้นจึงมีความสำคัญมาก ในปี ค.ศ. 1996 McCraken และคณะได้ทำการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บตัวอย่าง พบว่าถ้าเก็บตัวอย่างไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ปริมาณสาร AOZ จะคงอยู่เป็นเวลา 6 เดือน นอกจากนี้ก่อนการวิเคราะห์จะต้องสกัดแยกสารออกจากเนื้อเยื่อก่อนด้วยเทคนิค solid phase extraction (Leitner และคณะ, 2001) หรือ liquid-liquid extraction (Perez และคณะ, 2002) แล้วนำมา derivatized ด้วย 2-nitrobenzaldehyde แล้วจึงนำไปวิเคราะห์โดยใช้หลักการทางภูมิคุ้มกันวิทยา หรือทางเคมี วิธีการตรวจวิเคราะห์โดยใช้หลักการทางภูมิคุ้มกันวิทยานั้นจะตรวจโดยใช้วิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay หรือ ELISA จะอาศัยการตรวจวัด antigen โดยการใช้ antibody ที่ให้ผลทางชีวภาพเฉพาะกับยาและเอนไซม์ที่เชื่อมต่อทางเคมีกับ antibody เมื่อใส่ substrate ของเอนไซม์ลงไปเกิดเป็นสารประกอบที่มีสีขึ้น เช่น เมื่อนำฟูราโซลิโดนทำปฏิกิริยากับกรดอ่อน ๆ จะได้สารตัวใหม่คือ AOZ แล้วใช้สารตัวนี้เชื่อมต่อกับโปรตีนที่เหมาะสมเพื่อเป็นเสมือน antigen ในการสร้าง antibody ต่อตัวมันเอง แล้วจึงนำไปทดสอบกับตัวอย่างที่เราต้องการโดยอาศัยหลักการ competitive ELISA (Cooper และคณะ, 2004) วิธีนี้เป็นวิธีที่ประหยัดและรวดเร็ว วิเคราะห์ตัวอย่างได้คราวละมาก ๆ นิยมใช้เป็นวิธีทดสอบสารตกค้างเบื้องต้น ซึ่งหากตัวอย่างที่นำมาตรวจมีผลการตรวจค่อนข้างสูงก็สามารถยืนยันผลการตรวจอีกครั้งด้วยใช้ mass spectrometry (วารสารเพื่อส่งเสริมการวิเคราะห์วิจัยทางวิทยาศาสตร์ของไทย, 2545) สำหรับวิธีการตรวจทางเคมีซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้และยอมรับมากที่สุดในการตรวจหาสารตกค้างเมตาบอไลท์คือการตรวจด้วยวิธี liquid chromatography ร่วมกับ mess spectrometry หรือ LC–MS-MS เป็นวิธีที่ใช้ในการยืนยันและระบุชื่อสารในระดับน้อย ๆ ได้อย่างแม่นยำ ในปี 1996 McCraken และ

คณะ ตรวจหาสาร AOZ ในเนื้อหมูโดยใช้ระบบ thermo spray และตรวจวัดปริมาณโดยใช้ LC รวมกับ MS พบว่ามีค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์สารเท่ากับ 10 นาโนกรัม/กรัม ต่อมาในปี ค.ศ. 2001 Leitner และคณะ ได้ทำการตรวจวัดปริมาณ AOZ ในกล้ามเนื้อของสัตว์ด้วยวิธี HPLC โดยใช้ระบบ electro spray –ionization และตรวจวัดด้วย MS สองเครื่องต่อกัน ซึ่งมีค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์สารเท่ากับ 0.5-5 นาโนกรัม/กรัม จะเห็นว่าเทคนิคนี้สามารถตรวจวิเคราะห์สารตกค้างในปริมาณต่ำ ๆ ได้ดี แต่มีค่าใช้จ่ายสูงมากเนื่องจากเครื่องมือมีราคาแพง มีความยุ่งยากในการเตรียมตัวอย่าง และต้องใช้บุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญจึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในงานประจำ นอกจากวิธีการวิเคราะห์ทางเคมี และทางภูมิคุ้มกันวิทยาแล้วอีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการตรวจสอบเบื้องต้นเพื่อหาสารต้านจุลชีพที่ปนเปื้อนหรือตกค้างทั้งในอาหารสัตว์ และเนื้อเยื่อสัตว์ คือ วิธีทางจุลชีววิทยา (Microbiological assay) โดยใช้หลักการ microbial inhibition test ซึ่งเป็นวิธีการที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ในยากลุ่ม macrolides, aminoglycosides, cephalosporins, penicillins, quinolones, tetracyclins, sulphonamides และ lincosamides (Rault และคณะ, 2004; Donoghue และคณะ, 2003; Kozarova และคณะ, 2002, Hillerton และคณะ, 1990) สำหรับการตรวจวิเคราะห์หายาในกลุ่มไนโตรฟูแรนด้วยวิธีการทางจุลชีววิทยานั้นมีการศึกษาน้อยมาก โดยในขณะนี้สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ในส่วนของการวิจัยเพื่อปัญหาอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งของประเทศไทย กำลังทำการวิจัยและพัฒนาชุดตรวจสอบสารตกค้างในกลุ่มไนโตรฟูแรนในกระบวนการผลิตกุ้งด้วยวิธีตรวจสอบเบื้องต้นทางจุลชีววิทยา โดยดำเนินการทดสอบอาหารที่ผสมสารกลุ่มไนโตรฟูแรนความเข้มข้นตั้งแต่ 0.97–200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน 6 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* BGA, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereis* ATCC 11778, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus stearothermophilus* และ *Staphylococcus aureus* ATCC 6539 ใช้วิธี agar diffusion test พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* BGA, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereis* ATCC 11778 และ *Bacillus stearothermophilus* มีความไวต่อยาฟูราโซลิโดนที่ระดับความเข้มข้น 6.25, 1.95, 12.5 และ 25 ppm ตามลำดับ ส่วน *Staphylococcus aureus* ATCC 6539 ไม่มีความไวต่อยาฟูราโซลิโดน เป็นต้น ซึ่งการวิจัยดังกล่าวสามารถใช้ทดสอบและแยกสารกลุ่มไนโตรฟูแรนได้ถึง 5 ชนิดโดยดูจากโซนใสที่เกิดขึ้น แต่ข้อจำกัดของการใช้วิธีการวิเคราะห์ดังกล่าวคือ มีความยุ่งยากในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ได้มาตรฐาน และไม่สะดวกในการนำไปใช้ในภาคสนาม

จากข้อจำกัดต่าง ๆ ในการวิเคราะห์หาสารปนเปื้อนฟูราโซลิโดนโดยวิธีการดังกล่าวข้างต้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งพัฒนาชุดตรวจฟูราโซลิโดนในอาหารสัตว์โดยใช้จุลินทรีย์เป็นตัวตรวจหาการ

ปนเปื้อนโดยใช้หลักการ turbidimetric assay และมี 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) เป็นตัวบ่งชี้การเจริญของเชื้อแบคทีเรีย กล่าวคือ เมื่อมีการเจริญหรือการหายใจของแบคทีเรีย TTC ในรูปของออกซิไดซ์ซึ่งไม่มีสีจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของรีดิวซ์ซึ่งเป็นสารที่มีสีแดงดังแสดงในรูปที่ 2.13



TTC (colorless) formazan (red)

รูปที่ 2.13 แสดงโครงสร้างและปฏิกิริยารีดักชันของ TTC

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย