บทที่ 1

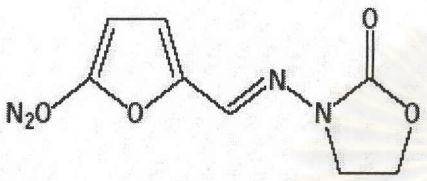
บทนำ

ประเทศไทยเผชิญปัญหาการตรวจหาสารกลุ่มไนโตรฟูแรน (nitrofuran) ในสินค้าส่งออกทางเกษตรกรรมจำพวกเนื้อสัตว์จากกลุ่มประเทศประชาคมยุโรปอย่างเข้มข้น ทำให้ยอดส่งออกของสินค้าเหล่านี้ลดลงเป็นมูลค่าหลายหมื่นล้านบาท กล่าวคือ ในปี พ.ศ. 2544 ยอดการส่งออกกุ้งไปต่างประเทศอยู่ที่ 98,680 ล้านบาท ลดลงเหลือ 60,000 ล้านบาท ในปี พ.ศ. 2545 (วารสารเพื่อส่งเสริมการวิเคราะห์วิจัยทางวิทยาศาสตร์ของไทย, 2545) จึงส่งผลกระทบต่อเกษตรกรผู้เลี้ยง ผู้ผลิต และผู้ส่งออกเนื้อสัตว์โดยตรง

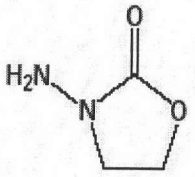
สารต้านจุลชีพในกลุ่มไนโตรฟูแรนเป็นสารที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้นในปี ค.ศ.1944 และใช้กันอย่างแพร่หลายในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ เพื่อป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมลบ แกรมบวก และ โปรโตซัว รวมทั้งใช้เป็นสารเร่งการเจริญเพื่อเพิ่มผลผลิตให้มากขึ้น สารกลุ่มนี้มีสูตรโครงสร้างที่ประกอบด้วยวงแหวนฟูแรนเกาะด้วยหมู่ไนโตร (nitro) เรียกว่า 5 ไนโตรฟูแรนดีไฮด์ (5-nitrofuraldehyde) ซึ่งเป็นส่วนที่สำคัญในการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Nikolaos and Dimitrios, 2001; มาลินี ลิ้มโภคา, 2525) อนุพันธ์ของสารในกลุ่มไนโตรฟูแรนมีหลายชนิด แต่มีเพียง 4 ชนิดที่นิยมใช้ ได้แก่ ฟูราโซลิโดน (furazolidone) ไนโตรฟูแรนโทอิน (nitrofurantoin) ฟูราลทาโดน (furaltadone) และ ไนโตรฟูราโซน (nitrofurazone) สารที่นิยมใช้มากที่สุดคือฟูราโซลิโดน เนื่องจากมีราคาถูก ประสิทธิภาพสูงเมื่อเทียบกับอนุพันธ์ตัวอื่นในกลุ่มเดียวกัน (Cooper และคณะ, 2004)

ฟูราโซลิโดนเป็นสารที่มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลือง ไม่มีรส ไม่มีกลิ่น ถูกย่อยสลายภายใต้สภาพแวดล้อมที่เป็นด่างและมีแสงแรง ๆ มีความสามารถในการละลายน้ำได้น้อย คือ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือคิดเป็นร้อยละ 0.004 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (National academy of science, 1981) ซึ่งสูตรโครงสร้างแสดงดังรูปที่ 1 แต่เมื่อ ฟูราโซลิโดนเข้าสู่กระบวนการเมทาบอริสมในร่างกายของสัตว์จะมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วในเนื้อเยื่อไปเป็น 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิโดน (3-amino-2-oxazolidinone, AOZ) ซึ่งจะไปรวมตัวกับเนื้อเยื่อในทางเดินอาหารของสัตว์ เรียกว่า tissue bound metabolite และพบว่ามีฤทธิ์เป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) และสารก่อการกลายพันธุ์ (mutanogen) (McCraken และคณะ, 1997) จากความเสี่ยงที่มนุษย์จะได้รับอันตรายจากสารตกค้างเหล่านี้ทำให้องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (USFDA) องค์การอาหารและเกษตรกรรมของสหประชาชาติ (FAO) และองค์การอนามัยโลก (WHO) ร่วมมือกันตั้ง

Codex Committee on Residue of Veterinary Drugs in Foods (CCRVDF) ขึ้น เพื่อกำหนดค่า Maximum Residue Limit หรือระดับสารตกค้างสูงสุดที่ยอมรับให้มีได้ในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่เป็นสากล โดยกำหนดให้อยู่ที่ระดับ zero tolerance คือต้องไม่มีสารกลุ่มไนโตรฟูแรนอยู่ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์เลย (เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต, 2544) และในปี ค.ศ.1993 สารกลุ่มไนโตรฟูแรนทุกชนิดถูกเสนอชื่อเข้าใน Annex IV of Council Regulation (EEC) No. 2377/90



ฟูราโซลิโดน



3-amino-2-oxazolidinone (AOZ)

รูปที่ 1.1 สูตรโครงสร้างของ nitrofuran antimicrobial drug ชนิด ฟูราโซลิโดน (parent drug) และ metabolites (AOZ) (Leitner และคณะ, 2001)

เนื่องจากฟูราโซลิโดนเป็นสารที่เมื่อเข้าสู่ร่างกายของสัตว์แล้วจะเข้าสู่กระบวนการเมตาบอลิสมอย่างรวดเร็วภายในเวลา 2-3 ชั่วโมง เปลี่ยนเป็นสารเมตาบอไลต์ AOZ ซึ่งจะจับกับเนื้อเยื่อได้นานหลายสัปดาห์ ดังนั้นการพัฒนาวิธีวิเคราะห์จึงมุ่งไปที่การหา tissue bound metabolite แต่สารตกค้างเหล่านี้เหลือตกค้างในเนื้อเยื่อของสัตว์ในปริมาณน้อยมากทำให้การตรวจวิเคราะห์ทำได้ยาก ดังนั้นการเก็บรักษาตัวอย่างก่อนการนำมาสกัดแยกสารตกค้างนั้นจึงมีความสำคัญมาก ในปี ค.ศ.1996 McCraken และคณะ ได้ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บตัวอย่าง พบว่าถ้าเก็บตัวอย่างไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ปริมาณสาร AOZ จะคงอยู่เป็นเวลา 6 เดือน การสกัดเอาสารตกค้างออกมาจากเนื้อเยื่อทำได้ด้วยเทคนิค solid phase extraction (Leitner และคณะ, 2001) หรือ liquid-liquid extraction (Perez และคณะ, 2002) แล้วนำมา derivatized ด้วย 2-nitrobenzaldehyde แล้วจึงนำไปวิเคราะห์โดยใช้หลักการทางภูมิคุ้มกันวิทยา หรือ ทางเคมี ได้มีผู้ทำการศึกษาหาปริมาณสารตกค้างชนิดฟูราโซลิโดน โดยใช้หลักการทางโครมาโตกราฟี เช่น McCraken และคณะ (1996) ใช้เทคนิค liquid chromatography (LC) ตรวจหาสาร AOZ ในเนื้อหมูโดยใช้ระบบ thermospray และตรวจวัดปริมาณโดยใช้ Mass spectrometer (MS) พบว่ามีค่า limit of detection เท่ากับ 10 นาโนกรัม/กรัม ต่อมาในปี ค.ศ. 2001 Leitner และคณะ ได้ทำการตรวจวัดปริมาณ AOZ ในกล้ามเนื้อของสัตว์ด้วยวิธี high performance liquid chromatography

(HPLC) โดยใช้ระบบ electrospray-ionization และตรวจวัดด้วย MS สองเครื่องต่อกัน ซึ่งมีค่า limit of detection เท่ากับ 0.5-5 นาโนกรัม/กรัม จะเห็นว่าตัวอย่างที่นำมาตรวจวิเคราะห์เพื่อหาสาร AOZ นั้นจะเป็นเนื้อเยื่อสัตว์ แต่สำหรับผลิตภัณฑ์จากสัตว์และอาหารสัตว์นั้นจะนิยมตรวจหาฟูราโซลิโดนโดยตรง อาทิเช่น มีการศึกษาหาสารตกค้างชนิด ไนโตรฟูแรนโทอิน ฟูราโซลิโดน และฟูราลทาโดน ในน้ำนมโดยใช้ HPLC ร่วมกับวิธีทาง electrochemistry พบว่าสามารถวิเคราะห์ปริมาณและแยกอนุพันธ์ทั้งสามชนิดได้อย่างชัดเจน (Galeano และคณะ, 1996) ต่อมาในปี ค.ศ.1997 Rosa และคณะ ได้วิเคราะห์หาสารตกค้าง ฟูราโซลิโดน ฟูราลทาโดน และไนโตรฟูราโซน ในไข่ไก่ด้วยวิธี HPLC ร่วมกับ UV photodiode array พบว่า สารตกค้างฟูราโซลิโดน และไนโตรฟูราโซน มี limit of detection เท่ากับ 2.5 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ส่วนฟูราลทาโดนเท่ากับ 5 ไมโครกรัม/กิโลกรัม และนำตัวอย่างเดิมมาวิเคราะห์เทียบกับวิธี HPLC-MS โดยมี limit of detection เท่ากับ 1.6, 3.2, และ 1 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ และมีการวิเคราะห์หาสารตกค้างในรูปสารเมตาบอไลต์ของยากลุ่มไนโตรฟูแรนใน salted chicken meat โดยใช้วิธี LC-MS-MS มี limit of detection เท่ากับ 0.5 ไมโครกรัม/กิโลกรัม (Pereira และคณะ, 2004) นอกจากวิธีการวิเคราะห์ทางเคมีแล้วยังมีการใช้หลักการทางภูมิคุ้มกันวิทยามาใช้ตรวจหา AOZ ซึ่งเป็นสารเมตาบอไลต์ฟูราโซลิโดน โดยการสร้าง antibody ที่มีความไวและมีความจำเพาะสูงต่อ AOZ โดยอาศัยหลักการ competitive enzyme linked immunosorbent assay (competitive ELISA) (Cooper และคณะ, 2004) จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นว่าวิธีการตรวจวิเคราะห์ส่วนใหญ่จะถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ตรวจหาสารเมตาบอไลต์ สำหรับเทคนิคในการตรวจสอบสารตกค้างในเนื้อสัตว์ที่นิยมใช้ในปัจจุบันคือ ELISA HPLC และ LC-MS-MS นอกจากวิธีการวิเคราะห์ทางเคมี และทางภูมิคุ้มกันวิทยาแล้ว อีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการตรวจสอบเบื้องต้นเพื่อหาสารต้านจุลชีพที่ปนเปื้อนหรือตกค้างทั้งในอาหารสัตว์ และเนื้อเยื่อสัตว์ คือ วิธีทางจุลชีววิทยา (Microbiological assay) โดยใช้หลักการ microbial inhibition test ซึ่งวิธีการนี้ยังไม่มีการใช้เพื่อตรวจหาสารกลุ่มไนโตรฟูแรนเลย แต่มีการใช้ตรวจในยากลุ่ม macrolides, aminoglycosides, cephalosporins, penicillins, quinolones, tetracyclins, sulphonamides และ lincosamides (Rault และคณะ, 2004; Donoghue และคณะ, 2003; Kozarova และคณะ, 2002; Hillerton และคณะ,1999)

ประเทศไทยเป็นประเทศผู้ผลิตสินค้าส่งออกจำพวกเนื้อสัตว์ทั้งในรูปของเนื้อสัตว์แช่แข็ง, ต้มสุก และแปรรูป ลำดับต้น ๆ ของโลก ดังนั้นการตรวจสารตกค้างชนิดฟูราโซลิโดนเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค จึงเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึง ดังนั้นจึงมีมาตรการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นโดยการระดมเครื่อง HPLC และ LC-MS-MS มาเพื่อใช้ตรวจหาสารกลุ่มไนโตรฟูแรนในรูปของเมตาบอไลต์ในสินค้าส่งออกเหล่านี้ เพื่อสร้างความเชื่อมั่นต่อประเทศลูกค้า เครื่องมือวิเคราะห์เหล่านี้

แม้ว่าจะมีความสามารถในการตรวจวิเคราะห์หาสารตกค้างที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ แต่มีราคาแพง มีความยุ่งยากในการเตรียมตัวอย่าง และต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการตรวจวิเคราะห์ ดังนั้นจึงมีนักวิจัยหลายกลุ่มพยายามที่จะพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ฟูราโซลิโดนที่ปนเปื้อนในอาหารสัตว์ เนื่องจากช่องทางที่ง่ายที่สุดที่สัตว์จะได้รับฟูราโซลิโดนเข้าสู่ร่างกายคือการกิน ดังนั้นการระวังป้องกันการตกค้างของฟูราโซลิโดนในเนื้อเยื่อสัตว์ในขั้นต้น คือ ต้องไม่มีฟูราโซลิโดนปนเปื้อนในอาหารสัตว์ แต่เกษตรกรไม่มีเครื่องมือใด ๆ ในการตรวจสอบเลย ดังนั้นแนวทางของงานวิจัยนี้จึงมุ่งพัฒนาชุดตรวจสอบฟูราโซลิโดนในอาหารสัตว์โดยใช้จุลินทรีย์เป็นตัวตรวจหาการปนเปื้อนของฟูราโซลิโดนในอาหารสัตว์ เพื่อให้ได้ชุดตรวจที่ราคาถูก ใช้งานง่าย ให้ผลการวิเคราะห์ถูกต้องแม่นยำที่เกษตรกรสามารถใช้ตรวจได้เอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ฟูราโซลิโดนที่ปนเปื้อนในอาหารสัตว์ ด้วยชุดตรวจที่มีความไวสูง ใช้งานง่าย และนำไปใช้ในภาคสนามได้สะดวก

สิ่งที่คาดว่าจะได้รับ

ได้แนวทางในการผลิตชุดตรวจสอบฟูราโซลิโดนที่ปนเปื้อนในอาหารสัตว์ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา ที่มีความไวสูง ใช้งานง่าย ไม่ต้องใช้เครื่องมือ หรือแถบเทียบสีในการอ่านผล และนำไปใช้ในภาคสนามได้สะดวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย