บทที่ 1

บทนำ

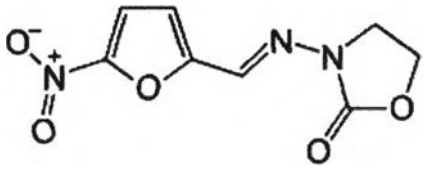
ในปัจจุบันประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตสินค้าที่สำคัญ เพื่อใช้ในการบริโภคภายในประเทศ และส่งออกจำหน่ายไปยังต่างประเทศ ในสภาวะปัจจุบันตลาดการค้าแบบเสรีมีการแข่งขันมากขึ้น ทำให้แต่ละประเทศต้องมีการพัฒนาคุณภาพสินค้าเพื่อสามารถตอบสนองความต้องการของลูกค้าได้ ในส่วนของประเทศไทยนั้นพบว่า คุณภาพของสินค้าบางประเภทยังไม่ได้มาตรฐานและยังไม่มีความปลอดภัยในการบริโภค ส่งผลให้บางประเทศใช้เรื่องคุณภาพสินค้ามาเป็นข้อจำกัดและกีดกันการส่งออกสินค้าจากประเทศไทย

ฟูราโซลิโดน (Furazolidone) เป็นยาต้านจุลชีพในกลุ่มไนโตรฟูแรน ถูกใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารสัตว์ เพื่อป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียทั้งแกรมบวก แกรมลบ และโปรโตซัว รวมทั้งยังมีการใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตเพื่อเพิ่มผลผลิตให้มากขึ้น แต่เนื่องจากฟูราโซลิโดนเป็นสารที่ก่อให้เกิดมะเร็งและการกลายพันธุ์ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ดังนั้นในปี ค.ศ.1995 สหภาพยุโรปได้ออกประกาศห้ามใช้สารฟูราโซลิโดนทั้งในอาหารและผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับสัตว์ (Commission Regulation 1442/95) สำหรับประเทศไทยตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 268 พ.ศ.2546 มีข้อกำหนดปริมาณของสาร 3-อะมิโน- 2-ออกซาโซลิดิโนน (3-amino-2-oxazolidinone; AOZ) ที่ระดับไม่มากกว่า 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ทำให้การตรวจสารตกค้างในเนื้อสัตว์เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการควบคุมการผลิต แต่เนื่องจากต้องเสียค่าใช้จ่ายสูง เพื่อไม่ให้สูญเสียโอกาสการส่งออก และมีผลกระทบต่อเกษตรกร จึงต้องพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจวัดอย่างต่อเนื่อง การแก้ปัญหาที่ตรงไปตรงมาคือ งดใช้ยาต้องห้ามในอาหารสัตว์ ซึ่งความเป็นจริงมักมีการลักลอบใส่ยาต้องห้ามรวมทั้งฟูราโซลิโดนลงในอาหารสัตว์ โดยที่เกษตรกรไม่ทราบ จึงควรมีการตรวจสอบอาหารสัตว์ก่อนที่จะนำมาใช้เลี้ยงสัตว์ แต่เนื่องจากการวิเคราะห์ฟูราโซลิโดนในอาหารสัตว์โดยส่งตรวจตามห้องปฏิบัติการจะให้ผลช้าและเสียค่าใช้จ่ายสูง ทำให้การดูแลควบคุมอาหารสัตว์เกิดการล่าช้าและอาจดูแลได้อย่างไม่ทั่วถึง ดังนั้นเกษตรกรจึงควรจะมีวิธีการตรวจสารฟูราโซลิโดนอย่างง่าย ให้ผลรวดเร็วและไม่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการตรวจวัดมากเกินไป ดังนั้น

การศึกษาในครั้งนี้จึงทำการพัฒนาชุดตรวจสอบฟูราโซลิโดนในอาหารสัตว์ โดยใช้ *Escherichia coli* DH5α λpir เป็นดัชนีในการตรวจวัด โดยใช้เป็นเครื่องมือตรวจสอบเบื้องต้นที่เกษตรกรสามารถใช้ตรวจได้เอง ซึ่งจะช่วยให้เกษตรกรพึ่งพาตัวเองได้มากขึ้น

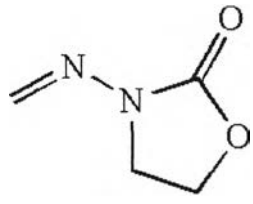
สารกลุ่มไนโตรฟูแรน (Nitrofurans) เป็นยาต้านจุลชีพที่ได้จากการสังเคราะห์ มีลักษณะเป็นผงสีเหลือง ไม่มีกลิ่น ไม่มีรส ละลายน้ำได้เล็กน้อย มีสูตรโครงสร้างที่ประกอบด้วยวงแหวนฟูแรนเกาะด้วยหมู่ไนโตรเจน เรียกว่า 5 – Nitofuraldahyde (David และคณะ, 1981) สารในกลุ่มนี้มีอยู่หลายอนุพันธ์ด้วยกันซนิดที่ใช้กันแพร่หลายอย่างมากในกรมปศุสัตว์ คือ ฟูราโซลิโดน (Furazolidone) ไนโตรฟูแรนโตอิน (Nitrofurantoin) ไนโตรฟูราโซน (Nitrofurazone) ฟูรัลทาโดน (Furaltadone) และไนโตรวิน (Nitrovin) ซึ่งนำมาใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคติดเชื้อในท่อทางเดินปัสสาวะและโรคติดเชื้อในช่องคลอด ตลอดจนโรคติดต่อทางผิวหนัง ในสัตว์ใช้รักษาโรคติดเชื้อในลำไส้ และทางเดินปัสสาวะ เช่น สุกร โค เป็ด ไก่ และกุ้ง สารกลุ่มไนโตรฟูแรน เป็นสารก่อมะเร็งได้ทั้งในคนและสัตว์ ซึ่งหากสะสมในร่างกายเป็นจำนวนมาก จะส่งผลให้มีความเสี่ยงสูงที่จะก่อให้เกิดโรคมะเร็งได้ นอกจากนี้บางอนุพันธ์ของสารกลุ่มไนโตรฟูแรนยังเข้าไปทำลายระบบประสาทส่วนปลายของปอด และอาจส่งผลกระทบทำให้เกิดอาการแพ้ที่บริเวณผิวหนังของคนอีกด้วย จึงนับได้ว่าสารกลุ่มไนโตรฟูแรนเป็นสารที่อันตรายต้องห้ามในการเลี้ยงสัตว์ที่จะนำมาใช้เป็นอาหารให้มนุษย์รับประทาน

ฟูราโซลิโดนมีสูตรทางเคมีคือ $C_8H_7N_3O_5$ เป็นสารประกอบของ N-(5-nitro-2furfaridene)-3-amino-2-oxazolidone มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองเข้ม ไม่มีรส ไม่มีกลิ่น น้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 225.158 กรัมต่อโมล จุดหลอมเหลวเท่ากับ 255 องศาเซลเซียส ถูกย่อยสลายภายใต้สภาวะที่เป็นด่าง และที่มีแสงแรงๆ มีความสามารถในการละลายน้ำได้ 40 ไมโครกรัมต่อลิตรหรือร้อยละ 0.004 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (Cooper และคณะ, 2004)



รูปที่ 1.1 รูปแสดงโครงสร้างทางเคมีของสารฟูราโซลิโดน

เมื่อฟูราโซลิโดนเข้าสู่ร่างกายจะมีการเปลี่ยนแปลงภายใน 2-3 ชั่วโมงไปเป็น 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิโดน (3-amino-2-oxazolidinone, AOZ) ซึ่งจะจับอยู่ที่เนื้อเยื่อในทางเดินอาหารของสัตว์ (McCracken และ Kennedy, 1997) เรียกว่า tissue bound metabolite เนื่องจากมีฤทธิ์เป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogens) และสารก่อการกลายพันธุ์ (mutanogen) ทำให้เกิดความเสี่ยงที่มนุษย์จะได้รับอันตรายจากสารตกค้างเหล่านี้



3-amino-2-oxazolidinone

(AOZ)

รูปที่ 1.2 รูปแสดงโครงสร้างทางเคมีของสาร 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิโดน

สหภาพยุโรปประกาศข้อกำหนดในการตรวจหาสารปริมาณน้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ (Minimum Required Performance Limits. MRPL) ของสารเมแทบอไลต์ (metabolite) ของสารกลุ่มไนโตรฟูแรนที่ระดับ 1.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และประกาศห้ามใช้ฟูราโซลิโดนทั้งในอาหารและผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับสัตว์ (Commission Decision 2003/181) ดังนั้นไม่ว่าจะตรวจพบสารตกค้างกลุ่มดังกล่าวในสินค้าอาหารระดับต่ำเท่าใดก็ตามถือว่าเป็นสิ่งที่สหภาพยุโรปไม่ต้องการ (สุจิตรา พงศ์วิวัฒน์, 2546) ภายหลังจากมีประกาศห้ามใช้ฟูราโซลิโดน พบข้อมูลจากรายงานสอบสวนฟาร์มและรายงานส่งตัวอย่างอาหารสัตว์ส่งตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ตั้งแต่เดือนมีนาคม 2545 - กันยายน 2546 ยังคงตรวจพบสารเมตาบอไลต์ของฟูราโซลิโดนในฟาร์มไก่ถึงร้อยละ 36.78 ของตัวอย่างทั้งหมด (สุริยะ กาวงษ์กลางและ อัชวัน โกมลเสวิน, 2547)

การตรวจวิเคราะห์ฟูราโซลิโดนนั้นทำได้ยาก เนื่องจากเมื่อฟูราโซลิโดนเข้าสู่ร่างกายของสัตว์จะถูกเมแทบอไลต์ เป็น AOZ อย่างรวดเร็วภายในเวลาน้อยกว่า 2 ถึง 3 ชั่วโมง โดย AOZ ซึ่งมีความเสถียรมากจะสร้างพันธะเพปไทด์กับเนื้อเยื่อ (Gottschall และคณะ, 1995) สารนี้สามารถ

สกัดออกจากเนื้อเยื่อโดยใช้กรดเจือจาง (Hoogembloom และคณะ, 1991) แต่เนื่องจาก AOZ เป็นสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กมาก ซึ่งไม่สามารถดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเล็ตได้ และถูกชะออกจากคอลัมน์อย่างรวดเร็ว ดังนั้นเพื่อให้สามารถตรวจวิเคราะห์สารนี้ได้จึงจำเป็นต้องเปลี่ยนให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ คือ 2-ไนโตรเบนแซลดีไฮด์-3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดิโนน (2-Nitrobenzaldehyde-3-amino-2-oxazolidinone; NPAOZ) (Leitener และคณะ, 2001) ซึ่งมีขั้นตอนในการทำที่ยุ่งยากและใช้เวลานานหลายชั่วโมง

การตรวจวิเคราะห์ฟูราโซลิโดนสามารถตรวจวิเคราะห์ทางเคมีได้หลายวิธี Cieri และคณะ (1978) ศึกษาการวิเคราะห์หาฟูราโซลิโดนในอาหารสัตว์ โดยใช้วิธี Thin layer chromatography หรือ TLC เริ่มจากการนำอาหารสัตว์มาสกัดด้วย acetone แล้วนำมาทดสอบด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ chloroform-methanol (1:9) เป็น mobile phase พบว่าเทคนิคนี้มีขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ฟูราโซลิโดนที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 50 µg/ml

Cieri และคณะ (1979) ได้มีการศึกษาการวิเคราะห์หาฟูราโซลิโดนในอาหารสัตว์โดยใช้วิธี High performance liquid chromatography หรือ HPLC ร่วมกับ UV-visible detector (360 nm) พบว่ามีขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ฟูราโซลิโดนที่ 5 µg/ml

Rosa และคณะ (1997) วิเคราะห์ฟูราโซลิโดน ฟูรัลทาโดน และ ไนโตรฟูราโซน ในไข่ไก่ด้วยวิธี HPLC ร่วมกับ UV photodiode array พบว่าฟูราโซลิโดน และไนโตรฟูราโซน มีขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ที่ 2.5 µg/ml และฟูรัลทาโดน ที่ 5 µg/ml

สุนันท์ กิตติจารุวัฒนา (2547) พัฒนาวิธีการตรวจฟูราโซลิโดน ด้วยวิธี HPLC แบบ reversed phase โดยวิธีการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของสารละลายใน mobile phase ระหว่าง 0.01 M sodium acetate, pH5.5 และ acetonitrile ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ในโดยอาศัยระยะเวลาที่แตกต่างกัน เพื่อใช้ในการหาไนโตรฟูราโตอิน ไนโตรฟูราโซน ฟูราโซลิโดน ฟูรัลทาโดน และไนโตรวิน พบว่าสารทั้ง 5 สารเกิดการแยกได้ดี และไม่มี peak รบกวน โดยมี retention time ที่ 3.79, 4.50, 5.76, 8.10 และ 20.08 นาที ตามลำดับ

หอสมุดกลาง สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำหรับในประเทศไทยการตรวจหาฟูราโซลิโดนและ3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิโดน ทำได้โดยใช้ HPLC หรือ LC-MS-MS ซึ่งค่าตรวจราคาแพงถึง 3,500 บาทต่อตัวอย่าง และรอผลนาน เนื่องจากสถาบันที่สามารถตรวจได้รับการรับรองน้อยมาก เกษตรกรจึงต้องเสี่ยงกับการปนเปื้อนโดยไม่ตั้งใจ เนื่องจากแม้ไม่ได้ใช้ยาก็อาจมีการปนเปื้อนสารในกลุ่มนี้ในอาหารสัตว์อยู่แล้วซึ่งเกิดจากการที่ผู้ผลิตอาหารสัตว์ที่ไม่มีความรับผิดชอบ ดังนั้นการที่เกษตรกรสามารถที่จะตรวจสารในกลุ่มนี้ได้ด้วยตนเองเบื้องต้นจะช่วยให้เกษตรกรเลือกใช้เฉพาะอาหารที่ไม่มีการปนเปื้อนสารดังกล่าวได้

กุลกานต์ ชูชัยยะ (2548) ได้คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถใช้เป็นดัชนีที่วัดการปนเปื้อนของฟูราโซลิโดนที่ระดับต่ำกว่า 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเจริญเติบโตได้เร็ว คือ *Escherichia coli* DH5α λpir ซึ่งมีศักยภาพที่จะใช้เป็นชุดตรวจสอบได้ ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อจุลินทรีย์ในการตรวจสอบฟูราโซลิโดนที่ปนเปื้อนในอาหารสัตว์เพื่อใช้เป็นชุดตรวจที่ใช้ง่าย มีความไวสูง มีความสามารถในการวิเคราะห์หาสารตกค้างที่ระดับความเข้มข้นต่ำๆ และมีราคาถูก

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อประเมินประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการเป็นดัชนีในชุดตรวจยาฟูราโซลิโดนในอาหารสัตว์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ชุดตรวจยาฟูราโซลิโดนในอาหารสัตว์ที่ใช้ *Escherichia coli* DH5$\alpha\lambda$pir เป็นดัชนีที่ใช้ง่าย เก็บไว้ได้นานและมีราคาถูกโดยเกษตรกรสามารถใช้งานได้