ว.วิทย. มข. 41(1) 36-45 (2556) KKU Sci. J. 41(1) 36-45 (2013)

การตรวจวัดยาปฏิชีวนะกลุ่มไนโตรฟูแรน ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์และอาหารสัตว์

Determination of Nitrofuran Antibiotics in Animal Products and Feeds

อุมาพร ฉัตรศรีสุวรรณ[1] *ธนาภัทร ปาลกะ*[2] *และ กิตตินันท์ โกมลภิส*[3*]

บทคัดย่อ

ยากลุ่มไนโตรฟูแรน (nitrofurans) เป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อในสัตว์ซึ่งมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมปศุสัตว์ แต่พบว่าหลังการใช้ยาจะเกิดการตกค้างของสารเมแทบอไลต์ในตัวสัตว์ ซึ่งมีความเสี่ยงในการก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์ที่บริโภคเนื้อสัตว์ซึ่งมีสารตกค้างดังกล่าว ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการตรวจสารตกค้างเหล่านี้ด้วยวิธีการตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพ ในปัจจุบันวิธีการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์มีหลายวิธี ได้แก่ วิธีทางเคมี เช่น liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS), gas chromatography mass spectrometry (GC-MS), high performance liquid chromatography (HPLC) เป็นต้น วิธีทางชีวภาพ เช่น การทดสอบทางจุลชีววิทยา (microbiology test) วิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกัน (immunoassay) โดยใช้หลักการของเทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์ (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) ซึ่งแต่ละวิธีก็มีข้อดีและข้อด้อยแตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของผู้ใช้งาน ทั้งนี้ ELISA มีความเหมาะสมสำหรับใช้ตรวจคัดกรองตัวอย่างจำนวนมากเพราะสามารถตรวจวัดสารได้อย่างจำเพาะ ให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้อง แม่นยำและสามารถตรวจวิเคราะห์หาสารตกค้างได้ครั้งละหลายตัวอย่างในเวลาเดียวกัน ในขณะที่วิธีทางเคมีมีความเหมาะสมในการตรวจผลยืนยันในตัวอย่างที่ต้องสงสัยหลังจากการตรวจคัดกรอง

[1]หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพ 10330
[2]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพ 10330
[3]สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพ 10330
*Corresponding Author, E-mail: kittinan.k@chula.ac.th

ABSTRACT

Nitrofurans are a group of antibiotics widely used to treat infected livestock. However, residues of their metabolites could be found in animals after use. This could be harmful to human who consume the contaminated animal products. Therefore, it is necessary to monitor these residues by efficient detection methods. Currently, the methods used to analytically detect the residues in meat are the chemical methods such as Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS), Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS), High Performance Liquid Chromatography (HPLC), and the biological methods such as microbiology test and immunoassay based on the technique of enzyme-linked immunosorbent assay or ELISA. Each method possesses different advantages and disadvantages and the selection depends on the objectives of the users. However, ELISA is a suitable method for screening a large number of samples because of its specificity, accuracy and precision and user friendliness. In addition, it can be used to detect a residue in many samples simultaneously, while the chemical based methods are suitable as confirmatory detection of a suspected sample after screening.

คำสำคัญ: ไนโตรฟูแรน การตรวจวัด

Keywords: Nitrofurans, Detection

บทนำ

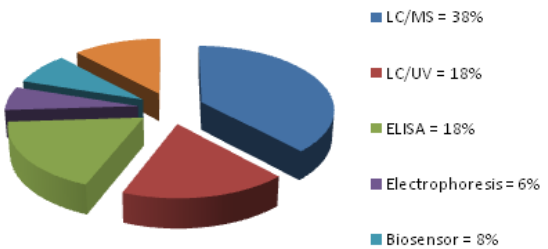
ยาปฏิชีวนะ (antibiotic) เป็นสารที่มีอำนาจยับยั้งหรือทำลายชีวิตของจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงมีการนำมาใช้รักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียทั้งในคนและในสัตว์ แต่พบว่ามีการนำยาปฏิชีวนะไปผสมในอาหารสัตว์เพื่อกระตุ้นการเติบโตในสัตว์สำหรับบริโภค ซึ่งยาปฏิชีวนะเข้าไปในร่างกายของสัตว์ติดต่อเป็นประจำอาจเกิดการสะสมและตกค้างอยู่ในตัวสัตว์ เมื่อนำสัตว์ไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ สารตกค้างจากยาปฏิชีวนะบางกลุ่มเป็นอันตรายอย่างมากต่อผู้บริโภคที่บริโภคเนื้อสัตว์ดังกล่าว ดังนั้น จึงมีการประกาศห้ามใช้ยาปฏิชีวนะบางกลุ่มในสัตว์ที่จะนำมาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อการบริโภคของมนุษย์ โดยสหภาพยุโรป (European Union, EU) ได้ออกกฎหมายห้ามใช้ยาปฏิชีวนะบางชนิดในกลุ่มประเทศสหภาพยุโรปตั้งแต่ปี ค.ศ. 2006 เป็นต้นมา (Diblikova et al., 2005) และห้ามให้มีการนำเข้าผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่มีการตกค้างของสารปฏิชีวนะบางชนิด นอกจากนี้ยังได้มีการกำหนดขีดจำกัดปริมาณสารตกค้างสูงสุด (maximum residue limits, MRLs) ของสารหลายชนิดไว้ด้วย ในกรณีของยาปฏิชีวนะที่กำหนดห้ามให้มีสารตกค้าง (zero tolerance) ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์นั้นก็ได้มีการกำหนดปริมาณต่ำสุดของสารตกค้างที่วิธีการตรวจวัดต้องสามารถตรวจสอบได้ (minimum required performance limit, MRPL) ในปัจจุบันได้มีการประกาศห้ามใช้ในหลาย ๆ ประเทศ รวมถึงประเทศไทยด้วย อย่างไรก็ตามก็ยังมีรายงานการตรวจพบยาปฏิชีวนะต้องห้ามตกค้างอยู่ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์อย่าง

ต่อเนื่อง ยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมปศุสัตว์มีอยู่ด้วยกันหลายกลุ่ม อาทิเช่น เบต้าแลคแตม (β-lactam) (เช่น เพนนิซิลิน (penicillin) และ เซฟาโลสปอริน (cephalosporins)) เตตราไซคลิน (tetracyclines) คลอแรมฟินิคอล (chloramphenicols) แมคโครไลด์ (macrolides) สเปคติโนมัยซิน (spectinomycin) ลินโคซามายด์ (lincosamides) ซัลโฟนามายด์ (sulphonamides) ไนโตรอิมิดาโซล (nitroimidazoles) ไตรเมทโตรพริม (trimethoprim) พอลิมัยซิน (polymycins) ควิโนโลน (quinolones) แมคโครซัยคลิค (macrocyclics) (เช่น แอนสามัยซิน (ansamycins) ไกลโคเปปไทด์ (glycopeptides) อะมิโนไกลโคไซด์ (aminoglycosides)) และ ไนโตรฟูแรน (nitrofurans) (Cháfer-Pericás et al., 2010)

จากปัญหาดังที่กล่าวมาข้างต้น การตรวจหายาปฏิชีวนะตกค้างในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ จึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อจะยืนยันถึงความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ โดยไม่ให้มียาปฏิชีวนะตกค้างเกินจากมาตรฐานที่กำหนด ซึ่งนับว่าเป็นปัจจัยสำคัญสำหรับอุตสาหกรรมการส่งออกอาหาร เพราะถ้ามีการส่งออกผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่มีการปนเปื้อนของสารตกค้างไม่ว่าจะเป็น ยาปฏิชีวนะ สารเร่งเนื้อแดง สารกันบูด สารพิษจากเชื้อรา หรือแม้แต่เชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค และเมื่อถูกตรวจพบจะทำให้เกิดการส่งกลับคืนของสินค้าก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมากต่อการส่งออก ทั้งต่อผู้ประกอบการหรือประเทศผู้ส่งออก เพราะไม่เพียงแต่จะทำให้ขาดรายได้ที่จะเข้าสู่ประเทศผู้ส่งออกอย่างมหาศาลแล้ว ยังส่งผลระยะยาวคือการถูกห้ามส่งสินค้าที่เป็นผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์เข้าประเทศอีกต่อไป เป็นเหตุให้ต้องมีการตรวจผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์อย่างเข้มงวดสำหรับการส่งออกในแต่ละครั้งเพื่อให้มั่นใจว่าสินค้าที่จะส่งออกไม่มีสารตกค้างที่เป็นสารต้องห้าม จากรูปที่ 1 จะเห็นว่า LC-MS จะเป็นวิธีที่ใช้ตรวจหายาปฏิชีวนะตกค้างมากที่สุด รองลงมาคือ Liquid Chromatography with Ultraviolet-Visible detection (LC-UV), ELISA, Biosensors และ Electrophoresis ตามลำดับ (Cháfer-Pericás et al., 2010)

ยาปฏิชีวนะกลุ่มไนโตรฟูแรน

ไนโตรฟูแรน เป็นยาปฏิชีวนะที่มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยวงแหวน 5-ไนโตรฟูแรน (5-nitrofuran ring group) จัดอยู่ในกลุ่มยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์อย่างกว้าง โดยออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรีย ราอะมีบา และโปรโตซัว ใช้รักษาและป้องกันการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารที่มีสาเหตุมาจาก *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp. (Draisci et al., 1997)



รูปที่ 1 แสดงสัดส่วนวิธีการตรวจวัดยาปฏิชีวนะตกค้างในอาหารโดยวิธีต่าง ๆ (ดัดแปลงจาก Cháfer-Pericás et al., 2010)

นอกจากนี้ยังพบว่ามีการนำไปผสมในอาหารสัตว์เพื่อกระตุ้นการเจริญของสัตว์ในกลุ่มปศุสัตว์ (เช่น หมู โค และกระบือ) และสัตว์น้ำ (เช่น ปลา และกุ้ง) (Li et al., 2010) ยาปฏิชีวนะในกลุ่มไนโตรฟูแรน ที่พบบ่อยมีอยู่ด้วยกัน 4 ชนิด คือ ฟูราโซลิโดน (furazolidone, FZD) ฟูรอลทาโดน (furaltadone, FTD) ไนโตรฟูแรนโทอิน (nitrofurantoin, NFT) และไนโตรฟูราโซล (nitrofurazone, NFZ) ดังรูปที่ 2(ก) ยาปฏิชีวนะกลุ่มนี้จะมีการเปลี่ยนโครงสร้างอย่างรวดเร็วเมื่อผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึมในร่างกายสัตว์ จึงพบสารตกค้างที่อยู่ในรูปสารตั้งต้น (parent drugs) ทั้งในเนื้อเยื่อและพลาสมาน้อยมาก แต่จะพบในรูปสารเมแทบอไลต์ (metabolized form) ได้แก่ 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิโดน (3-amino-2-oxazolidone, AOZ) 3-อะมิโน-5-มอร์โฟลิโนเมทธิล-2-ออกซาโซลิโดน (3-amino-5-morpholinomethyl-oxazolidone, AMOZ) 1-อะมิโนไฮแดนโทอิน (1-aminohydantoin, AHD) และ เซมิคาร์บาไซด์ (semicarbazide, SEM) (รูปที่ 2(ข)) ตามลำดับ (Thongsrisomboon et al., 2010) โดยกลไกการสลายตัวยังไม่ทราบแน่ชัด คาดว่าจะเกิดการตัดพันธะบริเวณวงแหวนไนโตรฟูแรน ทำให้ส่วนหางที่เหลือจากการตัดหรือสารเมแทบอไลต์เกิดการสร้างพันธะโควาเลนท์กับเนื้อเยื่อในตัวสัตว์ (Leitner et al., 2001) ซึ่งสารเหล่านี้จัดเป็นสารก่อมะเร็งและสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ นอกจากนี้ยังมีผลข้างเคียงต่อระบบประสาทส่วนกลาง รบกวนการทำงานของระบบทางเดินอาหาร น้ำหนักลด และลดปริมาณการสร้างตัวอสุจิอีกด้วย (Aiello et al., 2005)

Cooper และ Kennedy (2007) ได้ศึกษาความเสถียรของสารไนโตรฟูแรนในเนื้อสัตว์ในระหว่างการเก็บรักษาและการนำไปทำอาหาร โดยทำการเก็บรักษาเนื้อหมูและตับหมูที่มีสารเมแทบอไลต์ของไนโตรฟูแรนตกค้างเป็นเวลา 8 เดือน แล้วนำมาตรวจวิเคราะห์พบว่ามีปริมาณสารเมแทบอไลต์อยู่เท่าเดิม และเมื่อนำเนื้อหมูและตับหมูที่มีสารเมแทบอไลต์ของไนโตรฟูแรนตกค้างมาประกอบอาหาร ทั้งวิธี ทอด ผัด ย่าง อบ และ ผ่านเครื่องไมโครเวฟ นำมาตรวจสารสารตกค้าง ก็พบว่ามีปริมาณสารตกค้างหลงเหลืออยู่ถึง 67-100% นั่นแสดงให้เห็นว่า ทั้งการเก็บรักษาเป็นระยะเวลานาน และผ่านการประกอบอาหาร ไม่สามารถลดปริมาณสารเมแทบอไลต์ของไนโตรฟูแรนได้

จากผลเสียดังกล่าว สหภาพยุโรปจึงประกาศห้ามไม่ให้มีการใช้ยากลุ่มไนโตรฟูแรนในอาหารสัตว์ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1993 (Li et al., 2010) นอกจากนี้ยังมีการห้ามใช้ยาไนโตรฟูแรนในประเทศ ออสเตรเลีย ฟิลิปปินส์ บราซิล และประเทศไทย เป็นต้น (Khong et al., 2004) ในวันที่ 13 มีนาคม ปี ค.ศ. 2003 ได้มีการกำหนดค่า MRL ของสารตั้งต้นทุกตัวในกลุ่มไนโตรฟูแรน ไว้ที่ 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หรือ 1 ส่วนในล้านส่วน (part per million, ppm) (Barbosa et al., 2007) และห้ามพบสารเมแทบอไลต์ทุกตัวในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ โดยกำหนดค่า MRPL ไว้ที่ 1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม หรือ 1 ส่วนในพันล้านส่วน (part per billion, ppb) (Vass et al., 2008)

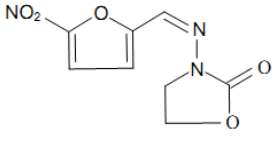
การตรวจวัดยาปฏิชีวนะกลุ่มไนโตรฟูแรน

การตรวจวัดสารตกค้างต่าง ๆ รวมถึงยาปฏิชีวนะในกลุ่มไนโตรฟูแรน มักจะตรวจหาในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์สำหรับการส่งออกจำหน่ายต่างประเทศเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งหมายถึงปริมาณผลิตภัณฑ์จำนวนมาก จึงจำเป็นจะต้องเลือกจำนวนตัวอย่างที่จะนำมาตรวจสอบให้ครอบคลุม และเลือกวิธีการสำหรับตรวจวัดสารตกค้างให้เหมาะสมด้วย โดยจะต้องเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว ให้ผลการตรวจสอบถูกต้อง

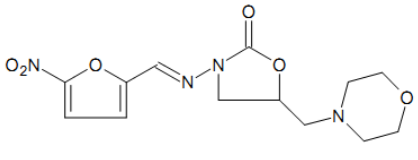
สามารถตรวจวัดได้หลายตัวอย่างในการปฏิบัติงานแต่ละครั้ง และมีค่าใช้จ่ายต่ำ นอกจากนี้วิธีการตรวจวัดที่นำมาใช้งานต้องสามารถตรวจวัดปริมาณสารตกค้างได้ในช่วงของค่า MRL หรือค่า MRPL ที่ได้มีการกำหนดไว้ของสารนั้นๆ ซึ่งในแต่ละวิธีจะต้องมีค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (limit of detection, LOD) และค่าปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้เชิงปริมาณ (limit of quantification, LOQ) ระบุไว้ด้วย (Cháfer-Pericás et al., 2010)

สำหรับยาปฏิชีวนะกลุ่มไนโตรฟูแรนตกค้างได้มีผู้ทำการวิจัยหลายกลุ่มเพื่อหาวิธีที่เหมาะสม ทั้งทางเคมี และ ชีวภาพ โดยวิธีการตรวจวัดสารไนโตรฟูแรนในอาหารสัตว์ จะต้องทำการตรวจในรูปสารตั้งต้น และในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ต้องทำการตรวจวัดในรูปสารเมแทบอไลต์เท่านั้น (Keeffe et al., 2004)

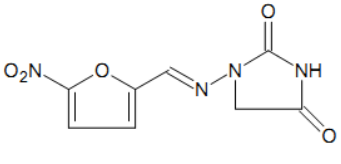
(ก) สารตั้งต้นในกลุ่มไนโตรฟูแรน



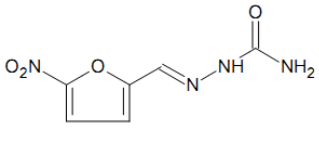
Furazolidone (FZD)



Furaltadone (FTD)

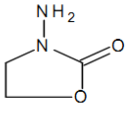


Nitrofurantoin (NFT)

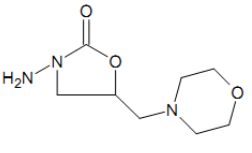


Nitrofurazone (NFZ)

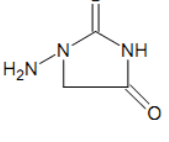
(ข) สารเมแทบอไลต์ในกลุ่มไนโตรฟูแรน



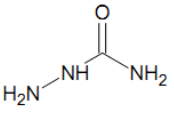
3-Amino-2-oxazolidinone (AOZ)



3-Amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone (AMOZ)



1-Aminohydantoin



Semicarbazide (SEM)

รูปที่ 2 โครงสร้างของสารตั้งต้นและสารเมแทบอไลต์ในกลุ่มไนโตรฟูแรน (ดัดแปลงจาก Vass et al., 2008)

การตรวจวัดทางวิธีเคมี

วิธีทางเคมีเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายและเป็นวิธีที่ใช้ตรวจยืนยันสารตกค้างที่มีอยู่ในตัวอย่าง ยกตัวอย่างเช่น วิธี LC-UV จะใช้หลักการดูดซับรังสี UV ของสารตกค้าง โดยจะดูดซับรังสีในช่วง 180 ถึง 350 นาโนเมตร ทำการวัดปริมาณรังสี UV ที่ถูกปลดปล่อยออกมาเปรียบเทียบกลับเป็นปริมาณสารตกค้างที่มีอยู่ แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดคือ ไม่มีความจำเพาะต่อสารตกค้างที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ (Kumer et al., 1994) และสำหรับวิธี LC-MS/MS เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจหาสารตกค้าง สามารถตรวจวัดสารที่มีโมเลกุลสูง สารมีขั้ว ไม่ระเหย และสามารถทนความร้อนได้สูง วิธีนี้มีความจำเพาะต่อสารตกค้างที่ต้องการวิเคราะห์สูง จึงให้ผลการตรวจที่แม่นยำ แต่ก็ยังมีข้อจำกัด ในด้านของเวลาที่ตรวจหาสารตกค้างกับจำนวนตัวอย่างมากๆ ค่าการตรวจวิเคราะห์สูง และยังมีค่าบำรุงรักษาเครื่องมือที่สูง (Balizs and Hewitt, 2003)

ในปี 2010 Thongsrisomboon et al. ได้ทำการตรวจวัดสารในกลุ่มไนโตรฟูแรนในอาหารสัตว์ โดยสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารสัตว์จากร้านค้าในจังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย ด้วยวิธี flow injection chemiluminescence (FI-CL) พบว่าในอาหารสัตว์จำนวน 5 ตัวอย่าง พบ FTD ถึง 4 ตัวอย่าง และพบปริมาณ FTD ใน 1 ตัวอย่าง เกินจากที่กำหนดไว้ที่ 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม คือตรวจพบที่ 1.63 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในปีเดียวกัน Li et al. ได้เก็บตัวอย่างอาหารสัตว์จากตลาดในประเทศจีนโดยแบ่งเป็นอาหารสุกร 10 ตัวอย่าง อาหารโคกระบือ 30 ตัวอย่าง และอาหารปลา 30 ตัวอย่าง มาทำการตรวจหาสารไนโตรฟูแรนโดยวิธี HPLC พบว่า ในตัวอย่างอาหารปลาจำนวน 2 ตัวอย่างพบสาร NFZ และพบสาร NFT 1 ตัวอย่าง และตรวจพบสารกลุ่มไนโตรฟูแรนในอาหารโคกระบือ 3 ตัวอย่าง โดยพบสาร FZD 2 ตัวอย่าง และสาร FTD 1 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1)

ในส่วนของสารไนโตรฟูแรนตกค้างที่อยู่ในรูปเมแทบอไลต์นั้น ได้มีผู้ทำการวิจัยตรวจสารตกค้างในตัวอย่างเนื้อหมูในกลุ่มประเทศยุโรปจำนวน 12 ประเทศเป็นจำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 1500 ตัวอย่างโดยใช้เครื่อง LC-MS/MS ในการตรวจวัด พบสาร AOZ และสาร AMOZ ในตัวอย่างเนื้อหมูจากประเทศโปรตุเกสจำนวน 10 ตัวอย่าง และพบสาร AMOZ ในตัวอย่างเนื้อหมูจากประเทศอิตาลีและกรีซประเทศละ 1 ตัวอย่าง (Keeffe et al., 2004)

จากผลงานวิจัยดังที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่ายังมีการใช้ยาปฏิชีวนะในกลุ่มไนโตรฟูแรนและตกค้างอยู่ในระดับที่เกินมาตรฐาน

รูปที่ 3 แสดงชุดตรวจวัดสารในกลุ่มไนโตรฟูแรนโดยวิธี ELISA

การตรวจวัดทางวิทยาภูมิคุ้มกัน

การตรวจวัดด้วยวิธีนี้อาศัยหลักการของการจับกันจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี โดยเรียกหลักการแบบนี้ว่า immunoassay โดยทั่วไปมักติดตามการจับโดยดูจากปฏิกิริยาของเอนไซม์จึงเรียกวิธีตรวจโดยใช้หลักการนี้ว่า ELISA ซึ่งเป็นวิธีที่มีข้อดีคือ มีความจำเพาะ (specificity) ระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนสูง มีความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบสูง ทำได้ง่ายและค่าใช้จ่ายไม่สูง และสามารถตรวจวัดได้ครั้งละหลายตัวอย่าง (Kantiani et al., 2010) จากรูปที่ 3 แสดงชุดตรวจสารในกลุ่มไนโตรฟูแรนโดยวิธี ELISA ที่มีจำหน่ายอยู่ในปัจจุบัน ซึ่งจะประกอบไปด้วยจานเพลทชนิด 96 หลุม แอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับสารที่ต้องการตรวจบัฟเฟอร์ สับสเตรท จะเห็นว่าในการวิเคราะห์ 1 ครั้ง สามารถตรวจได้มากถึงประมาณ 40 ตัวอย่าง สำหรับการตรวจตัวอย่างละ 2 ซ้ำ

ส่วนประกอบหลักที่สำคัญในการตรวจด้วยวิธี ELISA ได้แก่ แอนติบอดีที่สามารถจดจำสารได้อย่างจำเพาะ โดยมีผู้วิจัยทำการผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) จากกระต่าย โดยพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ครั้งแรกสามารถตรวจวัดสาร AOZ และได้นำมาประยุกต์ใช้ตรวจหาสาร AOZ ที่ตกค้างในกุ้งได้เป็นผลสำเร็จ (Cooper et al., 2004) หลังจากนั้นได้มีการผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีสำหรับตรวจวัดสาร AMOZ (Cooper et al., 2004) และ AHD (Liu et al., 2007) เป็นผลสำเร็จ โดยแอนติบอดีต่อ AHD นี้ สามารถหาสารได้ในปริมาณที่ต่ำกว่าค่า MRPL (1 ppb) แต่พบว่าแอนติบอดีนี้ทำปฏิกิริยาข้าม (cross-reactivity) กับสาร NFT ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ AHD ด้วย

นอกจากการใช้พอลิโคลนอลแอนติบอดีแล้ว ยังได้มีผู้วิจัยทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) โดยการหลอมรวมเซลล์ระหว่างเซลล์ม้าม (splenocyte) ของสัตว์ทดลองที่ได้รับการฉีดกระตุ้นภูมิ และเซลล์มัยอีโลมา (myeloma cell) เพื่อให้ได้เซลล์ลูกผสม (hybridoma cell) ที่สามารถผลิตมอโนโคลนอลแอนติบอดี และนำแอนติบอดีชนิดนี้ไปใช้กับเทคนิค ELISA เพื่อตรวจวัดสาร AMOZ ในเนื้อหมู ซึ่งสามารถตรวจวัดได้ในช่วงความเข้มข้น 0–10.5 ppb และสามารถตรวจสาร AMOZ ตกค้างในกุ้งได้ในช่วงความเข้มข้น 0–32.1 ppb (Diblikova et al., 2005) ในปี 2007 ได้มีการใช้มอโนโคลนอลแอนติบอดีตรวจวัดสาร SEM ซึ่งการตรวจวัดให้ผลการตรวจที่มีความแม่นยำสูง โดยมีค่าความเข้มข้นของสารแข่งขันที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลงครึ่งหนึ่งเมื่อไม่มีสารแข่งขัน (50% of inhibition concentration, IC_{50}) อยู่ที่ 1.3 ppb และมอโนโคลนอลที่ผลิตได้นี้ไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับสารตัวอื่น ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาเพื่อใช้สำหรับตรวจคัดกรองสาร SEM ตกค้างได้ต่อไป (Gao et al., 2007) ในปีถัดมา Chang et al. (2008) ได้ผลิตแอนติบอดีตรวจสาร AOZ ที่ตกค้างในปลา เนื้อหมู และเนื้อไก่ โดยสามารถตรวจสารได้ในปริมาณที่ต่ำได้ถึง 0.3 ppb ส่วนในประเทศไทยได้มีรายงานการผลิตมอโนโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อสาร AMOZ ที่มีความจำเพาะสูงและสามารถตรวจวัดสารเมแทบอไลต์นี้ได้ในปริมาณต่ำกว่าค่า MRPLs ที่กำหนดไว้ที่ 1 ppb โดยทดสอบความสามารถสามารถในการใช้ตรวจวัด AMOZ ในกุ้งที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 0.16 ppb (Pimpitak et al., 2009) ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยรวมในการตรวจด้วยวิธี ELISA จะใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมงสำหรับการตรวจ 1 ชุดตัวอย่าง (ประมาณ 40 ตัวอย่าง) ขณะที่วิธีทางเคมีจะใช้เวลาประมาณ 0.5 ชั่วโมงสำหรับการตรวจ 1 ตัวอย่าง

ตารางที่ 1 ตัวอย่างการตรวจวัดยาปฏิชีวนะกลุ่มไนโตรฟูแรนในอาหารสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์โดยวิธีต่าง ๆ

วิธีการวิเคราะห์	ชนิดตัวอย่าง	สารที่ตรวจ	ปริมาณที่ตรวจได้	เอกสารอ้างอิง
FI-CL	อาหารสัตว์	FZD, FTD, NFT, NFZ	0.27–1.63 ppm	Thongsrisomboon et al., 2010
HPLC	อาหารปลายี่ห้อ	NFZ, NFT	48.2-90.3 ppm	Li et al., 2010
	อาหารโคกระบือ	NTX, FZD	6.0-48.8 ppm	
LC-MS/MS	เนื้อหมู	AMOZ, AOZ	0.1 ppb	Keeffe et al., 2004
		SEM	0.2 ppb	
		AHD	0.5 ppb	
ELISA	อาหารปลาและ อาหารโคกระบือ	FZD, FTD, NFT, NFZ	52.8-96.0 ppm	Li et al., 2010
	เนื้อกุ้ง	AMOZ	0.16 ppb	Pimpitak et al., 2009
	เนื้อหมูและกุ้ง	AMOZ	0-32.1 ppb	Diblikova et al., 2005
	เนื้อปลา เนื้อหมู และเนื้อไก่	AOZ	0.3 ppb	Chang et al., 2008

หมายเหตุ: AHD = 1-aminohydantoin, AOZ = 3-amino-2-oxazolidinone, AMOZ = 3-amino-5-morpholino-methyl-1,3-oxazolidinone, FTD = furaltadone, FZD = furazolidone, NFT = nitrofurantoin, NFX = nifuroxazide, NFZ = nitrofurazone, SEM = semicarbazide

สรุป

จากอันตรายของสารตกค้างที่มีผลกระทบโดยตรงต่อผู้บริโภค ทำให้ทุกฝ่ายตระหนักถึงความสำคัญของการปนเปื้อนของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์สำหรับการบริโภค จึงมีการประกาศห้ามใช้สารกลุ่มไนโตรฟูแรน ส่งผลให้ต้องมีการตรวจสารดังกล่าวที่อาจตกค้างในผลิตภัณฑ์ ทำให้มีการคิดค้นวิธีในการตรวจวัดสารตกค้างที่เหมาะสมกับการใช้งาน โดยวิธีที่ใช้ตรวจสารตกค้างในกลุ่มไนโตร-ฟูแรนต้องสามารถตรวจสารตกค้างได้ต่ำถึง 1 ppb คณะผู้เขียนเห็นว่าในแต่ละวิธีตรวจวิเคราะห์ก็มีข้อเด่นและข้อด้อยที่แตกต่างกัน สำหรับตัวอย่างที่มีจำนวนมาก ควรใช้วิธีการตรวจวัดทางวิทยาภูมิคุ้มกันในการตรวจคัดกรอง เมื่อพบตัวอย่างต้องสงสัยจึงทำการตรวจซ้ำเพื่อยืนยันผลด้วยการตรวจวัดทางเคมีต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Balizs, G. and Hewitt, A. (2003). Determunation of veterinary drug residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. Analytica Chimica Acta. 492: 105-131.

Barbosa, J., Moura, S., Barbosa, R., Ramos, F. and Noronha da Silveira, M, I. (2007). Determination of nitrofurans in animal feeds by liquid chromatography-UV photodiode array detection and liquid chromatography-ionspray tandem mass spectrometry. Analytica Chimica Acta 586: 359-365.

Cháfer-Pericás, C., Maquieira, Á. and Puchades, R. (2010). Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. Trac-Trends in Analytical Chemistry 299.

Chang, C., Peng, D. P., Wu, J. E., Wang, Y. L. and Yuan, Z, H. (2008). Development of an indirect competitive ELISA for the detection of

furazolidone market residue in animal edible tissues. Journal of Agriculture and Food Chemistry 56: 1525-1531.

Cooper, M, K., Caddell, A., Elliott, T, C. and Kennedy, G, D. (2004). Production and characterization of polyclonal antibodies to a derivative of 3-amino-2-oxazolidinone, a metabolite of the nitrofuran furazolidone. Analytica Chimica Acta 520: 79-86.

Cooper, K. M., and Kennedy D. G. (2007). Stability studies of the metabolites of nitrofuran antibiotics during storage and cooking. Food Additives and Contaminants 24: 935-942.

Diblikova, I., Cooper, M, K., Kennedy, G, D. and Franek, M. (2005). Monoclonal antibody-based ELISA for the quantification of nitrofuran meyabolite 3-amino-2-oxazolidinone in tissue using a simplified sample preparation. Analytica Chimica Acta 540: 285-292.

Draisci, R., Giannetti, L., Llucentini, L., Palleschi, L., Brambilla, G., Sherpe, L. and Gallo, P. (1997). Determination of nitrofuran residues in avain eggs by liquid chromatography UV photodiode array detection and confirmation by liquid chromatography ionspray mass spectrometry. Journal of Chromatography A 777: 201-211.

Gao, A., Chen, Q., Cheng, Y., Lei, J. and Zeng, L. (2007). Preparation of monoclonal antibodies against a derivative of semicarbazide as a metabolic target of nitrofurazone. Analytica Chimica Acta 592: 58-63.

Kantiani, L., Llorca, M., Sanchis, J., Farre, M. and Barcelo, D. (2010). Emerging food contamination: a review. Analytical and Bioanalytical Chemistry 398: 2413-2427.

Keeffe, O, M., Conneely, A., Cooper, M, K., Kennedy, G, C., Kovacsics, L., Fodor, A., Mulder, J, P, P., Rhijn, A, J. and Triqueros, G. (2004). Nitrofuran antibiotic residues in pork; The FoodBrand retail survey. Analytica Chimica Acta 520: 125-131.

Khong, S. P., Gremaud, E., Richoz, J., Delatour, T., Guy, P. A., Stadler, R. H. and Mottier, P. (2004). Analysis of matrix bound nitrofuran residues in worldwide-originated honeys by isotope dilution high-performance liquid chromatography-tandem mass spectro metry. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52: 5309-5315.

Kumar, L., Toothill, J. R. and Ho, K. B. (1994). Determination of nitrofuran residues in poultry muscle tissues and eggs by liquid-chromatography. Journal of AOAC International 77: 591-595.

Leitner , A., Zollner, P. and Lindner, W. (2001). Determination of the metabolites of nitrofuran antibiotics in animal tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 939: 49-58.

Li, J., Liu, J., Zang, C, H., Li, H. and Wang, P, J. (2010). Broad specificity indirect competitive immunoassay for determination of nitrofurans in animal feeds. Analytica Chimica Acta. 678: 1-6.

Liu, W., Zhao, C., Zhang, Y., Lu, S., Liu, J. and Xi, R. (2007). Preparation of polyclonal antibodies to a derivative of 1-aminohydantoin (AHD) and development of an indirect competitive ELISA for the detection of nitrofurantoin residue in water. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55: 6829-6834.

Thongsrisomboon, P., Liawruangrath, B., Liawrungrath, S. and Sateinperakul, S. (2010). Determination of nitrofurans residues in

animal feeds by flow injection chemiluminescence procedure. Food Chemistry 123: 834-839.

Pimpitak, U., Puthong, S., Komolphis, K., Petsom, A. and Palaga, T. (2009). Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of the furaltadone metabolite, AMOZ, in fortified shrimp samples. Food Chemistry 116: 785-791.

Vass, M., Diblikova, I., Cernoch, I. and Franek, M. (2008). ELISA for semicarbazide and its application for screening in food contamination. Analytica Chimica Acta 608: 86-94.

❑❑❑❑❑