

การสำรวจปริมาณสารตกค้างไนโตรฟูแรนเมตาบอไลต์ในกุ้งขาวแวนนาไม
(*Litopenaeus vannamei*) จากตลาดสดพื้นที่กรุงเทพมหานคร

Surveillance of Nitrofuran Metabolite Residue in
Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) at Local Market in Bangkok

ณัชนน หวังวิบูลย์กิจ¹ อพัชชา จินดาประเสริฐ¹ ไสรยา เกิดพิบูลย์¹ และ อติสร เสวตวิวัฒน์^{1*}
Nutchamon Wangwibulkit¹, Aphacha Jindaprasert², Soraya Kerdpi boon² and Adison Swetwathana^{1*}

บทคัดย่อ

การศึกษาและตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารตกค้างไนโตรฟูแรนเมตาบอไลต์ในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) จากตลาดสดในพื้นที่กรุงเทพมหานคร จำนวน 5 แห่ง โดยสำรวจและเก็บตัวอย่างกุ้งขาวขนาดน้ำหนัก 9.20 ± 0.79 ถึง 31.00 ± 0.67 กรัม นำตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณไนโตรฟูแรนในรูปของเมตาบอไลต์ชนิด 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone (AMOZ), 1-aminohydantoin (AHD) และ semicarbazide (SEM) ด้วยวิธี LC-MS/MS ผลการวิเคราะห์พบสารไนโตรฟูแรนเมตาบอไลต์เฉพาะชนิด SEM ปริมาณระหว่าง 0.104-0.160 ไมโครกรัมต่อกรัม มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของขนาดกุ้งขาวกับปริมาณ SEM เชิงเส้นตรงทางลบ ($r = -0.6867$) โดยมีแนวโน้มพบสารตกค้าง SEM ในกุ้งขาวขนาดใหญ่ น้อยกว่ากุ้งขาวขนาดเล็ก ดังนั้นขนาดกุ้งขาวสามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดในการเลือกซื้อกุ้งขาวเพื่อการบริโภคที่มีความปลอดภัยจากสารตกค้าง ไนโตรฟูแรนเมตาบอไลต์โดยเลือกกุ้งขาวที่มีขนาดใหญ่จะมีความปลอดภัยจากสารตกค้างไนโตรฟูแรนเมตาบอไลต์ มากกว่ากุ้งขาวขนาดเล็ก

คำสำคัญ: ไนโตรฟูแรนเมตาบอไลต์ กุ้งขาวแวนนาไม กรุงเทพมหานคร

Abstract

The study aimed to analyze nitrofuran metabolite residues in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from the 5 local markets in Bangkok. The samples weighing from 9.20 ± 0.79 to 31.00 ± 0.67 g were analyzed for nitrofuran metabolites: 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone (AMOZ), 1-aminohydantoin (AHD) and semicarbazide (SEM) by using LC-MS/MS technique. The results showed that only SEM in the range 0.104-0.160 ug/kg was found. The correlation coefficient between weight and SEM showed the negative linearity ($r = -0.6867$). It was found that there were less SEM residues in large shrimps than small shrimps. Therefore, the size of white shrimp can be used as an index for purchasing shrimp that are safe for consumers.

Keywords: nitrofuran metabolite, Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, Bangkok

¹คณะอุตสาหกรรมอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

¹School of Food Industry, King Mongkut's Institute of Technology, Ladkrabang, Bangkok 10520

*Corresponding author, Email: adisorn.sw@kmitl.ac.th

คำนำ

กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) หรือโดยทั่วไปเรียกกันว่า “กุ้งขาว” เป็นสัตว์น้ำที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย เนื่องจากเป็นสินค้าส่งออกและสร้างรายได้มูลค่าสูงให้กับประเทศ ในปี 2563 มีปริมาณการส่งออก 114,398.93 ตัน มูลค่า 34,096.17 ล้านบาท คิดเป็น 76.53% และ 76.68% ของปริมาณ และมูลค่าการส่งออกกุ้งทะเลทั้งหมด ตลาดส่งออกที่สำคัญ ได้แก่ สหรัฐอเมริกา 35.41% ญี่ปุ่น 22.25% จีน 13.54% เกาหลีใต้ 5.42% และประเทศอื่นๆ 23.38% โดยผลผลิตกุ้งขาวจากการเลี้ยงแบบพัฒนาในปี 2563 มีผลผลิต 245,644.08 ตัน (Department of Fisheries [DoF], 2021; Sritrakul & Lungkapon, 2021) พื้นที่เลี้ยงกุ้งขาวบางส่วนอยู่ในพื้นที่ใกล้เคียงกรุงเทพมหานคร เช่น จังหวัดฉะเชิงเทรา สมุทรปราการ นครปฐม และสมุทรสาคร เป็นการเลี้ยงกุ้งขาวแบบพัฒนาโดยปล่อยกุ้งแบบหนาแน่น และมีการจัดการระบบการเลี้ยงที่ดี (DoF, 2021) แต่มีปัจจัยหลายประการที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดปัญหาการเลี้ยง เช่น สิ่งขั้บถ่าย อาหารที่เหลือตกค้าง คุณภาพน้ำที่ไม่เหมาะสมต่อกุ้งที่เลี้ยงในบ่อ ตลอดจนการเปลี่ยนแปลง ของฤดูกาลทำให้งุ้งอ่อนแอ และเกิดโรคต่างๆ โดยเฉพาะการติดเชื้อแบคทีเรียซึ่งเกษตรกรแก้ปัญหาโดยการ ใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น amoxicillin, ampicillin, ceftriaxone, ciprofloxacin, colistin และ oxytetracycline เมื่อมีการใช้ปริมาณมากทำให้เกิดการดื้อยา (Wiriyaakaradecha et al., 2020) จึงมีการนำยาปฏิชีวนะ ในกลุ่มไนโตรฟูแรนมาใช้แก้ปัญหาทำให้มีการตรวจพบสารตกค้างในกุ้งหลังการจับ ซึ่งสารกลุ่มไนโตรฟูแรนเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) และสารก่อกลายพันธุ์ (mutagen) ประเทศไทยได้เพิกถอนยาปฏิชีวนะกลุ่มนี้ออกจากทะเบียนตำรับยาที่ใช้สำหรับสัตว์ ห้ามนำเข้า และห้ามผลิตอาหารสัตว์ที่มีส่วนผสมไนโตรฟูแรนในอาหารสัตว์ทุกชนิดตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 151 นอกจากนี้สหภาพยุโรป สหรัฐอเมริกา และอีกหลายประเทศได้ออกกฎหมายห้ามใช้ยาปฏิชีวนะกลุ่มไนโตรฟูแรนในอาหารสัตว์ที่เลี้ยง เพื่อการบริโภคของมนุษย์ (Fernando et al., 2017)

ไนโตรฟูแรน (nitrofurans) เป็นยาปฏิชีวนะสังเคราะห์ที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียใช้ในการรักษา และป้องกันโรคติดเชื้อในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและปศุสัตว์ ยากลุ่มนี้ ได้แก่ furazolidone (FZD) furaltadone (FTD) nitrofurantoin (NFT) และ nitrofurazone (NFZ) ขบวนการเมตาบอลิซึมในสัตว์ จะเปลี่ยนเป็น สารเมตาบอไลต์จับตามเนื้อเยื่อโปรตีนได้นานหลายสัปดาห์ ทำให้สามารถตรวจสอบยาในกลุ่มนี้ในรูปสารเมตาบอไลต์ ได้แก่ 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ) 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone (AMOZ) 1-aminohydantoin (AHD) และ semicarbazide (SEM) ตามลำดับ (Figure 1) การวิเคราะห์ไนโตรฟูแรนเมตาบอไลต์ ในเนื้อสัตว์ด้วยวิธี LC-MS/MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometer/Mass Spectrometer) เป็นวิธีการที่นิยมใช้เนื่องจากมีความแม่นยำและเที่ยงตรงสูง (Chu & Lopez, 2005; Chumanee et al., 2009; An et al., 2012; Elizabeta et al., 2012; Payanan & Kaewklapanacharoen, 2015; Veach et al., 2015; Fernando et al., 2017) โดยทำการสกัดตัวอย่าง ให้บริสุทธิ์และใช้สถานะของ LC แตกต่างกันหลักการสกัดคือสลายพันธะของไนโตรฟูแรนเมตาบอไลต์ที่จับกับโปรตีน (protein-bound metabolites) ให้อยู่ในรูปอิสระด้วยกรด (hydrolysis) เปลี่ยนไนโตรฟูแรนเมตาบอไลต์ (total nitrofurans metabolites: free and protein-bound metabolites) เป็นสารอนุพันธ์ของ nitrophenyl (NP) โดยทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ (derivatisation) กับ 2-nitrobenzaldehyde (2-NBA) ปรับ pH ให้เป็นกลาง (neutralisation) สกัดแยกสาร (liquid-liquid extraction) ด้วย ethyl acetate ทำให้แห้งแล้วละลายในตัวทำละลายนำไปวิเคราะห์ปริมาณและชนิดสารด้วยเครื่อง LC-MS/MS

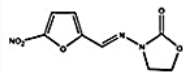
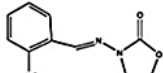
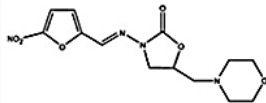
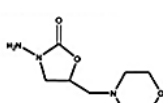
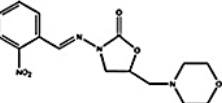
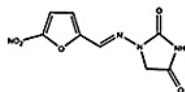
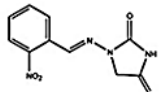
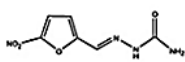
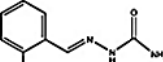
Nitrofurazone	Hydrolysed marker residue	Derivative for LC-MS/MS
Furazolidone 	3-amino-oxazolidinone (AOZ) 	NPAOZ 
Furaltadone 	3-amino-5-morpholino-methyl-2-oxazolidinone (AMMZ) 	NPAMMZ 
Nitrofurantoin 	1-aminohydantoin (AHD) 	NPAHD 
Nitrofurazone 	semicarbazide (SEM) 	NPSEM 

Figure 1 Structures of nitrofurans, their marker metabolites and nitrophenyl derivatives.

ที่มา: ดัดแปลงจาก Points et al. (2015)

ปัจจุบันผลผลิตกุ้งขาวส่งออกมีการจัดการให้ได้มาตรฐานการปฏิบัติทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่ดี (Good Aquaculture Practice, GAP) และมาตรฐานฟาร์มกุ้ง (Code of Conduct, CoC) เพื่อให้ได้ผลผลิตกุ้งขาว ที่มีคุณภาพและมีความปลอดภัยตามมาตรฐานที่กำหนดโดยกระบวนการผลิตที่ปลอดภัยต่อผู้ผลิตและผู้บริโภค โดยเฉพาะการใช้ยาและสารเคมีในระหว่างการผลิต และการตรวจสอบสารตกค้างในสินค้าสัตว์น้ำหลังการจับ (DoF, 2021) เพื่อให้ได้มาตรฐานการส่งออกตามความต้องการของประเทศผู้รับซื้อ ผลผลิตกุ้งขาว แวนนาไมที่จำหน่ายภายในประเทศมีการขายตรงจากฟาร์มโดยอาจไม่มีการตรวจสอบคุณภาพ ดังนั้นการตรวจหา ยาปฏิชีวนะตกค้างในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำมีความจำเป็นเพื่อยืนยันความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ เนื่องจากบางครั้ง ในทางปฏิบัติการเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนามีการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อแก้ปัญหาโรคที่เกิดจากแบคทีเรียแต่ไม่สามารถรักษา กุ้งขาวให้เป็นปกติได้ เกษตรกรจึงจำเป็นต้องจับกุ้งก่อนกำหนดทำให้อาจมีสารตกค้าง จากยาปฏิชีวนะและกุ้งมีขนาดเล็ก ไม่ได้มาตรฐานส่งออกทำให้ไม่สามารถจำหน่ายเป็นสินค้าส่งออกได้ ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจ กุ้งขาวจากตลาดสดในพื้นที่กรุงเทพฯ และนำมาตรวจวิเคราะห์ปริมาณ ยาปฏิชีวนะในโตรฟูแรนที่ตกค้างในกุ้งขาว ขนาดต่างๆ โดยวิเคราะห์ในโตรฟูแรนในรูปของเมตาบอไลต์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS และนำข้อมูลมาวิเคราะห์ สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของน้ำหนักรังนกกุ้งขาว กับปริมาณสารตกค้าง ในโตรฟูแรนเพื่อเป็นแนวทางในการใช้ขนาดกุ้งขาว เป็นดัชนีในการเลือกซื้อกุ้งขาวที่จำหน่ายในตลาดสดให้มีความปลอดภัยจากสารตกค้างในโตรฟูแรนเมตาบอไลต์

วิธีการศึกษา

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างกุ้งขาวแวนนาไม

สำรวจและเก็บตัวอย่างกุ้งขาวจากตลาดสดในพื้นที่กรุงเทพมหานคร A, B, C, D และ E ซึ่งบางพื้นที่ ของ กรุงเทพฯ อยู่ใกล้จังหวัดที่มีการเลี้ยงกุ้งขาว เช่น พื้นที่ A อยู่ใกล้จังหวัดฉะเชิงเทราและสมุทรปราการพื้นที่ D อยู่ใกล้ จังหวัดนครปฐมและสมุทรสาครและพื้นที่ E อยู่ใกล้จังหวัดสมุทรปราการ (Figure 2) โดยการสำรวจ และสอบถาม แหล่งที่มาของผลผลิตกุ้งขาวที่นำมาจำหน่ายในช่วงเดือนมกราคม-มีนาคม 2565 แต่ละพื้นที่เก็บตัวอย่าง น้ำหนัก

9.20±0.79 ถึง 31.00±0.67 กรัม จำนวน 4 ตัวอย่าง 3 ซ้ำ นำตัวอย่างกุ้งขาวมาซึ่งน้ำหนักคำนวณขนาด บันทึกข้อมูล และแหล่งที่มาของกุ้งขาว

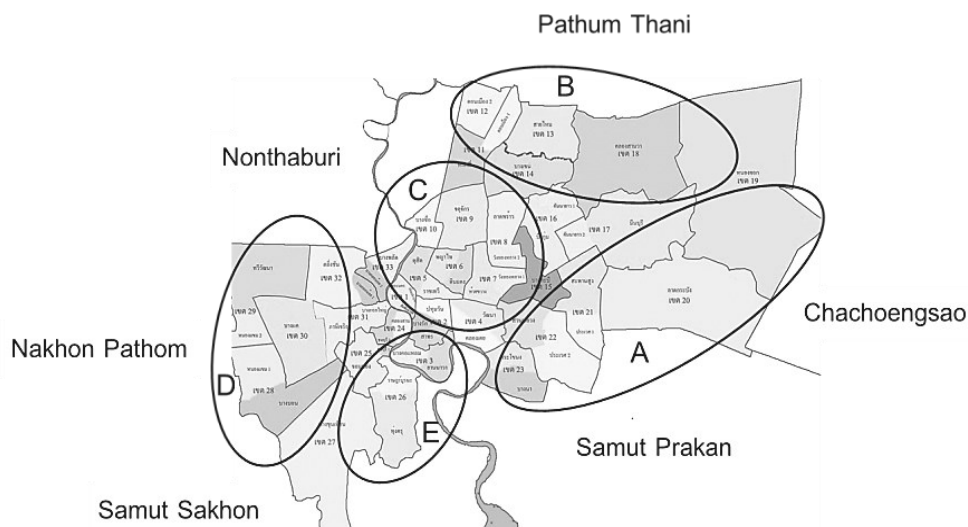


Figure 2 The sampling areas: A, B, C, D and E of local market in Bangkok.

2. การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรฟูแรนเมตาบอไลต์ตกค้างในกุ้งขาวแวนนาไม

เตรียมตัวอย่างกุ้งขาวโดยล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา ปอกเปลือกนำส่วนของเนื้อกุ้งไม่น้อยกว่า 300 กรัม นำมาปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องปั่นผสมอาหาร และเก็บรักษาตัวอย่างในตู้แช่แข็งอุณหภูมิไม่สูงกว่า -18 องศาเซลเซียส ก่อนการวิเคราะห์นำตัวอย่างมาละลายที่อุณหภูมิห้อง และทำการวิเคราะห์ภายใน 24 ชั่วโมง

เตรียมสารละลาย 50 mM 2-nitrobenzaldehyde (2-NBA), 0.1 M di-potassium hydrogen orthophosphate, 0.5 mM ammonium acetate ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$), mobile phase A (ammonium acetate:methanol อัตราส่วน 4:1), methanol:deionized water อัตราส่วน 1:1 และ mobile phase B (methanol)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน stock standard solution AOX, AMOX, AHD และ SEM ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, working mixed standard solution AOX และ AMOX ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร AHD และ SEM ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ AOX, AMOX, AHD, SEM ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียมตัวอย่างทดสอบ total residue ซึ่งตัวอย่างที่บดแล้ว 1.000±0.020 กรัม ใส่ในหลอดพลาสติกฝาเกลียวชนิด polypropylene ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำ deionized water 4 มิลลิลิตร เติมน้ำ 1 M hydrochloric acid 500 ไมโครลิตร เติมน้ำ 50 mM 2-NBA 150 ไมโครลิตร และสารมาตรฐาน working mixed internal standard 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 100 ไมโครลิตร นำไปปั่นผสมเข้ากันด้วยเครื่องปั่นตัวอย่าง แล้วนำไปต้มใน water bath ควบคุมอุณหภูมิที่ 37±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16±2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมน้ำ 0.1 M di-potassium hydrogen phosphate 5 มิลลิลิตร และสารละลาย 1 M sodium hydroxide 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารเคมีประมาณ 30 วินาที วัดค่า pH ด้วยกระดาษวัด pH ให้ได้ pH ประมาณ 7 * เติมน้ำ ethyl acetate ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และกลับสารละลายตัวอย่าง ในหลอดไปมาด้วยมืออย่างช้าๆ ประมาณ 1 นาที นำไปเหวี่ยง ตกตะกอนด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาทีถ่ายชั้นสารละลาย ethyl acetate ลงในหลอดทดลอง ขนาด 20x150 มิลลิเมตรหลังจากนั้นทำขั้นตอนซ้ำโดยเริ่มเติมน้ำ ethyl acetate ตาม * อีก

ครั้ง นำสารละลาย ไประเหยให้แห้งภายใต้แก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 50 ± 5 องศาเซลเซียส เติมสารละลายผสมระหว่าง methanol:deionized water ในอัตราส่วน 1:1 จำนวน 400 ไมโครลิตร ในตัวอย่าง ที่ผ่านการ ระเหยแห้งแล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารเคมีเพื่อสารละลายตัวอย่างใน microcentrifuge tube ขนาด 0.5 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำสารละลายตัวอย่างมากรองด้วย nylon filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ลงใน vial ตรวจวัดด้วยเครื่อง LC-MS/MS สภาวะเครื่อง HPLC (column:atlantis C18, 5 ไมโครเมตร, 2.1×150 มิลลิเมตร, flow rate:0.20 มิลลิลิตรต่อนาที run time:16 นาที inject volume:20 ไมโครลิตร solvent temperature 30 องศาเซลเซียส mobile phase A:ammonium acetate 50 mM, mobile phase B:methanol)

การควบคุมคุณภาพการทดสอบ: เตรียมตัวอย่าง reagent blank โดยนำหลอดพลาสติกฝาเกลียวชนิด polypropylene ขนาด 50 มิลลิลิตร โดยไม่ใส่ตัวอย่างทดสอบ นำไปวิเคราะห์ตามขั้นตอนการทดสอบในรูปแบบ total residue

เตรียม fortified sample เพื่อหา %recovery ซึ่งน้ำหนักตัวอย่างที่บดแล้ว 1.000 ± 0.020 กรัม ใส่ในหลอดพลาสติกฝาเกลียวขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวน 3 หลอดตัวอย่างหลอดที่ 2 และ 3 ปิดเปิด working mixed standard solution AOZ, AMOZ 6 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ AHD, SEM 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดพลาสติกซึ่งตัวอย่างจะมีความเข้มข้น AOZ, AMOZ 0.3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้น AHD, SEM 1.00 ng/ml เติม deionized water 4 มิลลิลิตร เติม 1 M hydrochloric acid 500 ไมโครลิตร เติม 2-NBA 150 ไมโครลิตร สารมาตรฐาน working mixed internal standard 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 100 ไมโครลิตร และนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง homogenizer

นำไปวิเคราะห์ตามขั้นตอนการทดสอบในรูปแบบ total residue

เตรียมตัวอย่างทดสอบซ้ำ (duplicate) โดยใช้ผลจาก fortified sample มาคำนวณค่า %RPD (Relative percent difference)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน เพื่อทำ calibration curve ในรูปแบบ total residue เตรียมสารละลายมาตรฐานทั้ง 4 ชนิดที่มีความเข้มข้น 0.0, 0.1, 0.25, 0.50, 1.0 และ 2.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเปิด working mixed standard solution AOZ, AMOZ, AHD, SEM 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 0, 10, 25, 50, 100 และ 200 ไมโครลิตร ตามลำดับ เติม deionized water 4 มิลลิลิตร เติม 1 M hydrochloric acid จำนวน 500 ไมโครลิตร เติม O-NBA จำนวน 150 ไมโครลิตรและเติม working mixed internal standard 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร นำไปผสมโดยใช้เครื่องเขย่านำไปวิเคราะห์ตามขั้นตอนการทดสอบในรูปแบบ total residue

ขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC/MS/MS รุ่น The Waters 2695 Separations Module การทดสอบความสามารถของระบบ (system suitability) โดยทำการฉีด working standard solutions 0.0, 0.10, 0.25, 0.50, 1.00 และ 2.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากความเข้มข้นน้อยไปหามากอย่างละ 1 ครั้ง เพื่อสร้าง calibration standard curveและฉีด reagent blank ทุกครั้ง หลังจากสร้าง calibration curve โดยค่า reagent blank ต้องน้อยกว่า LOD ทำการฉีดสารละลายตัวอย่างและตัวอย่าง QC และฉีด working standard solutions 0.0, 0.10, 0.25, 0.50, 1.00 และ 2.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร อีกครั้ง จากความเข้มข้นน้อยไปหามากอย่างละ 1 ครั้ง ซึ่งการควบคุมคุณภาพการทดสอบให้เป็นไปตามเกณฑ์ค่า $r \geq 0.995$ ค่า %recovery อยู่ในช่วง 50-120% ค่า %RPD $\leq 10\%$

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลน้ำหนักกุ้งขาวจากตลาดสดพื้นที่กรุงเทพฯ กับปริมาณสารตกค้างไนโตรฟูแรนเมตาบอไลต์ มาวิเคราะห์ทางสถิติหาสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson correlation coefficients) เพื่อเป็นแนวทางสำหรับการใช้ขนาดกุ้งขาวเป็นดัชนีชี้วัดในการเลือกซื้อกุ้งขาวที่ปลอดภัยจากการตกค้าง

ผลการศึกษาและวิจารณ์

1. ผลสำรวจและเก็บตัวอย่างกุ้งขาวแวนนาไมจากตลาดสดในพื้นที่กรุงเทพมหานคร

ผลการสำรวจและเก็บตัวอย่างกุ้งขาวจากตลาดสดในพื้นที่กรุงเทพมหานคร A, B, C, D และ E ซึ่ง DoF (2021) รายงานว่าในปี พ.ศ. 2563 จังหวัดฉะเชิงเทรามีผลผลิตกุ้งขาว 23,830 ตัน (ใกล้พื้นที่ A) จังหวัดสมุทรสาครมีผลผลิตกุ้งขาว 11,724 ตัน (ใกล้พื้นที่ D) และจังหวัดสมุทรปราการมีผลผลิตกุ้งขาว 8,690 ตัน (ใกล้พื้นที่ E) จะเห็นได้ว่าพื้นที่รอบบริเวณกรุงเทพฯ มีผลผลิตกุ้งขาวปริมาณมากที่ส่งไปจำหน่ายยังแพกุ้ง ตลาดกลางกุ้ง และบางส่วนส่งไปจำหน่ายยังตลาดสดในพื้นที่กรุงเทพฯ ที่อยู่ใกล้ฟาร์มโดยตรงผลจากการสำรวจและเก็บตัวอย่างกุ้งขาวนำมาวิเคราะห์ขนาดที่แตกต่างกันโดยมีน้ำหนักตั้งแต่ 9.00 ± 0.67 ถึง 31.00 ± 0.67 กรัม (Table 1) พบว่ากุ้งขาว ที่นำมาจำหน่ายในตลาดสดพื้นที่ B, C และ E รับซื้อมาจากตลาดกลางกุ้งส่วนในพื้นที่ A รับซื้อกุ้งขาวมาจากฟาร์มเลี้ยง และพื้นที่ D รับซื้อกุ้งขาวมาจากฟาร์มเลี้ยง และตลาดกลางกุ้ง จากการสำรวจร้านค้าพบว่าผู้ค้ารายย่อยขนาดเล็ก รับซื้อกุ้งขาวจากฟาร์มมาจำหน่ายในปริมาณน้อยและมีขนาดให้เลือกซื้อไม่มาก ส่วนผู้ค้ารายย่อยที่มีร้านค้าขนาดใหญ่ รับซื้อกุ้งขาวจากตลาดกลางกุ้งมาจำหน่ายในปริมาณมากและมีขนาดกุ้งขาวให้เลือกซื้อมากกว่า แต่การรับซื้อกุ้งขาว จากตลาดกลางนั้นไม่สามารถทราบแหล่งที่มาที่แน่นอนได้ เนื่องจากการรวบรวมผลผลิตจากฟาร์มกุ้งขาวหลายพื้นที่

2. ผลการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรฟูแรนเมตาบอไลต์ตกค้างในกุ้งขาวแวนนาไม

การวิเคราะห์ชนิด และปริมาณไนโตรฟูแรนเมตาบอไลต์ตกค้างในกุ้งขาวด้วยวิธี LC-MS/MS โดยวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิด 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone (AMOZ), 1-aminohydantoin (AHD) และ semicarbazide (SEM) ด้วยเครื่องวิเคราะห์ LC-MS/MS ช่วงการวิเคราะห์ที่ 0.0-2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม การควบคุมคุณภาพการทดสอบเป็นไปตามเกณฑ์ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) เป็นเส้นตรงมีค่า $r = 0.9992-0.9999$ (Figure 3) ความแม่นยำมีค่า %recovery = 93.89-116.88% ค่า %RPD = 0.5-4.0 จากผลการวิเคราะห์ไนโตรฟูแรนเมตาบอไลต์ ตกค้างในตัวอย่างกุ้งขาวที่สุ่มมาจากตลาดสดพื้นที่กรุงเทพฯ ไม่พบไนโตรฟูแรนเมตาบอไลต์ AOZ, AMOZ และ AHD แต่พบในรูป SEM ปริมาณ 0.104-0.160 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Table 1, Figure 4) ซึ่งมีปริมาณต่ำกว่าเกณฑ์ ที่กำหนดตามประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาที่กำหนดให้มีปริมาณสาร SEM น้อยกว่า 1.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Food and Drug Administration, 2006)

Table 1 The results of nitrofurantol metabolites (ug/kg) in each sampling areas.

Sampling areas	Shrimp weight (g)	Sources	SEM (ug/kg)
A		Shrimp farm	ND
	28.10±0.74	Shrimp farm	ND
	21.00±0.82	Shrimp farm	ND
	15.70±0.67	Shrimp farm	0.104±0.003
	9.20±0.79		
B		Central market	ND
	30.80±0.63	Central market	ND
	27.80±0.79	Central market	ND
	19.90±0.88	Central market	0.159±0.009
	9.60±0.52		
C		Central market	ND
	31.00±0.67	Central market	ND

	27.40±0.52	Central market	ND
	19.60±1.26	Central market	0.157±0.006
	9.80±0.63		
D		Shrimp farm	0.113±0.100
	30.50±0.71	Shrimp farm	0.142±0.006
	20.00±0.82	Central market	0.117±0.004
	12.70±0.82	Central market	0.160±0.004
	9.40±0.52		
E		Central market	ND
	30.60±0.84	Central market	ND
	22.20±0.79	Central market	ND
	17.10±0.88	Central market	0.104±0.004
	9.00±0.67		

Remark: ND = Not detected, N = 3 samples.

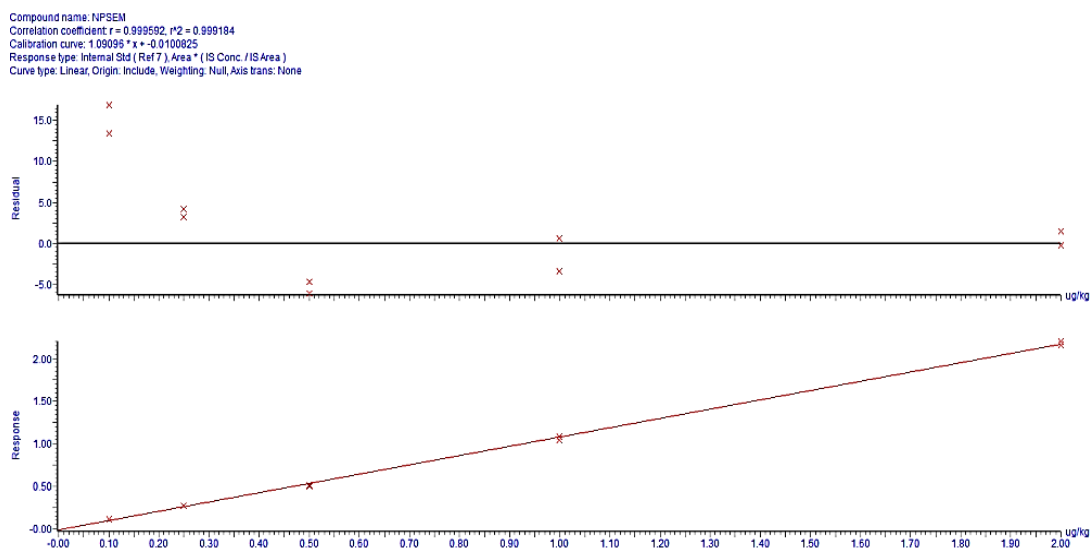


Figure 3 Linear regression curve of the SEM standard.

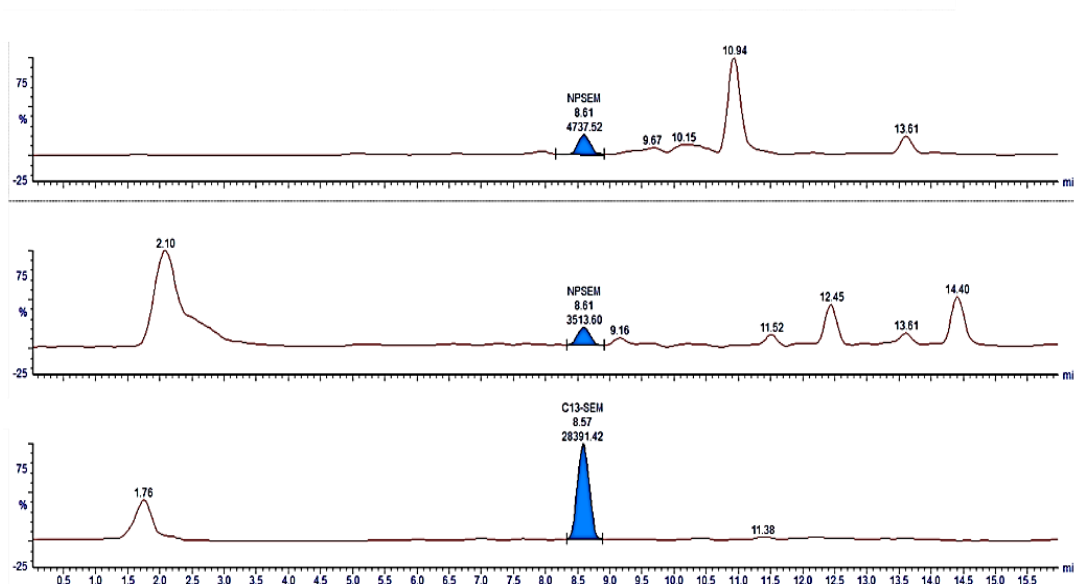


Figure 4 Chromatograms of SEM in shrimp.

3. การวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของขนาดน้ำหนักกุ้งขาวแวนนาไมกับปริมาณสารตกค้างไนโตรฟูแรนเมตาบอไลต์

ผลการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของน้ำหนักกุ้งขาวกับปริมาณไนโตรฟูแรนเมตาบอไลต์ SEM พบว่ามีค่า $r = -0.6878$ มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงทางลบอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยกุ้งขาวขนาดใหญ่ ที่มีน้ำหนักมากพบไนโตรฟูแรนเมตาบอไลต์ตกค้างน้อยกว่ากุ้งขนาดเล็กที่มีน้ำหนักน้อย (Figure 5) และผลการตรวจวิเคราะห์ไนโตรฟูแรนเมตาบอไลต์ตกค้างในกุ้งพบว่ามีปริมาณ SEM อยู่ในช่วง 0.104-0.160 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Table 1)

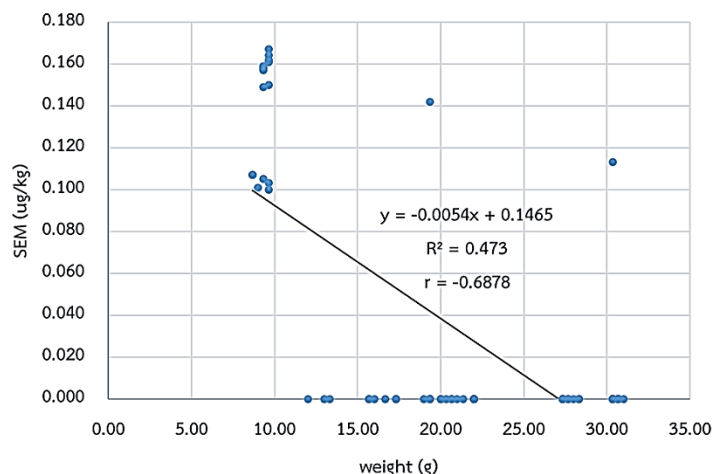


Figure 5 The correlation coefficient between weight (g) and SEM (ug/kg) in shrimp.

นำข้อมูลน้ำหนักกุ้งขาวทั้งหมดจาก Table 1 มาจัดแบ่งกุ้งขาวขนาดต่างๆ โดยแบ่งเป็นน้ำหนัก กุ้งขาวขนาดเล็ก 9-15 กรัม ขนาดกลาง 16-23 กรัม และขนาดใหญ่ 24-32 กรัม คำนวณเปอร์เซ็นต์กุ้งขาวที่พบ ไนโตรฟูแรนเมตาบอไลต์พบว่ากุ้งขาวขนาดเล็กตรวจพบไนโตรฟูแรนเมตาบอไลต์ 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ กุ้งขนาดกลาง และขนาดใหญ่ พบเพียง 14.29 เปอร์เซ็นต์ทั้งสองขนาด (Table 2) แต่ปริมาณที่พบ ยังต่ำกว่าเกณฑ์ที่กำหนดตามประกาศ

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ที่กำหนดให้มีปริมาณสาร SEM น้อยกว่า 1.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Food and Drug Administration, 2006) สาเหตุที่มีการตรวจพบไนโตรฟูแรนเมตาบอไลต์ ชนิด SEM ในกุ้งขนาดเล็กมากกว่าอาจเนื่องมาจากการเลี้ยงกุ้งชามักพบปัญหาการเกิดโรค ระหว่างการเลี้ยงโดยเฉพาะช่วงที่กุ้งยังมีขนาดเล็ก ดังนั้น การควบคุมการเลี้ยงให้ได้ผลผลิตที่ดี เกษตรกรจึงมีการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันปัญหาการเกิดโรคในระหว่างการเลี้ยงกุ้งขนาดเล็ก เมื่อพบว่ากุ้งเป็นโรค อาจเร่งจับขายทำให้ปริมาณยาตกค้างในกุ้ง เมื่อตรวจวิเคราะห์จึงพบสารตกค้าง ทั้งนี้ การปฏิบัติทางการ เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่ดีเพื่อให้ได้ผลผลิตสัตว์น้ำที่มีคุณภาพและปลอดภัยตามมาตรฐานที่กำหนดโดยกระบวนการผลิตต้องปลอดภัยกับทั้งผู้ผลิตและผู้บริโภค เมื่อมีการใช้ยาเพื่อรักษาโรคจะต้องมีระยะหยุดยาที่เหมาะสม เพื่อป้องกัน การตกค้างในกุ้งก่อนจับขาย ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าขนาดกุ้งขาวสามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดในการเลือกซื้อกุ้งขาวได้ โดยการศึกษาพบว่า กุ้งขาวที่มีขนาดใหญ่มีแนวโน้มพบไนโตรฟูแรนเมตาบอไลต์น้อยกว่ากุ้งขนาดเล็ก อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ดำเนินการเพียงช่วงเวลาหนึ่งและดำเนินการในบางพื้นที่ ควรมีการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อความชัดเจนของผล นอกจากนี้ตัวอย่างกุ้งขาวจากตลาดกลางที่รวบรวมจากแหล่งต่าง ๆ เป็นส่วนหนึ่ง ที่มีความสำคัญเนื่องจากอาจมาจากแหล่งเลี้ยงที่ไม่ได้มาตรฐาน ดังนั้น ผู้ซื้อควรเลือกซื้อจากแหล่งเลี้ยงที่ได้มาตรฐาน และตรวจสอบถึงแหล่งเลี้ยงได้

Table 2 Percentage of SEM found Shrimp.

Shrimp sizes (g)	Number of shrimp	Number of SEM found	(%)
9-15 (Small)	18	18	100
16-23 (Medium)	21	3	14.29
24-32 (Large)	21	3	14.29

สรุปผลการศึกษา

กุ้งขาวแวนนาไมที่จำหน่ายในตลาดสดพื้นที่กรุงเทพมหานคร ส่วนใหญ่เป็นผู้ค้ารายย่อยที่รับซื้อกุ้งขาว มาจากตลาดกลางและรับซื้อโดยตรงจากฟาร์มเลี้ยงที่อยู่ใกล้กับพื้นที่ตลาด โดยกุ้งขาวที่นำมาจำหน่ายมีน้ำหนัก 9.20 ± 0.79 ถึง 31.00 ± 0.67 กรัม การตรวจวิเคราะห์ปริมาณไนโตรฟูแรนเมตาบอไลต์ตกค้างในกุ้งขาวด้วยวิธี LC-MS/MS พบปริมาณไนโตรฟูแรนเมตาบอไลต์ชนิด SEM โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของขนาดน้ำหนัก กุ้งขาวกับปริมาณ SEM เชิงเส้นตรงทางลบแสดงว่ากุ้งขาวขนาดใหญ่มีแนวโน้มพบปริมาณ SEM ตกค้างน้อยกว่ากุ้งขาวขนาดเล็ก แต่ปริมาณที่พบในตัวอย่างกุ้งขาวมีปริมาณต่ำกว่าเกณฑ์ที่กำหนด ตามประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ดังนั้น ขนาดกุ้งขาวสามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดในการเลือกซื้อกุ้งขาว โดยซื้อกุ้งขาวขนาดใหญ่จะมีแนวโน้มพบสารตกค้างไนโตรฟูแรนเมตาบอไลต์น้อยกว่ากุ้งขาวขนาดเล็ก

เอกสารอ้างอิง

- An, H., Cain, T., Farly, D., Henry, M., Paek, C. H., & Tran, B. (2012). Determination of total nitrofurans metabolites in shrimp muscle using liquid chromatography/tandem mass spectrometry in the atmospheric pressure chemical ionization mode. *Journal of AOAC International*. 95(4), 1222-1233.
- Chu, P. & Lopez, M. I. (2005). Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of protein-bound residues in shrimp dosed with nitrofurans. *Agricultural and Food Chemistry*. 53, 8934-8939.
- Chumanee, S., Sutthivaiyakit, S., & Sutthivaiyakit, P. (2009). New reagent for trace determination of protein-bound metabolites of nitrofurans in shrimp using liquid chromatography with diode array detector. *Agricultural and Food Chemistry*. 57, 1752-1759.

- Department of Fisheries. (2008). Shrimp farming technique manual for CoC standard (Technical document for shrimp farm auditor). Samut Songkarm: Coastal Aquaculture Research and Development Center, Department of Fisheries. (in Thai).
- Department of Fisheries. (2021). **Statistics of marine shrimp culture 2020**. Fisheries Statistics Group, Fisheries Development Policy and Planning Division, Department of Fisheries. No. 10/20. (in Thai).
- Elizabeta, D., Gordana A., Zehra, H., Bilijana, S., Risto, U., Aleksandra, T. & Goran, S. (2012). In-house validation and quality control of commercial enzyme-linked immunosorbent assays for screening of nitrofurans metabolites in food of animal origin. **Macedonian Veterinary Review**. 35(1), 13-21.
- Elizabeta, D., Gordana A., Zehra, H., Bilijana, S., Risto, U., Aleksandra, T. & Goran, S. (2015). Quantitation of chloramphenicol and nitrofurans metabolites in aquaculture products using microwave-assisted derivatization, automated SPE, and LC-MS/MS. *Journal of AOAC International*. 98(3), 588-594.
- Fernando, R., Munasinghe, D. M. S., Gunasena, A. R. C., & Abeynayake, P. (2017). Determination of nitrofurans metabolites in shrimp muscle by liquid chromatography-photo diode array detection. **Food Control**. 72, 300-305.
- Food and Drug Administration. (2006). **Criteria, conditions and methods for the analysis of certain chemical contamination in food**. Retrieved from http://food.fda.moph.go.th/law/data/announ_fda/035ntffda_Criteria_For_Chem_Analysis (in Thai).
- Payanan, T. & Kaewklapanacharoen, L. (2015). Method development and validation for determination of nitrofurans metabolites in food by LC-MS/MS. **Bulletin of Department of the Medical Sciences**. 57(2), 91-108. (in Thai).
- Points, J., Burns, D. T., & Walker, M. J. (2015). Forensic issues in the analysis of trace nitrofurans veterinary residues in food of animal origin. **Food Control**. 50, 92-103.
- Sritrakul, C. & Lungkapon, P. (2021). **The situation of marine shrimp and products in 2020**. Retrieved from: <https://fisheries.go.th/strategy/fisheconomic/Monthly%20report/Shrimp>. (in Thai).
- Wiriyaakaradecha, S., Chuchird, N., Baoprasertkul, P., Somridhivej, B., & Pichitkul, P. (2020). Study on contamination of antimicrobial resistance in culture of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Thailand. **Khon Kaen Agricultural Journal**. 48(5), 1124-1133. doi:10.14456/kaj.2020.100. (in Thai).

วันรับบทความ (Received date) : 28 มิ.ย. 65

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 8 ก.ค. 65

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 8 ก.ค. 65