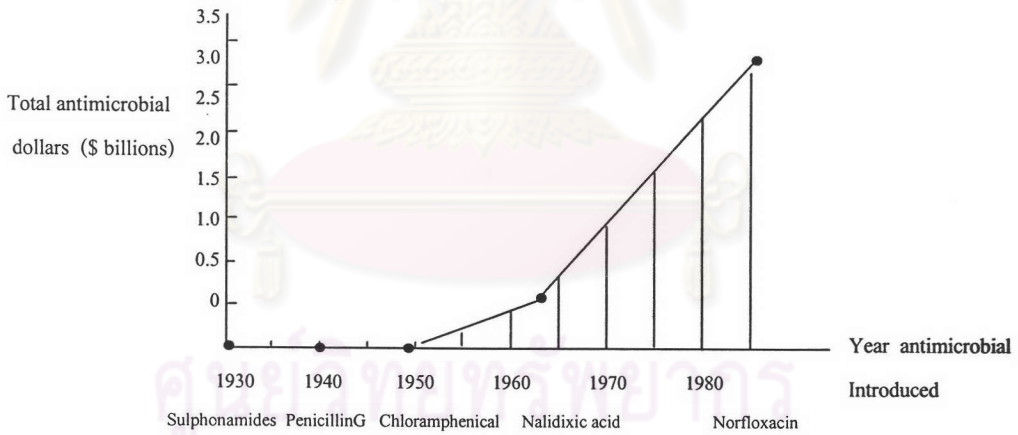
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

2.1.1 ยาต้านจุลชีพ

ยาต้านจุลชีพที่ใช้เพื่อรักษาโรคติดเชื้อ (antimicrobial chemotherapeutic agent) หรือ ยาต้านจุลชีพ (Antimicrobial drug) หมายถึง กลุ่มยาที่ออกฤทธิ์ต่อจุลชีพที่ทำให้เกิดโรคในร่างกาย มีฤทธิ์ต่อการเจริญเติบโต การแบ่งตัวหรือการมีชีวิตอยู่ของจุลชีพ (มาลินี,2525) เริ่มจากการใช้ยาในกลุ่มซัลโฟนาไมด์(Sulphonamides)ในปีค.ศ.1930 ส่วนสารในกลุ่มควิโนโลนมีการเริ่มใช้ในประเทศสหรัฐอเมริกาช่วงปี ค.ศ. 1963 ดังแสดงในรูปที่ 2.1 จนกระทั่งในปัจจุบันมีการใช้ยาต้านจุลชีพมากมายหลายชนิดแตกต่างกันไปตามแต่ละวัตถุประสงค์



รูปที่ 2.1 กราฟแสดงการใช้ยาต้านจุลชีพในประเทศสหรัฐอเมริกา (ดัดแปลงจาก Vincent,1989)

ยาต้านจุลชีพจะหมายความรวมถึงยาปฏิชีวนะ(antibiotic) ซึ่งเป็นยาที่ประกอบด้วยสารเคมีที่มีแหล่งกำเนิดผลิตเดิมจากสิ่งมีชีวิต เช่น จุลินทรีย์ พืช ภายหลังมีการสังเคราะห์แบบกึ่งสังเคราะห์ (ใช้การสังเคราะห์ทางเคมีร่วมกับการผลิตจากธรรมชาติ)ได้แก่ ยาในกลุ่มเพนนิซิลิน เตตราซัยคลินและยาที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี(synthetic antimicrobial agent)ซึ่งเป็นยาที่ประกอบด้วยสารเคมีสังเคราะห์ได้แก่ สารในกลุ่มควิโนโลน เป็นต้น

2.1.1.1 ประเภทของยาต้านจุลชีพ

ยาต้านจุลชีพสามารถจำแนกเป็นประเภทต่างๆได้หลายแบบขึ้นอยู่กับหลักเกณฑ์ในการจำแนก ดังนี้

1. จำแนกตามสูตรโครงสร้างทางเคมี

1.1 เบต้า-แลคแทม แอนตี้ไบโอติค เช่น เพนนิซิลลิน เซฟาโลสปอริน
1.2 แมคโครลีด เช่น อีริโทรมัยซิน
1.3 ลินโคซาไมด์ เช่น ลินโคมัยซิน
1.4 อะมิโนกลัยโคไซด์ เช่น เจนตามิซิน
1.5 เตตราซัยคลิน เช่น เตตราซัยคลิน
1.6 โพลีเปปไทด์ เช่น แวนโคมัยซิน
1.7 ซัลโฟนาไมด์ เช่น ซัลฟาไดอะซีน
1.8 ควิโนโลน เช่น นอร์ฟลอกซาซิน นาลิดิซิก แอซิด และฟลูมิควิน
1.9 กลุ่มอื่น ๆ เช่น คลอแรมเฟนิคอล ไนโตรฟูแรน

2. จำแนกตามขอบเขตการออกฤทธิ์

2.1 Broad spectrum ยาต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ หรือออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน นอกจากนี้ยังอาจครอบคลุมโปรโตซัวและริกเกตเซีย ได้แก่ เตตราซัยคลิน คลอแรมเฟนิคอล

2.2 Medium spectrum ยาต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียแกรมบวกหรือแกรมลบบางชนิดเท่านั้น ได้แก่ ซัลโฟนาไมด์

2.3 Narrow spectrum ยาต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียบางชนิด มีฤทธิ์ส่วนใหญ่ต่อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ คลอกซาซิลลิน หรือมีฤทธิ์ส่วนใหญ่ต่อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ อะมิโนกลัยโคไซด์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. จำแนกตามฤทธิ์ต่อจุลชีพ

3.1 Bactericidal ยาต้านจุลชีพที่มีฤทธิ์ฆ่าหรือทำลายเชื้อจุลชีพ โดยทั่วไปมักมีกลไกการออกฤทธิ์ต่อผนังเซลล์ และต่อเซลล์เมมเบรนของแบคทีเรีย

3.2 Bacteriostatic ยาต้านจุลชีพที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพ มักมีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างโปรตีน ถ้าเพิ่มขนาดยามากขึ้นอาจออกฤทธิ์ฆ่าหรือทำลายเชื้อจุลชีพ

4. จำแนกตามกลไกการออกฤทธิ์

4.1 ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ เช่น เพนนิซิลิน แวนโคมัยซิน

4.2 ออกฤทธิ์ต่อเซลล์เมมเบรน เช่น โพลีมิกซิน แอมโพเทอริซิน

4.3 ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างโปรตีน เช่น คลอแรมเฟนิคอล เตตราซัยคลิน

4.4 ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างกรดนิวคลิอิค เช่น ไรแฟมปีซิน **ควิโนโลน**

4.5 รบกวนการสังเคราะห์เมตาบอไลต์ที่จำเป็นในการดำรงชีพของเชื้อจุลชีพ เช่น ซัลโฟนาไมด์ ไอโซไนอะซิด

2.1.1.2 กลไกการออกฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพ

จุดประสงค์ในการใช้ยาต้านจุลชีพ คือ ให้ยาออกฤทธิ์ทำลาย หรือยับยั้งการเจริญเติบโตและยับยั้งการแบ่งตัวของจุลชีพที่ทำให้เกิดโรค ยาต้านจุลชีพที่ดีจะต้องเลือกออกฤทธิ์ต่อจุลชีพที่ทำให้เกิดโรค โดยมีอันตรายต่อเซลล์ของโฮทส์น้อยที่สุดจนถึงกับไม่ทำอันตรายเลย คุณสมบัติทางเคมีและทางฟิสิกส์ของยาควรเป็นสารที่ขับถ่ายออกจากร่างกายได้โดยทางปัสสาวะ กลไกการออกฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ๆ (มาลินี, 2525) คือ

กลุ่มแรก ยาต้านจุลชีพที่ทำให้โครงสร้างผนังเซล(cell wall)ของแบคทีเรียผิดปกติ หรือไปขัดขวางกระบวนการสร้างผนังเซลของแบคทีเรียหรือมีฤทธิ์ทั้งสองอย่าง ได้แก่ กลุ่มยาเพนนิซิลิน เซฟฟาโลสปอริน แวนโคมัยซิน แบซิแตรซิน ไซโคลเซอรีน

กลุ่มที่สอง ยาต้านจุลชีพที่ทำให้การทำงานของเมมเบรน (cytoplasmic membrane) ของแบคทีเรียผิดปกติ หรือไปขัดขวางกระบวนการสร้างเมมเบรนของแบคทีเรีย หรือออกฤทธิ์ทั้งสองอย่าง ได้แก่ โพลีมิกซิน ไธโรทริซิน แกรมมิซีดิน แอมโฟเทอริซิน ไนสแตติน

กลุ่มที่สาม ยาต้านจุลชีพพวกที่ไปขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน (Protein synthesis) หรือขัดขวางกระบวนการสร้างนิวคลีอิค แอซิดของแบคทีเรียหรือออกฤทธิ์ทั้งสองอย่าง แบ่งออกได้เป็น

1. ขัดขวางส่วนไรโบโซม ได้แก่ กลุ่มยาอะมิโนกลัยโคไซด์ กลุ่มยาแมคโครลีด เตตราซัยคลิน คลอแรมเฟนนิคอล ลินโคมัยซิน
2. ขัดขวางการสร้างนิวคลีอิคแอซิด
3. ขัดขวางเอ็นไซม์โพลีเมอเรส เช่น ไรฟามัยซิน
4. ขัดขวางดี เอ็น เอ เช่น โนโวไบโอซิน **นาลิดิซิก แอซิด**

กลุ่มสุดท้าย ยาต้านจุลชีพพวกที่ไปรบกวนกระบวนการเมตาโบลิซึม (Intermediary metabolism)ที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรีย ได้แก่ กลุ่มยาซัลฟา ไตรเมทโธพริม ไอโซไนอาซิด

2.1.1.3 อันตรายจากยาต้านจุลชีพ

อันตรายที่เกิดจากการใช้ยาต้านจุลชีพส่วนใหญ่เป็นฤทธิ์ข้างเคียงหรือ เป็นฤทธิ์อันไม่พึงประสงค์ของยาแต่ละกลุ่มที่ต่างกันออกไป อันตรายที่เกิดขึ้นนั้นมีหลายระดับ เริ่มตั้งแต่มีอาการแพ้เพียงเล็กน้อย เช่น มีผื่นขึ้นตามผิวหนัง คลื่นไส้ อาเจียน ผิวหนังไหม้ จนถึงขั้นรุนแรง เช่น ทำให้เป็นโรคโลหิตจาง ตับถูกทำลาย ไตวาย จนทำให้เสียชีวิตได้ ที่สำคัญคือ การดื้อยาของเชื้อโรคซึ่งจะทำให้การรักษาโรคติดเชื้อยากขึ้น (บุปผา, 2540)

อันตรายต่อระบบต่างๆในร่างกายที่เกิดจากยาต้านจุลชีพสามารถแบ่งออกได้ดังนี้

1. อันตรายต่อระบบประสาท รวมทั้งยาที่อันตรายต่อระบบการได้ยินและที่มีผลต่อระบบประสาทของกล้ามเนื้อ ยาพวกนี้ได้แก่ กลุ่มยาอะมิโนกลัยโคไซด์

2 อันตรายต่อไต ได้แก่ กลุ่มยาอะมิโนกลัยโคไซด์และกลุ่มยาโพลีมิกซินจะทำลายท่อไตทำให้มีการสะสมของยาเหล่านี้ในร่างกาย อาการจะดีขึ้นถ้าหยุดใช้ยาเหล่านี้ทันที ซึ่งสภาพผิดปกติของท่อไตสามารถกลับคืนสู่สภาพปกติได้ รวมถึงพวกที่มีผลต่อส่วนอื่นๆของไต ได้แก่ ยากลุ่มซัลฟา ทำให้เกิดผลึกในไตจนถึงกับทำให้ปัสสาวะลำบาก

3. อันตรายต่อตับ ได้แก่ กลุ่มยาเตตราซัยคลิน ทำให้เกิดวิการ fatty metamorphosis ที่ตับหลังจากฉีดยาเข้าเส้นเลือด หรือให้ยาในสัตว์ที่กำลังท้อง

4. มีผลต่อระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ ยาแอมพิซิลลิน ยาลินโคมัยซิน ทำให้ลำไส้ใหญ่เกิดการอักเสบที่เราเรียกว่า "pseudo membranous colitis" มีอาการถ่ายเป็นเลือดอย่างรุนแรง

5. มีผลต่อระบบสร้างโลหิต ได้แก่ ยาคลอแรมเฟนิคอลทำให้เกิดอาการโลหิตจางในคน อาการจะดีขึ้นถ้าหยุดให้ยา นอกจากนี้ยังทำให้เกิดโรคลิวโคพิเนีย และทรอมโบไซโตพีเนีย

2.1.2 ยาต้านจุลชีพในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์

ปัจจุบันอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์และผลผลิตในด้านปศุสัตว์ได้เพิ่มจำนวนขึ้น เป็นเพราะการอาศัยความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคนิคต่างๆเข้ามาช่วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการปรับปรุงอาหารสัตว์ให้มีคุณภาพดีขึ้น ที่นิยมทำกันทั่วโลกคือ การเติมยาหรือสารต่างๆลงไปในอาหารสำหรับเลี้ยงสัตว์ เป็นการช่วยเร่งการเจริญเติบโตของสัตว์ ช่วยป้องกันและรักษาโรค

2.1.2.1 การใช้ยาต้านจุลชีพในอาหารสัตว์

เคโมโพรไฟแลกซีส(Chemoprophylaxis)เป็นการให้ยาต้านจุลชีพแก่สัตว์เพื่อป้องกันการเกิดหรือการขยายตัวของจุลชีพที่ทำให้เกิดโรค เริ่มทำกันมาตั้งแต่ปีพ.ศ.2500 การที่ยาต้านจุลชีพได้รับความนิยมในวงการปศุสัตว์นั้น เนื่องมาจากเกษตรกรสามารถใช้ยาต้านจุลชีพในการควบคุมโรค pneumonia, hepatitis, wounds, salmonellosis, cholera, diarrhea และโรคติดเชื้อที่มักเกิดในสัตว์กว่า 12 ชนิดที่ไม่สามารถรักษาได้ด้วยวิธีการอื่นๆ เมื่อสัตว์กินอาหารดังกล่าวเข้าไปยาต้านจุลชีพจะไปมีผลทำให้ร่างกายสัตว์ดูดซึมสารอาหารได้มากขึ้น ทำให้สัตว์มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น มีสุขภาพดี แข็งแรง เจริญเติบโตเร็วกว่าปกติ และล้มตายเนื่องจากการติดเชื้อน้อยลง

การใช้ยาต้านจุลชีพในการเลี้ยงสัตว์ มีวัตถุประสงค์หลัก 3 ประการ

1. เพื่อการรักษาโรค ขนาดของยาที่ให้ต้องปริมาณสูงพอที่จะมีปริมาณยาในเลือดหรือเนื้อเยื่อสูงกว่าค่า MIC การรักษาจึงจะได้ผล นอกจากนี้จำเป็นต้องทราบการออกฤทธิ์ของยาที่มีต่อส่วนต่างๆของร่างกายและต่อเชื้อโรค

2. เพื่อการป้องกัน โดยให้ยาในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าระดับเพื่อการรักษา (Sub-therapeutic) หรือ ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC (sub MIC) ยาจะออกฤทธิ์ควบคุมแบคทีเรียในลำไส้ ทำให้การดูดซึมอาหารดีขึ้นและช่วยควบคุมแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคซึ่งยังมีปริมาณน้อย การใช้ลักษณะนี้อาจเร่งอัตราการการดื้อต่อยาต้านจุลชีพในสัตว์ที่สามารถส่งต่อการดื้อยามาถึงผู้บริโภค

3. เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของผลผลิต (Growth promoter) โดยให้ยาในระดับที่มีปริมาณความเข้มข้นของยาต่ำกว่าระดับเพื่อการป้องกัน

2.1.2.2 ปัญหาจากการใช้ยาต้านจุลชีพในการเลี้ยงสัตว์

ยาต้านจุลชีพปริมาณต่ำที่เติมในอาหารสัตว์เพื่อเร่งการเจริญจะไม่ก่อให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ แต่ในปัจจุบันพบว่าคนเลี้ยงสัตว์มักเพิ่มปริมาณการใช้ยาประเภทเหล่านี้จนถึงระดับที่ใช้เพื่อป้องกันโรค ซึ่งพบว่าการให้ยาต้านจุลชีพขนาดสูงๆ ติดต่อกันนานๆ ก่อให้เกิดปัญหาการดื้อยาและยังสามารถตรวจพบการปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ด้วย องค์การอนามัยโลกมีรายงานว่าการให้ยาต้านจุลชีพขนาด 100-200 ส่วนในล้านส่วนจะพบยาต้านจุลชีพปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ ยาบางชนิดหรือบางรูปแบบอาจปรากฏออกทางน้ำนมหรือไข่ด้วย ดังนั้นถ้าหากสัตว์เหล่านี้ถูกฆ่าหรือออกไข่ก่อนยาถูกกำจัดหมดจากร่างกายจะก่อให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์

แม้ยาต้านจุลชีพบางชนิดจะมีฤทธิ์เลือกสรรต่อเชื้อสูงมากแต่ฤทธิ์ข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ของยาก็มี โดยเฉพาะเมื่อมีการสะสมจนเกิดเป็นพิษขึ้น ดังนั้นถ้าบริโภคเนื้อสัตว์หรือผลิตภัณฑ์ที่มียาต้านจุลชีพปนเปื้อนเป็นประจำจะมีโอกาสสะสมก่อให้เกิดพิษในผู้บริโภค นอกจากนี้การที่คนแพ้ยาต้านจุลชีพก็อาจมีสาเหตุจากยาปนเปื้อนในอาหาร

การเลี้ยงสัตว์ด้วยอาหารที่มีการผสมยาต้านจุลชีพลงไปด้วยวัตถุประสงค์ใดก็ตามอาจก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อสุขอนามัยของมนุษย์ 2 ประการสามารถสรุปได้ คือ

1. อันตรายที่เกิดจากยาโดยตรง (direct toxic effects)

อันตรายที่เกิดจากยาโดยตรงอาจแบ่งออกได้เป็น อันตรายชนิดรุนแรงและชนิดเรื้อรัง อันตรายที่จัดเป็นชนิดรุนแรงจะขึ้นอยู่กับขนาดของยาที่ได้รับหรือปริมาณของยาที่ปนเปื้อนในอาหารที่ใช้บริโภค โดยทั่วไปปริมาณยาที่ปนเปื้อนอยู่ในเนื้อสัตว์หรือผลิตภัณฑ์จากสัตว์มักไม่สูงพอที่

จะทำให้เกิดอันตรายอย่างรุนแรงได้ แต่ปัญหาสำคัญก็คือ อันตรายที่เรื้อรังเป็นปัญหาระยะยาวขึ้นอยู่กับชนิดของยาและปริมาณของยาที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหารที่บริโภคประจำวัน ยาบางตัวเมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วอาจเปลี่ยนแปลงไปอยู่ในรูปที่เป็นอันตรายมากกว่าสารประกอบตั้งต้น (parent drug)

2. อันตรายที่เกิดโดยทางอ้อม (indirect toxic effects)

2.1 ทำให้เกิดอาการแพ้

อาการแพ้พบในรายบุคคลที่มีความไวต่อสารเคมีตัวหนึ่งตัวใดโดยเฉพาะ ไม่ได้พบในคนทุกคนที่ได้รับ ยาต้านจุลชีพที่มีส่วนทำให้คนเกิดอาการแพ้ขึ้นได้คือ เพนนิซิลลิน กลุ่มยาเตตราซัยคลิน คลอแรมเฟนิคอล อาการแพ้ที่เกิดจากยาต้านจุลชีพไม่ได้ขึ้นอยู่กับขนาดของยาที่ได้รับ แต่มีความสัมพันธ์กับระยะเวลาที่ได้รับยา (duration) หรือความถี่ที่ได้รับยา (frequency) โครงสร้างทางเคมีของยาก็มีส่วนที่ทำให้คนเกิดอาการแพ้ได้มากหรือน้อยต่างกัน นอกจากนี้วิธีที่ได้รับยาเข้าไปก็มีผล หากได้รับยาโดยการสัมผัสหรือสูดดม มีโอกาสที่จะเกิดอาการแพ้ได้ง่ายกว่ากินยาหรือยาฉีด

2.2 การเปลี่ยนแปลงจุลชีพในร่างกาย (suprainfection)

มีทางเป็นไปได้ที่ยาต้านจุลชีพที่ได้รับเข้าไปเป็นประจำจะมีผลต่อจุลชีพในร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลชีพภายในช่องปากและกระเพาะอาหาร ยาพวกที่ดูดซึมได้ไม่ดีอาจหลงเหลือลงไปถึงส่วนลำไส้บ้างก็ได้ อย่างไรก็ตามการไปมีผลต่อจุลชีพในร่างกายจากยาที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหารนั้นอาจกล่าวได้ว่ามีน้อยมาก

2.3 เกิดการขยายตัวของเชื้อดื้อยา (development of resistant bacteria)

หากสัตว์ได้รับยาต้านจุลชีพขนาดต่ำตลอดเวลาเป็นประจำ จะไปทำลายจุลชีพที่มีความไวต่อยาทีละน้อย ทำให้จุลชีพกลุ่มที่ดื้อยาที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติมีโอกาสเจริญเติบโตและขยายตัวไปอย่างรวดเร็ว แบคทีเรียหรือจุลชีพในร่างกายจะเกิดการดื้อยาต่อยาต้านจุลชีพโดยธรรมชาติ โดยเกิดการเปลี่ยนแปลงของสายเบสในดีเอ็นเอ (mutation) ทำให้เกิด sequence ของกรดอะมิโนที่ผิดปกติในตัวจุลชีพ ซึ่งมีผลทำให้โครงสร้างของโปรตีนในตัวจุลชีพผิดปกติไป เกิดเป็นจุลชีพที่ไม่มีความไวต่อยาต้านจุลชีพ (drug resistant mutant)

ปัญหาหรืออันตรายที่เกิดจากการใช้ยาต้านจุลชีพในอาหารสัตว์ โดยทั่วไปแล้ว กลุ่มบุคคลหรือกลุ่มสัตว์ที่ต้องเสี่ยงต่ออันตรายที่อาจเกิดขึ้นได้มีอยู่ 4 กลุ่มด้วยกัน คือ

1. สัตว์ที่ได้รับยา
2. ผู้บริโภคเนื้อสัตว์
3. ประชาชนทั่วไป
4. เกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ที่ใช้ยาต้านจุลชีพอยู่เป็นประจำ

สัตว์ที่ได้รับยาและผู้บริโภคเนื้อสัตว์จากสัตว์ที่ได้รับยาเป็นกลุ่มที่จะเสี่ยงต่ออันตรายที่จะเกิดขึ้นได้มากที่สุด ส่วนประชาชนทั่วไปและเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์จะเสี่ยงกับอันตรายที่เกิดจากการขยายตัวและเพิ่มจำนวนของเชื้อดื้อยา

2.1.2.3 การป้องกันการปนเปื้อนของยาต้านจุลชีพ

การป้องกันการปนเปื้อนของยาต้านจุลชีพในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์นั้น สามารถทำได้เป็น 2 ระยะ ดังนี้

1. Pre-clearance requirements of animal drug residue safety

ก่อนที่ยาต้านจุลชีพจะได้รับอนุมัติให้ออกสู่ท้องตลาด ควรได้รับการทดสอบว่าภายหลังจากที่สัตว์ได้รับยานั้นแล้ว จะมีตัวยาและ/หรือเมตาโบไลต์ของยานั้นตกค้างอยู่ในเนื้อสัตว์ น้ำนม และไข่หรือไม่ ปริมาณของตัวยาหรือเมตาโบไลท์ของยาที่ตกค้างอยู่ในร่างกายสัตว์ ปริมาณที่ตกค้างอยู่นั้นจะเป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภคหรือไม่ ผลจากการทดลองทั้งหมดดังกล่าวนอกจากจะเป็นการป้องกันปัญหาของยาตกค้างแล้ว (drug residues) ยังเป็นมาตรการในการตั้ง Tolerance levels หรือ maximum allowable residues ของยาแต่ละชนิดในเนื้อสัตว์ น้ำนมและไข่ที่ใช้บริโภคอีกด้วย

2. Pre-slaughter withdrawal times

การทิ้งระยะเวลาจากการให้ยาครั้งสุดท้ายก่อนส่งโรงฆ่าสัตว์ หลังจากที่ยาเข้าสู่ร่างกายสัตว์แล้ว ยาและ/หรือเมตาโบไลต์ของยาจะถูกขับออกจากร่างกาย ระยะเวลาที่ยาและเมตาโบไลต์ของยาถูกขับถ่ายออกจากร่างกายขึ้นอยู่กับชนิดของยาที่ได้รับ สัตว์แต่ละชนิดและสภาพของสัตว์แต่ละ

ตัว เราต้องคำนึงถึงระยะเวลาที่เพียงพอที่จะให้ยานั้นขับถ่ายออกจากร่างกายของสัตว์ก่อนรีดนม หรือก่อนที่จะส่งโรงฆ่าสัตว์เพื่อใช้เป็นอาหาร (Pre-slaughter withdrawal times) เพื่อเป็นการขจัดปัญหาการปนเปื้อนของยาต้านจุลชีพ

2.1.2.4 มาตรฐานระหว่างประเทศ

จากปัญหาการปนเปื้อนของยาต้านจุลชีพในเนื้อสัตว์และการดื้อยาของเชื้อจุลชีพก่อโรคในสัตว์และมนุษย์ หลายประเทศจึงมีการกำหนดให้มีขั้นตอนการตรวจสอบเพื่อเป็นการประเมินความปลอดภัยในการใช้ยาต้านจุลชีพ (microbiological safety) โดยการหาค่าระดับความเข้มข้นระดับต่ำสุดของยาที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ หรือ MIC (Minimum Inhibitory Concentration) เป็นค่าทางเภสัชฤทธิ์วิทยา (Pharmacodynamic) ที่สำคัญที่สุดตัวหนึ่ง ซึ่งนำมาใช้ประเมินได้ทั้งประสิทธิผลและความปลอดภัยของยาต้านจุลชีพ

2.1.2.4.1 ประเทศไทย

การค้าระหว่างประเทศให้ความสำคัญกับความปลอดภัยและคุณภาพของอาหาร โดยมีการออกข้อกำหนดทางด้านมาตรฐานอาหาร ที่สำคัญ คือ การออกข้อกำหนดโดยคณะกรรมาธิการโครงการมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (Codex Alimentarius Commision : CODEX) คือ การตั้งมาตรฐานปริมาณยาสัตว์ตกค้างสูงสุดที่กำหนดให้มีได้ในผลิตภัณฑ์สัตว์ (Maximum Residue Limits หรือ MRLs) ซึ่งจะใช้ผลการพิจารณาและวิเคราะห์ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์จาก Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs (CCRVDF) เพื่อคุ้มครองสุขภาพอนามัยผู้บริโภค โดยมาตรฐานค่า MRLs ของ CODEX หลังจากผ่านการยอมรับในขั้นสุดท้ายแล้ว ประเทศสมาชิกและWTO จะนำไปใช้เป็นข้อกำหนดการค้าระหว่างประเทศ ซึ่งประเทศไทยในฐานะสมาชิกองค์การค้าโลกและสมาชิกของ Codex จึงมีพันธกรณีที่จะต้องปฏิบัติตามข้อตกลง

หลายหน่วยงานที่เกี่ยวข้องจึงออกมาตรการแก้ไขปัญหา ดังเช่น เมื่อวันที่ 2 เมษายน 2545 กระทรวงสาธารณสุขร่วมกับกระทรวงพาณิชย์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กระทรวงอุตสาหกรรม และกระทรวงการคลัง โดยให้ใช้มาตรการห้ามนำเข้ายา เภสัชเคมีภัณฑ์ และเกลือของเภสัชเคมีภัณฑ์ ตามกลุ่มหรือชนิดที่สหภาพยุโรปและอเมริกาห้ามใช้ รวม 16 กลุ่มรายการ คือ

1. อริสโตโลเซีย
2. คลอแรมเฟนิคอล
3. คลอโรฟอร์ม
4. คลอโปรมาซีน
5. คอลซิซีน
6. เดปโซน
7. ไดมิไตรดาโซล
8. เมโทรนิดาโซน
9. ไนโตรฟูแรน
10. โรนิดาโซล
11. ไดเอทิลสติลเบสโทรล
12. อิมโพรนิดาโซล
13. ไนโตรอิมมิดาโซล
14. ซัลโฟนาไมด์
15. ควิโนโลน
16. ไกลเปปไตด์

2.1.2.4.2 สหรัฐอเมริกา

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาสหรัฐฯ (Food and Drug Adminis tration : FDA) ได้อนุมัติให้มีการใช้ยาต้านจุลชีพผสมลงในอาหารสัตว์ เพื่อเร่งการเจริญเติบโตและป้องกันการเกิดการเจ็บป่วยของสัตว์ในฟาร์มเป็นระดับที่ไม่สูงนัก แต่เพียงพอสำหรับใช้ป้องกันและบำบัดโรคในสัตว์ได้ โดยมี 2 หน่วยงานที่รับผิดชอบงานในการป้องกันและควบคุมการใช้ยาในสัตว์ที่ใช้เป็นอาหาร คือ หน่วยงานสัตวแพทย์ กองควบคุมคุณภาพอาหารและยา (FDA) ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการใช้ยารักษาโรคในสัตว์และการใช้ยาในอาหารสัตว์ ทำการควบคุมและรับรองยาใหม่ก่อนที่จะออกสู่ตลาดตลอดจนฉลากปิดยา ตัวยา ข้อบ่งใช้ พิษที่อาจเกิดขึ้น และการทิ้งระยะเวลาการให้ยาก่อนส่งโรงฆ่าสัตว์ และหน่วยงานที่เรียกว่า The United States Department of Agriculture through the Animal and Plant Health Inspection Survice (APHIS) ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมและรับผิดชอบเกี่ยวกับการตกค้างของยาในเนื้อสัตว์ น้ำนมและไข่ ตลอดจนผลิตภัณฑ์จากนม

2.1.2.4.3 สหภาพยุโรป

ปัจจุบันสหภาพยุโรปได้กำหนดแผนการที่แน่นอนในการถอนการใช้ Anti-biotic growth promoter (AGP) พร้อมไปกับการปรับเปลี่ยนระบบการจัดการเลี้ยงสัตว์และดูแลสุขภาพสัตว์ วิธีการในการป้องกันโรค การให้วัคซีน และการกำจัดโรคสัตว์เพื่อสุขภาพและสวัสดิภาพของสัตว์ควบคู่ไปกับการนำโภชนะเสริมสุขภาพ (nutricines or neutraceutical) ซึ่งจัดเป็นกลุ่มที่ไม่ใช้ยาต้านจุลชีพ (non–drug) และ natural product ผสมลงไปในสูตรอาหาร เช่น mineral supplement, conjugated linoleic acid (CLA) เป็นต้น รวมไปถึงสมุนไพรที่เป็นเภสัชภัณฑ์ธรรมชาติ เพื่อ ให้เกิดความเชื่อมโยงระหว่างสูตรอาหารสุขภาพสัตว์ การป้องกันโรค และสภาพแวดล้อมที่ไม่เป็นพิษ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

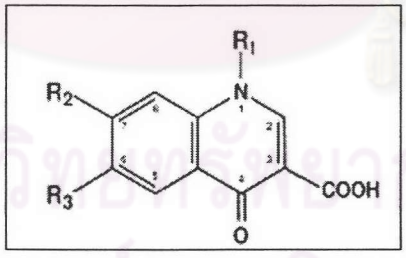
สหภาพยุโรปเข้มงวดเรื่องการนำเข้าเนื่องมาจากเมื่อปี พ.ศ.2544 มีการตรวจพบคลอแรมเฟนิคอลปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำที่ส่งไปจำหน่ายในประเทศแถบยุโรป คณะกรรมการยุโรปจึงแจ้งไปยังประเทศสมาชิกสหภาพยุโรป ให้ตรวจสอบการปนเปื้อนของยาต้านจุลชีพในสินค้าที่นำเข้าจากประเทศในเอเชียอย่างเข้มงวด และให้ประเทศสมาชิกที่ดำเนินการตรวจสอบสินค้าแจ้งผลต่อคณะกรรมาธิการฯ ทำให้ประเทศผู้นำเข้าเฝ้าระวังและเข้มงวดในสินค้าอาหารประมงจากประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มากขึ้น ประเทศไทยจึงได้รับผลกระทบอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้

2.1.3 สารกลุ่มควิโนโลน

สารกลุ่มควิโนโลนเป็นยาต้านจุลชีพที่ได้มาจากการสังเคราะห์ทางเคมีโดยตรง สารตัวแรกของกลุ่มนี้ คือ Nalidixic acid ซึ่งใช้สำหรับรักษาโรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะจากแบคทีเรียแกรมลบมานานกว่า 40 ปีแล้ว แต่เนื่องจากยานี้มีฤทธิ์แทรกแซงค่อนข้างมากและเชื้อดื้อต่อยานี้ได้ง่าย จึงมีการผลิตยาซึ่งมีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาและฤทธิ์ต้านจุลชีพดีกว่า Nalidixic acid ขึ้นมาหลายตัว ได้แก่ Norfloxacin, Flumequine, Ciprofloxacin, Sarafloxacin และ Enrofloxacin เป็นต้น (สุวัฒน์, 2542)

2.1.3.1 โครงสร้างทางเคมี

สูตรโครงสร้างโดยทั่วไปของยาในกลุ่มควิโนโลนแสดงดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 แสดงสูตรโครงสร้างโดยทั่วไปของสารกลุ่มควิโนโลน

มีการพัฒนายาในกลุ่มควิโนโลนเป็น fluoroquinolones โดยมี**fluorine atom จับกับ** carbon atom ที่ตำแหน่งที่ 6 ซึ่งมีผลทำให้ยาเหล่านี้มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมลบ**ได้แรงขึ้นและครอบ**คลุมเชื้อได้กว้างขึ้น กล่าวคือ นอกจากจะครอบคลุมเชื้อแบคทีเรียแกรมลบแล้ว ยัง**มีฤทธิ์ครอบคลุมเชื้อ**แบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดได้อีกด้วย ยา fluoroquinolones ส่วนใหญ่มี piperazine ring **จับอยู่กับ** carbon atom ที่ตำแหน่งที่ 7 ทำให้ยาเหล่านี้มีฤทธิ์ต้านเชื้อ P.*aeruginosa* เพิ่มขึ้น **ตัวอย่างการพัฒนายา**ในกลุ่มควิโนโลนแสดงตามตารางที่ 2.1

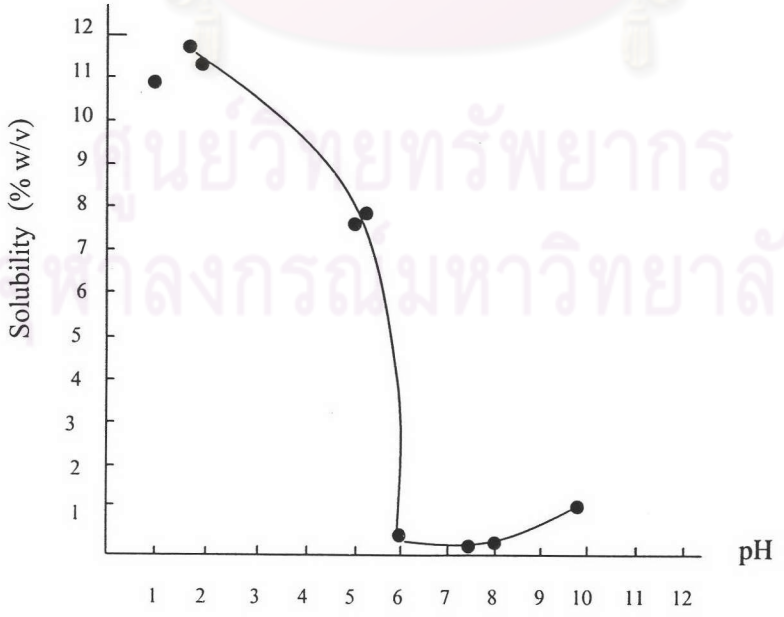
ตารางที่ 2.1 แสดงการแบ่งกลุ่มของสารกลุ่มควิโนโลน

Structure	Name	Antibacterial activity
First –Generation Compounds		
1,8 Naphthyridine (carboxylic acid)		
7- Methyl	Nalidixic acid	Enterobacteria only, no significant anti-gram-positive activity
7-Piperazine (pyrido-pyrimidine)	Pipemidic acid	P.*aeruginosa* added

6,7,8 Side chain substituents	Name	N-1 Side chain	Antibacterial activity
Second-Generation Compounds			
6-Fluoro	Flumequine	-	Gram-negative : less than piperazinyl derivatives
6-Fluoro-7-piperazinyl	Norfloxacin	Ethyl	Enhanced anti-gram-negative potency, including P.*aeruginosa* plus some limited anti-gram-positive activity
6,8-Difluoro-7-piperazinyl	Lomefloxacin	Ethyl	Lesser anti-gram-positive activity

ที่มา : Andriole (1998)

สารกลุ่มควิโนโลนมีความสามารถในการละลายได้ดีในช่วงที่เป็นกรดตามที่แสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 แสดงการละลายของควิโนโลนเมื่อเปลี่ยนแปลงค่า pH (ดัดแปลงจาก Florey ,1989)

2.1.3.2 ฤทธิ์ต้านจุลชีพ

ยาในกลุ่มควิโนโลนมีวงฤทธิ์ครอบคลุมเชื้อแบคทีเรียคล้ายคลึงกัน แต่อาจจะมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียบางชนิดมากหรือน้อยแตกต่างกันไปบ้าง ฤทธิ์ของยาในกลุ่มนี้มีดังนี้

แบคทีเรียแกรมลบ ส่วนใหญ่ไวต่อยา ได้แก่ เชื้อในกลุ่ม entero bacteriaceae เช่น *E. coli, enterobacter, proteus, citrobacter, salmonella* และ *shigella* เป็นต้น โดยมีค่า minimum inhibitory concentration (MIC) เท่ากับหรือน้อยกว่า 2 มิลลิกรัม/ลิตร สำหรับเชื้อ *Acinetobacter , Providencia* และ *Serratia* จะมีความไวต่อยาลดลง (MIC_{90} 1-32 มิลลิกรัม/ลิตร) *Ps.aeruginosa* โดยทั่วไปจะถูกยับยั้งที่ความเข้มข้น1-2 มิลลิกรัม/ลิตร เชื้อ *N.gonorrheae* ทั้งที่สร้างและไม่สร้างbetalactamase จะถูกยับยั้งในขนาดต่ำ (MIC_{90}) เท่ากับ 0.06 และ 0.015 – 0.03 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *P. cepacia* และ *X. maltophilia* มีลักษณะการดื้อต่อยา

แบคทีเรียแกรมบวก ยาในกลุ่มนี้ได้ผลต่อ *staphylococci* (MIC_{90} 1-4 มิลลิกรัม/ลิตร) ทั้งพวกที่ไวและดื้อต่อ methicillin แต่สำหรับเชื้อ *streptococci , enterococci* และ *corynebacterium* ส่วนใหญ่ค่อนข้างจะต้านยา มีค่า MIC_{90} 2-16 มิลลิกรัม/ลิตร

เชื้ออื่นๆ ยาในกลุ่มนี้บางขนาน เช่น ciprofloxacin และ ofloxacin ยังได้ผลต่อเชื้อ *chlamydia, mycoplasma*และ *mycobacterium* บางสายพันธุ์ ได้แก่ *M. tuberculosis, M. avium complex, M.ka n sasii* และ *M. fortuitum* อีกด้วย สำหรับเชื้อในกลุ่ม anaerobes ส่วนใหญ่ดื้อต่อยาในกลุ่มนี้

2.1.3.3 กลไกการออกฤทธิ์

ยาในกลุ่มควิโนโลนมีฤทธิ์เป็นแบบbactericidal วิถีการออกฤทธิ์เป็นการรบกวนการสร้าง DNA ตำแหน่งออกฤทธิ์ของยา คือ subunit A ของเอนไซม์ DNA-gyrase (topoisomerase II) เอนไซม์นี้ทำหน้าที่ในการควบคุมให้โครโมโซมของแบคทีเรียคงอยู่ในสภาพnegative supercoiling เพื่อให้โครโมโซมนั้นมีขนาดเล็กพอที่จะบรรจุอยู่ภายในขอบเขตของเซลล์ได้ และยังทำหน้าที่ในการตัดต่อสาย DNA 2 สายที่พันเกลียวกันอยู่ (double helical DNA) ก่อนที่จะมีการสังเคราะห์ DNA (DNA repli cation)ใหม่ขึ้น เมื่อเอนไซม์นี้ถูกยับยั้งแบคทีเรียจึงไม่สามารถสังเคราะห์DNAขึ้นได้ ขณะเดียวกันโครโมโซมหรือ สายของ DNA นี้ก็ไม่สามารถคงอยู่ในสภาพ negative supercoiling ที่จะบรรจุอยู่ภายในเซลล์ได้ และพบว่าถ้าใช้ยาในขนาดสูงเกินไปฤทธิ์ของยาจะกลับเป็นเพียง bacteriostatic ได้ เนื่องจากยามีผลยับยั้งการสังเคราะห์ RNA และโปรตีนของแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียหยุดการเจริญเติบโตและแบ่งตัว จึงไม่สามารถแสดงผลต่อการสังเคราะห์ DNA ของแบคทีเรียได้ (มาลิน, 2540)

2.1.3.4 ฤทธิ์แทรกแซง

ยาในกลุ่มควิโนโลนมีฤทธิ์ที่ส่งผลต่อผู้บริโภคมีลักษณะคล้ายคลึงกัน โดยสามารถแบ่งได้เป็นระบบต่างๆ ดังต่อไปนี้

1. ผลกระทบต่อระบบเลือด

Castaman (1994) ทำการศึกษา พบว่า ยาในกลุ่มควิโนโลนจะส่งผลต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว (Leucopenia) ซึ่งเป็นภาวะของร่างกายที่มีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือดน้อยกว่าปกติ (สุเทพ, 2540) นอกจากนี้อาจทำให้เกิดอาการเลือดไหลไม่หยุดเนื่องจากมีปัญหาเกี่ยวกับเกล็ดเลือด (thrombo-cytopenia)

2. ผลกระทบต่อทางเดินอาหาร

ส่วนใหญ่ยาในกลุ่มควิโนโลนจะมีฤทธิ์แทรกแซงในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งเกิดขึ้นประมาณ 2.4% ของจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด เช่น ทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ท้องเดิน เป็นต้น

3. ระบบประสาทส่วนกลาง

ฤทธิ์แทรกแซงต่อระบบประสาทส่วนกลางอาจพบได้บ้าง เช่น ประสาทการมองเห็นซึ่งอาจทำให้ผู้ใช้ตาพร่า ทำให้เกิดอาการมึนงง ปวดศีรษะ นอนไม่หลับ กระสับกระส่าย (British Medical Association , 2003) นอกจากนี้อาจทำให้เกิดอาการชักหรือมีอาการของลมบ้าหมู (Aoun,1992)

4. ผลกระทบต่อระบบกล้ามเนื้อ

อาการปวดข้อ (arthralgia) ในสัตว์ทดลองที่กำลังมีการเจริญเติบโต พบว่า การใช้ยาขนาดสูงหรือต่อเนื่องเป็นเวลานาน อาจทำให้เกิดการกร่อนของกระดูกอ่อน(cartilage erosion) รอบๆ ข้อได้ โดยเฉพาะข้อที่ต้องรับน้ำหนักมากๆ(weight-bearing joints) เช่น ข้อสะโพกและข้อเข่า เป็นต้น (Huston, 1994)

5. ภาวะการแพ้ยา

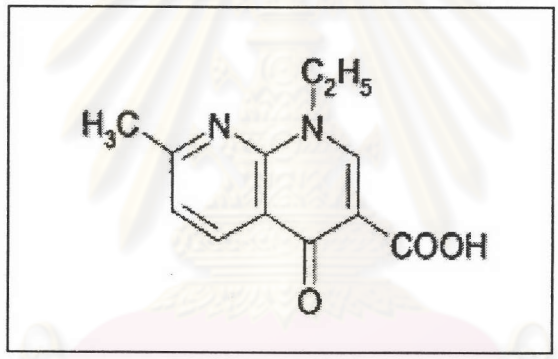
Drago (1994) ทำการศึกษาภาวะการแพ้ยา พบอาการและความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับร่างกายอย่างเฉียบพลันซึ่งเป็นผลจากปฏิกิริยาภูมิแพ้ (anaphylaxis) และการเกิดพิษต่อผิวหนังชั้นนอก (toxic epidermal necrolysis) เป็นต้น

2.1.4 สารกลุ่มควิโนโลนที่ทำการศึกษา

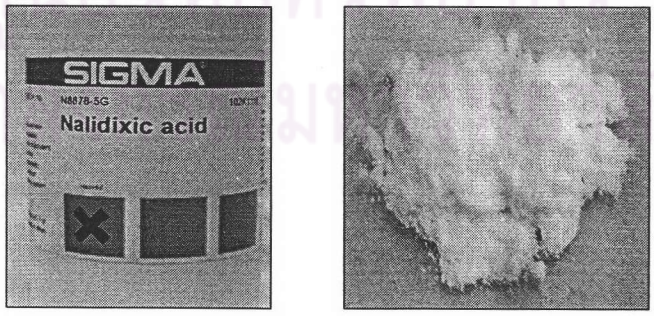
สารในกลุ่มควิโนโลนที่จะทำการศึกษามี 3 ชนิด คือ นาลิดิซิก แอซิด (NAL), นอร์ฟล็อกซาซิน (NOR) และฟลูมิควิน (FLU) ซึ่งมีรายละเอียดคุณสมบัติของสารแต่ละชนิดดังต่อไปนี้

2.1.4.1 Nalidixic Acid

นาลิดิซิก แอซิด (Nalidixic acid) เป็นยาตัวแรกในกลุ่มควิโนโลน นิยมใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ (Aszalos, 1986) มีสูตรโครงสร้าง ลักษณะผลึก, คุณสมบัติทางเคมีและการละลาย ตามรูปที่ 2.4 , 2.5 และ ตารางที่ 2.2 , 2.3 ตามลำดับ



รูปที่ 2.4 แสดงสูตรโครงสร้างของนาลิดิซิก แอซิด



รูปที่ 2.5 แสดงลักษณะผลึกและสีของนาลิดิซิก แอซิด

ตารางที่ 2.2 แสดงคุณสมบัติทางเคมีของนาลิดิซิก แอซิด

คุณสมบัติ	รายละเอียด
ชื่อ	1-Ethyl-1,4-dihydro-7-metyl-4-oxo-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid
สูตรโมเลกุล	$C_{12}H_{12}N_2O_3$
ประกอบด้วย	C 62.06%, H 5.21%, N 12.06%, O 20.67%
มวลโมเลกุล	232.24
ลักษณะ	ผงผลึกสีขาว หรือ สีเหลืองอ่อน
จุดหลอมเหลว	225-231° C

ที่มา : Helrich (1990)

ตารางที่ 2.3 แสดงคุณสมบัติการละลายของนาลิดิซิก แอซิด ที่ 23 °C

Solvent	Solubility (mg/ml)
Chloroform	3.5
Toluene	1.6
Ethyl acetate	0.8
Methanol	1.3
Ethanol	0.9
Isopropanol	0.4
Water (distilled)	0.1
Ethyl ether	0.1

ที่มา : Grubb (1979)

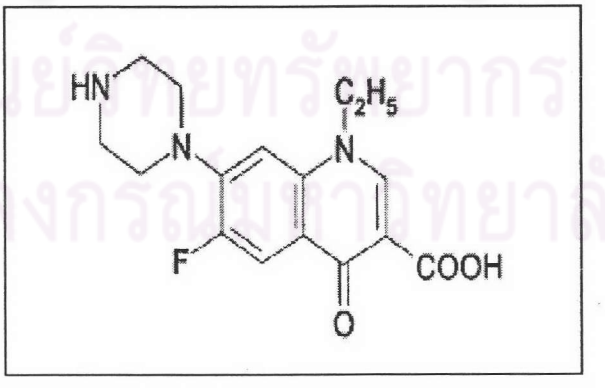
มีการศึกษาครึ่งชีวิตของนาลิดิซิก แอซิด โดยทำการศึกษาในพลาสมาของมนุษย์พบว่ามีค่าเท่ากับ 85-100 นาที และ ในลูกวัวมีค่าครึ่งชีวิต เท่ากับ 24 ชั่วโมง (McChesney,1964) ส่วนข้อมูลความเป็นพิษ (LD_{50} : Lethal Dose) ซึ่งเป็นปริมาณของสารพิษหรือสารเคมีต่อน้ำหนักตัวของประชากรที่ได้รับเข้าไปครั้งเดียวแล้วจะทำให้ประชากรตายไปครึ่งหนึ่ง (50%) ของจำนวนประชากรทั้งหมด (อุสารัตน์,2545) ของนาลิดิซิก แอซิด ทำการศึกษาในหนูเมาส์ พบว่า

- ทางปาก : 3000 (mg/kg)
- ทางผิวหนัง : 500 (mg/kg)
- ทางเส้นเลือด : 76 (mg/kg)

นาลิดิซิก แอซิดจะออกฤทธิ์ขัดขวางการสังเคราะห์DNAในแบคทีเรียพวกแกรมลบโดยที่มีผลต่อการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอน้อยมาก นาลิดิซิก แอซิดไม่มีผลต่อการสังเคราะห์ DNA ในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ให้ผลดีในการต้านเชื้อแกรมลบส่วนใหญ่ (ยกเว้น*P. aeruginosa*) ส่วนเชื้อแกรมบวกค่อนข้างจะดื้อยานี้ นิยมนำมาใช้เพื่อรักษาโรคทางเดินปัสสาวะที่เกิดจากเชื้อ (แม้ว่าระดับยาในเลือดเพียงพอที่จะออกฤทธิ์ต้านเชื้อ)

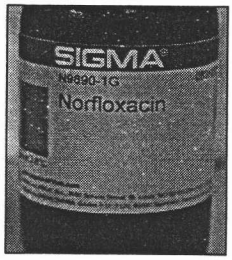
2.1.4.2 Norfloxacin

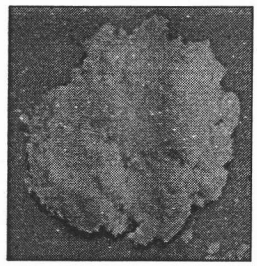
นอร์ฟล็อกซาซิน (Norfloxacin) เป็นยาฆ่าเชื้อที่มีการนำมาใช้เพื่อรักษาโรคติดเชื้อทางเดินปัสสาวะและทางเดินอาหาร (มังกร, 2540) มีการค้นพบในช่วงปี ค.ศ.1977 มีสูตรโครงสร้างสัมพันธ์กับนาลิดิซิก แอซิด แต่เนื่องจากมี Fluoro atom และ piperazinyl จึงมีอำนาจการควบคุมเชื้อกว้างกว่าและมีฤทธิ์แรงกว่า โดยเฉพาะอย่างยิ่งฤทธิ์ต่อเชื้อ*Ps.aeruginosa*และแบคทีเรียชนิดแกรมบวกบางชนิด มีสูตรโครงสร้าง , ลักษณะผลึก , คุณสมบัติทางเคมีและการละลาย ดังรูปที่ 2.6, 2.7 และตารางที่ 2.4 , 2.5 ตามลำดับ



รูปที่ 2.6 แสดงสูตรโครงสร้างของนอร์ฟล็อกซาซิน

ที่มา : Bailey (1984)





รูปที่ 2.7 แสดงลักษณะผลึกและสีของนอร์ฟล็อกซาซิน

ตารางที่ 2.4 แสดงคุณสมบัติทางเคมีของนอร์ฟล็อกซาซิน

คุณสมบัติ	รายละเอียด
ชื่อ	1-Ethyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-pipe razinyl)-3-quinolinecarboxylic acid
สูตรโมเลกุล	$C_{16}H_{18}FN_3O_3$
ประกอบด้วย	C 64.36%, H 4.63%, F 7.27%, N 5.36%, O 18.37%
มวลโมเลกุล	319.34
ลักษณะ	ผงผลึกสีขาว หรือ สีเหลืองอ่อน
จุดหลอมเหลว	220-221°

ที่มา : Helrich (1990)

ตารางที่ 2.5 แสดงคุณสมบัติการละลายของนอร์ฟล็อกซาซิน ที่ 25 °C

Solvent	Solubility (mg/ml)
Water	0.28
Methanol	0.98
Ethanol	1.90
Acetone	5.10
Chloroform	5.50
Diethyl ether	0.01
Benzene	0.15
Glacial acetic acid	340.00
Octyl alcohol	5.10

ที่มา : Grubb (1979)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นอร์ฟล็อกซาซินสามารถเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียได้ดีกว่านาลิดิซิก แอซิด มีการออกฤทธิ์โดยการยับยั้งที่subunit Aของเอนไซม์ DNA gyraseที่ผนังเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ช่วยให้DNAของแบคทีเรียสามารถขดตัวอยู่ภายในนิวเคลียสของแบคทีเรียได้ (super coiled DNA helix) และช่วยในการคลายเกลียวเวลาที่แบคทีเรียจะแบ่งตัวด้วย เมื่อยาไปขัดขวางการทำงานของเอนไซม์นี้ทำให้การแบ่งตัวของแบคทีเรียผิดปกติและเซลล์แตกในที่สุด

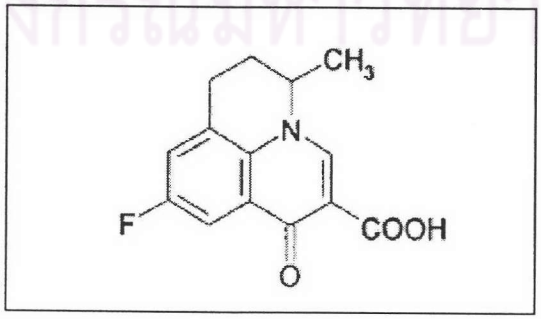
ส่วนข้อมูลความเป็นพิษ (LD_{50}) ของนอร์ฟล็อกซาซิน (Maryadele,2001) มีดังนี้

- หนูเมาส์ ทางปาก : > 4000 (mg/kg)
  ทางผิวหนัง : 1500 (mg/kg)
  ทางเส้นเลือด : 220 (mg/kg)

- หนูแรท ทางปาก : > 4000 (mg/kg)
  ทางผิวหนัง : 1500 (mg/kg)
  ทางเส้นเลือด : 270 (mg/kg)

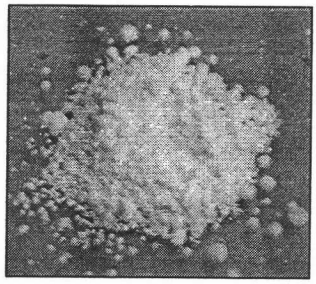
2.1.4.3 Flumequine

ฟลูมิควิน (Flumequine) ผลิตขึ้นในปี ค.ศ.1973 (Peterson,1986) มีการศึกษาประสิทธิภาพของยาฟลูมิควิน (จิรศักดิ์, 2532) พบว่ามีความสามารถในการหยุดยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแอร์โรโมนาส ไฮโดรฟิลลา และเชื้อวิบริโอ แอนกูลาลุม ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีสูตรโครงสร้าง , ลักษณะผลึก, คุณสมบัติทางเคมีและคุณสมบัติการละลาย ดังแสดงในรูปที่ 2.8, 2.9 และตารางที่ 2.6, 2.7 ตามลำดับ



รูปที่ 2.8 แสดงสูตรโครงสร้างของสารฟลูมิควิน

ที่มา : Sittig (1988)



รูปที่ 2.9 แสดงลักษณะผลึกและสีของฟลูมิควิน

ตารางที่ 2.6 แสดงคุณสมบัติทางเคมีของฟลูมิควิน

คุณสมบัติ	รายละเอียด
ชื่อ	9-Fluoro-6,7-dihydro-5-metyl-1-oxo-1H,5H-benzo[ij]quinolizine-2-carboxylic acid
สูตรโมเลกุล	$C_{14}H_{12}FNO_3$
ประกอบด้วย	C 63.36% H 4.63% F 7.27% N 5.36% O 18.37%
มวลโมเลกุล	261.25
ลักษณะ	ผลึกสีขาว
จุดหลอมเหลว	253–255°

ที่มา : Helrich (1990)

ตารางที่ 2.7 แสดงคุณสมบัติการละลายของฟลูมิควินที่ 25 °C

Solvent	Solubility (mg/ml)
Methanol	0.28
Water	0.98
Ethyl acetate	1.90
Ethanol	5.10
Chloroform	5.50

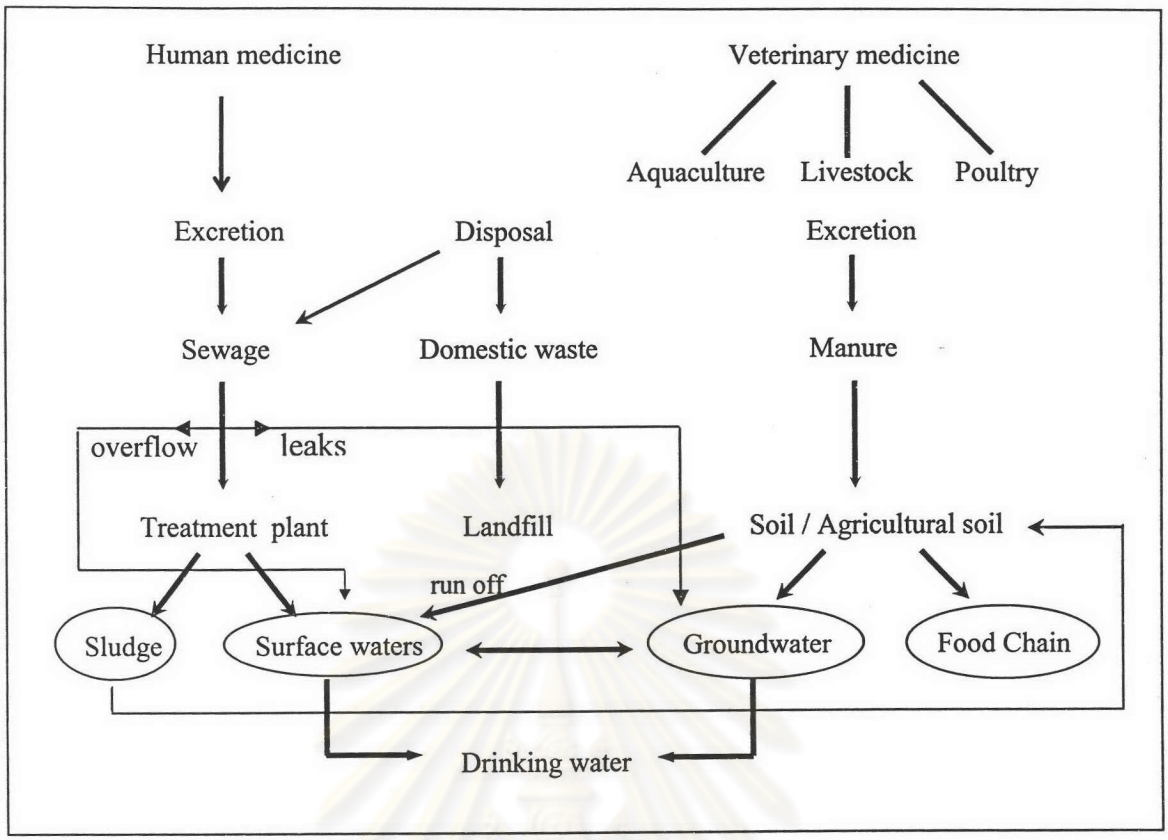
2.1.4.4 ปัญหาการใช้ยาในกลุ่มควิโนโลน

ปี ค.ศ.1998 องค์การอนามัยโลกรายงานความเกี่ยวข้องระหว่างการใช้ยาต้านจุลชีพกลุ่มควิโนโลนว่าทำให้เกิดการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียในมนุษย์เพิ่มขึ้นในหลายประเทศ หลังจากที่เริ่มมีการใช้ยากลุ่มนี้ในการเลี้ยงสัตว์ โดยเฉพาะเชื้อ *Salmonella* และ*Campylobacter* ดื้อต่อยาในกลุ่มนี้มากขึ้นเพราะยาในกลุ่มควิโนโลนเป็นยาต้านจุลชีพชนิดออกฤทธิ์กว้าง (broad spectrum antimicrobial) การที่ได้รับยาต้านจุลชีพในระดับต่ำต่อเนื่องเป็นเวลานาน เพิ่มโอกาสในการที่เชื้อจะเกิดความต้านทานโดยเกิดการกลายพันธุ์ (mutation)บนโครโมโซมและแบคทีเรียในรุ่นต่อมาจะพัฒนาความต้านทานขึ้นไปอีกจนกระทั่งอยู่เหนือระดับของยาที่ใช้ในการรักษา นอกจากนี้ยังสามารถเกิดการดื้อยาข้ามไปยังยาตัวอื่นๆ (cross – resistance) ได้อีกด้วย

ในปี ค.ศ.2000 ศูนย์สัตวแพทย์ของสหรัฐอเมริกาได้เสนอให้ถอนการอนุมัติการใช้ยากลุ่มควิโนโลนที่เคยได้อนุมัติการใช้ในไก่ คือ นอร์ฟล็อกซาซิน เนื่องจากมีหลักฐานแนวโน้มว่าการใช้ยาดังกล่าวในสัตว์เป็นสาเหตุให้เชื้อ *Campylobacter* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคที่เป็นปัญหา และติดต่อมายังผู้บริโภคทำให้เกิดอันตรายถึงชีวิตได้โดยเฉพาะในผู้ที่ภูมิคุ้มกันโรคต่ำ จากการเฝ้าระวังปัญหาเชื้อดื้อยาพบว่า หลังจากมีการอนุมัติให้ใช้ยากลุ่มนี้ในสัตว์ปีกเมื่อปี ค.ศ.1995 และในปี ค.ศ.1999 พบการติดเชื้อ *Campylobacter* ที่ดื้อต่อยากลุ่มนี้เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยถึง 17.6 % (Center for veterinary medicine,2000)

การกระจายตัวของสารในกลุ่มควิโนโลนสู่สิ่งแวดล้อมสามารถอธิบายตามรูปที่2.10 ซึ่งในรูปจะแสดงแหล่งที่มา การกระจายตัวของยาในสิ่งแวดล้อมและหนทางในการปนเปื้อนของยากลุ่มควิโนโลนสู่สิ่งแวดล้อม เริ่มจากการใช้ยาในมนุษย์และการเลี้ยงสัตว์แหล่งกำเนิดที่สำคัญคือ การปล่อยของเสียจากกระบวนการผลิต การขับถ่าย การทิ้งเป็นของเสียจากยาที่ไม่ได้ใช้หรือยาที่หมดอายุแล้ว เป็นต้น ทั้งหมดที่กล่าวไปนั้นการขับถ่ายของเสียจากสิ่งมีชีวิตเป็นแหล่งที่ สำคัญที่สุดในการปนเปื้อนของยาสู่สิ่งแวดล้อม การใช้ยาในการทำปศุสัตว์จะสิ้นสุดโดยการทำเป็นปุ๋ยเพื่อการเกษตร เมื่อมีการใช้ในการกสิกรรมก็จะเกิดการกระจายตัวลงสู่พื้นดิน และอาจจะเกิดการปนเปื้อนไปจนถึงน้ำใต้ดิน ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของดิน สภาพภูมิศาสตร์ เช่นเดียวกันกับสลัดจ์ (Sludge) ที่เกิดจากการบำบัดน้ำเสียในระหว่างกระบวนการบำบัด หากยาที่ปนเปื้อนมามีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำก็จะเกิดการปนเปื้อนอยู่ในสลัดจ์เมื่อ มีการนำสลัดจ์ ไปใช้เป็นปุ๋ยก็จะเข้าสู่กระบวนการปนเปื้อนในดินต่อไปเช่นเดียวกัน

หมายเหตุ : สลัดจ์ (Sludge) หมายถึง ของแข็ง (ที่ยังมีน้ำปน) ที่แยกออกจากน้ำหรือน้ำเสีย และจมสะสมตัวอยู่เบื้องล่าง หรือ ของแข็งซึ่งเกิดจากการบำบัดโดยวิธีการทางเคมีและตกตะกอน (สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย , 2544)



รูปที่ 2.10 การกระจายตัวของควิโนโลนในสิ่งแวดล้อม (ที่มา : Barcelo และคณะ)

2.1.5 เทคนิคการตรวจวิเคราะห์

การพัฒนาวิธีทดสอบสารปนเปื้อนในอาหารสัตว์หรือยาสัตว์ มักจะต้องการให้วิธีทดสอบสามารถทดสอบหาสารตกค้างได้หลายชนิดภายใต้ภาวะทดสอบเดียวกัน (multiresidue method) เนื่องจากมีการใช้ยาต้านจุลชีพในการเลี้ยงสัตว์มากมายหลายชนิด นอกจากนี้ยังต้องการความรวดเร็วในการวิเคราะห์ และเนื่องจากยาแต่ละกลุ่มหรือยาแต่ละตัวในกลุ่มเดียวกัน มีคุณสมบัติทางเคมีกายภาพที่แตกต่างกันทำให้สามารถชี้บ่งได้ว่าเป็นยาชนิดใดหรือมีปริมาณยาตกค้างมากน้อยเพียงใดได้ การวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือจุดประสงค์สำคัญสำหรับการทดสอบที่ควรคำนึงถึง คือ

1. มีประสิทธิภาพการสกัดที่ยอมรับได้
2. มีความสามารถในการบ่งชี้หรือหาปริมาณสารตกค้างที่ต้องการได้
3. มีความจำเพาะเจาะจงในการวิเคราะห์สารที่ต้องการได้
4. มีความแม่น (precision) และมีความเที่ยงตรง (accuracy) อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้
5. ครอบคลุมสัตว์ทุกชนิดที่มีการใช้ยานั้น

6. สามารถวิเคราะห์ได้ในเนื้อเยื่อและส่วนต่างๆ ของสัตว์ หรือ ได้มาจากสัตว์ เช่น เนื้อ ตับ ไขมัน ไข่ นม และ น้ำผึ้ง ที่เกี่ยวข้องกับการใช้ยานั้น

เทคนิคในการวิเคราะห์หาสารกลุ่มควิโนโลนนั้นนิยมใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Enzyme–Linked Immunosorbent Assay (ELISA) และ Mass Spectrometry (MS) ซึ่งมีรายละเอียดของเทคนิคต่างๆ ดังต่อไปนี้

2.1.5.1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

การตรวจวิเคราะห์สารในกลุ่มควิโนโลนโดยใช้เทคนิค HPLC นี้ เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวางและมีประสิทธิภาพสูง สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารได้โดยอาศัยข้อมูลเกี่ยวกับค่าการดูดกลืนแสงโดยทำการตรวจวัดด้วยเครื่องultraviolet spectrophotometer นอกจากนี้ยังใช้เวลาในการวิเคราะห์สารปริมาณน้อยได้ดี มีค่าความเที่ยงและความแม่นที่ดี แต่เทคนิคนี้มีราคาของเครื่องมือและวิธีการวิเคราะห์ที่สูง (McGill และ Hardy, 1991)

เป็นการพัฒนาเทคนิคโครมาโตกราฟีให้มีประสิทธิภาพในการแยกสารผสมออกจากกันให้เร็วขึ้นโดยการใช้ลูกสูบ (pump) คุณภาพสูงอัดวัฏภาคที่เคลื่อนที่ด้วยความดันสูงเพื่อช่วยให้ของเหลวไหลเร็วขึ้นและใช้วัฏภาคที่อยู่กับที่ให้มีขนาดเล็กลงสำหรับบรรจุในคอลัมน์เพื่อให้พื้นที่ผิวสัมผัสของวัฏภาคที่อยู่กับที่กับที่เกิดแรงกระทำของสารผสมที่ต้องการแยกให้มากขึ้น เทคนิค HPLC สามารถแยกสารผสมที่อาจมีมวลโมเลกุลสูงๆ หรือ ทั้งผลิตภัณฑ์สารอินทรีย์และอนินทรีย์ได้ จึงเป็นเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับแมโครโมเลกุล (macromolecules) สารอนินทรีย์หรืออนุมูลไอออน ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ไม่คงตัว (labile natural products) สารประกอบทางด้านยาและสารชีวเคมี โดยใช้ตัววัดสัญญาณ (detector) แบบอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิล ที่เป็นตัววัดสัญญาณที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง มีความไวต่อการตอบสนองสูงอาศัยหลักการดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเลตหรือช่วงวิสิเบิล (คณิตา,2542)

2.1.5.2 Enzyme – Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

เป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการตรวจวัด antigen โดยการใช้ antibody ที่ให้ผลทางชีวภาพเฉพาะกับยาและเอนไซม์ที่เชื่อมต่อทางเคมีกับ antigen หรือ antibody วิธี ELISA นี้เป็นวิธีการที่ประหยัดและรวดเร็ว แต่เป็นวิธีการที่ใช้ตรวจวัดแบบคร่าวๆ (Screening Method) เท่านั้น สำหรับสารตัวอย่างที่ต้องการผลที่ถูกต้อง แม่นยำจึงต้องนำไปตรวจวัดด้วยวิธีทาง mass spectrometry เพื่อยืนยันผลการวิเคราะห์อีกครั้ง จึงไม่เหมาะสำหรับนำมาใช้ในงานประจำ (McGill และ Hardy, 1991)

2.1.5.3 Mass Spectrometry (MS)

โดยใช้ลิควิดโครมาโตกราฟี (Liquid chromatography) คู่กับอิเล็กโทรสเปรย์แมสสเปกโทรเมทรี และแทนเด็ม แมสสเปกโทรเมทรี วิธีการนี้เป็นวิธีการที่ดีมากในการทำคุณภาพวิเคราะห์ของสาร เพราะสามารถยืนยันและใช้ตรวจสอบระบุชื่อสารระดับน้อยมากๆได้อย่างแม่นยำ และใช้สารตัวอย่างเพียงเล็กน้อย แต่เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่เครื่องมือวิเคราะห์มีราคาแพงมาก และต้องใช้บุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญโดยเฉพาะ (McGill และ Hardy, 1991)

2.1.5.4 Colorimetric method

เทคนิคคัลเลอริเมตริกเป็นการวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสาร โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสี (color formation)ของหมู่ฟังก์ชันในโมเลกุลกับรีเอเจนท์ที่เหมาะสม เกิดเป็นสารมีสีสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าดูดกลืนแสงได้ในช่วงvisible ความเข้มของสีจะเปลี่ยนแปลงไปตามปริมาณของสารที่ทำให้เกิดสีนั้น จากนั้นทำการตรวจวัดโดยใช้เครื่อง UV-VIS spectrophotometer อ่านความเข้มของสีและหาปริมาณโดยการเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานที่เตรียมในความเข้มข้นต่างๆ แล้วทำให้เกิดสีเช่นเดียวกับสารละลายตัวอย่างทุกประการ การเปรียบเทียบอาจทำได้โดยใช้ calibration curve หรือเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นใกล้เคียงกับสารตัวอย่าง (สุวรรณา,2544)

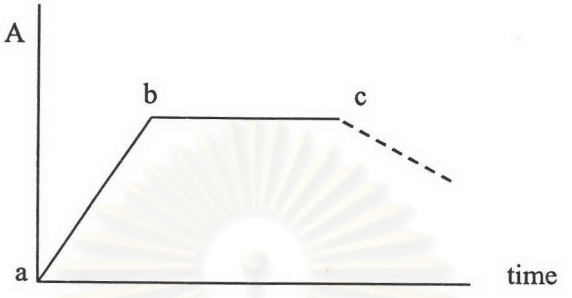
คุณสมบัติที่สำคัญของปฏิกิริยาที่ใช้ใน colorimetry

ที่มาของปฏิกิริยาเคมีที่นำมาใช้ใน colorimetry นั้น ได้มาจากปฏิกิริยาการเกิดสีที่ใช้ในการตรวจเอกลักษณ์ของสารต่างๆที่เรียกว่า “color test” โดยนำมาปรับปรุงให้มีคุณสมบัติเหมาะสมกับการวิเคราะห์หาปริมาณ กล่าวคือ

1. สีที่เกิดขึ้นจะต้องมีความเข้มสูงคุณสมบัติประการนี้จะส่งผลถึง sensitivity ของการวิเคราะห์ คือสามารถวิเคราะห์สารในปริมาณที่ต่ำมากๆได้ และแม้จะมีสารในปริมาณที่ต่างกันเพียงเล็กน้อยสีที่เกิดขึ้นควรมีความเข้มสีที่ต่างกันชัดเจน

2. ปฏิกิริยาควรเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว และสีที่เกิดขึ้นจะต้องมีความคงตัวสูงตลอดช่วงที่ทำการวัด

รูปที่ 2.11 แสดงความสัมพันธ์ดังกล่าว ab เป็นช่วงเวลาที่เกิดปฏิกิริยาซึ่งควรเป็นช่วงเวลาที่สั้นที่สุด และ bc เป็นระยะเวลาที่สีคงตัว คือมีค่า A คงที่ตลอดในระยะเวลาที่นานพอที่จะวัดได้อย่างสะดวกก่อนที่ความเข้มของสีจะเปลี่ยนแปลง



รูปที่ 2.11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของสีกับเวลา

3. ความเข้มของสีที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสาร คือ มีความสัมพันธ์เป็นไปตาม Beer's Law

การวิเคราะห์ด้วยวิธีการเกิดสีนี้ ในทางปฏิบัติจำเป็นต้องควบคุมให้ปฏิกิริยาเคมีเกิดขึ้นอย่างสม่ำเสมอทุกๆครั้ง สารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างมักทำควบคู่กันเสมอ เพราะความคลาดเคลื่อนจากปฏิกิริยาเคมีมักเกิดขึ้นง่าย โดยเฉพาะอย่างยิ่งปฏิกิริยาที่ไวต่อแสง อุณหภูมิ หรือการเปลี่ยนแปลง pH

แนวทางงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการพัฒนาการตรวจสอบวิเคราะห์สารกลุ่มควิโนโลนโดยใช้เทคนิคการเกิดสีที่เหมาะกับการตรวจสอบหาสารปนเปื้อนเบื้องต้นได้อย่างแม่นยำ โดยไม่จำเป็นต้องใช้เทคนิคที่มีความสลับซับซ้อนและต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญเฉพาะทาง และยังสามารถนำไปใช้ตรวจสอบสารปนเปื้อนที่ภาคสนามได้

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์หาสารกลุ่มควิโนโลนโดยการใช้เทคนิคต่างๆกันไปนั้นมีหลายชิ้นที่มีความน่าสนใจ ส่วนใหญ่เป็นการตรวจวิเคราะห์ในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ ในสิ่งแวดล้อมต่างๆ และงานวิจัยอื่นที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวิเคราะห์สารในกลุ่มควิโนโลน

2.2.1 การวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มควิโนโลนที่ปนเปื้อนในอาหาร, เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ชนิดต่างๆ

HPLC เป็นเทคนิคที่นิยมใช้วิเคราะห์สารกลุ่มควิโนโลน ดังงานวิจัยของดานิศและคณะ(2540) ทำการวิเคราะห์สารตกค้างกลุ่มควิโนโลนจากตลาดสดเขตอำเภอเมือง 8 จังหวัดทั่วประเทศไทย ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างในฤดูฝน ฤดูร้อนและฤดูหนาว ในเนื้อและตับไก่ ตรวจหาฟลูมิควินและ Oxolinic acid ส่วนในเนื้อและตับสุกรเป็นการหาฟลูมิควินและนอร์ฟล็อกซาซิน ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้ acetonitrite : Methanol : 0.01M oxalic acid อัตราส่วน 3:1:6 เป็น mobile phase พบว่าในตับไก่และสุกรจะพบสารปนเปื้อนมากกว่าในเนื้อไก่และเนื้อสุกร โดยพบฟลูมิควินในไก่มากที่สุดในฤดูหนาว (0.761 ppm) ส่วน Oxolinic acid พบมากที่สุดในฤดูฝน (0.048 ppm) สำหรับในสุกรจะพบนอร์ฟล็อกซาซินมากที่สุดในฤดูหนาว (0.059 ppm) และฟลูมิควินพบมากที่สุดในฤดูร้อน (0.146 ppm)

ในปีต่อมา Delmas และคณะ(1998) ทำการวิเคราะห์ฟลูมิควินในพลาสมาของแกะด้วยเทคนิค HPLC ใช้คอลัมน์ Lichrospher RP Select B (125 x 4 mm I.D.) 5 µm และ C_{18} (4 x 4 mm) ทำการวิเคราะห์ที่ 324 nm ต่อมา Ramos และคณะ (2003) ได้ใช้เทคนิค HPLC-Fluorescence ในการวิเคราะห์ควิโนโลน 5 ตัว คือ flumequine, enrofloxacin, ciprofloxacin, sarafloxacin และ oxolinic acid ในเนื้อสุกรและปลาแซลมอน โดยทำการปั่นตัวอย่างด้วย 0.05 M phosphate buffer ที่ pH 7.4 ทำการกำจัดสิ่งรบกวนด้วย Discovery DS-18 cartridges และทำการแยกสารด้วย Symmetry C_{18} โดยใช้ acetonitrile-0.02 M phosphate buffer pH 3.0 (34:66) เป็น mobile phase สำหรับ flumequine และ oxolinic acid วัดที่ความยาวคลื่น excitation 312 นาโนเมตร ความยาวคลื่นemission 366 นาโนเมตร โดยใช้ acetonitrile 0.02 M phosphate buffer pH 3.0 (18:82) เป็น mobile phase สำหรับ ciprofloxacin, enrofloxacin และ sarafloxacin วัดที่ความยาวคลื่น excitation 280 นาโนเมตร ความยาวคลื่นemission 450 นาโนเมตร พบว่าทุกชนิดมีค่า limit of detection เท่ากับ 5 นาโนกรัมต่อกรัม ยกเว้น sarafloxacin มีค่าเท่ากับ 10 นาโนกรัมต่อกรัม

Xuan และคณะ (2001) ทำการวิเคราะห์ควิโนโลนชนิดใหม่ (BMS-284756) ในหนู ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้คอลัมน์ Nucleosil 100 (25 cm x 4.6mm ,10 μm) และมี mobile phase คือ acetonitrile และ 0.01 M NaH_2PO_4 อัตราส่วน 20 : 80 พบว่ามีค่า R^2 เท่ากับ 0.998 ช่วงความเข้มข้น 0.2 – 10.0 μg/ml เช่นเดียวกับ Eng และคณะ (1998) ที่ใช้เทคนิค HPLC ในการวิเคราะห์ฟลูมิควินและออกโซลินิก แอซิดในเนื้อไก่ที่ทำการ spike สารลงไป 5, 10, 25 และ 50 ng/g โดยใช้คอลัมน์ Hypersil ODS (5 x 4.6 มิลลิเมตร) มี acetonitrile, tetrahydrofuran และ 20mM sodium phosphate ในอัตราส่วน 20 : 15 : 65 เป็น mobile phase พบว่ามีค่าการกลับคืน (% recovery) ในช่วง 94.0 – 114.8 % สำหรับสารทั้ง 2 ชนิด นอกจากนี้การวิเคราะห์ควิโนโลน 9 ชนิด ในเนื้อไก่ด้วยเทคนิค HPLC ในการวิจัยของ Yorke และ Froc (2000) ทำการวิเคราะห์โดยใช้คอลัมน์ PLRP – S (150 x 4.6 มิลลิเมตร, 5 μm) มี acetonitrile, tetrahydrofuran และ 20 mM sodium phosphate เป็น mobile phase เช่นเดียวกัน พบว่าสามารถทำการวิเคราะห์ในความเข้มข้นช่วง 15 – 30 ไมโครกรัม/กิโลกรัม

Pecorelli และคณะ (2002) ได้ใช้วิธีการวิเคราะห์ควิโนโลน 13 ชนิด ในอาหารสัตว์ โดยทำการสกัดด้วยสารละลาย metaphosphoric acid / acetonitrile ที่ pH 2.6 ด้วยวิธี liquid chromato graphy (LC-FLD-UV-DAD) ใช้คอลัมน์ C_5 (150 x 4.6mm, 5 μm) มีค่า r^2 เท่ากับ 0.999 ค่า LOD ของ นาลิดิซิก แอซิด , นอร์ฟล็อกซาซินและฟลูมิควิน เท่ากับ 1.1, 1.3 และ 0.9 mg/kg ตามลำดับ เช่นเดียวกับ Marazuela และ Moreno (2004) ศึกษาการใช้ LC-FLD-UV-DAD เพื่อหาปริมาณควิโนโลนที่ตกค้างในน้ำนมโดยใช้ Norfloxacin เป็น internal standard แล้วทำการแยกด้วยคอลัมน์ ($AQUA^{TM}$ C_{18}) มีค่า quantification limits 2.4 ถึง 10 ng/ml ส่วน Bailac และคณะ (2004) ทำการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มควิโนโลนในเนื้อไก่ด้วยเทคนิค liquid chromatography (LC) โดยวิเคราะห์หานอร์ฟล็อกซาซิน,ฟลูมิควินและสารกลุ่มควิโนโลนอีก 6 ตัว โดยใช้ acetonitrile และ citric buffer เป็น mobile phase ที่ค่าพีเอช 4.5 มีเปอร์เซ็นต์การกลับคืน 66 – 91 % ที่ช่วงความเข้มข้น 30 – 300 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ มีค่า limits of detection ในช่วง 16 – 30 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

นอกจากนี้ยังมีการทำชุดทดสอบโดย ธงชัยและคณะ(2544) ทำการพัฒนาชุดตรวจสอบยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมโค โดยมีหลักการ คือ หยอดตัวอย่างน้ำนม 0.1 มิลลิลิตร ลงในชุดตรวจสอบและทำการอบเพาะที่อุณหภูมิ 65±1 องศาเซลเซียสนาน 2½- 3½ ชั่วโมง ถ้าตัวอย่างน้ำนมที่ทำการตรวจไม่มียาปฏิชีวนะตกค้างแบคทีเรีย *B. stearothermophilus* ก็จะสามารถแบ่งตัวเป็นผลให้มีการใช้สารอาหารในหลอดทดสอบ ทำให้มีสภาพกรดเกิดขึ้นซึ่งจะไปเปลี่ยนสีของสาร Bromcresol purple blue จากสีม่วงเป็นสีเหลือง แต่ถ้าในน้ำนมมียาตกค้างอยู่ ยาก็จะไปยับยั้งการแบ่งตัวของแบคทีเรีย ทำให้ไม่เกิดขบวนการการใช้สารอาหารในหลอดทดสอบ ดังนั้นสาร Bromcresol purple blue ก็ยังคงมีสีม่วงตามเดิม

2.2.2 การวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการปนเปื้อนของสารกลุ่มควิโนโลนในสิ่งแวดล้อม

การวิจัยการปนเปื้อนของสารกลุ่มควิโนโลนยังไม่เป็นที่แพร่หลายมากนัก อย่างไรก็ดีมีการศึกษาการปนเปื้อนในน้ำผิวดิน ได้แก่ Reverteและ คณะ (2003) ได้ทำการวิเคราะห์น้ำตัวอย่างจากแม่น้ำ บ่อน้ำ และ ระบบบำบัดน้ำเสีย โดยใช้วิธี Solid Phase Extraction (SPE) และ HPLC-MS เพื่อวิเคราะห์หาควิโนโลน 2 ชนิด คือ enrofloxacin และciprofloxacin พบว่าค่าการกลับคืน (% recovery) ของน้ำจากแม่น้ำมีค่าเท่ากับ 88 ถึง 112 % ส่วนน้ำจากบ่อน้ำมีค่าสูงกว่า 64 % และน้ำจากระบบบำบัดน้ำเสียมีค่าเท่ากับ 68 - 89% ตามลำดับ สำหรับผลของการวิเคราะห์จากน้ำตัวอย่างทั้ง 3 แห่งพบเพียง ciprofloxacin ในระบบ บำบัดน้ำเสีย ซึ่งมีค่า เท่ากับ 0.58- 0.6 ไมโครกรัม / ลิตร

ในปีเดียวกัน Turiel และคณะ (2003) ทำการวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของควิโนโลน (นอร์ฟล็อกซาซิน, นาลิดิซิก แอซิด และ ฟลูมิควิน) ในน้ำผิวดิน ด้วยวิธีการ LC-UV (Liquid Chromatography Ultraviolet detection) โดยใช้ตัวดูดซับ(sorbent) 4 ชนิด คือ C_{18}, styerenedivinyl benzene (SDB), C_{18} cation-exchange และ SDB cation-exchange และเลือกใช้ C_{18} cation-exchange ถูกเลือกใช้ในการวิเคราะห์ควิโนโลนในน้ำจากทะเลสาบและแม่น้ำ พบว่ามีค่า limit of detection เท่ากับ 8-20 นาโนกรัม/ลิตร

สำหรับในประเทศไทยมีหน่วยงาน คือ หน่วยงานพัฒนาและตรวจสอบคุณภาพสินค้าประมงในประเทศไทยให้บริการตรวจหาสารตกค้างออกโซลินิก แอซิด (Oxolinic acid) โดยใช้วิธี HPLC และออกใบรับรองคุณภาพ โดยทำการเก็บตัวอย่างจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งของเกษตรกร ดำเนินการโดยเก็บตัวอย่างกุ้งกุลาดำที่มีอายุ 90 วันขึ้นไปก่อนจับประมาณ 5วัน จากรอบบ่อและแจ้งให้เกษตรกรโดยออกใบแจ้งผล มีวัตถุประสงค์เพื่อแก้ไขปัญหายาต้านจุลชีพตกค้างในกุ้งกุลาดำ

2.2.3 การวิจัยอื่นที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มควิโนโลน

ส่วนใหญ่เป็นงานวิจัยคุณสมบัติของควิโนโลนด้วยเทคนิคต่างๆ ดังตัวอย่าง ทำการศึกษาปฏิกิริยาระหว่างนอร์ฟล็อกซาซินและ 2,4-dinitrofluorobenzene Razak และคณะ (1999) พบว่าความยาวคลื่นสูงสุดที่ 365 นาโนเมตร มีความคงตัวเป็นเวลา 45 นาที มีค่า limit of detection เท่ากับ 0.47 μg/ml และค่า R^2 เท่ากับ 0.9999 และปฏิกิริยาของนอร์ฟล็อกซาซินในยากับโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต Nafisur และคณะ (2004) โดยทำการศึกษาในความเข้มข้นช่วง 1.0-20 μg/ml พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 603 นาโนเมตร

การศึกษาคุณสมบัติของนอร์ฟล็อกซาซิน Liming และคณะ (2003) และฟลูมิควิน Giménez และคณะ (2004) ด้วยเทคนิค fluorimetric พบว่า นอร์ฟล็อกซาซินมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของ excitation และ emission เท่ากับ 334 และ 431 นาโนเมตร และมีค่า limit of detection เท่ากับ 0.02 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร ค่า R^2เท่ากับ 0.9996 ส่วนฟลูมิควินมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นในการ excitation เท่ากับ 240 และความยาวคลื่น emission อยู่ที่ 362 นาโนเมตร นอกจากนี้ Gawad และ Attia (1994) ทำการวิเคราะห์ปริมาณของ Ciprofloxacin ในยารักษาโรคด้วยการทำปฏิกิริยากับ Iron(III) Chloride ในช่วงความเข้มข้น 5 ถึง 150 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 384 นาโนเมตร และมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9978

มีการศึกษาคุณสมบัติของควิโนโลนด้วยเทคนิค HPLC โดยการใช้คอลัมน์ต่างกันไป ได้แก่ การใช้คอลัมน์ PRP-1 (250 x 4.1 mm, 10 μm) Kim และ Lee (1996) มี Phosphate buffer และ organic modifier เป็น mobile phase โดยทำการวัดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และการใช้คอลัมน์ LichroCART (250 x 4 mm I.D.) ในการวิเคราะห์ Ciprofloxacin จากงานวิจัยของ Zupancie และ Pihlar (1999) มี 0.01M phosphoric acid และ acetonitrile อัตราส่วน 80 : 20 เป็น mobile phase นอกจากนี้การวิเคราะห์นอร์ฟล็อกซาซินด้วยเทคนิค HPLC จากงานของ Borrego และ Díaz (1999) ได้ทำการวิเคราะห์โดยใช้คอลัมน์ Lichrosorb-RP-8 (10μm , 20 cm x 4.6 mm) ที่ความยาวคลื่น 278 นาโนเมตร พบว่า มีค่า R^2เท่ากับ 0.999 ในความเข้มข้นช่วง 1 ถึง 20 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร ส่วน Tourakiและคณะ (2001) ทำการวิเคราะห์ออกโซลินิก แอซิดและฟลูมิควิน โดยการใช้คอลัมน์ Hypersil octadecylsilane (150 x 4.6 มิลลิเมตร, 5 μm) มี 0.1 M phosphate buffer และ Methanol อัตราส่วน 20 : 80 เป็น mobile phase ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ช่วงความเข้มข้น 1.0 – 50 ไมโครกรัม / กรัม

เทคนิคอื่นในการศึกษาถึงคุณสมบัติของควิโนโลน คือ งานวิจัยของEl-Kommosและคณะ (2003) ได้ทำการตรวจวิเคราะห์หานาลิดิซิก แอซิด, นอร์ฟล็อกซาซินและควิโนโลนอีก 6 ตัว ด้วยวิธี metal chelation โดยใช้ zirconium, molybdenum, vanadium และ tungsten พบว่าที่สภาวะเหมาะสม chelates จะมีความเสถียรภาพที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน และถ้าหากทำการเพิ่มอุณหภูมิเป็น 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง จะทำให้มีเสถียรภาพมากขึ้น สำหรับค่า limits of detection ของทั้ง 8 ชนิด มีค่าอยู่ในช่วง 1.214 ถึง 2.046 นาโนกรัม/ มิลลิลิตร จากนั้นทำการประยุกต์ใช้โดยนำไปทำการวิเคราะห์หาในน้ำปัสสาวะและพลาสมา

นอกจากนี้มีการศึกษาควิโนโลนในพลาสมาและน้ำปัสสาวะของมนุษย์ ดังเช่นงานวิจัยของ Ocaña และคณะ (2003) ได้ทำการศึกษาสารกลุ่มควิโนโลนในน้ำปัสสาวะของมนุษย์ด้วยเทคนิค fluorimetric ในช่วงความเข้มข้น 0.1-0.75 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงช่วง excitation ที่ 281 nm และ emission ที่ 546 nm โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9997 ส่วน Mascher และ Kikuta (1998) ทำการวิเคราะห์ใน พลาสมาและน้ำปัสสาวะของมนุษย์ด้วยวิธี HPLC โดยใช้คอลัมน์ C_{18} ใช้ methanol, perchloric acid และ triethylamine ในน้ำ เป็น mobile phase ทำการวัดที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร พบว่ามีค่า R^2 เท่ากับ 0.999 ค่า LOQ เท่ากับ 31.0 นาโนกรัม/ มิลลิลิตร Vybiralova และคณะ (2004) ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาในมนุษย์ด้วยเทคนิค HPLC เช่นกัน โดยใช้คอลัมน์ C_{18} 5 μm และมี mobile phase คือ Nonylamine และ Acetonitrile อัตราส่วน 95 : 5 พบว่ามีค่า R^2 เท่ากับ 0.9997

สำหรับงานวิจัยในครั้งนี้จะเป็นการพัฒนาชุดตรวจสอบสารกลุ่มควิโนโลน 3 ชนิด คือ นาลิดิซิก แอซิด, นอร์ฟล็อกซาซิน และฟลูมิควิน ซึ่งเป็นตัวที่มีความนิยมใช้ในประเทศไทย เป็นการตรวจสอบในอาหารสัตว์โดยใช้เทคนิคคัลเลอริเมตริก วัตถุประสงค์ในการวิจัยเพื่อเป็นการตรวจสอบในระดับเบื้องต้น สามารถใช้งานได้สะดวก ค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบต่ำ มีความแม่นยำในระดับหนึ่ง โดยรายละเอียดในการทำการวิจัยจะได้กล่าวในส่วนของวิธีการศึกษาและผลการศึกษาในบทต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย