บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคเต้านมอักเสบเป็นปัญหาที่เกิดขึ้นบ่อยในฟาร์มโคนม ทั้งฟาร์มขนาดเล็กและขนาดใหญ่ ความสูญเสียที่เกิดขึ้นแก่เกษตรกรจะทำให้ผลผลิตน้ำนมลดลง น้ำนมซึ่งเป็นอาหารที่มีคุณค่าสูงเสื่อมคุณภาพ ไม่เหมาะที่จะส่งจำหน่ายให้กับผู้บริโภค เนื่องจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่อาจมีอันตรายต่อสุขภาพ เพิ่มต้นทุนในการผลิตโดยเกษตรกรต้องเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาและค่าเลี้ยงดูโคนมโดยไม่ได้รับผลผลิตตอบแทน โรคจะทวีความรุนแรงยิ่งขึ้น หากเริ่มการรักษาช้า เลือกชนิดยาที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพไม่ครอบคลุมเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรค ระดับยาภายในเต้านมต่ำหรือหยุดยาเร็วเกินไป เต้านมจะฝ่อลีบไม่สามารถสร้างน้ำนมได้ หรือโรครุนแรงเฉียบพลันจนโคนมตายในที่สุด จึงจำเป็นต้องให้การรักษาอย่างมีประสิทธิภาพ ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของยา, ชนิดของเชื้อ, การบริหารยาและการเปลี่ยนแปลงยาในร่างกายตามขบวนการเภสัชจลนศาสตร์ ขณะเดียวกันจะต้องกำหนดระยะหยุดยา (witholding time) เพื่อให้ผู้บริโภคได้ดื่มนมซึ่งนอกจากจะปลอดภัยจากจุลินทรีย์แล้ว ยังปลอดภัยจากสารพิษที่เกิดจากการขับยาออกทางน้ำนมด้วย ยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการรักษาเต้านมอักเสบนั้นมีอยู่หลายชนิด การใช้ยา Ampicillin และ Cloxacillin ร่วมกันจะทำให้ยาออกฤทธิ์กว้าง การบริหารยาในรูปของยาเฉพาะที่โดยการฉีดยาเข้าเต้านมโดยตรง (Intramammary infusion) เป็นวิธีที่สะดวกและทำให้ความเข้มข้นของยาในเต้านม ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีการติดเชื้อสูงขึ้นจนถึงระดับที่ยาออกฤทธิ์ต้านเชื้ออย่างได้ผลในเวลารวดเร็ว อย่างไรก็ตามการใช้ยาต้านจุลชีพในขนาดสูงติดต่อกันเป็นเวลานานหลายวัน อาจก่อให้เกิดปัญหาจุลชีพดื้อยา หรือมีการสะสมของยาในสัตว์จนเกิดเป็นพิษได้ ส่วนอันตรายต่อผู้บริโภคนั้น มักเกิดจากการบริโภคน้ำนมที่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์หรือมีการตกค้างของยา (drug residues) ซึ่งผลกระทบที่มีต่อสุขภาพ อาจทำให้ผู้บริโภคน้ำนมมีอาการแพ้ยาหรือดื้อยาเกิดขึ้น และหากบริโภคน้ำนมที่มียาตกค้างอยู่เป็นประจำ ยาอาจสะสมในร่างกายจนเกิดเป็นพิษต่อผู้บริโภคได้เช่นเดียวกัน ดังนั้นเพื่อให้การใช้ยาต้านจุลชีพรักษาเต้านมอักเสบเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ และลดปัญหาการบริโภคสารพิษจากยาที่ตกค้างเนื่องจากการขับยาออกทางน้ำนม นอกจากชนิดของยาที่จะต้องพิจารณาเลือกใช้แล้ว ระดับของยาในน้ำนมนับเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงเพื่อใช้ประโยชน์ต่อการกำหนดขนาดของยา ระยะเวลาในการให้ยา และกำหนดระยะหยุดยาที่เหมาะสม ทำให้ผู้บริโภคได้ดื่มน้ำนมที่มีคุณภาพดีและไม่มีอันตรายจากสารพิษตกค้างดังกล่าว การวัดระดับยาในน้ำนมนั้นมีเทคนิคต่าง ๆ หลายวิธี วิธีเดิมใช้หลักทางจุลชีววิทยาซึ่งมีขั้นตอนที่ยุ่งยาก และใช้เวลานานกว่าจะได้ผลในการวิเคราะห์ จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคการแยกและวัดระดับสารด้วยระบบ High Performance Liquid Chromatography ซึ่งใช้งานได้สะดวกง่าย ที่สำคัญคือสามารถแยกสารได้หลายชนิดได้อย่างแม่นยำ ถูกต้อง ในเวลาที่รวดเร็ว ได้ข้อมูลที่นำไปแปรผลใช้เป็นประโยชน์ทันตามความต้องการ จึงน่าจะได้นำเทคนิค chromatography นี้มาพัฒนาวิธีการตรวจวัดระดับยาต่าง ๆ หลายชนิดในน้ำนม และผลิตภัณฑ์จากน้ำนมอื่น ๆ ต่อไป

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

2.1 เพื่อศึกษาการขับยาออกทางน้ำนมของยาสอดเข้าเต้านม Ampicillin และ Cloxacillin จากเต้านมที่มีการอักเสบภายหลังการบริหารยาโดยการฉีดยาเข้าเต้านมอักเสบโดยตรง

2.2 เพื่อศึกษาการดูดซึม การกระจาย และการขับยาออกทางน้ำนมของยาสอดเข้าเต้านม Ampicillin และ Cloxacillin จากเต้านมอักเสบกับเต้านมข้างเคียง

2.3 เพื่อศึกษาเทคนิคของวิธีการตรวจวัดระดับยาในน้ำนม โดยใช้ระบบ High Pressure Liquid Chromatography ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการตรวจหายาตกค้าง โดยการวัดระดับยานี้ในผลิตภัณฑ์นมอื่น ๆ ได้

2.4 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของยา Ampicillin และ Cloxacillin ในการรักษาโรคเต้านมอักเสบ

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

3.1 จะได้ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของยาในเต้านมอักเสบที่ได้รับยาฉีดเข้าเต้านมโดยตรง

3.2 จะได้ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับปริมาณยาที่มีการดูดซึม การกระจายของยาจากเต้านมอักเสบที่ได้รับยาฉีดเข้าเต้านมโดยตรง ไปยังเต้านมอื่นที่อยู่ข้างเคียง

3.3 จะได้ข้อมูลระยะหยุดยาก่อนส่งนมจำหน่าย ภายหลังการใช้ยาสอดเข้าเต้านม Ampicillin และ Cloxacillin รักษาเต้านมอักเสบ ซึ่งใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเผยแพร่ให้เกษตรกร ใช้ปฏิบัติในการรีดนมส่งจำหน่ายเพื่อให้ได้น้ำนมที่ปลอดสารพิษจากยาตกค้าง

3.4 จะได้ข้อมูลระยะเวลาที่เหมาะสมในการให้ยา เพื่อรักษาระดับยาในเต้านมให้สูงพอที่จะต้านเชื้อจุลชีพได้ ทำให้การใช้ยาเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ

3.5 จะได้ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับเทคนิคของวิธีการตรวจวัดระดับยาโดยระบบ High Performance Liquid Chromatography ซึ่งสามารถพัฒนาไปใช้ในการตรวจหาการตกค้างของยานี้ ในผลิตภัณฑ์นมอื่น ๆ ได้ต่อไป

3.6 ผู้บริโภคจะได้ดื่มน้ำนมที่มีคุณภาพดี ไม่มีอันตรายจากจุลินทรีย์และสารพิษจากยาที่ตกค้างอยู่ในน้ำนม

3.7 ได้ข้อมูลประสิทธิภาพของยา (Efficacy of drugs) ในการใช้ Intramammary Ampicillin และ Cloxacillin รักษาโรคเต้านมอักเสบ การเลือกชนิดของยาที่มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคได้อย่างเหมาะสม จะทำให้เกษตรกรเสียค่าใช้จ่ายน้อยที่สุด

3.8 คณาจารย์และนักวิชาการได้ใช้ประโยชน์จากการศึกษาเทคนิคการวิเคราะห์สาร และนำข้อมูลพื้นฐานนี้มาแปรผลเพื่อใช้สอนนักศึกษาต่อไป

4. เอกสารและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Ampicillin เป็นยาต้านจุลชีพในกลุ่ม Penicillins ซึ่งมี β-lactam ring เป็นโครงสร้างหลักสำคัญที่ทำให้ยามีฤทธิ์ต้านจุลชีพเช่นเดียวกับโครงสร้างหลักของยา Cloxacillin Ampicillin เป็นยาที่สำคัญในกลุ่มยา Penicillins เนื่องจากมีวงฤทธิ์ต้านเชื้อกว้าง (broad spectrum) ออกฤทธิ์ทำลายบักเตรีทั้งชนิดแกรมบวก และแกรมลบ (Wise, 1982; Ball, 1982) จึงใช้รักษาโรคเต้านมอักเสบที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อได้หลายชนิด และได้ผลดีเยี่ยมในการทำลายเชื้อ Streptococcus agalacteae และ Staphylococus aureus ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของโรคเต้านมอักเสบ (Wishart, 1981) Cloxacillin เป็นยาที่ออกฤทธิ์ได้ผลดีต่อเชื้อ Staphylococcus ที่ดื้อต่อ Ampicillin ดังนั้นการใช้ยาสองขนานนี้ร่วมกัน จะทำให้ประสิทธิภาพในการรักษาดีขึ้น ความสำเร็จในการรักษาโรคเต้านมอักเสบมิได้ขึ้นกับการเลือกชนิดยาที่ถูกต้องอย่างเดียว (Ziv, 1980a) การบริหารยา ขนาดของยาและระยะห่างของการให้ยามีผลต่อปริมาณยาในเต้านมที่จะออกฤทธิ์ต้านเชื้อ (Ziv, 1980b) การใช้ยาชนิดสอดเข้าเต้าฉีดเข้าเต้านมโดยตรง ทำให้ระดับยาในเต้านมสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว และสามารถกำหนดขนาดของยาในเต้านมได้ค่อนข้างแน่นอน (Ziv, 1980c) อย่างไรก็ตามยาที่มีตัวยาชนิดเดียวกัน ก็ยังมีการเปลี่ยนแปลงในร่างกายโดยขบวนการเภสัชจลนศาสตร์ ได้แก่ การดูดซึม การกระจาย และการขับออกของยาที่แตกต่างกัน ดังนั้นการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์โดยการวัดระดับของยาในน้ำนม จึงต้องมีการศึกษาต่อไปเนื่องจากมียาหลายชนิดที่ผลิต ออกสู่ตลาดและมีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงยาในร่างกาย การศึกษาเภสัชจลนศาสตร์จะสามารถช่วยให้การใช้ยาในทางคลินิกรักษาโรคอย่างได้ผล และไม่เกิดอันตรายจากพิษของยา (Francois และคณะ, 1987) สำหรับอันตรายต่อผู้บริโภคจากการฉีดยาเข้าเต้านมโดยตรง จะมียาปริมาณมากถูกขับออกมากับน้ำนม จึงต้องมีกำหนดระยะเวลาหยุดยาก่อนส่งนมจำหน่าย (Booth, 1986) อันตรายจากยา Ampicillin และ Cloxacillin นั้น เนื่องจากเป็นยาในกลุ่ม Penicillins ดังนั้น ผู้บริโภคที่มีประวัติแพ้ยา Penicillins หากดื่มนมที่มียานี้ตกค้างอยู่เป็นประจำ อาจเกิดการแพ้ยาเพียงเล็กน้อย (allergy) ไปจนถึงการแพ้ยาอย่างรุนแรงแบบ hypersensitivity (Dewdney, 1984) และเมื่อยาสะสมอยู่ในร่างกายมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น จะเกิดพิษจากยา พบอาการชัก ไตอักเสบเม็ดเลือดขาวต่ำ และเลือดออกผิดปกติ (Parry, 1987) และยังทำให้เกิดปัญหาดื้อยาด้วย จากการสำรวจโดยการตรวจตัวอย่างน้ำนม พบว่าน้ำนมคิดเป็น 1% มีสารตกค้างเป็นพวกยาต้านจุลชีพ (Booth, 1982) ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดปัญหายาตกค้างในน้ำนมมีหลายประการ เช่น เกษตรกรไม่มีระบบในการจดบันทึกประวัติการให้ยา ไม่ทราบกำหนดระยะเวลาหยุดยาก่อนส่งน้ำนม (Witholding time) ไม่มีการควบคุมคุณภาพน้ำนมโดยการตรวจหายาตกค้างในน้ำนมหน้าโรงงานรับซื้อนม และไม่มีบทลงโทษทำให้เกษตรกรยังคงรีดนมส่งจำหน่ายตามปกติ และทราบว่าน้ำนมมียาตกค้างอยู่ก็ตาม การวัดระดับยาในน้ำนมสามารถทำได้ด้วยเทคนิคต่าง ๆ หลายวิธี วิธีทาง Microbiological assay สามารถวัดระดับยาต่าง ๆ ในน้ำนมและใน biological fluid ได้หลายชนิด เช่น ในเลือดและในพลาสม่า แต่ความถูกต้อง (accuracy) และความไว (sensitivity) ต่ำต้องใช้เวลานานในการเพาะเลี้ยงเชื้อ (incubation) เพื่ออ่านผล การทดสอบ (Schmidt and Roholt, 1966, Siman and Yin, 1970, Vilim and Larocque, 1983) จึงทำให้มีการพัฒนาเทคนิคใหม่ ๆ เช่น การวัดระดับยาด้วยวิธี enzyme immunoassay ซึ่งมีความไวสูงแต่มีความยุ่งยากในการเตรียม antibody ต่อยา(Miura, 1981) การวัดระดับยาด้วยวิธี Thin layer chromatography มีความไวและความถูกต้องในการตรวจวัดต่ำ

(Bossuyt, 1976) แต่มีความจำเพาะต่อยาแต่ละชนิด ทำให้สามารถวัดระดับยาหลายชนิดได้พร้อมกัน การใช้เทคนิค High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) เป็นวิธีการที่ใช้กันมากในการตรวจวัดระดับยา ในปัจจุบันและมักใช้แทนวิธีเดิม (Westerlund, 1979) เนื่องจากมีความถูกต้อง (accuracy) ความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) และความรวดเร็ว (Rapidity) ในการตรวจวัดสูง มีรายงานวิธีการวัดระดับยากลุ่ม penicillins ด้วยเทคนิค HPLC มากมาย สำหรับการศึกษาวิจัยนี้ได้ประยุกต์ใช้วิธีของ Mendez และคณะ (1991) และ Francois และคณะ (1987) มาใช้ในการวัดระดับ Ampicillin และ Cloxacillin ในน้ำนมเพื่อหาวิธีการตรวจวัดระดับยาที่เหมาะสม นำไปใช้ประโยชน์การตรวจวัดหายาตกค้าง และเพิ่มประสิทธิภาพการใช้ยารักษาโรคในทางคลินิกต่อไป

ระเบียบวิธีวิจัย

1. **วิธีดำเนินการวิจัย**

1.1 สัตว์ทดลอง

- โคนมพันธุ์ผสมโฮลสไตน์ฟรีเซียน (Holdstein Freishian) ของฟาร์มโคนมองค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี จำนวน 12 ตัว โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มดังนี้

  กลุ่มที่หนึ่ง เป็นกลุ่มที่ไม่เป็นโรคเต้านมอักเสบทั้งสี่เต้า จำนวน 4 ตัว

  กลุ่มที่สอง เป็นกลุ่มที่เป็นโรคเต้านมอักเสบที่เต้านมเต้าใดเต้าหนึ่ง ส่วนสามเต้าที่เหลือไม่เป็นโรคเต้านมอักเสบ จำนวน 8 ตัว

- การให้นม : โคนมทุกตัวให้ปริมาณน้ำนมเฉลี่ย 7.5 กิโลกรัมต่อวัน มีอายุในระหว่าง 4-8 ปี และมีระยะการให้นม (lactation period) อยู่ในครั้งที่ 2, 3 และ 4
- การประเมินสุขภาพ : ก่อนการรีดนมทุกครั้งโคนมทุกตัวได้รับการตรวจวินิจฉัยโรคเต้านมอักเสบจากเต้านมทุกเต้า ด้วยวิธี California Mastitis Test (CMT)พบว่าความรุนแรงของโรคที่ประเมินได้จากอาการและคุณภาพน้ำนม โดยเฉลี่ยจะอยู่ในระดับ +2
- การให้ยา : โคนมทุกตัวไม่เคยได้รับยาต้านจุลชีพใดมาก่อนการทดลองนี้อย่างน้อย 7 วัน

1.2 การบริหารยา

โคนมทุกตัวจะได้รับยาโดยการฉีด Ampiclox®LC เข้าไปในเต้านมครั้งละ 1 หลอด หลังจากรีดนมเช้า-เย็น ติดต่อกัน 3 ครั้ง ในกลุ่มที่หนึ่ง ซึ่งเป็นกลุ่มโคนมปกติที่ใช้ควบคุมการทดสอบยาที่ตกค้างในน้ำนมของกลุ่มที่สอง โดยการให้ยาเข้าไปในเต้านมหน้าขวา และในกลุ่มที่สอง ให้ยาเข้าไปในเต้านมที่มีการอักเสบ

1.3 การประเมินประสิทธิภาพของยา

ตรวจอาการเต้านมอักเสบและทดสอบน้ำนมด้วยวิธี California Mastitis Test ก่อนการรีดนมที่เวลา 0 และ 96 ชั่วโมง

1.4 การตรวจวัดระดับยาในน้ำนม

1. แยกเก็บตัวอย่างน้ำนมจากทุกเต้าก่อนให้ยา และหลังให้ยาที่เวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 และ 96 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างละ 5 มิลลิลิตร ในหลอดแก้วทดลองที่ผ่านขบวนการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว
2. เก็บตัวอย่างน้ำนมทั้งหมดไว้ที่อุณหภูมิ - 60° C ในตู้แช่แข็ง (Deep Freezer) จนกระทั่งนำไปสะกัดและวิเคราะห์หาระดับยาด้วยระบบ High Performance Liquid Chromatogrophy (HPLC)

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

2.1 เครื่องมือวิทยาศาสตร์

1. ชุด HPLC ระบบ gradient ประกอบด้วย

1.1.1 Waters 510 HPLC pumps (Waters Associated, Milford, MA, U.S.A.)

1.1.2 Waters Tunable 486 UV absorbance detector (Waters Associated, Milford, MA, U.S.A.)

1.1.3 Waters System Interface Module (Waters Associated, Milford, MA, U.S.A.)

1.1.4 Waters ™ 717 plus Autosampler (Waters Associated, Milford, MA, U.S.A.)

1.1.5 Maxima 820 chromatographic software (Waters Associated Milford, MA, U.S.A.) เพื่อใช้ควบคุมขบวนการแยกสารที่ต้องการจากสารละลายที่สะกัดได้ โดยโปรแกรมจะได้รับการติดตั้งอยู่ใน hard disk ของ 386 BX IBM compatible computer ที่เชื่อมโยงกับpumps และ UV absorbance detector

1.1.6 Analytical column (Waters Associated, Milford, MA, U.S.A.) เป็นชนิด 300 mm. X 3.9 mm.(i.d.) μ-Bondapax C_{18} reversed phase steel column ที่บรรจุด้วย 10 μm dimethyoctadecylsilyl bonded amorphous silica

1.1.7 Guard pakTM column (Waters Associated, Milford, MA, U.S.A.) ซึ่งบรรจุสารชนิดเดียวกับ analytical column

2. Solvent/Eluent clarification kit (Waters Associated, Milford, MA, U.S.A.) เพื่อใช้ในการกรองตัวทำละลาย
3. Ultrasonicator (Mettler Electronic® Corp.) สำหรับไล่ฟองอากาศออกไปจากตัวทำละลาย
4. NANO pure ultrapure and Deionization water system (Barnstead/thermolyne Corporation Iowa, U.S.A.) เพื่อทำให้น้ำที่ใช้ในการวิจัยอยู่ในรูปของ deionized water ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว
5. Vortex mixer (Vortex Manufacter, Cleveland, OH, U.S.A.)
6. pH meter (Corning, U.S.A.) เพื่อที่จะปรับ pH ของ mobile phase
7. Table top centrifuge (Heraeus, Germany)
8. California Mastitis Test kit (CMT-kit)
9. Deep Freezer (Revco)

2.2 สารมาตรฐาน ampicilln และ cloxacillin

1. Ampicillin (D [-] - ∝- Aminobenzylpenicillin) sodium salt, lot no. 85H0372 (SIGMA, Sigma Chemical Co.)
2. Cloxacillin ([5 - Metlyl - 3 - (0 - chlorophenyl) - 4 - isoxazolyl] penicillin) sodium salt monohydrate, lot no. 40H07391 (SIGMA, Sigma Chemical Co.)

2.3 ยาAmpiclox® LC ของบริษัทสมิทธ์ไคลน์ แอนด์ เฟรนช์ ประเทศไทย จำกัด (Beecham Animal Health, Brentford, England) ในรูป intramammary suspension โดยมีน้ำหนักสุทธิ 3 กรัม ต่อ 1 หลอด ในแต่ละหลอดจะมีส่วนประกอบตัวยาที่สำคัญคือ

1. 75 มิลลิกรัมของ Sodium ampicillin (Sodium 6 - [CDC-) - ∝ - aminophenylacetamido)] penicillanic acid)
2. 200 มิลลิกรัม Sodium cloxacillin (Sodium 6 - [3 - (2 - chlorophenyl) - 5 - methylisoxazole - 4 - carboxamido] penicillanic acid)

2.4 สารเคมี

1. HPLC garade methanol และ acetonitrile (Baker Analysed, Philipburg, NJ, U.S.A.)
2. Analytical grade ammonium acetate และ glacial acetic acid (Merck, Darmstadt, Germany)
3. น้ำกลั่นที่ทำให้บริสุทธิ์และอยู่ในรูปของ deionized water (Barnstead/Thermolyne Coporation, Iowa, U.S.A.)

2.5 การเตรียม Ampicillin และ cloxacillin mobile phase ตามลำดับดังนี้

1. เตรียม 20 m M ammonium acetate buffer โดยเติม deionized water ให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตรลงไปใน 1.548 กรัม ammonium acetate กรองสารละลายที่ได้ผ่านกระดาษกรองชนิด Millipore® membrane filter ที่มีขนาด 0.45 μm
2. เติม acetonitrile ที่กรองเรียบร้อยแล้วลงไปในสารละลาย 20 mM ammonium acetate buffer ที่ได้ในอัตราส่วนของ buffer : acetonitrile โดยปริมาตร = 92 : 8 สำหรับ Ampicillin mobile phase และ 72 : 28 สำหรับ cloxacillin mobile phase
3. ปรับ pH ของ mobile phase ที่ได้ด้วย glacial acetic acid ให้ได้ pH = 5.0
4. ต้องไล่ฟองอากาศจาก mobile phase ที่ปรับ pH เรียบร้อยแล้ว ก่อนนำไปใช้ทุกครั้งด้วยUltrasonicator อย่างน้อย 15 นาที

3. รูปแบบของการวิจัย

3.1 การทดลอง

โคนมจำนวนทั้งหมด 12 ตัว ที่ผ่านการประเมินสุขภาพตามที่กำหนดไว้ และเต้านมทั้งสี่เต้าจะต้องไม่มีแผลและการบวมน้ำ หรือสภาวะอื่น ๆ ที่จะเป็นสาเหตุโน้มนำให้เกิดการอักเสบของเต้านมปกติ หรือเพิ่มความรุนแรงของการอักเสบในเต้านมที่มีการอักเสบอยู่แล้ว ตลอดการทดลองโคนมทุกตัวจะได้รับหญ้า อาหารข้น และน้ำดื่มอย่างสม่ำเสมอเป็นประจำทุกวัน ตามที่องค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทยได้กำหนดไว้ และนำเข้าสู่คอกโครีดนมวันละ 2 ครั้ง (เช้าและเย็น) เพื่อทำการรีดน้ำนมตามปกติ น้ำนมในระยะที่กำลังให้ยาและ 3 วันหลังจากให้ยาครั้งสุดท้าย จะไม่นำเข้าสู่โรงงานนมตามที่บริษัทผู้ผลิตยาได้แนะนำไว้ การทดลองได้แบ่งโคนมออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

<u>การทดลองที่ 1</u> ประกอบด้วยโคนมจำนวน 4 ตัว ที่ปราศจากโรคเต้านมอักเสบทั้งสี่เต้า โดยการตรวจด้วยวิธี California Mastitis Test (CMT) โคนมทุกตัวในกลุ่มนี้จะได้รับยา Ampiclox® LC **ฉีดเข้าเต้านมหน้าขวา**หลังจากการรีดนมในแต่ละครั้ง ครั้งละ 1 หลอด ติดต่อกัน 3 ครั้ง ตัวอย่างน้ำนมที่เก็บได้จะนำมาวิเคราะห์หาปริมาณการตกค้างของ ampicillin และ cloxacillin ในน้ำนมปกติเพื่อเป็นตัวควบคุมเปรียบเทียบกับปริมาณสารตกค้าง ampicillin และ cloxacillin ในโคนมกลุ่มที่มีการอักเสบของเต้านมเต้าใดเต้าหนึ่งเพียงเต้าเดียว

<u>การทดลองที่ 2</u> ประกอบด้วยโคนมจำนวน 8 ตัว ที่ปรากฏมีการอักเสบของเต้านมเต้าใดเต้าหนึ่งเพียงเต้าเดียว เมื่อตรวจวัดด้วยวิธีCMT (ตารางที่ 1) **สำหรับเต้านมข้างที่มีการอักเสบ**จะได้รับยา Ampiclox®LC ฉีดเข้าเต้านมโดยตรง หลังจากการรีดนมในแต่ละครั้ง ครั้งละ 1 หลอด ติดต่อกัน 3 ครั้ง และตัวอย่างน้ำนมที่เก็บได้ทั้งหมดจะนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารตกค้าง ampicillin และcloxacillin โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ต่อไป

ตารางที่ 1 ประวัติและผลการตรวจวัดเต้านมอักเสบด้วยวิธี California Mastitis Test (CMT) ก่อนให้ยา Ampiclox® LC ของแม่โคนมจำนวน 12 ตัว

ลำดับที่	เบอร์แม่โค	วันเกิด	Lactation Period ที่	เต้านมที่ได้รับยา Ampiclox®LC	ผลของ CMT
<u>การทดลองที่</u> 1					
1	D 30117	7 ก.ย. 33	3	หน้าขวา	-
2	D 40195	1 ธ.ค. 34	2	หน้าขวา	-
3	D 40201	7 ธ.ค. 34	3	หน้าขวา	-
4	D 50074	7 ส.ค. 35	2	หน้าขวา	-
<u>การทดลองที่</u> 2					
1	D 20070	8 ส.ค. 32	2	หน้าซ้าย	+2
2	D 40110	10 ส.ค. 34	3	หน้าขวา	+2
3	D 50027	29 มี.ค. 35	4	หลังซ้าย	+2
4	D 50032	7 เม.ย. 35	2	หน้าขวา	+2
5	D 50462	6 ก.ย. 35	2	หน้าซ้าย	+2
6	D 60026	14 ก.พ. 36	2	หลังซ้าย	+3
7	JD 0412	6 พ.ย. 32	2	หลังซ้าย	+3
8	PK 22085	13 พ.ย. 32	2	หน้าขวา	+2

3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน ampicillin และ cloxacillin

3.2.1 เตรียมstock solutions ของสารมาตรฐาน ampicillin และ cloxacillin แต่ละตัวที่มี ความเข้มข้น1000 μg/ml ในน้ำกลั่นและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C นานถึง 6 เดือน แต่ถ้านำมาละลายเพื่อเตรียมสารละลายมาตรฐานจะใช้ได้ไม่เกิน 2 สัปดาห์

3.2.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน ampicillin และ cloxacillin ในแต่ละตัว โดยนำ stock solutions มาละลายและทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้สารละลายมาตรฐานเริ่มแรก ที่ความเข้มข้น 200, 60, 20 และ 10 μg/ml. และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -5°C ได้ไม่เกิน 2 สัปดาห์

3.2.3 นำสารละลายมาตรฐานเริ่มแรกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ได้ในข้อ 3.2.2 มาทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายมาตรฐาน ampicillin และ cloxacillin ที่ 0.83, 1.67, 5.0, 16.67 และ 30.77 μg/ml.

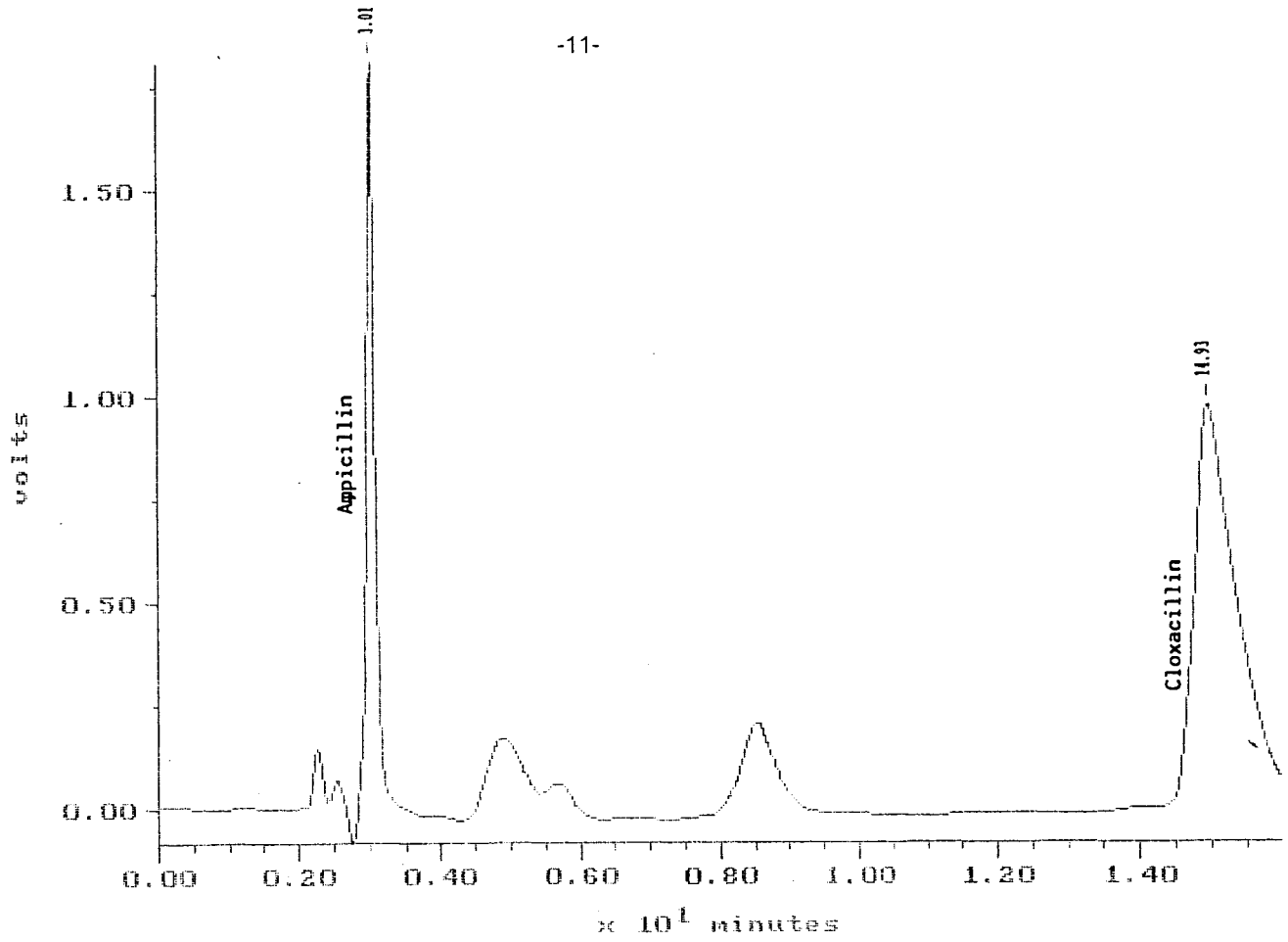
3.2.4 ฉีด 30 μl ของสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นสุดท้าย ผ่าน ampicillin และ cloxacillin mobile phases เข้าไปในระบบ gradient ของ HPLC เพื่อหาความคงที่ของเครื่องมือ HPLC ทั้งระบบที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณของสารตกค้าง ampicillin และ cloxacillin ในตัวอย่างน้ำนมโดยวิธีหาค่าของpeak areas ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน และคำนวณหาlinear regression และ correlation coefficient ของทั้ง ampicillin และ cloxacillin

3.3 การสะกัดและการวิเคราะห์หา ampicillin และ cloxacillin ในตัวอย่างน้ำนม

ละลายตัวอย่างน้ำนมใน water bath เขย่าสารละลายช้าๆ ให้เป็นเนื้อเดียวกัน ไปเปต 1 มิลลิลิตรของสารละลายตัวอย่างที่ได้ลงไปในหลอดแก้วทดลองที่สะอาด และผ่านขบวนการฆ่าเชื้อแล้ว และเติม 1 มิลลิลิตร methanol ลงไป นำของผสมไปปั่นที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนโปรตีน, ไขมัน และน้ำตาลในน้ำนม ไปเปต 100 ไมโครลิตร supernatant ลงไปใน 1 มิลลิลิตร methanol ผสมให้เข้ากันด้วย vortex เป็นเวลา 30 วินาที แล้วนำไปปั่นที่ 3000 rpm ใน 10 นาที สารละลายส่วนใสที่แยกได้สามารถที่จะเก็บไว้ที่ -5°C ได้ไม่เกิน 2 สัปดาห์ และนำมาฉีดเข้าใน HPLC column โดยมีส่วนผสมของ 20 mM. Ammonium acetate buffer และ acetonitrileในอัตราส่วน 92 : 8 และ 72 : 28 โดยปริมาตรที่ pH 5.0 สำหรับแยก ampicillin และ cloxacillin ออกจาก HPLC column ภายใน 16 นาที ตามลำดับต่อไป

การวิเคราะห์หาปริมาณของ ampicillin และ cloxacillin โดยใช้ระบบgradient HPLC ภายใต้อุณหภูมิห้องด้วยการฉีด 60 μl ของแต่ละสารละลายตัวอย่างที่สะกัดเรียบร้อยแล้วเข้าไปใน C18 reversed-phase HPLC column ในอัตราการไหลของmobile phases ที่ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยให้pump A และ pump B ควบคุมอัตราการไหลของ ampicillin และ cloxacillin mobile phases ตามลำดับ ในอัตราส่วนผสม = 25% A → 100%B ที่ความยาวคลื่นของรังสี ultraviolet (UV) = 225 nm. ตลอดการวิเคราะห์ใช้ Maxima 820 chromatographic software ควบคุมการทำงานทั้งระบบของ HPLC รวมทั้งผลการคำนวณpeak height, peak area และความเข้มข้นของ ampicillin และ cloxacillin ที่ปรากฏบน chromatograms (รูปที่ 1 และตารางที่ 2) และตลอดการทดลองได้ดำเนินการวิเคราะห์ 3 ครั้ง ต่อหนึ่งสารละลายตัวอย่างน้ำนมที่สะกัดได้

Concentration-time curves ของampicillin และ cloxacillin ในน้ำนมของสัตว์แต่ละตัว จัดหาได้โดยการพล๊อตค่าความเข้มข้นของยา (μg/ml) ต่อเวลา (ชั่วโมง) ที่เปลี่ยนแปลงไปของยาแต่ละตัว



รูปที่ 1 HPLC-UV chromatogram ของสารมาตรฐาน ampicillin และ cloxacillin ใน deionized water ที่ retention time 3.01 นาที และ 14.93 นาที ตามลำดับ โดยทำการวิเคราะห์ในระบบ gradient ที่ 25% A → 100% B และอัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที

(A = HPLC pump A สำหรับ ampicillin mobile phase

B = HPLC pump B สำหรับ cloxacillin mobile phase)

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ retention time, peak start และ peak end ของสารมาตรฐาน ampicillin และ cloxacillin ที่ระดับความเข้มข้น 0.83, 1.67, 5.0, I6.67, 30.77 μg/ml และความเข้มข้นรวมทั้งหมดจาก 0.83-30.77 μg/ml.

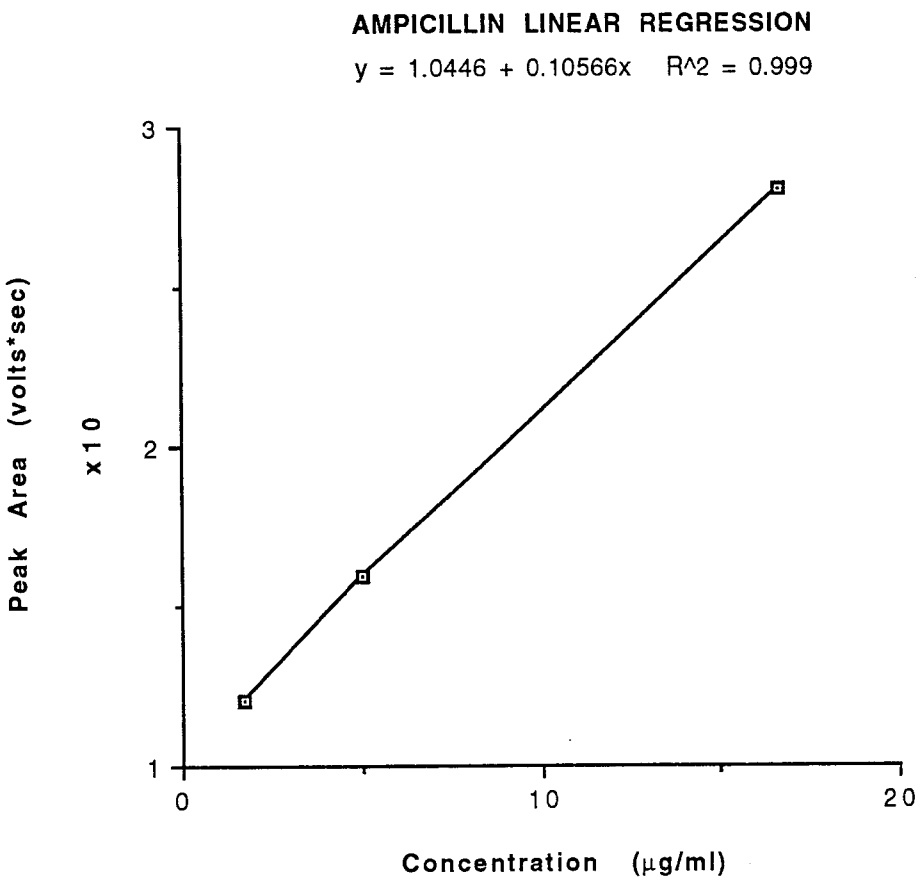
ความเข้มข้นของสาร (μg/ml)	Retention Time (นาที) (mean ± SD)	Peak Start (นาที) (mean ± SD)	Peak End (นาที) (mean ± SD)
1. Ampicillin			
0.83	2.95 ± 0.17	2.70 ± 0.14	3.38 ± 0.22
1.67	2.89 ± 0.18	2.66 ± 0.17	3.31 ± 0.09
5.00	2.90 ± 0.18	2.57 ± 0.38	3.43 ± 0.23
16.67	2.88 ± 0.21	2.65 ± 0.21	3.65 ± 0.31
30.77	2.80 ± 0.22	2.60± 0.23	3.47 ± 0.15
0.83→30.77	2.89 ± 0.18	2.67 ± 0.17	3.43 ± 0.28
2. Cloxacillin			
0.83	15.06 ± 0.31	14.47 ± 0.31	15.97 ± 0.06
1.67	14.77 ±0.23	14.23 ± 0.39	15.88 ± 0.19
5.00	14.77 ± 0.40	14.17 ± 0.46	15.85 ±0.21
16.67	14.50 ± 0.35	14.13 ± 0.39	15.88 ± 0.19
30.77	14.25 ± 0.01	13.85 ± 0.00	15.71 ± 0.40
0.83→30.77	14.74 ± 0.38	14.24 ± 0.38	15.89 ± 0.17

3.4 Standard curves

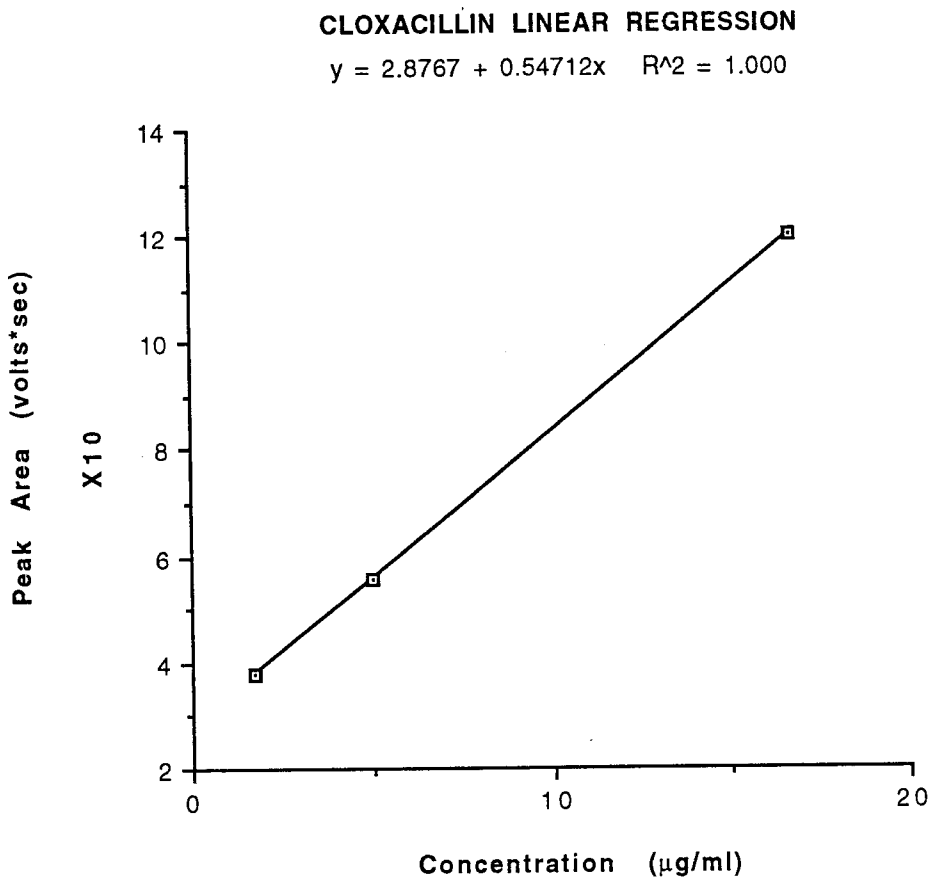
Standard curves จัดหาได้โดยการพล๊อตค่าของpeak areas ต่อความเข้มข้นที่ระดับต่าง ๆ กัน ระหว่าง 0.83-30.77 μg/ml ของ ampicillinหรือ cloxacillin โดยใช้linear regression ควบคุมความเป็นเส้นตรงของ curves ตารางที่ 3, รูปที่ 2 และรูปที่ 3 แสดงให้เห็นถึงวิธีการได้มาของสมการ linear regression เพื่อที่จะนำมาใช้ในการควบคุมขบวนการวิเคราะห์ให้อยู่ในสภาวะที่คงที่ โดยใช้ค่า correlation coefficient (r) ซึ่งต้องเท่ากับหรือมากกว่า 0.99 ($r \geq 0.99$) เพื่อจะทำให้สมการ regression ที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็นเส้นตรง และนำสมการ linear regression ที่ได้มาใช้ในการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของ ampicillin และ cloxacillin ในตัวอย่างน้ำนมต่อไป โดย $Y = 1.0446 + 0.10566\ X$ ($r = 0.999$, $p < 0.0001$) สำหรับ ampicilin และ $y = 2.8767 + 0.54712\ X$ ($r = 1.00$, $P < 0.0001$) สำหรับ cloxacillin นั่นก็คือ

X = ความเข้มข้นของ ampicillin หรือ cloxacillin (μg/ml) ที่ปรากฏในน้ำนม

Y = peak area ของ ampicillin หรือ cloxacillin (volts* sec) ที่ปรากฏบน chromatogram ของแต่ละตัวอย่างน้ำนม



รูปที่ 2 Standard curve ของสารละลาย ampicillin ใน deionized water ที่ความเข้มข้น 1.67, 5.00 และ 16.67 µg/ml เพื่อนำมาใช้ในการ8คำนวณหาค่าความเข้มข้นของ ampicillin ในตัวอย่างน้ำนม



รูปที่ 3 Standard curve ของสารละลาย cloxacillin ใน deionized water ที่ความเข้มข้น 1.67, 5.00 และ 16.67 µg/ml เพื่อนำมาใช้ในการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของ cloxacillin ในตัวอย่างน้ำนม

ตารางที่ 3 Linear regression equations และ correlation coefficient (r) ของสารมาตรฐาน ampicillin และ cloxacillin เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของ ampcillin และ cloxacillin ในตัวอย่างน้ำนม

ความเข้มข้นของสาร (μg/ml)	Peak Area (volts* sec)	
	Ampicillin (mean ± SD)	Cloxacillin (mean ± SD)
0.83	0.2152 ± 0.2067 **	1.0627 ± 0.7784 **
1.67	1.1749 ± 0.6610	3.7691 ± 2.2661
5.00	1.6245 ± 0.7424	5.6127 ± 3.9823
16.67	2.7866 ± 1.3761	11.9197 ± 8.4109
30.77	3.8878 ± 1.2747 **	115.1147 ± 5.9837 **
	r = 0.999 y = 1.0446 + 0.10566 X	r = 1.00 y = 2.8767 + 0.54712 X

** ไม่ใช้ในสมการของ linear regression ที่ได้เนื่องจากที่ความเข้มข้นต่ำสุดและสูงสุด ทำให้ค่า correlation coefficient ต่ำ (r = 0.907 สำหรับ ampicillin ; r = 0.813 สำหรับ cloxacillin ซึ่งทำให้สมการ regression ที่ได้ไม่เป็นเส้นตรง)

3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ได้นำ PC-SPSS soft ware package มาใช้ในการวิเคราะห์ทางสถิติ โดยการเปรียบเทียบข้อมูลของระดับยา ampicillin และ cloxacillin ในน้ำนม ระหว่างโคนมที่มีการอักเสบของเต้านม (การทดลองที่ 2) กับโคนมที่ไม่เป็นโรคเต้านมอักเสบ (การทดลองที่ 1) ที่เวลาต่าง ๆ กัน ทั้งก่อนและหลังการให้ยา Ampiclox® LC เข้าไปในเต้านม เพื่อที่จะดูผลของความสำคัญของการอักเสบที่มีต่อความเข้มข้นของยา และใช้ Student's paired t-test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 วิเคราะห์หาค่าความแตกต่างทางสถิติของข้อมูลในแต่ละเต้า

3.6 การวิเคราะห์ทางจลนศาสตร์

ค่าครึ่งชีวิตในการกำจัดยาจากเต้านม ($T_{1/2}$) โดยการหาค่า elimination rate constant (β หรือ Kel) จาก log concentration-time curves ในน้ำนมของยาแต่ละตัว แล้วคำนวณหาค่าครึ่งชีวิตของยาแต่ละตัวจากสมการ $T_{1/2}$ = 0.693/kel ของ ampicillin และ cloxacillin ประเมินได้จาก concentration-time curves ในน้ำนมของยาแต่ละตัว และใช้ trapezoidal rule ในการคำนวณหาค่าของพื้นที่ที่อยู่ใต้ curves (AUC)

4. ขอบเขตและข้อจำกัดของการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ได้ทำการจัดหาสภาวะที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างน้ำนม การสะกัดตัวอย่างน้ำนม และ Gradient High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ในการตรวจวิเคราะห์หาระดับยาampicillin และ cloxacillin การวิเคราะห์ผล และการสรุปผลในช่วงระยะเวลา ตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2538 ถึงเดือนเมษายน 2540 ข้อมูลที่ได้จึงมีขอบเขตและข้อจำกัดเฉพาะในโคนมจำนวน 8 ตัว ที่มีการอักเสบของเต้านมที่เต้าใดเต้าหนึ่ง เปรียบเทียบกับโคนม จำนวน 4 ตัว ที่ไม่มีการอักเสบทั้งสี่เต้า และโคนมทั้ง 4 ตัวได้รับยา Ampiclox® LC เข้าไปในเต้านมหน้าขวา และตัวอย่างทั้งหมดที่สะกัดและวิเคราะห์โดยวิธี gradient HPLC จำนวน = 480 ตัวอย่าง ดังนี้

1. สารมาตรฐาน ampicillin และ cloxacillin — 48 ตัวอย่าง
   (วิเคราะห์ 8 ชุด ๆ ละ 6 ตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0 (steriled water)
   0.83, l.67, 5.00, 16.67, 30.77 μg/ml.)
2. โคนมกลุ่มที่ไม่มีการอักเสบที่เต้านมทั้งสี่เต้า — 144 ตัวอย่าง
   (โคนมจำนวน 4 ตัว ๆ ละ 4 เต้า ๆ ละ 9 ตัวอย่าง ที่เวลา
   0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 ชั่วโมง)
3. โคนมกลุ่มที่มีการอักเสบที่เต้าใดเต้าหนึ่ง — 288 ตัวอย่าง
   (โคนมจำนวน 8 ตัว ๆ ละ 4 เต้า ๆ ละ 9 ตัวอย่าง ที่เวลา
   0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 ชั่วโมง)

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

1. เปรียบเทียบระดับยาในน้ำนมจากเต้านมที่ได้รับยาโดยตรง และเต้านมอื่นข้างเคียงภายหลังการให้ยาที่เวลาเดียวกัน โดย analysis of variance ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เพื่อศึกษาการดูดซึม และการกระจายตัวของยา
2. เปรียบเทียบระดับยาในน้ำนมจากเต้านมแต่ละเต้าที่เวลาต่าง ๆ กันก่อนและหลังการให้ยา โดย Student paired T-test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เพื่อศึกษาการขับยาออกทางน้ำนม
3. เปรียบเทียบจำนวนสัตว์ที่เป็นโรคเต้านมอักเสบก่อนและหลังการรักษาโดยอัตราร้อยละ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของยาในการรักษาโรคเต้านมอักเสบ

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. **การตกค้างของ ampicillin และ cloxacillin**

จากการทดลองที่ 1 แสดงให้เห็นว่าภายในไม่เกิน 12 ชั่วโมง หลังจากให้ยา Ampiclox® ในขนาดสุดท้าย จะคงมีการตกค้างของ ampicillin และ cloxacillin อยู่ในระดับที่สามารถจะตรวจวัดได้ ในน้ำนมจากเต้านมหน้าขวา (ตารางที่ 4) และไม่สามารถจะตรวจพบการตกค้างของ ampicillin และ cloxacillin ในตัวอย่างน้ำนมทั้งหมดที่ได้จากสามเต้านมที่เหลือ ซึ่งไม่ได้รับการฉีดยา Ampiclox®

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นของ ampicillin และ cloxacillin ในน้ำนมเต้าหน้าขวาที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน ของแม่โคนม จำนวน 4 ตัว ที่ปราศจากโรคเต้านมอักเสบทั้งสี่เต้าโดยการฉีดยา Ampiclox® LC เข้าในเต้านมหน้าขวาภายหลังจากการรีดนมในแต่ละครั้ง ๆ ละ 1 หลอด ติดต่อกัน 3 ครั้ง ที่เวลา 0, 12 และ 24 ชั่วโมง

เวลาที่เก็บตัวอย่างน้ำนม (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (μg/ml)	
	Ampicillin (mean ± SD)	Cloxacillin (mean ± SD)
0	0	0
12	0.18 ± 0.13 *	0.14 ± 0.05 **
24	0.86 ± 0.68 **	1.20 ± 0.45 *
36	0.39 ± 0.20 **	0.10 ± 0.07 ***
48	0	0
60	0	0
72	0	0
84	0	0
96	0	0

* จำนวน 7 ครั้ง ที่ตรวจพบ ampicillin หรือ cloxacillin จากการวิเคราะห์ทั้งหมด 12 ครั้ง

** จำนวน 6 ครั้ง ที่ตรวจพบ ampicillin หรือ cloxacillin จากการวิเคราะห์ทั้งหมด 12 ครั้ง

*** จำวนวน 4 ครั้ง ที่ตรวจพบ ampicillin หรือ cloxacillin จากการวิเคราะห์ทั้งหมด 12 ครั้ง

จากการทดลองที่ 2 แสดงให้เห็นว่าภายในไม่เกิน 12 ชั่วโมง หลังจากให้ยา Ampiclox ® ในขนาดสุดท้ายจะคงมีการตกค้างของ ampicillin และ cloxacillin อยู่ในระดับที่สามารถจะตรวจวัดได้ ในน้ำนมเต้าที่มีการอักเสบ (ตารางที่ 5) และในทำนองเดียวกันกับการทดลองที่ 1 จะไม่สามารถตรวจพบการตกค้างของ ampicillin และ cloxacillin ในตัวอย่างน้ำนมทั้งหมดที่ได้จากสามเต้านมที่เหลือ ซึ่งไม่ได้รับการฉีดยา Ampiclox®

ตารางที่ 5 ความเข้มข้นของ ampicillin และ cloxacillin ในน้ำนมเต้าที่อักเสบในระยะเวลาต่าง ๆ กัน ของแม่โคนม จำนวน 8 ตัว ที่ปรากฏเต้านมอักเสบที่เต้าใดเต้าหนึ่ง (ตารางที่ 1) และได้รับการรักษาโดยการฉีดยา Ampiclox® LC เข้าไปในเต้านมที่มีการอักเสบภายหลังจากการรีดนม ในแต่ละครั้ง ๆ ละ 1 หลอด ติดต่อกัน 3 ครั้ง ที่เวลา 0, 12 และ 24 ชั่วโมง

เวลาที่เก็บตัวอย่างน้ำนม (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (μg/ml)	
	Ampicillin (mean ± SD)	Cloxacillin (mean ± SD)
0	0	0
12	0.92 ± 0.71 *	3.83 ± 2.44 **
24	6.73 ± 7.47 ***	4.64 ± 2.31 ****
36	5.02 ± 6.06 ***	1.43 ± 1.94 ***
48	0	0
60	0	0
72	0	0
84	0	0
96	0	0

* จำนวน 9 ครั้ง ที่ตรวจพบ ampicillin หรือ cloxacillin จากการวิเคราะห์ทั้งหมด 24 ครั้ง

** จำนวน 13 ครั้ง ที่ตรวจพบ ampicillin หรือ cloxacillin จากการวิเคราะห์ทั้งหมด 24 ครั้ง

*** จำนวน 14 ครั้ง ที่ตรวจพบ ampicillin หรือ cloxacillin จากการวิเคราะห์ทั้งหมด 24 ครั้ง

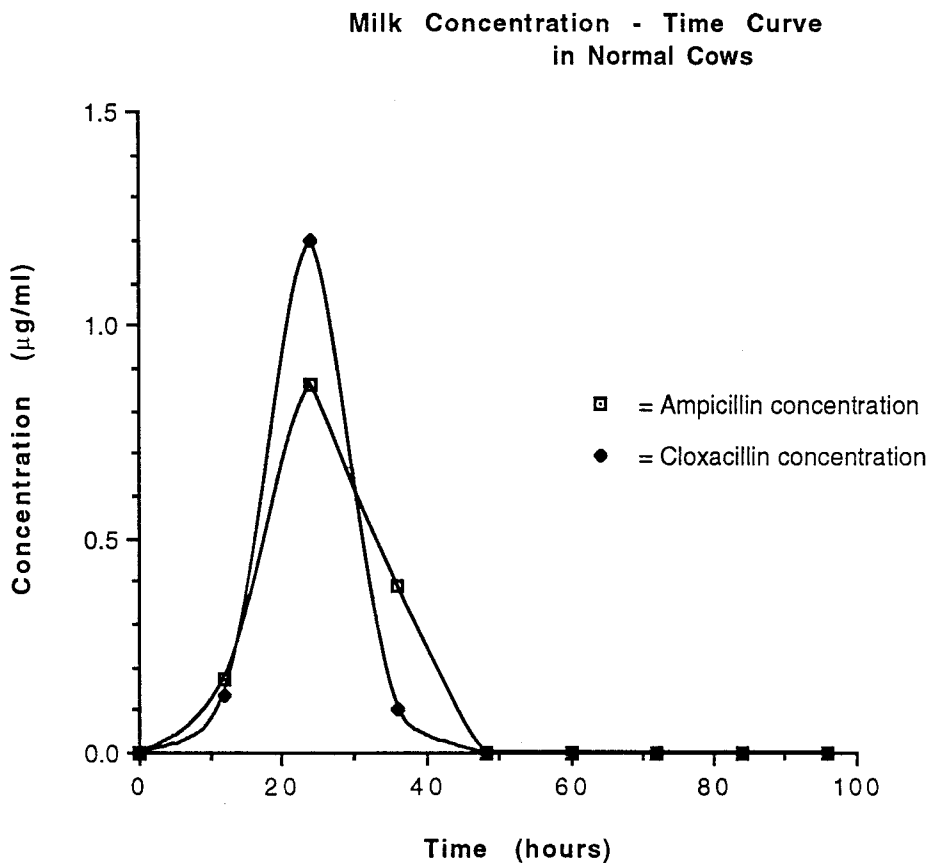
**** จำนวน 16 ครั้ง ที่ตรวจพบ ampicillin หรือ cloxacillin จากการวิเคราะห์ทั้งหมด 24 ครั้ง

2. จลนศาสตร์การขับยา ampicillin และcloxacillin ในน้ำนม

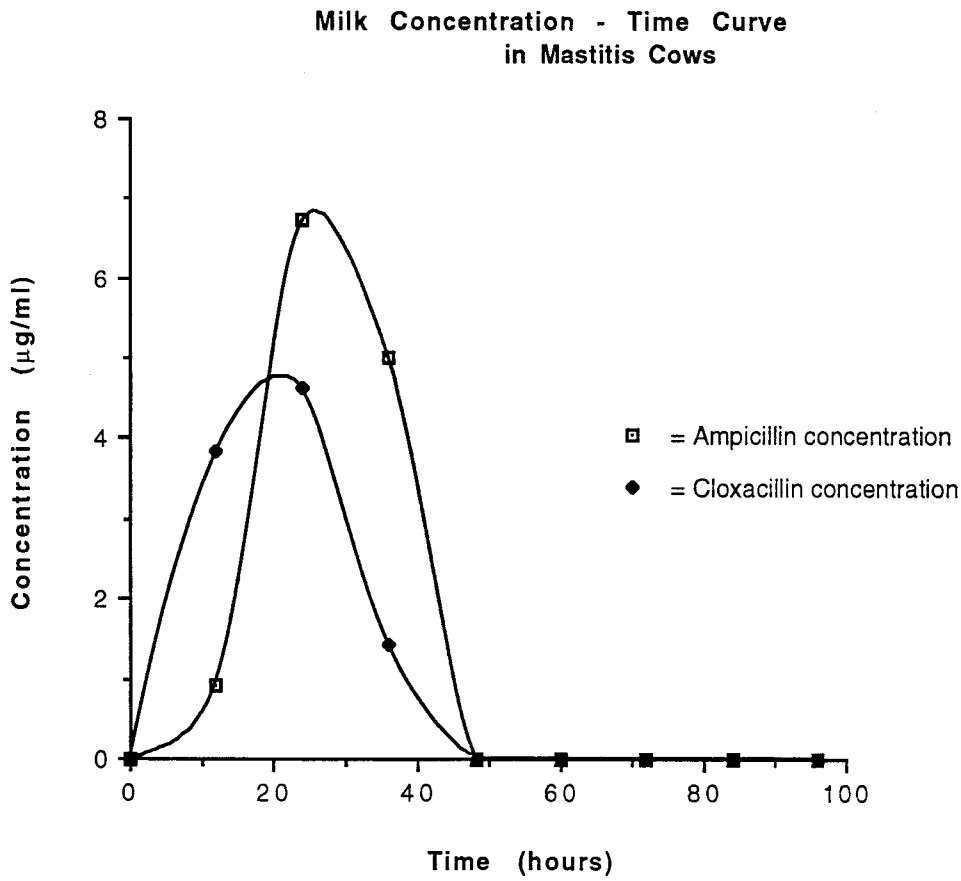
ภายหลังจากฉีดยา Ampiclox® เข้าไปในเต้านมจะมีการขับ ampicillin และ cloxacillin ออกทางน้ำนมและสามารถที่จะตรวจหาความเข้มข้นของยาในน้ำนมได้ ในระดับที่แตกต่างกันตามระยะเวลาที่ผ่านไป ค่าความเข้มข้นที่เป็นศูนย์ชี้ให้เห็นว่าปริมาณของยาที่ถูกขับออกมาในน้ำนม ไม่สามารถจะตรวจพบได้ ซึ่งจะมีค่า < 0.2 μg/ml สำหรับ cloxacillin ดังแสดงในตารางที่ 4

Phetsuksiri (1995) ได้ศึกษาค่าครึ่งชีวิตในการกำจัดยาจากเต้านมของ ampicillin และ cloxacillin หลังจากให้ยา Ampiclox® เพียงครั้งเดียวเข้าไปในเต้านมที่ไม่มีการอักเสบ มีค่าเท่ากับ 1.86 ± 0.27 ชั่วโมง สำหรับ ampicillin และ 2.31 ± 0.27 ชั่วโมง สำหรับcloxacillin (n = 10) ซึ่งจะได้นำมาอภิปรายผลเกี่ยวกับจลนศาสตร์การขับยาต่อไป

รูปที่ 4 และ 5 แสดงให้เห็นถึงความเข้มข้นของ ampicillin และ cloxacillin ที่ขับออกมาทางน้ำนมภายหลังจากให้ยาAmpiclox® เข้าไปในน้ำนม 3 ครั้งติดต่อกัน ทั้งในน้ำนมปกติ (รูปที่ 4) และ เพื่อการรักษาเต้านมอักเสบ (รูปที่ 5) จะเห็นได้ว่าจะไม่พบการตกค้างของ ampicillin และ cloxacillin ที่เวลา 48 ชั่วโมง ทั้งในน้ำนมปกติและน้ำนมที่มีการอักเสบ



รูปที่ 4 Milk concentration-time curves ของ ampicillin และ cloxacillin หลังจากให้ยา Ampiclox® 3 ครั้ง ที่เวลา 0, 12 และ 24 ชั่วโมง เข้าไปในเต้านมหน้าขวาของแม่โคนม จำนวน 4 ตัว ที่ปราศจากโรคเต้านมอักเสบทั้ง 4 เต้า



รูปที่ 5 Milk concentration-time curves ของ ampicillin และ cloxacillin หลังจากให้ยา Ampiclox® 3 ครั้ง ที่เวลา 0, 12, และ 24 ชั่วโมง เข้าไปในเต้านมที่อักเสบของแม่โค จำนวน 8 ตัว ที่ปรากฏเป็นเต้านมอักเสบที่เต้าใดเต้าหนึ่งเพียงเต้าเดียว

ตารางที่ 6 และ 7 แสดงให้เห็นถึงการเปรียบเทียบจลนศาสตร์การขับยา ampicillin และ cloxacillin ตามลำดับ ระหว่างกลุ่มโคนมที่ไม่เป็นโรคเต้านมอักเสบ (การทดลองที่ 1) และกลุ่มโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ (การทดลองที่ 2)

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบความเข้มข้นของ ampicillin ในน้ำนมจากโคนมที่ปราศจากโรคเต้านมอักเสบในการทดลองที่ 1 กับโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบที่เต้าใดเต้าหนึ่งในการทดลองที่ 2 หลังจากการให้ยา Ampiclox® เข้าไปในเต้านมที่เวลา 0, 12 และ 24 ชั่วโมง

	ความเข้มข้นของ ampicillin (μg/ml) ที่เวลา			
	12	24	36	48 ชั่วโมง
<u>การทดลองที่ 1</u>				
ค่าต่ำสุด	0.05	0.28	0.18	0
ค่าสูงสุด	0.42	1.90	0.59	0
ค่าเฉลี่ย	0.18	0.86	0.39	0
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	± 0.13	± 0.68	± 0.20	0
<u>การทดลองที่ 2</u>				
ค่าต่ำสุด	0.13	0.05	0.05	0
ค่าสูงสุด	1.88	23.32	20.33	0
ค่าเฉลี่ย	0.92	6.73	5.02	0
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	± 0.71	± 7.47	± 6.06	0
t-value	2.6686 **	3.0953 *	1.4236^{NS}	-

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับ $P \leq 0.01$

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P \leq 0.05$

NS ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบความเข้มข้นของ cloxacillin ในน้ำนมจากโคนมที่ปราศจากโรคเต้านมอักเสบในการทดลองที่ 1 กับโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบที่เต้าใดเต้าหนึ่งในการทดลองที่ 2 หลังจากการให้ยา Ampiclox® เข้าไปในเต้านมที่เวลา 0, 12 และ 24 ชั่วโมง

	ความเข้มข้นของ cloxacillin (μg/ml) ที่เวลา			
	12	24	36	48 ชั่วโมง
<u>การทดลองที่ 1</u>				
ค่าต่ำสุด	0.09	0.38	0.01	0
ค่าสูงสุด	0.20	1.64	0.15	0
ค่าเฉลี่ย	0.14	1.20	0.10	0
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	± 0.05	± 0.45	± 0.07	0
<u>การทดลองที่ 2</u>				
ค่าต่ำสุด	0.20	0.01	0.01	0
ค่าสูงสุด	8.26	8.26	6.73	0
ค่าเฉลี่ย	3.83	4.64	1.43	0
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	±2.44	±2.31	±1.94	0
t-value	3.6383 *	3.8548 *	1.3376^{NS}	-

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับ $P \leq 0.01$

NS ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

3. ประสิทธิภาพของยา ampicillin และ cloxacillin

ตารางที่ 8 แสดงให้เห็นถึงผลการรักษาเต้านมอักเสบของ Ampiclox® โดยเปรียบเทียบการตรวจวัดดูการเปลี่ยนแปลงของน้ำนมทุกเต้า ก่อนที่จะเริ่มการทดลอง (0 ชั่วโมง) และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (96 ชั่วโมง) ด้วยวิธี California Mastitis Test (CMT) พบว่าโคนมทุกตัวทั้งที่มีอาการ subclinical และ clinical (CMT +2 และ +3) มีผลเป็นลบต่อ CMT เมื่อสิ้นสุดการทดลอง จึงชี้ให้เห็นว่า ampicillin และ cloxacillin เมื่อนำมาใช้ในรูปแบบที่กำหนดให้ สามารถที่จะรักษาโรคเต้านมอักเสบได้ผล 100%

นอกจากนี้ CMT มีผลเป็นลบต่อน้ำนมปกติจากเต้านมสามเต้าที่ปราศจากโรคเต้านมอักเสบ ทั้งก่อนการทดลองและเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

ตารางที่ 8 ผลการตรวจวัดการอักเสบของน้ำนมด้วยวิธี California Mastitis Test (CMT) จากแม่โคนม จำนวน 8 ตัว ภายหลังจากให้ยา Ampiclox® ฉีดเข้าไปในเต้านมที่มีการอักเสบ 3 ครั้ง ติดต่อกันโดยให้ครั้งละ 1 หลอดที่เวลา 0, 12 และ 24 ชั่วโมง

ลำดับที่	เบอร์แม่โค	เต้านมที่มีการอักเสบ	อาการของการอักเสบ	ผลของ CMT ที่เวลา 0 และ 96 ชั่วโมง
1	D 20070	หน้าซ้าย	Subclinical	+2 -
2	D 40110	หน้าขวา	Subclinical	+2 -
3	D 50027	หลังซ้าย	Subclinical	+2 -
4	D 50032	หน้าขวา	Subclinical	+2 -
5	D 50462	หน้าซ้าย	Subclinical	+2 -
6	D 60026	หลังซ้าย	Clinical	+3 -
7	JD 0412	หลังซ้าย	Clinical	+3 -
8	PK 22085	หน้าขวา	Subclinical	+2 -

อภิปรายผล

1. **วิธีการวิเคราะห์ยา** ampicillin **และ** cloxacillin

การศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณยาปฏิชีวนะ ampicillin และ cloxacillin ในน้ำนมมีหลายวิธี โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้เกิดความง่าย รวดเร็ว มีความแม่นยำ และประหยัดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ มีรายงานการใช้ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ในการวิเคราะห์หายาในกลุ่มของ penicillins (Francois Jehl et al., 1987) และ Phetsuksiri, B. (1995) ได้นำวิธีวิเคราะห์ของ Francois Jehl. et al., (1997) มาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ยา ampicillin และ cloxacillin ในน้ำนมและซีรั่ม โดยใช้ระบบ isocratic HPLC ซึ่งประกอบด้วย C^{18} μ-Bondapax column และ mobile phase ที่ประกอบด้วย 20 mM ammonium acetate buffer : acetonitrile ในปริมาตร 92 : 8 สำหรับ ampicillin และ 72 : 28 สำหรับ cloxacillin โดยปรับ pH = 5.0 ด้วย glacial aoctic acid

ในการทดลองนี้ได้พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ของ Phetsuksiri, B. (1995) จากระบบ isocratic HPLC เป็นระบบ gradient HPLC เพื่อประหยัดเวลาในการวิเคราะห์ และให้ได้ peaks ของทั้ง ampicillin และ cloxacillin ปรากฏบนchromatograms เดียวกันต่อการฉีดตัวอย่างเพียงครั้งเดียว (รูปที่ 1, ข้อมูลที่ยังไม่ได้ตีพิมพ์) โดยคงใช้ column และ mobile phases เหมือนเดิม จากการทดสอบด้วยสารมาตรฐาน ampicillin และ cloxacillin พบว่าการให้อัตราส่วนผสมของmobile phases ที่ 25% pump A (ampicillin mobile phase) → 100% pump B (cloxacillin mobile phase) ในอัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที จะทำให้peaks ของ ampicillin และ cloxacillin มีการแยกตัวกันอย่างชัดเจน (รูปที่ 1) แต่ถึงกระนั้นก็ตาม peak areas ที่ปรากฏออกมาในทุกระดับ ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ยังมีการผันแปรที่แตกต่างกันมาก (จากค่า mean ± SD ในตารางที่ 3) ทำให้สมการ regression ที่ได้ไม่เป็นเส้นตรง ($r = 0.907$ สำหรับ ampicillin; $r = 0.813$ สำหรับ cloxacillin) ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากสารละลายที่ได้ไม่บริสุทธิ์ ทำให้มีผลต่อ % resolution ของยาampicillin และ cloxacillinในสารละลายไม่คงที่ แต่ถ้าไม่ใช้ peak areas ที่ความเข้มข้น 0.83 μg/ml และ 30.77 μg/ml. ของทั้งampicillin และ cloxacillin จะทำให้สมการ regression เป็นเส้นตรง โดยที่ $r = 0.99$ สำหรับ ampicillin (รูปที่ 2) และ $r = 1.000$ สำหรับ cloxacillin (รูปที่ 3) จึงนำสมการlinear regression ที่ได้จากความเข้มข้นที่ 1.67, 5.00 และ 16.67 μg/ml มาใช้ในการคำนวณหาความเข้มของยา ampicillin และ cloxacillin จากตัวอย่างน้ำนมได้ โดยอาศัยความคงที่ของ retention time, peak start และ peak end ที่ทุกระดับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (ตารางที่ 2)

ดังนั้น การนำระบบ gradient HPLC มาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณของยา ampicillin และ cloxacillin ที่ 25% A → 100% B ได้ผลเป็นอย่างดีตลอดการทดลอง โดยไม่คำนึงถึงสภาวะการผันแปรใน % resolution ของยา ampicllin และ cloxacillin ในสารละลายน้ำนมที่สะกัดได้ อย่างไรก็ตามน่าจะมีการศึกษาการใช้ระบบ gradient HPLC ในการวิเคราะห์ยา ampicillin และ cloxacillin ต่อไปเพื่อที่จะปรับเปลี่ยน

ก
SF
967
.M5
S451

% resolution ของยาให้อยู่ในสภาวะคงที่ และเพื่อที่จะลดเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์โดยการไปเพิ่มการเคลื่อนย้ายยาออกจากchromatographic column.

2. ประสิทธิภาพและจลนศาสตร์การขับยา ampicillin และ cloxacillin ในน้ำนม

Phetsuksiri, B. (1995) พบว่าภายหลังจากการให้ยา Ampiclox® ฉีดเข้าไปในเต้านมที่ไม่มีการอักเสบเพียงขนาดเดียวในแม่โคนม จำนวน 10 ตัว ค่าครึ่งชีวิตในการขับยาออกทางน้ำนมของ ampicillin และ cloxacillin มีค่าเท่ากับ 1.86 $\pm$ 0.27 ชั่วโมง สำหรับ ampicillin และ 2.31 $\pm$ 0.27 ชั่วโมง สำหรับ cloxacillin แสดงว่าการตกค้างของ cloxacillinภายในเต้านมจะมีมากกว่าการตกค้างของ ampicillinในทุก ๆ ชั่วโมงที่มีการขับยาออกจากเต้านม และจะไม่พบมีการดูดซึมและการกระจายตัวของ ampicillin และ cloxacillin ไปยังสามเต้าที่เหลือ ซึ่งไม่ได้ให้ยา Ampiclox® เข้าไปในเต้านม และจะพบว่าทั้ง ampicillin และ cloxacillin จะถูกขับออกไปจากน้ำนมที่ได้แทบจะทั้งหมดภายใน 12 ชั่วโมง

ดังนั้น การศึกษาเกี่ยวกับจลนศาสตร์การขับยาในครั้งนี้ พบว่าภายหลังจากการให้ยา Ampiclox® ติดต่อกัน 3 ครั้ง ๆ ละ 1 หลอด ห่างกันทุก 12 ชั่วโมง ทั้งในการทดลองที่ 1 ซึ่งเป็นโคนมปกติ (รูปที่ 4) และการทดลองที่ 2 ซึ่งเป็นโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ (รูปที่ 5) พบว่าระดับความเข้มข้นของ ampicillin และ cloxacillin สูงที่สุดที่ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นความเข้มข้นของยาทั้งสองจะลดลงเรื่อย ๆ จนกระทั่งไม่สามารถจะตรวจวัดได้ คือความเข้มข้นของยามีค่าเท่ากับศูนย์ ที่เวลา 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 6 และ 7) นั่นก็คือ ระยะเวลาหยุดยาก่อนส่งน้ำนม (Witholding time) ควรจะอยู่ที่ 48 ชั่วโมง ซึ่งอาจจะผันแปรได้ในโคแต่ละตัว (Ziv.G., 1980) เนื่องจากมีแฟคเตอร์หลายประการที่มีผลต่อระยะเวลาหยุดยาก่อนส่งน้ำนม ได้แก่ วิธีการตรวจวัดหาความเข้มข้นของยา, ความไว ความจำเพาะ และความแม่นยำของระบบ HPLC ที่มีผลต่อวิธีการตรวจวัด, วิธีการเก็บตัวอย่างน้ำนม, วิธีการบริหารยาและขนาดของยาที่ให้, อายุและโรคที่เกิดกับตัวสัตว์ และในทำนองเดียวกันกับการทดลองของ Phetsuksiri, B. (1995) สำหรับทั้งการทดลองที่ 1 และ 2 ก็ไม่สามารถที่จะตรวจวัดการตกค้างของยา ampicillin และ cloxacillin ในน้ำนมของสามเต้าที่เหลือ ซึ่งไม่ได้ให้ยา Ampiclox® แสดงว่ายาจะจำกัดอยู่เฉพาะแห่งภายในเต้าที่ได้รับยาเข้าไปโดยตรง และแทบจะไม่มีการดูดซึมและการกระจายตัวผ่านแผ่นเยื่อกั้นภายในเต้านมไปยังเต้านมข้างเคียงได้ จึงทำให้ยาออกฤทธิ์เฉพาะแห่ง เพื่อทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคเต้านมอักเสบได้

หอสมุดกลาง มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ตารางที่ 6 และ 7 แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของทั้ง ampicillin และ cloxacillin ในโคนมกลุ่มที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ (การทดลองที่ 2) จะมีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ไม่เป็นโรค (การทดลองที่ 1) และจะมีค่าความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญให้เห็นอย่างชัดเจนที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง เนื่องจากเริ่มมีการสะสมของยาภายในเต้านมเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงมีความเข้มข้นสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นการให้ยาในขนาดสุดท้าย และที่เวลา 36 ชั่วโมง จะไม่มีค่าความแตกต่างทางสถิติ เนื่องจากว่ายา ampicillin และ cloxacillin มีคุณสมบัติในการไปจับเกาะกับโปรตีนของเนื้อเยื่อและเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์สูง (Kucers A., 1987) ทำให้ยาที่อยู่ในรูป

อิสระน้อย จึงทำให้การขับออกของยามีปริมาณลดลงเรื่อย ๆ จนกระทั่งไม่สามารถจะวัดหาความเข้มข้นของยาทั้งสองได้ที่เวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งก็คือ Witholding time ของยา

ตารางที่ 8 แสดงให้เห็นว่ายา ampicillin และ cloxacillin ให้ผลในการรักษาโรคเต้านมอักเสบที่อยู่ในระดับ subclinical (CMT = +2) และ clinical (CMT = +3) ถึง 100% เนื่องจากว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่เวลา 96 ชั่วโมง ผลการตรวจน้ำนมด้วย CMT มีค่าเป็นลบในโคนมทุกตัว จึงชี้ให้เห็นว่า Ampiclox® เหมาะสมในการนำไปใช้ในการรักษาโรคเต้านมอักเสบที่มีผลของ CMT อยู่ในระดับ +2 และ +3 เมื่อให้ยาโดยการฉีดเข้าไปในเต้านมติดต่อกัน 3 ครั้ง ๆ ละ 1 หลอด ทุก 12 ชั่วโมง

สรุปผลการทดลอง

1. พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของยา ampicillin และ cloxacillin ในน้ำนม และเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน ampicillin และ cloxacillin ที่จัดหาได้ด้วยระบบ gradient high performance liquid chromatography โดยการฉีดสารละลายที่บริสุทธิ์เข้าไปใน ampicillin mobile phase (pump A) และ cloxacillin mobile phase (pump B) ในอัตราส่วนผสม 25% A $\rightarrow$ 100% B ผ่าน C_{18} μ-Bondapax column ภายใน 16 นาที ในอัตราการไหล 2 มิลลิลิตร ต่อนาที ด้วยความยาวคลื่น 225 nm จะได้ chromatogram ที่ปรากฏ peak ของ ampicillin และ cloxacillin ที่ retention time 2.89 ± 0.18 นาที และ 14.74 ± 0.38 นาที ตามลำดับ

2. การให้ Ampiclox® LC ซึ่งประกอบด้วย ampicillin 75 มิลลิกรัม และ cloxacillin 200 มิลลิกรัม เพื่อรักษาโรคเต้านมอักเสบในโคนม โดยฉีดเข้าไปในเต้านมโดยตรงติดต่อกัน 3 ครั้ง ๆ ละ 1 หลอด และห่างกันครั้งละ 12 ชั่วโมง พบว่า

2.1 การตกค้างของ ampicillin และ cloxacillin ในเต้านมที่อักเสบจะปรากฏภายใน 36 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 0.05-23.32 μg/ml สำหรับ ampicillin และ 0.01-8.26 μg/ml สำหรับ cloxacillin

2.2 ระยะเวลาหยุดยาก่อนส่งน้ำนม (Witholding time) คือ 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาที่ไม่สามารถจะตรวจพบความเข้มข้นของยา ampicillin และ cloxacillin ในน้ำนม จึงควรงดส่งน้ำนมสู่โรงงานในช่วงระยะเวลาดังกล่าวเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค

2.3 Ampiclox® ให้ผลดีในการรักษาโรคเต้านมอักเสบที่มีอาการ subclinical (CMT = +2) และ clinical (CMT = +3) เนื่องจากปริมาณของยาทั้งหมด จำกัดอยู่เฉพาะเต้านมที่มีการอักเสบ โดยไม่พบมีการดูดซึมและการกระจายตัวของยาผ่านแผ่นเยื่อกั้นระหว่างเต้านมไปยังเต้านมข้างเคียงได้

2.4 สภาวะการเกิดโรคเต้านมอักเสบจะมีผลกระทบต่อการตกค้างของทั้ง ampicillin และ cloxacillin เนื่องจากว่ามีค่าความแตกต่างทางสถิติเห็นได้อย่างชัดเจน ระหว่างโคนมกลุ่มที่เป็นโรคเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่เป็นโรค โดยเฉพาะที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง หลังจากให้ยาเพียงขนาดแรก ($p < 0.01$ ที่ 24 ชั่วโมง)