วารสารเภสัชวิทยา
THAI JOURNAL OF PHARMACOLOGY

- การทดสอบยาหยอดตาซัลฟาเซทตาไมด์
- แอสปาร์เทม : สารแต่งรสหวานชนิดใหม่
- AFLATOXINS
- SYMPOSIUM HIGHLIGHTS

ISSN 0125-3832

ปีที่ 8 เล่มที่ 1 ม.ค.– เม.ย. 2529
Vol 8 No. 1 Jan.– Apr. 1986

สมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย

THE PHARMACOLOGICAL AND THERAPEUTIC SOCIETY OF THAILAND

คณะกรรมการบริหาร วาระ พ.ศ. 2529-2530

นายก	รศ.ดร.จุฑามาศ สัตยวิวัฒน์
อุปนายก	ผศ.ดร.ไพฑูรย์ สังวรินทะ
ผู้รั้งตำแหน่งนายก	รศ.ดร.อรพรรณ มาตังคสมบัติ
เลขาธิการ	รศ.ดร.พรเพ็ญ เปรมโยธิน
เหรัญญิก	พ.ท.หญิงสุเพ็ญ ภัทรกิจวานิช
ปฏิคม	รศ.ดร.ประสาน ธรรมอุปกรณ์
นายทะเบียน	ผศ.ดร.ลัดดาวัลย์ การะโชติ
กรรมการวิชาการ	รศ.ดร.มธุรส รุจิรวัฒน์
บรรณาธิการวารสาร	พ.อ.ดร.ทัศนัย สุริยจันทร์
กรรมการ	รศ.นพ.กรุงไกร เจนพาณิชย์
	ภญ.สมทรง ศักดิ์ศรี
	ภก.กมล สวัสดีมงคล
	ดร.ภักดี โพธิศิริ
	ผศ.ดร.วรา พานิชเกรียงไกร
	ผศ.อโนชา อุทัยพัฒน์

EXECUTIVE COMMITTEE 1986-1987

President	Jutamaad Satayavivad
Vice-President	Paitoon Sanvarinda
President Elect	Oraphan Matangkasombat
Secretary General	Pornpen Pramyothin
Treasurer	Supen Patarakitvanit
Reception Secretary & Public Relation	Prasarn Dhumma-Upakorn
Registrar	Laddawan Karachot
Chairman of Scientific Section	Mathuros Ruchirawat
Editor	Dhasanai Suriyachan
Members	Krungkrei Chenpanich
	Somsong Suksri
	Kamol Sawasdimongkol
	Pakdee Pothisiri
	Wara Panichkriangkrai
	Anocha Utaipatana

วารสารเภสัชวิทยา
THAI JOURNAL OF PHARMACOLOGY

ปีที่ ๘ เล่มที่ ๑ ม.ค.-เม.ย.๒๕๒๙ Vol.8 No.1 Jan.-Apr. 1986

สารบาญ CONTENTS

รายงานวิจัย ORIGINAL ARTICLE

1 การทดสอบการระคายเคืองของยาหยอดตาซัลฟา เซทตาไมด์ I : ในกระต่าย

ปราโมทย์ ธีรพงษ์, กฤษณา ไกรสินธุ์, ศิริวรรณ ป้อมจักรศิลป์, วีระมล บุญทัด, มัณฑนา วาณิชกรพิพัฒน์, ปรีชา วรรณะพาหุณ, ประเสริฐ สวนกัน, เรณู ศรีทองแท้

13 การทดสอบการระคายเคืองของยาหยอดตาซัลฟา เซทตาไมด์ II : ในคน

ปราโมทย์ ธีรพงษ์, กฤษณา ไกรสินธุ์, ศิริวรรณ ป้อมจักรศิลป์, วีระมล บุญทัด, มัณฑนา วาณิชกรพิพัฒน์, ปรีชา วรรณะพาหุณ, ประเสริฐ สวนกัน, เรณู ศรีทองแท้

บทความปริทัศน์ REVIEW ARTICLE

21 Aflatoxins : biochemical toxicity and metabolism

Chaivat Toskulkao and Thirayudh Glinsukon

บทความทั่วไป GENERAL ARTICLE

43 แอสปาร์เทม : สารแต่งรสหวานชนิดใหม่

นิสามณี สัตยาบัน

49 Symposium Highlights

51 Comparing the pharmacology of non-narcotic analgesics

K. Brune

52 Pulmonary side effects of non-narcotic analgesics : allergy and pseudoallergy

B.A. Peskar

53 Renal toxicity of non-narcotic analgesics

P. Kincaid-Smith

54 Role of prostaglandin synthesis inhibition in NSAID-associated renal syndromes

C.A. Patrono

55 Risk of ulcer complications with NSAIDs

M.J.S. Langman

56 Role of leukotrienes and prostaglandins in NSAID-induced acute gastrointestinal mucosal damage

B.M. Peskar

57 Liver damage

L.F. Prescott

58 Blood dyscrasias secondary to NSAIDs

P.A. Miescher

60 Prescription event monitoring

N.S.B. Rawson

61 Intensive medicines monitoring programme in New Zealand

I.R. Edwards

62 Serious ADRs associated with non-narcotic analgesics

H. Kewitz

63 The regulatory challenge

P.K.M. Lunde

64 Regulatory decisions and the consumer

M.D. Rawlins

65 Decision-making and the regulatory bodies : viewpoint from Sweden

K. Strandberg

อภินันทนาการ

จาก

บริษัท โอสถสภา (เต๊กเฮงหยู) จำกัด

2100 ถนนรามคำแหง กรุงเทพ ฯ

โทร. 377-7121. 31. 41. 51

วารสารเภสัชวิทยา
ปีที่ ๑ เล่มที่ ๑ ม.ค.-เม.ย.2529

การทดสอบการระคายเคืองของยาหยอดตา ซัลฟาเซทตาไมด์ I :ในกระต่าย

ปราโมทย์ ธีรพงษ์*, กฤษณา ไกรสินธุ์, ศิริวรรณ ป้อมจักรศิลป์, วีระมล บุญทัด, มัณฑนา วาณิชกรพิพัฒน์, ปรีชา วรรณะพาหุณ, ประเสริฐ สวนกัน, เรณู ศรีทองแท้

*ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และ องค์การเภสัชกรรม กระทรวงสาธารณสุข กรุงเทพมหานคร

IRRITABILITY TEST OF SULFACETAMIDE EYE DROPS I : IN RABBIT

*Pramote Teerapong**, *Krisana Kraisintu*, *Sirivan Pomchakrasilp*, *Veeramol Boonthud*, *Montana Vanishkornpipat*, *Preecha Wonnaparhoun*, *Prasert Suan-gun*, *Raenu Srithongthae*

*Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University** and *Government Pharmaceutical Organization, Ministry of Public Health, Bangkok, Thailand*

Abstract

Generally, sulfonamide drugs should not be used topically to prevent or to treat bacterial infections because of a high risk of sensitization, and potential irritation and other adverse reactions such as drug allergy, hypersensitivity etc. These experiments were designed to study the irritability and some other topical adverse effects of 10% sulfacetamide ophthalmic solution using rabbits (n = 8) as test animal. An approximate volume of 0.05 ml. (2 drops) of the sulfacetamide solution was instilled into conjunctival sacs of rabbit eyes every 2 hours, 3 times a day (9.00, 11.00 and 13.00 hr.) and 3 days a week (Monday, Tuesday and Wednesday) for 6 weeks and compared to the effects of 0.9% sodium chloride solution for injection (n = 3).

In all tested animals (n = 8) and control (n = 3), the sulfacetamide and sodium chloride solutions did not cause corneal cloudiness or opacity. Both solutions did not cause swelling (edema), congestion or hemorrhage of iris, did not alter pupillary light reflex, neither produced superinfection nor allergic reactions. However, only the sulfacetamide

Thai J. Pharmacol.
Vol.8 No.1 Jan.-Apr. 1986

solution produced mild and transient (15-30 min.) swelling and slight redness of nictitating membrane (grade I conjunctivitis) in 2 rabbits in the second week of testing. It was concluded that 10% sulfacetamide eye drops produced negligible eye irritation in rabbits in this study.

Prontosil (sulfaminum, sulfanilam, p'-sulfamylchrysoidine) เป็นยาต้านจุลชีพตัวแรกที่ใช้ป้องกันและรักษาการติดเชื้อแบคทีเรีย (1) ในร่างกายยาจะสลายตัวให้ para-aminobenzenesulfonamide (sulfanilamide) ซึ่งยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยยับยั้งการทำงานของ dihydropteroate synthetase ของแบคทีเรีย ในการนำ para-aminobenzoic acid (PABA) ไปสร้าง dihydropteroic acid ซึ่งจะนำไปสู่การสร้าง di- และ tetrahydrofolic acid และ/หรืออาจเข้ารวมในโมเลกุล dihydropteroate ด้วย (2-7) ยาซัลฟา (sulfas, sulfonamides) ที่จำหน่ายอยู่ในท้องตลาดทุกตัว เข้าใจว่าออกฤทธิ์ด้วยกลไกเช่นเดียวกับ sulfanilamide (8)

ยาซัลฟาบางชนิด เช่น sulfacetamide sodium, sulfisoxazole diolamine (sulphafurazole diethanolamine), mafenide proprionate, sulfamethizole, sulphasomidine เป็นต้น ทำเป็นรูปยาหยอดตา เนื่องจากมีรายงานว่ายาซัลฟาที่ใช้ทาภายนอกที่ผิวหนัง เช่น sulfathiazole, mafenide acetate, silver sulfadiazine อาจทำให้ผิวหนังเกิดอาการระคายเคือง, คัน, เจ็บ, แสบ, แดง, พอง, หลุดลอก, ไวต่อแสงและกระตุ้นร่างกายให้ไวต่อยา เช่น ออกผื่น (urticaria, maculopapular rash), ผิวหนังประทุ (skin eruption), ผิวหนังอักเสบ (contact dermatitis, exfoliative dermatitis) นอกจากนี้อาจทำให้เส้นเลือดหรือบริเวณรอบเส้นเลือดอักเสบ (vasculitis, arteritis, periarteritis nodosa), erythema nodosum, Stevens-Johnson syndrome (erythema multiforme), Behcet's syndrome, Lyell's syndrome, lupus erythematosus-like syndrome, toxic epidermal necrolysis, ปวดข้อ, ปวดกล้ามเนื้อ, ปวดศีรษะ, ปาก เยื่อตา เยื่อจมูกอักเสบ, ตาและรอบๆ ตาบวม, มีไข้, อ่อนเพลีย, อ่อนแรง เหนื่อยอ่อน, anaphylaxis เป็นต้น (9) ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลองครั้งนี้ขึ้นเพื่อทดสอบว่า ยาหยอดตา

ซัลฟา เซทตาไมด์ ซึ่งมีผู้นิยมใช้มากชนิดหนึ่งอาจก่อให้เกิดอาการระคาย เคืองหรืออาการข้างเคียง อันไม่พึงประสงค์อื่นๆ ในสัตว์ทดลองหรือไม่

ในการทดลองครั้งนี้ได้ใช้กระต่ายขาวเป็นสัตว์ทดลอง เนื่องจากว่าเป็นสัตว์ที่หาง่าย เลี้ยงง่าย เชื่อง ราคาถูก จับถือง่าย นัยน์ตาโต กระจกตา (cornea) และเยื่อตา (conjunctiva) ใสและกว้าง ม่านตา (iris) ไม่มีเม็ดสี ทำให้เห็นลักษณะรูปร่างม่านตาและเส้นเลือดที่ม่านตาและตาขาว (sclera) ชัดเจน ซึ่งถ้าเกิดการอักเสบจะสังเกตเห็นได้ง่ายกว่านัยน์ตาคน นัยน์ตากระต่ายยังมีระบบถ่ายเทสารน้ำ (aqueous humor dynamics) เช่นเดียวกับคน และตอบสนองต่อสิ่งระคายเคืองได้ดี รายงานการทดสอบการระคายเคืองของสารต่างๆ ต่อนัยน์ตา เช่น oxalic acid, phenethyl alcohol, dimercaprol, tetraethoxysilane, colchicine, blasticidin-S, phenol, tetracycline, cytarabine hydrochloride (0.1%), polyethylene glycol ethers (2%), chlorobutanol (0.4%), sodium hypochlorite (5%), turpentine vapor, kerosene, petroleum oil เป็นต้น ใช้กระต่ายเป็นสัตว์ทดลอง และพบว่าได้ผลใกล้เคียงกับคน แม้มีรายงานสารอื่นให้ผลมากหรือน้อยกว่าของคนบ้าง ก็ยังถือได้ว่ากระต่ายเป็นสัตว์ที่เหมาะสม อย่างไรก็ตาม กระต่ายมีเปลือกตาที่ ๓ (nictitating membrane) และ Harderian gland เมื่อมีการระคายเคือง เกิดขึ้น เปลือกตาที่ ๓ อาจบวมและ Harderian gland ขับของเหลวลักษณะขุ่นๆ ไม่ใส เหมือนน้ำตาออกมา (๑๐) ทำให้สังเกตเห็นความผิดปกติได้ง่าย

วิธีการ

นำกระต่ายขาวตาแดง น้ำหนักระหว่าง 2-3 กก. ที่จะทดสอบมาเลี้ยงก่อนทำการทดลองประมาณ 7 วัน เพื่อให้กระต่ายปรับตัวคุ้นเคยสถานที่ เชื่องมือ และเพื่อตรวจดูนัยน์ตาและสุขภาพทั่วไปว่าปกติหรือไม่

ในวันทดลองนำกระต่ายเข้ามาไว้ในห้องปฏิบัติการอย่างน้อย ๑ ชั่วโมงก่อนเริ่มทดสอบ เพื่อให้กระต่ายสงบ คุ้นเคยกับห้องปฏิบัติการ ในขณะทดลองก็พยายามไม่รบกวนหรือทำให้

Thai J. Pharmacol.
Vol.8 No.1 Jan.-Apr. 1986

ตกใจ ห้องที่ใช้ทดสอบเป็นห้องมิดชิด มีแสงและอุณหภูมิคงที่ กระต่ายอยู่ในกล่องโดยจัดให้เฉพาะส่วนหัวถึงลำคอยื่นออกมา กระต่ายไม่สามารถหดหัวกลับเข้าไปได้ เพราะขนาดของช่องเล็กกว่าขนาดของหัวแต่ใหญ่กว่าลำคอ ก่อนหยอดยาตรวจดูกระจกตา เยื่อตา ทั้งที่ผิวลูกตา (bulbar conjunctiva) และด้านในเปลือกตาบนและล่าง (palpebral conjunctivea) เปลือกตาที่ 3 ม่านตาและรูม่านตา ตรวจดูการตอบสนองต่อแสงและวัดขนาดรูม่านตาก่อนหยอดซึ่งกระต่ายทุกตัวต้องปกติ

กระต่ายกลุ่มที่ 1 หยอดซัลฟาเซทตาไมด์ ความเข้มข้น 10% (pH 7.13-8.12) 2 หยด (ประมาณ 0.05-0.1 มล.) เข้าที่แอ่งเยื่อตาทั้ง 2 ข้าง ควรดึงเปลือกตาล่างออกมาให้แอ่งใหญ่ขึ้น จับเปลือกตาบนและล่างประกบกันประมาณ 1 วินาที แล้วปล่อยมือออก กระต่ายกลุ่มที่ 2 หยอดตาด้วยน้ำเกลือบริสุทธิ์สำหรับฉีด (0.9% NaCl) (pH 6.89-6.95) ด้วยวิธีเดียวกัน ทำการหยอดยาโดยไม่ล้างออก ทุก 2 ชั่วโมง วันละ 3 ครั้ง (ที่เวลาประมาณ 9.00,11.00 และ 13.00 น.) สัปดาห์ละ 3 วันติดต่อกัน เป็นเวลาทั้งสิ้น 6 สัปดาห์ บันทึกการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นรวมทั้งวัดขนาดรูม่านตาหลังหยอดตาที่เวลา 1, 15, 30, 60, 120 นาที และที่ 24 ชั่วโมง ถ้านัยน์ตายังมีความผิดปกติตรวจดูต่อไปที่เวลา 2, 3, 5, 7, 14 และ 21 วันหรือจนกว่าจะปกติ และใช้เกณฑ์ตัดสินความรุนแรงของการระคายเคืองที่กระจกตา เยื่อตาและม่านตา ดังนี้

การเปลี่ยนแปลงที่กระจกตา

กระจกตาปกติจะโปร่งแสงและใส เรียบ ไม่มีแผล กระจกตาไม่มีเส้นเลือดมาเลี้ยง เมื่อมีการระคายเคืองเกิดขึ้นจะเปลี่ยนแปลงไปในลักษณะขุ่นทึบแสง และ/หรือมีแผล ความมากน้อยของความขุ่นทึบแสดงถึงความรุนแรงของการระคายเคือง ซึ่งพอจะจัดอันดับความรุนแรงได้ดังนี้

การเปลี่ยนแปลงที่กระจกตา	อันดับความรุนแรง
- ไม่มีบาดแผล และไม่ขุ่นทึบ	0
- มีความขุ่นทึบเล็กน้อยกระจายเบาบางบนกระจกตา	

แต่ยังเห็นรายละเอียดของม่านตาชัดเจน 1

- กระจกตามัวหรือขุ่นทึบบ้าง แต่มองผ่านเห็นม่านตาได้ง่าย แม้รายละเอียดของม่านตาจะถูกบดบังไปบ้าง 2
- กระจกตาขาวนวลและขุ่นทึบแสงไม่สามารถเห็นรายละเอียดของม่านตาและเกือบมองไม่เห็นขนาดรูม่านตา 3
- กระจกตาขุ่นทึบมากจนมองไม่เห็นม่านตา 4

การเปลี่ยนแปลงที่ม่านตา

ม่านตาเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่เกาะกันหลวมๆ เป็นแผ่น เคลื่อนไหวได้ มีเส้นเลือดมาเลี้ยงมากมาย ผิวมีรอยย่นเป็นร่องและเป็นรัศมีแผ่ออกจากรูม่านตา ด้านหลังของม่านตาเป็นชั้นเยื่อผิวซึ่งในคนมีเม็ดสี แต่ในกระต่ายที่ทดลองไม่มีเม็ดสี ห้องหน้าม่านตา (anterior chamber) และห้องหลังม่านตา (posterior chamber) มีสารน้ำซึ่งติดต่อถึงกันทางรูม่านตา ถ้าม่านตาระคายเคืองและอักเสบจะบวม มีเลือดคั่ง ผิวแดงนูนเป็นคลื่นลึก เลือดออก และอาจมีการชำรุดเสียหาย อันดับความรุนแรงของการระคายเคืองแบ่งออกได้ดังนี้

การเปลี่ยนแปลงที่ม่านตา	อันดับความรุนแรง
- ไม่มีการเปลี่ยนแปลง	0
- ม่านตาเป็นคลื่นลึกชัดเจน บวม เลือดคั่ง รอบๆ ม่านตาแดง แต่ยังตอบสนองต่อแสงได้แม้จะช้าลง	1
- ม่านตามีเลือดออก และ/หรือ มีการชำรุดเสียหาย และ/หรือ ไม่ตอบสนองต่อแสง	2

การเปลี่ยนแปลงที่เยื่อตา

เยื่อตาไม่มี keratin แต่มีเซลล์เมือกและ goblet cells (หรือ caliciform cells ซึ่งขับเมือกเช่นกัน) มาก เยื่อตาด้านหลังเปลือกตามี meibomian (tarsal)

Thai J. Pharmacol.
Vol.8 No.1 Jan.-Apr. 1986

glands เป็นต่อมไขมันใหญ่และยาว glands of Zeis เป็นต่อมไขมันขนาดเล็ก glands of Moll เป็นต่อมเหงื่อที่เปลี่ยนแปลงไปและ glands of Krause and Wolfring เป็นต่อมน้ำตาย่อย (accessory lacrimal glands) เปลือกตาที่ 3 ของกระต่ายมี Harderian glands (Harder's glands) ซึ่งขับสารพวกไขมันมีลักษณะเป็นเมือกขุ่นขาว กระต่ายมีต่อมน้ำตาใหญ่มาก แต่มีน้ำตาและกระพริบตาน้อยกว่าคน (11)

เมื่อมีการระคายเคืองและอักเสบที่เยื่อตา เยื่อตาจะมีลักษณะแดง บวม โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เปลือกตาที่ 3 เยื่อตาด้านหลัง เปลือกตาบนและล่าง อันดับความรุนแรงของการระคายเคืองแบ่งออกได้ดังนี้

เมื่อดูจากการเปลี่ยนแปลงเส้นเลือดที่เยื่อตา

การเปลี่ยนแปลง	อันดับความรุนแรง
- เส้นเลือดปกติ เยื่อตาสีปกติ	0
- เส้นเลือดแดงกว่าปกติบางแห่ง เยื่อตาสีแดงกว่าปกติ	1
- เยื่อตาสีแดงจัดจนเกือบมองไม่เห็นเส้นเลือด	2
- เยื่อตาสีแดงจนออกน้ำตาล	3

เมื่อดูจากอาการบวมที่เปลือกตาบนและล่าง และเปลือกตาที่ 3

การเปลี่ยนแปลง	อันดับความรุนแรง
- ไม่บวมเลย	0
- บวมกว่าปกติเล็กน้อยแม้แต่ที่เปลือกตาที่ 3 ก็ตาม	1
- บวมชัดเจนและเปลือกตากลับบางส่วน	2
- บวมชัดเจนจนเปลือกตาปิดนัยน์ตาครึ่งหนึ่ง	3
- บวมชัดเจนจนเปลือกตาปิดนัยน์ตามากกว่าครึ่ง	4

ผลการศึกษา

การเปลี่ยนแปลงที่กระจกตา ม่านตาและเยื่อตา

น้ำเกลือบริสุทธิ์สำหรับฉีด ไม่ทำให้เกิดอาการระคายเคืองหรืออักเสบที่กระจกตา ม่านตาและเยื่อตาของกระต่ายในกลุ่มเปรียบเทียบ (control) เลย (n = 3) (ตารางที่ 1)

ยาหยอดตาซัลฟาเซทตาไมด์ ไม่ทำให้กระจกตาขุ่นทึบหรือมีบาดแผลหรือมีเส้นเลือดแผ่เข้าไป (pannus formation) ไม่ทำให้ม่านตาบวมแดง เลือดคั่ง เลือดออกหรือชำรุดเสียหาย ไม่ทำให้เยื่อตาที่ลูกตาและด้านในเปลือกตาบนและล่างบวมแดง แต่ทำให้เปลือกตาที่ 3 ของกระต่าย 2 ตัวในกลุ่มทดสอบยา (n = 8) บวมแดงเล็กน้อย นาน 15-30 นาที ในสัปดาห์ที่ 2 ของการทดลอง (ตารางที่ 1)

การตอบสนองต่อแสงและการเปลี่ยนแปลงขนาดรูม่านตา

น้ำเกลือบริสุทธิ์สำหรับฉีดไม่มีผลต่อการตอบสนองต่อแสงของม่านตา และไม่ทำให้ขนาดรูม่านตาเปลี่ยนแปลงในกลุ่มเปรียบเทียบ ยาหยอดตาซัลฟาเซทตาไมด์ไม่มีผลต่อการตอบสนองต่อแสงของม่านตา และไม่ทำให้ขนาดรูม่านตาเปลี่ยนแปลงในกลุ่มทดสอบยา (ตารางที่ 2)

การเกิดการติดเชื้อแทรกซ้อน

การติดเชื้อแทรกซ้อนอาจเกิดจากยาเตรียมที่ไม่สะอาดพอ หรือเกิดจากมีการเพิ่มจำนวนของเชื้อดื้อยาหรือเชื้อที่ยาไม่มีผลหลังจากเชื้อที่ไวต่อยาถูกทำลายหมดหรือเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งพบได้ในการใช้ยาต้านจุลชีพซึ่งมีขอบเขตการออกฤทธิ์กว้าง ในการทดลองครั้งนี้ ทั้งน้ำเกลือสำหรับฉีดและยาหยอดตาซัลฟาเซทตาไมด์ ซึ่งมีขอบเขตการออกฤทธิ์กว้าง ไม่ทำให้เกิดการติดเชื้อแทรกซ้อน

การเกิดการแพ้

ปฏิกิริยาแพ้มีหลายชนิด เช่น ปฏิกิริยาภูมิไวเกินเฉียบพลัน (type I) ปฏิกิริยาภูมิไวเกินที่มีการทำลายเซลล์ (type II) ปฏิกิริยาภูมิไวเกิน เกิดสารเชิงซ้อนแอนติเจน-แอน-

Thai J. Pharmacol.
Vol.8 No.1 Jan.-Apr. 1986

ติบอดี้ (type III) และปฏิกิริยาภูมิไวเกินเนิ่นนาน (type IV) มีรายงานว่ายาซัลฟาสามารถก่อให้เกิดการแพ้ได้ทั้ง 4 แบบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งซัลฟาที่มีฤทธิ์นาน การใช้ยาซัลฟาทาภายนอกก็อาจกระตุ้นร่างกายให้ไวต่อยาได้ สำหรับการทดลองครั้งนี้ไม่พบว่าเกิดการแพ้ใดๆ ในกระต่ายทั้ง 2 กลุ่ม

ตารางที่ 1 การเปลี่ยนแปลงที่กระจกตา ม่านตาและเยื่อตา

	กลุ่มเปรียบเทียบ (n=3) น้ำเกลือสำหรับฉีด		กลุ่มทดสอบ (n=8) ซัลฟาเซทตาไมด์ 10%	
	ความรุนแรง	อุบัติการ	ความรุนแรง	อุบัติการ
กระจกตา				
ความขุ่นทึบ บาดแผล เส้นเลือดแผ่เข้าไป	0	0/3	0	0/8
ม่านตา				
เลือดตั้ง เลือดออก แดง บวม	0	0/3	0	0/8
เยื่อตา				
บวม แดงที่เยื่อตา ลูกตาและด้านใน เปลือกตาบนและล่าง	0	0/3	0	0/8
บวมที่เปลือกตาที่ 3	0	0/3	2	2/8

วิจารณ์

เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้าตา ร่างกายตอบสนองด้วยการขับน้ำตาออกมาชำระผิวลูกตา อาการน้ำตาไหลจึงพบได้ทั่วไปและค่อนข้างบ่อย ซึ่งไม่สัมพันธ์กับการระคายเคืองเท่ากับการอักเสบที่

ตารางที่ 2 การเปลี่ยนแปลงขนาดรูม่านตา

	กลุ่มเปรียบเทียบ (n=3)		กลุ่มทดสอบ (n=8)	
	ตาขวา (ม.ม.)	ตาซ้าย (ม.ม.)	ตาขวา (ม.ม.)	ตาซ้าย (ม.ม.)
ขนาดรูม่านตาก่อนหยอด	6.1±0.09	6.05±0.1	5.76±0.11	5.96±0.1
การเปลี่ยนแปลงขนาดรูม่านตาหลังหยอด				
1 นาที	- 0.28±0.07	- 0.22±0.08	- 0.06±0.05	- 0.14±0.06
15 นาที	- 0.17±0.06	- 0.08±0.06	- 0.12±0.05	- 0.09±0.06
30 นาที	- 0.11±0.05	- 0.01±0.07	- 0.06±0.06	- 0.10±0.06
60 นาที	- 0.15±0.08	- 0.08±0.05	- 0.06±0.05	- 0.05±0.06
120 นาที	- 0.02±0.03	- 0.06±0.04	0.0±0.03	- 0.02±0.03

- หมายความว่า รูม่านตาหดเล็กลง + หมายความว่า รูม่านตาขยายกว้างขึ้น

เกิดที่กระจกตา ม่านตา และ/หรือเยื่อตา ในกระต่ายค่าปกติของอัตราการไหลของน้ำตาคือ 0.66-0.78 ไมโครลิตร/นาที (12,13) อัตราการไหลนี้ช้ากว่าของคนเล็กน้อย และเมื่อมีการระคายเคืองเกิดขึ้นน้ำตาก็ยังไหลน้อยกว่าคนแม้กระต่ายจะมีต่อมน้ำตาใหญ่กว่า (11) ปริมาตรของน้ำตาบนผิวลูกตามีค่าประมาณ 7.5-8.0 ไมโครลิตร (14,15) ถ้าปริมาตรมากกว่านี้เพียงเท่าตัวอาจมองเห็นนัยน์ตาเยิ้ม (16) และถ้าเกิน 30 ไมโครลิตรน้ำตาจะล้นออกมานอกเบ้าตา การหยอดยาที่แอ่งเยื่อตา 2 หยด (0.05-0.1 มล.) เป็นปริมาตรที่มากพอที่จะทำให้เห็นว่ากระต่ายมีน้ำตาเยิ้ม ปริมาตรที่มากเกินพอนี้ถูกขับออกโดยระบบถ่ายเทน้ำตาทาง lacrimal puncta แล้วไหลไปตาม superior และ inferior lacrimal canaliculi เข้าสู่ถุงน้ำตา (lacrimal sac) ซึ่งมีท่อไปออกในโพรงจมูกบริเวณ inferior nasal meatus เรียกว่า nasolacrimal duct ทำให้กระต่ายหายใจคล้ายเป็นหวัด การกระพริบตาก่อให้เกิดผล 2 อย่างคือ ทำให้น้ำตาคลุมผิวนัยน์ตาทั่วถึงเป็นแผ่นบางๆ

Thai J. Pharmacol.
Vol.8 No.1 Jan.-Apr. 1986

และทำให้เกิดสูญญากาศหรือความดันลบขึ้นใน canaliculi และถุงน้ำตา เป็นเหตุให้น้ำตาถูกดูดออกครั้งละประมาณ 2 ไมโครลิตร (17) การระคายเคืองทำให้น้ำตาออกมากกว่าปกติและเป็นเวลานาน กระต่ายกระพริบตาถี่ขึ้นและหลายชั่วโมงต่อมามีสารเมือกขุ่นขาวถูกขับออกมาจาก Harderian gland (10) สำหรับการทดลองครั้งนี้พบว่า กระต่ายมีน้ำตาเยิ้มเล็กน้อยทั้งกลุ่มเปรียบเทียบ (1 ใน 8) และกลุ่มทดสอบยา (4 ใน 8) แต่ไม่พบสารเมือกขุ่นขาวที่ตา จึงเป็นสิ่งหนึ่งที่ชี้บ่งว่าไม่เกิดอาการระคายเคือง

การระคายเคืองนอกจากทำให้น้ำตาไหลพรากและมีสารเมือกจาก Harderian gland แล้ว ยังอาจทำให้เยื่อตาอักเสบบวมแดงที่ผิวลูกตา ที่ด้านในเปลือกตาบนและล่างและที่เปลือกตาที่ 3 มีแผลที่เยื่อตา และ/หรือกระจกตา กระจกตาขุ่นทึบ บวม และ/หรือมีเส้นเลือดแผ่เข้าไป อาจมีการติดเชื้อถ้ามีแผลที่กระจกตาและ/หรือเยื่อตา และอาจมีเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเข้าไปด้วย ซึ่งอาจทำให้กระจกตาขุ่นทึบถาวร ม่านตาแดง บวม เลือดคั่ง เลือดออก และ/หรือมี Tyndall phenomenon ซึ่งปรากฏการณ์ที่สารน้ำในห้องหน้าม่านตามีสีแดง (aqueous flare) จากการที่มีเซลล์ สารโปรตีน ฮีโมโกลบินผสมอยู่ แสดงถึงการชำรุดเสียหายของม่านตาและ blood-aqueous barrier ในกระต่ายนั้นการซ่อมแซมเซลล์เยื่อผิวกระจกตาช้ากว่าในคนและลิง (11, 18, 19) และการอักเสบที่ม่านตาข้างหนึ่งชักนำให้ม่านตาอีกข้างหนึ่งไวต่อการระคายเคืองมากขึ้น (20) การทดสอบการระคายเคืองของยา 2 ชนิดในกระต่ายตัวเดียวกันอาจให้ผลคลาดเคลื่อนได้ การทดลองครั้งนี้ใช้วิธีหยอดยาชนิดเดียวกันที่นัยน์ตาทั้งสองข้าง และพบว่าในกลุ่มเปรียบเทียบซึ่งหยอดด้วยน้ำเกลือสำหรับฉีด ไม่พบการอักเสบที่ม่านตา กระจกตา และเยื่อตาเลย ในกลุ่มที่หยอดด้วยซัลฟาเซทตาไมด์ (10%) ไม่พบอาการม่านตาบวมแดง เลือดคั่ง เลือดออก การชำรุดเสียหายหรือ Tyndall phenomenon ไม่พบความผิดปกติในการตอบสนองต่อแสง และการเปลี่ยนแปลงขนาดรูม่านตา ไม่พบกระจกตาขุ่นทึบหรือเป็นแผล ไม่พบเยื่อตาที่ลูกตาและด้านในเปลือกตาบนและล่างบวมแดง แต่พบว่าเปลือกตาที่ 3 บวมแดงเล็กน้อยชั่วคราว (15-30 นาที) อันดับความรุนแรงเท่ากับ 1 ในสัปดาห์ที่ 2 ของการทดลองในกระต่าย 2 ตัว (n = 8) นอกจากนี้ไม่พบการติดเชื้อแทรกซ้อนและปฏิกิริยาภูมิแพ้เกิดขึ้น จึงเชื่อว่ายาหลอดตาซัลฟาเซทตาไมด์ไม่ทำให้เกิดการระคายเคืองหรือเกิดการระคายเคืองน้อยมากในกระต่าย

คำขอบคุณ

ผู้วิจัยขอขอบคุณองค์การเภสัชกรรมและกระทรวงสาธารณสุขที่ได้สนับสนุนการวิจัย และขอขอบคุณสัตวแพทย์หญิง วจีรัตน์ กังสะนันทน์ หัวหน้าแผนกสัตว์ทดลอง กองชีววัตถุ องค์การเภสัชกรรม กระทรวงสาธารณสุข ที่ได้ให้คำแนะนำเกี่ยวกับสัตว์ทดลอง

เอกสารอ้างอิง

1. Gelmo P. Sulphamides of p-aminobenzenesulphonic acid. J Prakt Chem 1908; 77:369-82.
2. Woods DD. Relation of p-aminobenzoic acid to mechanism of action of sulphanilamide. Br J Exp Pathol 1940; 21:74-90.
3. Woods DD. The biochemical mode of action of the sulphonamide drugs. J Gen Microbiol 1962; 29:687-702.
4. Fildes P. A rational approach to research in chemotherapy. Lancet 1940; 1:955-7.
5. Miller AK, Bruno P, Berglund RM. The effect of sulfathiazol on the *in vitro* synthesis of certain vitamins by *Escherichia coli*. J Bacteriol 1947; 54:9.
6. Brown GM. The biosynthesis of folic acid. II. inhibition by sulfonamides. J Biol Chem 1962; 237:536-40.
7. Brown GM. The biosynthesis of pteridines. Adv Enzymol 1971; 35:35-77.
8. Mandell GL, Sande MA. Sulfonamides, trimethoprim-sulfamethoxazole, and agents for urinary tract infections. In : Gilman AG, Goodman LS, Rall TW, Murad F, eds. The pharmacological basis of therapeutics. 7th ed. New York : Macmillan Publishing, 1985; 1095-114.
9. Zinner SH, Mayer KH. Sulfonamides and trimethoprim. In : Mandell GL, Douglas RG Jr, Bennett JE, eds. Principles and practice of infectious diseases. 2nd ed. New York : John Wiley & Sons, 1985:237-44.
10. Mann I, Pirie A, Pullinger BD. An experimental and chemical study of the reaction of the anterior segment of the eye to chemical injury, with special reference to chemical warfare agents. Br J Ophthalmol 1948; 13 (suppl):15-54.
11. Buehler EV, Newmann EA. A comparison of eye irritation in monkeys and rabbits. Toxicol Appl Pharmacol 1964; 6:701-10
12. Patton TF, Robinson JR. Influence of topical anesthesia on tear dynamics and ocular drug bioavailability in albino rabbits. J Pharm Sci 1975; 64:267-71.

13. Longwell A, Birss S, Keller N, Moore D. Effect of topically applied pilocarpine on tear film pH. J Pharm Assoc 1976; 65:1654-7.

14. Chrai SS, Patton TF, Mehta A, Robinson JR. Lacrimal and instilled fluid dynamics in rabbit eyes. J Pharm Sci 1973; 62:1112-21.

15. Scherz W, Doane MG, Dohlman CH. Tear volume in normal eyes and keratoconjunctivitis sicca. Albrecht von graefes Arch Klin Ophthalmol 1974; 192:141-50.

16. Ehlers N. Pharmacology of the conjunctival sac. In : Dikstein S, ed. Drugs and ocular tissues. Basel : Karger, 1977:23-56.

17. Doane MG. Blinking and the mechanics of the lacrimal drainage system. Ophthalmology 1981; 88:844-51.

18. Carpenter CP, Smyth HF. Chemical burns of the rabbit cornea. Am J Ophthalmol 1946; 29:1363-74.

19. Carter RO, Griffith JG. Assessment of eye hazard. Toxicol Appl Pharmacol 1965; 7(Suppl 2):60-73.

20. Davson H. The intraocular fluids. In : Davson H, ed. The eye. vol I. New York : Academic Press, 1969:217-8.

วารสารเภสัชวิทยา
ปีที่ 8 เล่มที่ 1 ม.ค.-เม.ย.2529

การทดสอบการระคายเคืองของยาหยอดตา ซัลฟาเซทตาไมด์ II : ในคน

ปราโมทย์ ธีรพงษ์*, กฤษณา ไกรสินธุ์, ศิริวรรณ ป้อมจักรศิลป์, วีระมล บุญทัด, มัณฑนา วาณิชกรพิพัฒน์, ปรีชา วรรณะพาหุณ, ประเสริฐ สวนกัน, เรณู ศรีทองแท้

*ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และ องค์การเภสัชกรรม กระทรวงสาธารณสุข กรุงเทพมหานคร

IRRITABILITY TEST OF SULFACETAMIDE EYE DROPS II : IN MAN

*Pramote Teerapong**, *Krisana Kraisintu*, *Sirivan Pomchakrasilp*, *Veeramol Boonthud*, *Montana Vanishkornpipat*, *Preecha Wonnaparhoun*, *Prasert Suan-gun*, *Raenu Srithongthae*

*Department of Pharmacolgy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University**, and Government Pharmaceutical Organization, Ministry of Public Health, Bangkok, Thailand*

Abstract

Although it was found that 10% sulfacetamide ophthalmic solution produced negligible mild eye irritation in rabbits, the solution was further studied for irritability and other topical adverse effects in 24 volunteers. An approximate volume of 0.05 ml. (2 drops) of 0.9% sodium chloride solution for injection and 10% sulfacetamide ophthalmic solution were instilled into conjunctival sacs of left and right eyes respectively every 2 hours, 3 times a day (9.00, 11.00 and 13.00 hr) for 7 days. Both solutions did not cause corneal cloudiness (opacity) or damage, did not produce conjunctivitis, did not cause swelling (edema), congestion, hemorrhage of the iris, did not alter pupillary light reflex and vision, neither caused superinfection nor allergic reactions. However, only the sulfacetamide eye drops produced brief and mild sensation of pain or burning when contacting the eyes.

Thai J. Pharmacol.
Vol.8 No.1 Jan.-Apr. 1986

ถึงแม้การทดสอบการระคายเคืองของยาหยอดตาซัลฟาเซทตาไมด์ในกระต่าย จะได้ผลน่าพอใจ กล่าวคือ ยาอาจทำให้ระคายเคืองเล็กน้อย (1) แต่โครงสร้างและคุณสมบัติของนัยน์ตากระต่ายไม่เหมือนนัยน์ตาของคนทีเดียว (2) เช่น กระต่ายมีเปลือกตาที่ 3 (nictitating membrane) และมีกระจกตา (cornea) บางกว่าของคน (0.37 เทียบกับ 0.5 มม.) กระพริบตาน้อยครั้งกว่าในคน และมีน้ำตาออกมาน้อยกว่า น้ำตากระต่ายมี pH ประมาณ 8.2 แต่ของคนประมาณ 7.2 กระต่ายมี Harderian glands แต่ไม่มี Bowman's membrane นัยน์ตากระต่ายอาจไวต่อสารทดสอบไม่เท่ากับของคน (3,4) เช่น นัยน์ตากระต่ายไวต่อแชมพูและยาต้านฮิสตามีนน้อยกว่านัยน์ตาคน (5,6) แต่ไวต่อสบู่ สารลดแรงตึงผิวบางอย่างและ piperonyl butoxide มากกว่านัยน์ตาคน (7,8,9) ดังนั้นยาทุกชนิดที่จะนำมาใช้กับนัยน์ตาคน หลังจากทดสอบในสัตว์ทดลองได้ผลเป็นที่น่าพอใจแล้ว ต้องนำมาทดสอบในคนเสียก่อน

ยาซัลฟาเคยเป็นยาที่ใช้แพร่หลายมากสำหรับป้องกัน และ/หรือ รักษาโรคติดเชื้อ แต่ปัจจุบันความนิยมใช้ยาซัลฟาได้ลดลง อย่างไรก็ตามมียาซัลฟาประมาณ 7 ชนิด ผลิตในรูปยาทาภายนอกสำหรับรักษาการติดเชื้อที่นัยน์ตา ได้แก่ sulfacetamide sodium (10 - 30% eye drops, 10% ointment), sulfisoxazole diolamine sodium (sulphafurazole diethanolamine) (4% eye drops และ ointment), mafenide proprionate (5% eye drops และ ointment), sulfathiazole (5% ointment), sulfadiazine sodium (5% ointment), sulfamethizole (4% eye drops) และ sulphasomidine-Z (10% eye drops) ในบรรดายาเหล่านี้ ยาหยอดตาซัลฟาเซทตาไมด์เป็นยาที่แพร่หลายมากที่สุด และสมควรได้รับการศึกษาอีกครั้งหนึ่ง เนื่องจากเป็นยาหยอดตาที่มีจำหน่าย และใช้แพร่หลายตัวหนึ่งในประเทศไทย แต่ยากลุ่มซัลฟาเป็นยาที่อาจก่อให้เกิดการระคายเคือง กระตุ้นร่างกายให้ไวต่อยา และอาจก่อให้เกิดอาการแพ้รุนแรงถึงเสียชีวิต (แม้แต่ยาหยอดตาซัลฟาเซทตาไมด์) เช่น เกิด Stevens-Johnson syndrome, systemic lupus erythematosus (SLE)- like syndrome (10,11,12) และเพราะดวงตาเป็นอวัยวะที่มีค่ามากที่สุดอวัยวะหนึ่งของร่างกาย การใช้ยาหรือสารเคมีใดๆ กับนัยน์ตา จึงต้องระมัดระวังมากเป็นพิเศษ และมากกว่าการใช้ยาหรือสารเคมีกับผิวหนัง

วิธีการ

คัดเลือกอาสาสมัครไม่จำกัดเพศมา 24 คน อายุระหว่าง 20-45 ปี ตรวจดูความปกติของนัยน์ตาก่อนการทดลอง ซึ่งอาสาสมัครทุกคนต้องมีนัยน์ตาปกติทั้งสองข้าง เริ่มทดลองโดยหยอดตาซ้ายอาสาสมัครด้วยน้ำเกลือบริสุทธิ์สำหรับฉีด (0.9% NaCl) (pH 6.89-6.95) 2 หยด (0.05-0.1 มล.) เพื่อไว้สำหรับเปรียบเทียบ (control) และหยอดตาขวาด้วยยาหยอดตาซัลฟาเซทตาไมด์ความเข้มข้น 10% (pH 7.13-8.12) 2 หยดที่แอ่งเยื่อตา(conjunctival sac) ทั้ง 2 ข้าง ทำการหยอดทุก 2 ชั่วโมง วันละ 3 ครั้ง (ที่เวลาประมาณ 9.00, 11.00 และ 13.00 น.) เป็นเวลา 7 วัน สังเกตดูการเปลี่ยนแปลงทุกอย่างที่เกิดขึ้นกับนัยน์ตาทั้งสองข้าง เช่น การระคายเคืองและอักเสบที่กระจกตา เยื่อตาและม่านตา การเปลี่ยนแปลงในขนาดรูม่านตา การมองเห็นและความรู้สึก (sensation) ของประสาทสัมผัสที่ตา ที่เวลา 1, 120 นาที และ 24 ชั่วโมง ถ้ายังมีความผิดปกติเกิดขึ้น ทำการตรวจดูต่อทุก 24 ชั่วโมง จนกว่าจะกลับเป็นปกติ

ผลการศึกษา

การเปลี่ยนแปลงที่กระจกตา ม่านตาและเยื่อตา

น้ำเกลือบริสุทธิ์สำหรับฉีด และยาหยอดตาซัลฟาเซทตาไมด์ ไม่ทำให้กระจกตาขุ่นทึบหรือมีบาดแผล ไม่ทำให้ม่านตาบวมแดง เลือดคั่ง เลือดออก หรือซ้ำรุดเสียหาย ไม่ทำให้เยื่อตาที่ลูกตาและที่ด้านในเปลือกตาบนและล่างบวมแดงในอาสาสมัครทั้งหมด (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การเปลี่ยนแปลง (การระคายเคือง) กระจกตา ม่านตา และเยื่อตา

	ตาซ้าย (n=24) น้ำเกลือบริสุทธิ์สำหรับฉีด		ตาขวา (n=24) ซัลฟาเซทตาไมด์ 10%	
	ความรุนแรง	อุบัติการ	ความรุนแรง	อุบัติการ
กระจกตา	0	0/24	0	0/24
เยื่อตา	0	0/24	0	0/24
ม่านตา	0	0/24	0	0/24

Thai J. Pharmacol.
Vol.8 No.1 Jan.-Apr. 1986

การตอบสนองต่อแสงและการเปลี่ยนแปลงขนาดรูม่านตา

น้ำเกลือบริสุทธิ์สำหรับฉีดและยาหยอดตาซัลฟาเซทตาไมด์ ไม่มีผลต่อการตอบสนองต่อแสงของม่านตา และไม่ทำให้ขนาดรูม่านตาเปลี่ยนแปลงในอาสาสมัครทั้งหมด (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การเปลี่ยนแปลงขนาดรูม่านตา*

	ตาซ้าย (มม.)	ตาขวา (มม.)
ขนาดรูม่านตาก่อนหยอดยา	2.8 ± 0.03	2.73 ± 0.04
การเปลี่ยนแปลงขนาดรูม่านตาหลังหยอดยา (1 นาที)	0.03 ± 0.03	0.03 ± 0.05

*n = 24

การเกิดการติดเชื้อแทรกซ้อน

น้ำเกลือบริสุทธิ์สำหรับฉีดและยาหยอดตาซัลฟาเซทตาไมด์ซึ่งมีฤทธิ์กว้าง ไม่ทำให้เกิดการติดเชื้อแทรกในอาสาสมัครทั้งหมด

การเปลี่ยนแปลงในการมองเห็น

น้ำเกลือบริสุทธิ์สำหรับฉีดและยาหยอดตาซัลฟาเซทตาไมด์ ไม่ทำให้การเห็นภาพลดลง ตามัว ตาพร่า หรือเห็นภาพซ้อน ในอาสาสมัครทั้งหมด

การเปลี่ยนแปลงในความรู้สึก

น้ำเกลือบริสุทธิ์สำหรับฉีด ไม่ทำให้เกิดอาการ เจ็บ แสบ คัน ร้อน ในอาสาสมัครเลย แต่ยาหยอดตาซัลฟาเซทตาไมด์ทำให้เกิดความรู้สึกแสบหรือเจ็บเล็กน้อยเพียงครู่เดียว (น้อยกว่า 1 นาที) ขณะที่ยาสัมผัสนัยน์ตา ในอาสาสมัครทั้งหมด

การเกิดการแพ้

ในการทดลองครั้งนี้ ไม่พบอาการแพ้ใดๆ จากยาหยอดตาซัลฟาเซทตาไมด์ และน้ำเกลือบริสุทธิ์สำหรับฉีด ในอาสาสมัครทั้ง 24 คนเลย

วิจารณ์

Hellauer ได้เรียงลำดับความไวของการเกิดการระคายเคืองที่นัยน์ตาต่อสารเคมีในสัตว์ชนิดต่างๆ จากมากไปหาน้อยคือ วัว คน กระต่าย สุนัข และแมว (13) แต่ Battista และ McSweeney เชื่อว่า นัยน์ตากระต่ายไวต่อการระคายเคืองมากกว่านัยน์ตาคน (2) อาจเป็นเพราะกระต่ายมีเส้นเลือดรอบกระจกตา (limbus) มาก และเส้นเลือดแผ่เข้าไปในกระจกตา (pannus formation) จึงมีการอักเสบง่ายกว่านัยน์ตาคนและลิง (14,15)มีรายงานว่า สารบางชนิดก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อนัยน์ตากระต่ายง่ายกว่านัยน์ตาคน เช่น cresol, ethylene glycol, selenium sulfide และฮีสตามีนเป็นต้น (16) ดังนั้นผลการทดลองจากสัตว์อาจไม่สอดคล้องกับผลในคนเสมอไป ความจริงยังมีปัจจัยอื่นๆ อีกหลายประการ ที่เกี่ยวข้องหรือมีอิทธิพลต่อผลการทดสอบการระคายเคือง นอกเหนือจากความแตกต่างในชนิดของ สัตว์ทดลอง ได้แก่ 1) ชนิดของสารหรือความแตกต่างกันของสาร — สารต่างชนิดกันก่อให้เกิดการระคายเคืองไม่เท่ากัน 2) รูปแบบยาเตรียม — ยาเตรียมที่เป็นของแข็งระคายเคืองมากกว่า ยาเตรียมที่เป็นน้ำ 3) วิธีหยอด — หยอดแล้วไม่ล้างระคายเคืองมากกว่าหยอดแล้วล้างออก 4) คุณสมบัติทางชีวเคมีของสาร เช่น การจับกับเนื้อเยื่อ โปรตีนหรือเอนซัยม์ของสาร 5) คุณสมบัติทางเคมีของสาร เช่น ขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุล ชนิดของเกลือและโครงสร้างของสาร เป็นต้น 6) คุณสมบัติทางฟิสิกส์ เช่น การแตกตัว การมีขั้วของสาร (polarity) ความเข้มข้น (17,18) ความคงตัว การละลายในไขมันและ partition coefficient

ความถี่และระยะเวลาที่ยาสัมผัสนัยน์ตามีผลต่ออาการระคายเคือง โดยที่ยาที่สัมผัสนัยน์ตาบ่อยครั้งหรือสัมผัสอยู่นานทำให้เกิดการระคายเคืองมากกว่าการให้ยานานๆ ครั้ง หรือให้เพียงระยะเวลาสั้นๆ และถ้ายาสัมผัสนัยน์ตานานกว่า 10-20 วินาที แม้จะล้างยาออก ก็ยังเกิดการระคายเคืองได้ (19,20) สารลดแรงตึงผิวชนิดประจุบวก (cationic detergent) ทำให้เกิดการระคายเคืองมากกว่าพวกประจุลบ (anionic) หรือเป็นกลาง (nonionic) ตามลำดับ (21, 22) อายุ เพศและพันธุ์ของสัตว์ทดลอง มีส่วนทำให้ผลการทดลองแปรผันได้ (23) ดังนั้นจึงควรทำให้ปัจจัยต่างๆ คงที่ตลอดการทดลองให้มากที่สุดเท่าที่จะมากได้ อนึ่งถึงแม้ยาซัลฟาเซทตาไมด์ที่ใช้

ทดลองมี pH แปรผันระหว่าง 7.13-8.12 แต่นัยน์ตาสามารถทนต่อ pH ได้ในช่วง 3-11 (24, 25) หรือสูงกว่านั้น (26) ถ้า pH สูงเกินไป (> 12) อาจเกิดการชำรุดเสียหายที่เนื้อกระจกตาอย่างถาวร (25,27,28,29)

สำหรับการทดลองโดยวิธีหยอดยาโดยไม่ล้างออก ทุก 2 ชั่วโมง วันละ 3 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน พบว่ายาหยอดตาซัลฟาเซทตาไมด์ ความเข้มข้น 10% ไม่ทำให้เกิดการขุ่นทึบหรือมีบาดแผล หรือเกิดเส้นเลือดแผ่เข้าไปที่กระจกตา ไม่ทำให้เกิดอาการบวมแดงของเยื่อบุตา และด้านในเปลือกตา ไม่ทำให้เกิดอาการบวมแดง เลือดคั่ง เลือดออก เป็นแผล หรือชำรุดเสียหายที่ม่านตา ไม่พบ Tyndall phenomenon แต่ม่านตาตอบสนองต่อแสงปกติ ไม่เปลี่ยนแปลงการมองเห็น ไม่เกิดภาพซ้อนหรือมัว ไม่เกิดการติดเชื้อแทรกซ้อน แต่ยาก่อให้เกิดความรู้สึกแสบหรือเจ็บสักครู่หนึ่งขณะที่ยาสัมผัสนัยน์ตา

คำขอบคุณ

ผู้วิจัยขอขอบคุณองค์การเภสัชกรรม กระทรวงสาธารณสุข ที่ได้ให้การสนับสนุนการวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

1. ปราโมทย์ ธีรพงษ์, กฤษฎา ไกรสินธุ์, ศิริวรรณ ป้อมจักรศิลป์ และคณะ, การทดสอบการระคายเคืองของยาหยอดตาซัลฟาเซทตาไมด์ I : ในกระต่าย.: วารสารเภสัชวิทยา 2529;8:1-12
2. Battista SP, McSweeney ES Jr. Approaches to quantitative method of testing eye irritation. J Soc Cosmet Chem 1965;16:119-31.
3. Ballantyne B, Swanston DW. The irritant potential of dilute solutions of ortho - chlorobenzylidene malononitrile(CS) on the eye and tonque. Acta Pharmacol Toxicol 1973;32:266-77.
4. Ballantyne B, Swanston DW. The irritant effects of dilute solutions of dibenzoxazepine (CR) on the eye and tonque. Acta Pharmacol Toxicol 1974;35:412-23.

5. Grant WM, Loeb DR. Effect of locally applied antihistamine drugs on normal eye. Arch Ophthalmol 1948;39:553-4.

6. Gaunt F, Harper KH. The potential irritancy to the rabbit eye of certain commercial available shampoos. J Soc Cos Chem 1964;15:209-30.

7. Fairhall LT. Industrial toxicology. 2nd ed. Baltimore : Williams & Wilkins, 1957.

8. Beckley JH. Comparative eye testing : Man VS Animal. Toxicol Appl Pharmacol 1965;7:93-101.

9. Harris LS, Kahanowica Y, Shimmyo M. Corneal anesthesia induced by soaps and surfactants, lack of correlation in rabbits and humans. Ophthalmologica 1975;170:320-5.

10. Gottschalk HR, Stone OJ. Stevens-Johnson syndrome from ophthalmic sulfonamide. Arch Dermatol 1976;112:513-4.

11. Rubin Z. Ophthalmic sulfonamide-induced Stevens-Johnson syndrome. Arch Dermatol 1977;113:235-6.

12. Adams JD. Drug induced lupus erythematosus - a case report. Aust J Dermatol 1978;19:31-2.

13. Hellauer HF. Sensibilitat und acetylcholingehalt der hornhaut verschiedenier tiereund des menschen. Zeitschrift Fur Vergleichende Physiologie 1950;32:303-10.

14. Mann I, Pullinger BD. A study of mustard gas lesions of the eyes of rabbits and men. Proc Roy Soc Med 1942;35:229-44.

15. Buehler EV, Newmann EA. A comparison of eye irritation in monkeys and rabbits. Toxicol Appl Pharmacol 1964;6:701-10.

16. McDonald TO, Seabaugh V, Shadduck JA, Edelhauser HF. Eye irritation In : Marzulli FN, Maibach HI, eds. Dermatotoxicology. 2nd ed. Washington : Hemisphere Publishing Corporation, 1983:555-610.

17. Marzulli FN, Simon ME. Eye irritation from topically applied drugs and cosmetics : preclinical studies. Am J Ophthalmol 1971;48:61-79.

18. Bucher K, Bucher KE, Walz D. The topically irritant substance : essentials - bio - tests - predictions. Agents and Actions 1981;11: 515-9.

19. Davies RE, Kynoch SR, Liggett MP. Eye irritation test : an assessment of maximum delay time to remedial irrigation. J Soc Cosmet Chem 1976;27:301-6.

20. Seabaugh UM, Osterberg RE, Hocheisal CA, Murphy J, Bierbower G. A comparative study of rabbits ocula reactions to various exposure times to chemicals. The 15th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Atlanta, Ga, 1976.

21. Hazelton LW. Relation of surface active properties to irritation of the rabbit eye. Proc Sci Sect Toilet Goods Assoc 1952;17:5-9.

22. Carter LM, Duncan G, Rennie GK. Effects of detergents on the ionic balance and permeability of isolated bovine cornea. Exp Eye Res 1973;17:490-6.

23. Weltman AS, Sparber SB, Jurtshuk T. Comparative evaluation and the influence of various factors on eye-irritation scores. Toxicol Appl Pharmacol 1965;7:308-19.

24. Hughes WF. Alkali burns of the eye. Arch Ophthalmol 1946;35:423-49.

25. Grant MW. Toxicology of the eye. 2nd ed. Illinois : Thomas, 1974.

26. York M, Lawrence RS, Gibson GB. An *in vitro* test for the assessment of eye irritancy in consumer products-preliminary findings. Int J Cosmet Sci 1982;4:233-34.

27. McLaughlin RS. Chemical burns of the human cornea. Am J Ophthalmol 1946;29:1355-62.

28. Butscher P. Beitrag Zur Therapie von Augenschadigunen durch Thioglykulsaur bei der Herstellung der sogenannten Kaltwelle : Klin Monatsbl Augenheilkd 1953;122:349-50.

29. Grant MW, Kern HL. Action of alkalis on the corneal stroma. Arch Ophthalmol 1956;54:931-9.

วารสารเภสัชวิทยา
ปีที่ 8 เล่มที่ 1 ม.ค.-เม.ย.2529

AFLATOXINS : BIOCHEMICAL TOXICITY AND METABOLISM

Chaivat Toskulkao and Thirayudh Glinsukon

Department of Physiology, Faculty of Science
Mahidol University, Bangkok 10400

OCCURRENCE OF AFLATOXINS

Aflatoxins were discovered as a consequence of epizootic outbreaks of hepatic necrosis, resulting in the deaths of thousands of turkeys poults ("Turkey X disease"), ducklings and chicks in England in 1960 and 1961. The problem was eventually traced to feed contamination, specifically a shipment of Brazilian peanut meal used as a protein supplement in poultry feed. This meal proved to be both toxic and carcinogenic and was found to be contaminated with *Aspergillus flavus (1,2)*.

The active chemicals were extracted and isolated from *Aspergillus flavus* cultures and chemically identified (3,4). Later in 1960, outbreaks of disease occurred in pigs, also apparently caused by an unknown etiology was reported in calves (5). In both cases the etiology was traced to the incorporation of Brazilian groundnut meal into the rations of the livestock. Following the reports of investigation into the cause of "Turkey X disease" in England, it was established that the same etiologic agent was present in the cotton meal used as feed which was later shown to be contaminated with aflatoxin (6,7). Lancaster *et al.* reported that rats fed the toxic groundnut meal developed hepatocarcinoma (8). In 1964, Butler and Barnes reported a series of feeding experiments with the toxic groundnut meal, assayed for aflatoxin, which showed that aflatoxin is an extremely potent carcinogen for the rat (9). This was confirmed later by using crystalline aflatoxins (10).

Thai J. Pharmacol.
Vol.8 No.1 Jan.-Apr. 1986

Aflatoxin-producing mold strains are widely dispersed in air and soil, and are capable of growing on a variety of natural substrates. Two species of molds, the *Aspergillus* and the *Penicillium* are most important in their ability to produce toxic metabolites and the aflatoxins represent the most potent of these compounds. In *Aspergillus* group : *A. flavus*, *A. flavus* var *columnis*, *A. parasiticus*, *A. parasiticus* var *globosus* and *A. oryzae* were capable of producing aflatoxins. In *Penicillium* group : *P. puberulum*, *P. variable*, *P. frequentans* and *P. citrinum* were capable of producing aflatoxins (11). These molds generally synthetize only two or three type of aflatoxins under a given set of conditions, one of which is always aflatoxin B_1, the most potent toxin and most carcinogenic of the group. Aflatoxins in the G series almost always present in lesser amounts than aflatoxin B_1 (12). When they occur as food contaminants, aflatoxin B_1 is always present. Although aflatoxins in the G series have sometimes been found in contaminated products, they generally occur less frequently than aflatoxin B_1 amd have never been reported in the absence of aflatoxin B_1.

STRUCTURE AND CHEMISTRY OF AFLATOXINS

The aflatoxins constitute a group of highly substituted coumarins containing a fused dihydrofurofuran moiety whose characteristic physicochemical feature is their intense fluorescence under ultraviolet illumination. Structurally, the aflatoxins were grouped into two series, aflatoxin B and derivatives, and aflatoxin G and derivatives, based possibly on the blue violet fluorescence of the former and the greenish yellow fluorescence of the latter (3). Hartley *et al.* showed that aflatoxins could be resolved into four distinct compounds, namely aflatoxins B_1, B_2 and G_1, G_2 accordingly (13). Their chemical structures are shown in Fig. 1.

Structures based largely on interpretation of spectral data were proposed for aflatoxin B_1 and G_1 (4, 14), and for aflatoxins B_2 and G_2 (15, 16). The molecular formula of aflatoxin B_1 was established as $C_{17}H_{12}O_6$ (MW 312) and of aflatoxin G_1 as $C_{17}H_{12}O_7$ (MW 328) while aflatoxins B_2 and G_2 were found to be the dihydroderivatives of the parent compounds with the molecular formulae of $C_{17}H_{14}O_6$ (MW. 314) and $C_{17}H_{14}O_7$ (MW 330), respectively.

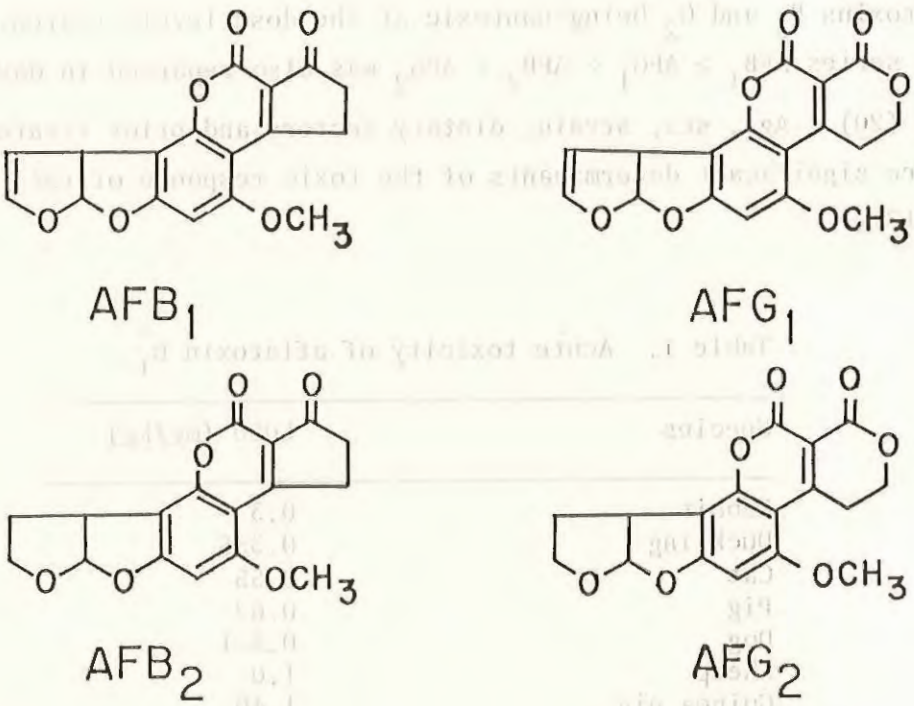


FIGURE 1. Structures of the aflatoxins.

BIOLOGICAL ACTIVITY OF AFLATOXINS

ACUTE TOXICITY OF AFLATOXINS

The aflatoxins, aflatoxin B_1 in particular, are acutely toxic to a large number of organisms, including laboratory and domestic animals (17). The toxic properties of the aflatoxins depend upon the dose, duration of exposure, and animal species. There is a wide range of susceptibility from the highly susceptible 1-day-old duckling to the more resistant mouse and adult turkey.

Aflatoxin B_1 toxicity data for rodents and nonrodent vertebrates are shown in Table 1. The acute toxicity of aflatoxin B_1 to mammals and birds may vary over two orders of magnitude between a sensitive species (rabbit, LD50 0.3 mg/kg) and an insensitive species (mouse, LD50 approximately 40 mg/kg). Aflatoxin B_1 was more toxic than aflatoxin G_1 in male rats

but aflatoxins B_2 and G_2 being nontoxic at the dose levels tested. The toxicity series $AFB_1 > AFG_1 > AFB_2 > AFG_2$ was also reported in day-old duckling (20). Age, sex, strain, dietary factors and prior treatment with drugs were significant determinants of the toxic response of rats to aflatoxin B_1 (17).

Table 1. Acute toxicity of aflatoxin B_1*.

Species	LD50 (mg/kg)
Rabbit	0.3
Duckling	0.335
Cat	0.55
Pig	0.62
Dog	0.5-1
Sheep	1.0
Guinea pig	1.40
Rat male	7.2
female	17.9
Hamster	10.2
Mouse	40.0
Chick embryo	0.025 µg/embryo

* From (18, 19)

Rats have been the most extensively studied laboratory animal. There are sex and strain differences in the susceptibility of rats with Fischer rats being considerably more susceptible than the Wistar ones. The lesion induced in both sexes and in different strains is the same, and consists of a periportal zone necrosis and biliary proliferation (18). The necrosis develops slowly over 3 days, and is accompanied by marked biliary proliferation. There is only slow recovery of this lesion.

In man, the evidences of acute toxicity of aflatoxins was reported. Serk-Hansen reported the death of a boy in Uganda from acute liver damage, and it was found that the casava eaten by the boy was heavily contaminated with aflatoxin (21). In Thailand, the consumption of leftover cooked rice,

tremendously contaminated with aflatoxin, was associated with the death of Thai boy who suffered from Reye's syndrome. Reye's syndrome, in which there is an encephalopathy and fatty infiltration of the liver and the kidney, has been reproduced experimentally in monkey by feeding aflatoxin (22). Aflatoxins have also been found in autopsy specimens of Reye's syndrome by Becroft and Webster in New Zealand (23), and by Dvorackova and his coworkers in six cases in Czechoslovakia (24). All of the children consumed moldy rice heavily contaminated with aflatoxin. In Western India, Krishnamachari *et al.* reported that aflatoxin B_1 involved in the human toxicosis (25). This outbreak affected as many as 20 villages and was responsible for the death of approximately 26% (106 deaths/397 patients) of all patients admitted to the hospital. It was found that maize was contaminated with *Aspergillus flavus* and aflatoxin. The clinical features were similar to those seen in animals insulted with aflatoxin B_1.

AFLATOXINS CARCINOGENESIS

The work of Lancaster and his colleagues gave an insight into the carcinogenic potential of the aflatoxins (8). They showed a high incidence of liver tumors in rats fed with diet containing a highly mouldy peanut meal. Subsequent studies showed that aflatoxins were the carcinogenic agents in mould-infected peanuts (10, 26, 27). Aflatoxins have also been shown to have carcinogenic activity in many species of animals, including rodents, nonhuman primates, birds and fish (12, 19). Factors influencing aflatoxin carcinogenicity such as diet, hormonal status, liver injury, microsomal enzyme activity, and concurrent exposure to other carcinogenic agents have been reviewed (12). The carcinogenic potency series AFB_1 > AFG_1 > AFB_2 > AFG_2 has been verified in the rats (20).

Epidemiological surveys have revealed strong correlations between liver cancer and aflatoxin B_1 contamination in Africa, Phillipines and other countries (28, 29). Alpert *et al.* found that 40% of food samples tested in Uganda contain aflatoxin with 15% containing more than 1 ppm (30). Levels of 0.015 ppm may induce carcinoma in the rat with continuous inges-

tion. In Kenya, Swaziland, Thailand, and Mozambique, where the incidence of hepatic carcinoma is high, aflatoxins are present in human food. It was reported that the variety of fungi contaminated market foods and foodstuffs in Southeast Asia. Among these, *Aspergillus flavus* was frequently found in all foods and foodstuffs (31, 32). Natural occurrence of aflatoxins was highest in peanuts and peanut products, and responsible for human aflatoxicosis and liver cirrhosis in India (25, 33). There is, therefore, supportive evidence that man is exposed to the aflatoxins in those areas of the world in which hepatic carcinoma is prevalent. This exposure results directly from the problems of harvesting and food storage in developing countries. In order to reduce the body burden of aflatoxins, these practices must be improved.

AFLATOXINS METABOLISM

Studies on toxicity of aflatoxins have largely been focused on aflatoxin B_1 because it is the most abundant and the most toxic metabolite. It is highly hepatotoxic, hepatocarcinogenic, and teratogenic to test animals and highly mutagenic to microbial assay systems (34). Strong evidence exists to indicate that aflatoxin B_1 requires metabolic activation for its toxic, mutagenic and carcinogenic effects. For example, it requires mixed function oxidase (MFO) activation to elicit its potent mutagenicity to the bacterium *Salmonella typhimurium* (35). Also, its covalent binding to nucleic acids occurs both *in vivo* and *in vitro* in the presence of a MFO activation system (36).

Aflatoxins are primarily metabolized by the microsomal mixed function oxidase system, a complex organization of cytochrome coupled, O_2- and NADPH-dependent enzymes located mainly on the endoplasmic reticulum of liver cells, but also present in kidney, lungs, skin and other organs.These enzymes oxidatively metabolize a wide variety of foreign or xenobiotic compounds, with the net result usually being detoxication of the parent compound by the formation of various hydroxylated derivatives which, in turn, are conjugated with sulfate or glucuronic acid to form water-soluble glucuronide or sulfate esters (37). These conjugates are readily excreted in the

urine or bile. During the course of metabolism, highly reactive metabolites may be generated which have the capacity to react covalently with various nucleophilic centers in cellular macromolecules such as DNA, RNA and protein. This activation reaction poses a biological hazard to the cell and constitutes a possible theory by which certain compounds exert toxic and carcinogenic effects (38).

Based on the apparent association between metabolism and toxicity of aflatoxin B_1, attempts have been made to quantitate the relative susceptibility of aflatoxin B_1 as a function of respective *in vitro* metabolic profiles of aflatoxin B_1 (39). *In vitro* metabolic parameters of aflatoxin B_1 for various animal species were then determined and compared with animal susceptibilities to aflatoxin toxicity. The same metabolic parameters were also determined for human tissue preparations and used to estimate the unknown human susceptibility based upon the correlations established for the test animals. The distribution of metabolic products formed showed that aflatoxin B_1 is biotransformed *in vitro* by all the species tested to aflatoxin metabolites. The major metabolites produced by hamster, monkey and human *in vitro* was aflatoxin Q_1, while rat and duck showed a relatively higher conversion to aflatoxicol. A similarity in metabolic profile was observed between hamster and human. Based on the maximal overall *in vitro* metabolic activity of aflatoxin B_1, Patterson has calculated the time required by the whole liver preparations of an animal to completely metabolize one LD50 dose of aflatoxin B_1 (40). According to Patterson's correlation, the fast metabolizers such as rabbit and duck are more prone to acute rather than chronic or carcinogenic aflatoxicosis, whereas the slow metabolizers such as sheep and rat are more susceptible to chronic rather than acute effects. Man and monkey were found to be fast metabolizers, and are typically more susceptible to acute aflatoxicosis but are relatively resistant to carcinogenic effects.

Aflatoxin B_1 is biotransformed into several kinds of metabolites by cytosol and microsomal enzyme systems as shown in Fig. 2. There are at least four types of metabolic reactions characteristic of aflatoxin B_1 :

reduction, hydroxylation, O-demethylation and epoxidation leading to the respective formation of aflatoxicol (AFL), aflatoxin M_1 (AFM_1) and aflatoxin Q_1 (AFQ_1), aflatoxin P_1 (AFP_1) and the aflatoxin B_1-2, 3-oxide (AFB_1-2, 3-oxide). Except for the epoxide, all the metabolites have been isolated and characterized.

Aflatoxin M_1 : Ring hydroxylation of aflatoxin B_1 at the 4 position produces aflatoxin M_1. This metabolite was first detected in the milk of cows ingesting aflatoxin B_1 (41). Aflatoxin M_1 has also been detected in the urine of humans consuming aflatoxin B_1-contaminated peanut butter (42). It was formed *in vitro* by liver preparations from a variety of species, including human, and it has been found in milk, tissues and urine of animals and people ingesting aflatoxin B_1 (43, 44, 45). The degree of acute toxicity of aflatoxin M_1 appears to be equivalent to that of aflatoxin B_1 but is much less carcinogenic (46, 47).

Aflatoxin Q_1 : Ring hydroxylation of the carbon atom β to the carbonyl function of the cyclopentenone ring produces aflatoxin Q_1. It was identified as major *in vitro* aflatoxin B_1 metabolite using monkey liver and human liver microsomes (48, 49). It was also produced *in vitro* by liver microsomes of various animals (44). This seems to be a minor pathway *in vivo* and free aflatoxin Q_1 has not been found in tissues or excreta of any animal exposed to aflatoxin B_1 (43). This metabolite was nontoxic to chicken embryo (50), and was only 1-2% as mutagenic as aflatoxin B_1 in the Ames bacterial mutagenesis assay (45).

Aflatoxin P_1 : This metabolite was produced by the O-demethylation of aflatoxin B_1, and was the major excretory product in the urine of aflatoxin B_1-treated rhesus monkey (51). It was slightly formed *in vitro* by mouse, rat, monkey and human microsomes (44, 52). Aflatoxin P_1 was nontoxic to chicken embryos (53), and inactive in the Ames assay (54).

Aflatoxicol : Reduction of the cyclopentenone carbonyl function of aflatoxin B_1 by an NADPH-dependent cytoplasmic enzyme produced aflatoxicol. Rabbit

and bird liver homogenates were active aflatoxicol producers, whereas rodent and sheep preparations were inactive (55). Aflatoxicol was nontoxic to the day-old duckling (56), and the relatively high mutagenic potential and carcinogenicity in trouts may be due to its metabolism to aflatoxin B_1 (54).

Aflatoxin B_1 -2, 3-oxide : Although generally remaining unidentified, the most reactive and labile metabolites are thought to be the "ultimate" toxins in their respective biochemical lesions. The metabolite of greatest current interest is the proposed aflatoxin B_1 -2, 3-oxide. Even though aflatoxin B_1 -2, 3-oxide has not been isolated, its formation and toxic action can be measured indirectly by the Ames mutagen assay. Using mutagenesis in the test bacterium *Salmonella typhimurium* as the model biochemical lesion, differing aflatoxin B_1 mutagenic responses elicited by post-mitochondrial liver fractions prepared from animals of different susceptibilities to aflatoxin B_1 carcinogenicity indicate that net epoxide formation appears to be another metabolic parameter associated with animal susceptibility (39).

Structural-activity evaluations using mutagenicity and DNA-binding activity as model biological lesions support the involvement of the 2, 3-vinyl-ether double bond in toxicity, with the epoxide as the active species (45, 59).

MACROMOLECULAR BINDING OF AFLATOXIN

The covalent incorporation of an aflatoxin moiety into nucleic acids and proteins is now considered to be an important mechanism by which aflatoxin B_1 initiates its toxic and carcinogenic effects. The aflatoxin B_1-2, 3-oxide has been proposed by various investigators as the active form or ultimate carcinogen of aflatoxin B_1 (60, 61). It was later shown that the predominant metabolite of aflatoxin B_1 that binds to DNA in animal and human tissues is the aflatoxin B_1,-2, 3-oxide (36, 62).

Once aflatoxin B_1 -2, 3-oxide formed, it can either exert electrophilic attack on the target nucleophiles such as in nucleic acids and proteins to cause biochemical lesions; or be conjugated by reduced glutathione

Thai J. Pharmacol.
Vol.8 No.1 Jan.-Apr. 1986

(GSH) and be detoxified (63,64); or be hydrolyzed to form the 2, 3-dihydrodiol of aflatoxin B_1 (58). After incubation the mixture of aflatoxin B_1, DNA, microsomes and NADPH, and following chemical analysis of the modified DNA, the major aflatoxin B_1 -DNA adduct was identified as 8,9-dihydro-8-(7-guanyl)-9-hydroxy-aflatoxin B_1 or 2, 3-dihydro-2-(N^7-guanyl)-3-hydroxy-aflatoxin B_1 (Fig.3) (65). This adduct was also the major product formed *in vivo* in rat liver (63,66). Aside from this major adduct, more than ten minor products were detected, and one of them was identified as an imidazole ring-opened derivative of aflatoxin B_1-N^7-Guanine (Fig.3) (67).

Attempts in isolating the highly reactive 2, 3-oxide have been unsuccessful, although it can be chemically generated by oxidation of aflatoxin B_1 and trapping the epoxide as nucleic acid or nucleoside adducts with DNA (68). Although the epoxide itself has not been isolated because of its great reactivity, a more stable model compound, aflatoxin B_1-2, 3-dichloride has been synthesized (61). This electrophilic analog of the epoxide was considerably more potent than aflatoxin B_1 in the Ames mutagenesis assay and in the induction of various rat and mouse tumors. The aflatoxin B_1 -2, 3-dichloride also reacted spontaneously with DNA, RNA, protein and amino acids with nucleophilic centers, such as cysteine, histidine and lysine. Thus it seems likely that the epoxidation pathway may represent an important activation step in aflatoxin metabolism. Furthermore, it is generally agreed that this metabolite is probably produced by the mixed function oxidase enzyme system.

The relative biological hazard posed by the formation of aflatoxin adducts with different classes of cellular macromolecules is unknown. However, in studies comparing *in vivo* macromolecular binding of aflatoxin B_1 (toxic) and aflatoxin B_2 (relatively nontoxic) to rat liver DNA, RNA and protein, it was noted that aflatoxin B_2 bound to the nucleic acids approximately 1% of that bound by aflatoxin B_1, whereas protein binding was 35 to 70% of that observed with aflatoxin B_1 (61). This suggested that aflatoxin-protein adducts were relatively unimportant in the manifestation of toxic and carcinogenic effects. There has been very good correlation, with certain parameters studied, between the toxicity and carcinogenicity of afla-

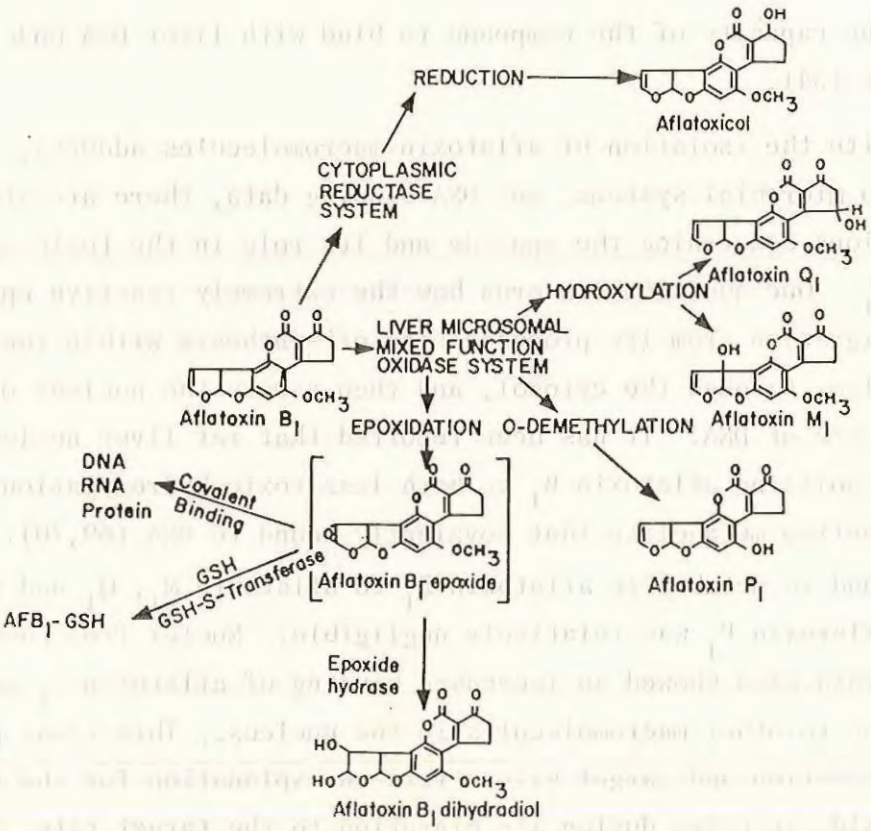
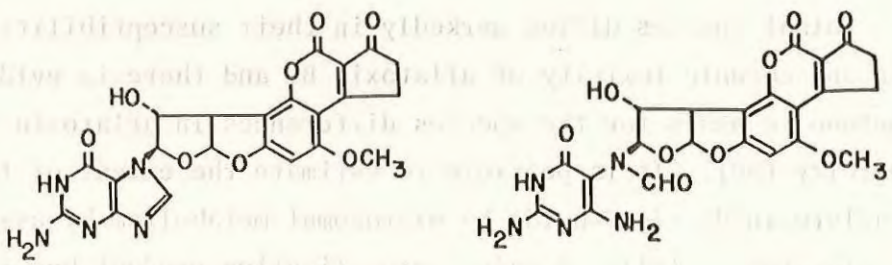


FIGURE 2. Aflatoxin B_1 and its metabolic pathway (From Ueno, 1985; Moss and Neal, 1985) (57,58)



8,9-Dihydro-8-(N^7-guanyl)-9-hydroxy-aflatoxin B_1
(AFB_1-Gua)

8,9-Dihydro-8-(N^5-formyl-2',5',6'-triamino-4'-oxo-N^5-pyrimidyl)-9-hydroxy-aflatoxin B_1
(AFB_1-triamino-Py)

(57)

FIGURE 3. Aflatoxin B_1-DNA adducts (From Ueno, 1985)

Thai J. Pharmacol.
Vol.8 No.1 Jan.-Apr. 1986

toxin B_1 and the capacity of the compound to bind with liver DNA under *in vivo* conditions (34).

Despite the isolation of aflatoxin-macromolecules adducts, mutagenicity to microbial systems, and DNA-binding data, there are still unsolved questions concerning the epoxide and its role in the toxic action of aflatoxin B_1. One question concerns how the extremely reactive epoxide survives the migration from its proposed site of synthesis within the endoplasmic reticulum, through the cytosol, and then across the nuclear membrane to the target site of DNA. It has been reported that rat liver nuclei were capable of metabolizing aflatoxin B_1 to both less toxic hydroxylation metabolites and reactive metabolite that covalently bound to DNA (69,70). Nuclei were found to metabolize aflatoxin B_1 to aflatoxin M_1, Q_1 and P_1; the formation of aflatoxin P_1 was relatively negligible. Nuclei from phenobarbital-treated rats also showed an increased binding of aflatoxin B_1 metabolites to DNA and to other macromolecules in the nucleus. This close proximity of the activation and target site offers an explanation for the survival of the epoxide *in vitro* during its migration to the target site, and may stimulate activation of the nuclear membrane and subsequent DNA binding *in vivo*.

Animal species differ markedly in their susceptibilities to both the acute and chronic toxicity of aflatoxin B_1 and there is evidence supporting a metabolic basis for the species differences in aflatoxin B_1-induced hepatotoxicity (58). It is possible to estimate the extent of the activation to aflatoxin B_1 -2, 3-oxide by microsomal metabolism by assaying aflatoxin B_1 dihydrodiol (71). A major detoxification product has recently been identified as a glutathione conjugate of the epoxide aflatoxin B_1 (2, 3-dihydro-2-(S-glutathionyl)-3-hydroxy-aflatoxin B_1 (72). Both activation and deactivation pathways have been investigated and would account for the relative susceptibilities to aflatoxin B_1 toxicity. Glutathione conjugation (AFB_1-GSH) has also been associated with reduced macromolecular binding *in vivo* and *in vitro* via cytosolic GSH-S-transferase enzymes (64,73,74).

Another pathway of the inactivation of aflatoxin B_1 -2, 3-oxide

is hydrolysis of this active intermediate by epoxide hydrase. Based on previous evidence that 1,2,3-trichloropropane oxide, a potent inhibitor of epoxide hydrase, increases the binding of aflatoxin B_1 to nuclear DNA *in vitro*, it is presumed that aflatoxin B_1 -2, 3-oxide is inactivated by this enzyme (57). In conclusion, two major pathways that can detoxified aflatoxin B_1 -2, 3-oxide are

a) hydration to the aflatoxin B_1 dihydrodiol by hepatic microsomal epoxide hydrase.

b) conjugation with glutathione to form 2, 3-dihydro-2-(S-glutathionyl)-3-hydroxy aflatoxin B_1 which catalyzed by glutathione-S-epoxide transferase in soluble fraction.

BIOCHEMICAL EFFECTS OF AFLATOXIN

Many investigations have difficulty with the biochemical responses elicited by aflatoxin B_1 in a variety of experimental systems with the goal of identifying those reactions essential to the toxic and carcinogenic activity of the compound. The vast majority of the *in vivo* studies have been carried out using acutely toxic single doses of aflatoxin B_1, therefore the resulting biochemical responses were probably more relevant to mechanisms underlying the toxicity of aflatoxin B_1 rather than its carcinogenicity. No recent comprehensive experiments on the biochemical effects of aflatoxin B_1 are available.

Inhibition of DNA synthesis was one of the first events of aflatoxin B_1 intoxication to be reported. Lafarge and Frayssinet reported an inhibition of DNA synthesis after administration of aflatoxin B_1 and the inhibition was maximal between 2 and 24 hours postdosing in rats (75). The mouse, which was more resistant to the toxic and carcinogenic effects of aflatoxin B_1, was much more resistant to the effects of aflatoxin B_1 on DNA synthesis. An aflatoxin B_1 (2.5 mg/kg) resulting in 92% inhibition of DNA synthesis in rats, only caused a 13% reduction in DNA synthesis in mice(76).

When aflatoxin B_1 acts directly on the DNA molecule its consequence

is the inhibition of the ability of the nucleic acid to act as a primer for RNA synthesis. Nucleolar RNA synthesis was inhibited by afaltoxin B_1 both *in vivo* and *in vitro* (75,77). RNA synthesis was maximally inhibited from 15 min to 12 hours. Complete recovery of RNA synthesis was attained by 36 hours. Inhibition of RNA polymerase has been demonstrated by several investigators in various biological systems (78,79). The direct addition of aflatoxin B_1 to nuclear preparations from the livers of untreated animals did not inhibit RNA synthesis indicating that metabolisms of aflatoxin B_1 was required for the expression of these effects (78,80).

Protein synthesis is also inhibited by aflatoxin B_1 treatment, although the effect is neither as rapid nor as extensive as the inhibition of DNA and RNA synthesis in comparable model systems. *In vivo* liver protein synthesis in monkeys was inhibited by 3.5 to 13 hours after an oral dose of aflatoxin B_1, though no effects were observable 1 hour postdosing (81). Hence, aflatoxin B_1-induced disruption of protein synthesis was not necessarily a consequence of the primary inhibition of DNA/RNA synthesis. Polysome disaggregation is consistently associated with, and may be the basis for, the inhibition of protein synthesis by aflatoxin B_1 treatment. Polysome disaggregation has been demonstrated after aflatoxin B_1 treatment in liver preparations from rats and monkeys (81,82). Polysome reaggregation was apparent by 36 hours, and the normal profile was again obtained 5 days after aflatoxin B_1 treatment.

Several miscellaneous biochemical processes, including alterations in cellular enzyme activities, have also been shown to be affected by aflatoxin B_1 treatment. Generally these mechanisms have not been investigated as extensively as those concerned with macromolecular biosynthesis. This does not necessarily imply that these studies are less significant in terms of understanding the mode of action of aflatoxins, although many of these aflatoxin-induced effects may be expected to be derived from and secondary to the disruption of nucleic acid or protein synthesis. The observations that aflatoxin B_1 may also function to some degree as a membrane-active toxin, is suggested by its effects on mitochondrial function and lysosome

permeability. These responses may have validity in explaining at least some of the acute toxic effects of the aflatoxins.

An early observation that a low orally administered dose of aflatoxin B_1 inhibited oxygen consumption and phosphorylation in rat liver mitochondria indicating that mitochondria were also a sensitive target of aflatoxin action (83). Results from previous studies have established that acutely toxic doses of aflatoxin B_1 inhibit mitochondrial electron transport between b and c or C_1 (site II) (84,85). However, it has also been suggested that the degree and sites of inhibition by aflatoxin B_1 depend on the toxin concentrations. Aflatoxin B_1 also inhibited at the cytochrome oxidase level (86,87).

It is significant that the concentration of aflatoxin B_1 which induced a higher percentage inhibition of guinea fowl liver mitochondrial respiration was about a hundred times lower than that reported for the rat. This probably accounts for the greater susceptibility of the avian species to aflatoxin hepatotoxicity (88). Obidoa and Siddiqui reported that aflatoxin B_1 inhibition of guinea fowl liver mitochondrial respiration is not localized at coupling site II but may involve inhibition around site I (86). These findings explain the greater susceptibility of the avian species to aflatoxin toxicity.

Breakdown of lysosomes and the release of degradative lysosomal enzymes into the surrounding tissues is obviously implicated in the hepatic necrosis and hemorrhage consistently observed with acutely toxic doses of aflatoxin B_1. A broad range of rat lysosomal enzyme activities were increased in whole liver homogenates after an oral LD50 dose of aflatoxin B_1 (89). As an example, there was about a 3-fold increase in acid DNAase activity 48 hours after aflatoxin B_1. Much of the enzymatic activity was present in the supernatant, indicating that the lysosomal enzymes had been released. *In vitro* treatment of rat liver lysosomal preparations with aflatoxin B_1 also produced a dose-dependent release of the marker enzymes (90).

Recent studies have demonstrated that many compounds undergo bio-

transformation in the liver to chemically reactive metabolites which covalently bind to hepatic macromolecules, particularly DNA, resulting in hepatic injury (91). The isolation and structural identification of the major aflatoxin B_1 -DNA adduct *in vivo* and *in vitro* strongly suggested that the microsomal oxidase-catalyzed epoxidation of aflatoxin B_1 at the 2,3 double bond is the mechanism by which aflatoxin residues are covalently bound to nucleic acids and may coincidentally explain the relative biological potency of aflatoxin B_1 (65,67). The mechanism responsible for the inhibition of mitochondrial function and the potentiation of lysosomal enzymes release are not as yet clear.

REFERENCES

1. Sargeant K, Sheridan A, O'Kelly J, Carnaghan RBA. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. Nature 1961 ; 192:1096-1097.
2. Sargeant K, Carnaghan RBA, Allcroft R. Toxic products in groundnuts : chemistry and origin. Chem Ind 1963:53-55.
3. Nesbitt BF. O'Kelly J, Sargeant K, Sheridan A. Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. Nature 1962 ; 195:1062-1063.
4. Asao T. Buchi G, Abel-Kader MM, Chang SB, Wick EL, Wogan GN. Aflatoxins B and G. J Am Chem Soc 1963 ; 85:1706-1707.
5. Loosemore RM, Markson LM, Poisoning of cattle by Brazilian groundnut meal. Vet Record 1961 ; 73:813-814.
6. Wolf H, Jackson EW. Hepatomas in rainbow trout : descriptive and experimental epidemiology. Science 1963 ; 142:676-678.
7. Sinnhuber RO, Wales JH, Ayres JL. Dietary factors and hepatoma in rainbow trout. I. aflatoxin in vegetable protein. J Natl Cancer Inst 1968 ; 41:711-718.
8. Lancaster MC, Jenkins FP, Philip J. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. Nature 1961 ; 192:1095-1096.
9. Butler WH, Barnes JM. Toxic effects of groundnut meal contaiing aflatoxin to rats and guinea pigs. Br J Cancer 1964 ; 17:699-710.
10. Barnes, JM, Butler WH. Carcinogenic activity of aflatoxin to rats. Nature 1964 ; 202:1016.
11. Diener UL, Davis ND. Aflatoxin formation by Aspergillus flavus. In : Goldblatt LA, ed. Aflatoxin, scientific background, control and implications. New York : Academic Press, 1969:13-54.

12. Wogan GN. Mycotoxins and other naturally occurring carcinogens. In : Kraybill H, Mchlman MA, eds. Environmental cancer. Washington : Hemisphere, 1977:263-290.

13. Hartley RD, Nesbitt BF, O'Kelly J. Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. Nature 1963 ; 198:1056-1058.

14. Asao T, Buchi G, Abdel-Kader MM, Chang BS, Wick EL, Wogan GN. The structures of aflatoxin B_1 and G_1. J Am Chem Soc 1965 ; 87:882-886.

15. Chang SB, Abdel-Kader MM, Wick EL, Wogan GN. Aflatoxin B_2: chemical identity and biological activity. Science 1963 ; 142:1191-1192.

16. Van Dorp DA, Van der Zizden ASM. Beerthuis RK, et al. Dihydro-aflatoxin B_1 a metabolite of *A. flavus*. Rec Trav Chem 1963 ; 82:587-592.

17. Wogan GN. Aflatoxin carcinogenesis. Methods Cancer Res 1973 ; 7:309-344.

18. Butler WH. Aflatoxin. In:Purchase IFH, ed. Mycotoxins. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Company, 1974:1-28.

19. Busby WF, Wogan GN. Food-borne mycotoxins and alimentary mycotoxicoses. In:Rieman H, Bryan FL, eds. Food-borne infections and intoxications. New York : Academic Press, 1979:519-610.

20. Wogan GN, Edwards GS, Newberne PM. Structure-activity relationships in toxicity and carcinogenicity of aflatoxins and analogs. Cancer Res. 1971 ; 31:1936-1942.

21. Serck-Hanssen A. Aflatoxin-induced fatal hepatitis: a case report from Uganda. Arch Environ Health 1970 ; 20:729-731.

22. Bourgeois C, Olson L, Comer D, et al. Encephalopathy and fatty degeneration of the viscera. Am J Clin Pathol 1971 ; 56:558-571.

23. Becroft DMO, Webster DR. Aflatoxins and Reye's syndrome. Br Med J 1972 ; 4:117.

24. Dvorackova I, Brodsky F, Cerman J. Aflatoxin and encephalitic syndrome with fatty degeneration of viscera. Nutr Rep Int 1974 ; 10:89-101.

25. Krishnamachari R, Bhat RV, Nagarajone V, Talak TBG. Hepatitis due to aflatoxicoses. Lancet 1975 ; 1:1061-1063.

26. Newberne PM. Carcinogenicity of aflatoxin-contaminated peanut meals. In : Wogan GN, ed. Mycotoxins in foodstuffs. Cambridge : MIT Press, 1965 ; 187-208.

27. Wogan GN. Chemical nature and biological effects of the aflatoxins. Bacteriol Rev 1966 ; 30:460-470.

28. Peers FG, Gilman GA, Linsell CA. Dietary aflatoxins and human liver cancer, a study in Swaziland. Int J Cancer 1976 ; 17:167-176.

29. Bulatao-Jajame J, Almero EM, Castro MCA, Jardeleza MTR, Salamat LA. A case-control dietary study of primary liver cancer risk from afla-

toxin exposure. Int J Epidemiol 1982 ; 11:112-119.

30. Alpert ME, Hutt MSR, Wogan GN, Davidson CS. Association between aflatoxin content of food and hepatoma frequency in Uganda. Cancer 1971 ; 28:253-260.

31. Shank RC, Wogan GN, Gibson JB. Dietary aflatoxins and human liver cancer. I. toxigenic moulds in foods and foodstuffs in tropical South-East Asia. Food Cosmet Toxicol 1792 ; 10:71-84.

32. Glinsukon T, Thamavit W, Ruchirawat M. Studies on the population of toxigenic fungi in market foods and foodstuffs. I. microflora contamination. J Sce Soc Thailand 1976 ; 2:176-182.

33. Yadgiri B, Reddy V, Tulpule PG, Srikantia SG, Gopalone C. Aflatoxin and Indian childhood cirrhosis. Am J Clin Nutr 1970 ; 23:94-98.

34. Hsieh DPH, Wong JJ. Metabolism and toxicity of aflatoxins. Adv Exp Med Biol 1982 ; 136 B : 847-863.

35. Ames BN, Durston WE, Yamasaki E, Lee FD. Carcinogens and mutagens: a simple test system combinding liver homogenates for activation and bacterial for detection. Proc Natl Acad Sci 1973 ; 70:2281-2285.

36. Lin JK, Miller JA, Miller EC. 2,3-dihydro-2-(N^7-guanyl)-(guanyl-7)-3-hydroxy-aflatoxin B_1, a major acid hydrolysis product of aflatoxin B_1-DNA or ribosomal RNA adducts formed in hepatic microsomal-mediated reactions and in rat liver *in vivo*. Cancer Res 1977 ; 37:4430-4438.

37. Dalezios JE, Wogan GN. Metabolism of aflatoxin B_1 in Rhesus monkeys. Cancer Res 1972 ; 32:2297-2303.

38. Miller EC. Some current perspectives on chemical carcinogenesis in human and experimental animals: presidential address. Cancer Res 1978 ; 38:1479-1496.

39. Hsieh DPH, Wong ZA, Wong JJ, Michas C, Ruebner BH. Comparative metabolism of aflatoxin. In : Rodricks JV, Hasseltine CW, Mehlman, MA, eds. Mycotoxins in human and animal health. Illinois : Pathotox Publishers, 1977:37-50.

40. Patterson DSP. Metabolism as a factor in determining the toxic action of the aflatoxins in different animal species. Food Cosmet Toxicol 1973 ; 11:287-294.

41. Masri MS, Lundin RE, Page JR, Garcia VC. Crystalline aflatoxin M_1 from urine and milk. Nature 1967 ; 215:753-755.

42. Campbell TC, Caedo JR, Bulatao-Jayme J, Salamat L, Engel RN. Aflatoxin M_1 in human urine. Nature 1970 ; 227:403-404.

43. Campbell TC, Hayes JR. The role of aflatoxin metabolism in its toxic lesion. Toxicol Appl Pharmacol 1976 ; 35:199-222.

44. Roebuck BD, Wogan GN. Species comparison of *in vitro* metabolism of aflatoxin B_1. Cancer Res 1977 ; 37:1649-1656.

45. Gurtoo HL, Dahms RP, Paigen B. Metabolic activation of aflatoxins related to their mutagenicity. Biochem Biophys Res Commun 1978 ; 81: 965-972.

46. Pong RS, Wogan GN. Toxicity and biochemical and fine structural effects of synthetic aflatoxins M_1 and B_1 in rat liver. J Natl Cancer Inst 1971 ; 47:485-492.

47. Wogan GN, Paglialunga S. Carcinogenicity of synthetic aflatoxin M_1 in rats. Food Cosmet Toxicol 1974 ; 12:381-384.

48. Masri MS, Haddon WF, Lundin RE, Hsieh DPH. Aflatoxin Q_1 : a newly identified major metabolite of aflatoxin B_1 in monkey liver. J Agr Food Chem 1974 ; 22:512-515.

49. Büchi GH, Muller PM, Roebuck BD, Wogan GN. Aflatoxin Q_1: a major metabolite of aflatoxin B_1 produced by human liver. Res Commun Chem Pathol Pharmacol. 1974 ; 8:585-592.

50. Hsieh DPH, Salhab AS, Wong JJ, Yang SL. Toxicity of aflatoxin Q_1 as evaluated with the chicken embryo and bacterial auxotrophs. Toxicol Appl Pharmacol 1974 ; 30:237-242.

51. Dalezios JI, Hsieh DPH, Wogan GN. Excretion and metabolism of orally administered aflatoxin B_1 by rhesus monkeys. Food Cosmet Toxicol 1973 ; 11:605-616.

52. Dahms R, Gurtoo HL. Metabolism of aflatoxin B_1 to aflatoxins Q_1, M_1 and P_1 by mouse and rat. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 1976; 15: 1-20.

53. Stoloff L, Verrett MJ, Dantzman J, Reynaldo EF. Toxicolgical study of aflatoxin P_1 using fertile chicken egg. Toxicol Appl Pharmacol 1972 ; 23:528-531.

54. Wong JJ, Hsieh DPH. Mutagenicity of aflatoxins related to their metabolism and carcinogenic potential. Proc Natl Acad Sci 1976 ; 73:2441-2244.

55. Patterson DSP, Roberts BA. Steroid sex hormones as inhibitors of aflatoxin metabolism in liver homogenates. Experientia 1972 ; 28:929-930.

56. Detroy RW, Hasseltine CN. Isolation and biological activity of a microbial conversion product of aflatoxin B_1. Nature 1968 ; 219:967.

57. Ueno Y. The toxicology of mycotoxins. CRC Crit Rev Toxicol 1985 ; 14:99-132.

58. Moss EJ, Neal GE. The metabolism of aflatoxin B_1 by human liver. Biochem Pharmacol 1985 ; 34:3193-3197.

59. Coles BF, Smith JRL, Carner RC. Mutagenicity of 3a, 8a-dihydrofuro (2,3,6) benzofuran, a model of aflatoxin B_1 for *Salmonella typhimurium* TA 100. Biochem Biophys Res Commun 1977 ; 76:888-892.

60. Swenson DH, Miller JA, Miller EC. The reactivity and carcinogenicity of aflatoxin B_1-2,3-dichloride, a model for the putative 2,3-oxide metabolite of aflatoxin B_1. Cancer Res 1975 ; 35:3811-3823.

61. Swenson DH, Lin JK, Miller EC, Miller JA. Aflatoxin B_1-2,3-oxide as a probable intermediate in the covalent binding of aflatoxin B_1 and B_2 to rat liver DNA and ribosomal RNA *in vivo*. Cancer Res 1977 ; 37:172-181.

62. Croy RG, Essigmann JM, Reinhold VM, Wogan GN. Identification of the principal aflatoxin B_1-DNA adduct formed *in vivo* in rat liver. Proc Natl Acad Sci 1978 ; 75:1745-1749.

63. Degan GN, Neuman HG. The major metabolite of aflatoxin B_1 in the rats is a glutathione conjugate. Chem Biol Interact 1978 ; 22:239-255.

64. Lotlikar PD, Insetta SM, Lyons PR, Jhee E. Inhibition of microsome mediated binding of aflatoxin B_1 to DNA by glutathione-S-transferase. Cancer Lett 1980 ; 9:143-149.

65. Essigman JM, Croy RG, Nadzan AM, et al. Structural identification of the major DNA adduct formed by aflatoxin B_1 *in vitro*. Proc Natl Acad Sci 1977 ; 74:1870-1874.

66. Essigman JM, Green CL, Croy RG, Fowler KW, Büchi GH, Wogan GN. Interactions of aflatoxin B_1 and alkylating agents with DNA : structural and functional studies. Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology XLVII : 1983 ; 327-337.

67. Croy RG, Wogan GN. Temporal patterns of covalent DNA adducts in rat liver after single and multiple doses of aflatoxin B_1. Cancer Res 1981 ; 41:197-203.

68. Martin CN, Garner RC. Aflatoxin B_1-oxide generated by chemical or enzymic oxidation of aflatoxin B_1 causes a guanine substitution in nucleic acids. Nature 1977 ; 267:863-865.

69. Vaught JB, Klohs W, Gurrtoo HL. *In vitro* metabolism of aflatoxin B_1 by rat liver nuclei. Life Sci 1977 ; 21:1497-1504.

70. Guengerich FP. Similarity of nuclear and microsomal cytochrome P-450 in the *in vitro* activation of aflatoxin B_1. Biochem Pharmacol 1979 ; 28:2883-2890.

71. Neal GE, Colley PJ. The formation of 2,3-dihydro-2,3-dihydroxy-aflatoxin B_1 by the metabolism of aflatoxin B_1 *in vitro* by rat liver microsomes. FEBS Lett 1979 ; 101:382-386.

72. Moss EJ, Judah DJ, Przybylski M, Neal GE. Some mass-spectral and n.m.r. analytical studies of a glutathione conjugate of aflatoxin B_1. Biochem J 1983 ; 210:227-233.

73. Neal GE, Metcalfe SA, Legg RF, Judah DJ, Green JA. Mechanism of the resistance to cytotoxicity which precedes aflatoxin B_1 hepato-carcinogenesis. Carcinogenesis 1981 ; 2:457-461.

74. O'Brien K, Moss EJ, Judah DJ, Neal GE. Metabolic basis of the species difference to aflatoxin B_1 induced hepatotoxicity. Biochem Biophys Res Commun 1983 ; 114:813-821.

75. Lafarge C, Frayssinet C. The reversibility of inhibition of RNA and DNA synthesis induced by aflatoxin in rat liver. a tentative explanation for carcinogenic mechanism. Int J Cancer 1970 ; 6:74-83.

76. Godoy HM, Neal GE. Some studies of the effects of aflatoxin B_1 *in vivo* and *in vitro* on nucleic acid synthesis in rat and mouse. Chem Biol Interact 1976 ; 13:257-277.

77. Pong RS, Wogan GN. Time course and dose-response characteristics of aflatoxin B_1 effects on rat liver RNA polymerase and ultra-structure. Cancer Res 1970 ; 30:294-304.

78. Akinrimisi EO, Benecke BJ, Seifart KH. Inhibition of rat-liver RNA polymerase *in vitro* by aflatoxin B_1 in the presence of a microsomal fraction. Eur J Biochem 1974 ; 42:333-339.

79. Yu FL. Mechanism of aflatoxin B_1 inhibition of rat hepatic nuclear RNA synthesis. J Biol Chem 1977 ; 252:3245-3251.

80. Neal GE. The effect of aflatoxin B_1 on normal and cortisol-stimulated rat liver ribonucleic acid synthesis. Biochem J 1972 ; 130:619-629.

81. Rao KS. Afaltoxin B_1 induced inhibition of liver protein synthesis *in vivo* and its role in fatty liver. Biochem Pharmacol 1971 ; 20: 2825-2831.

82. Pong RS, Wogan GN. Time course of alteration of rat liver polysome profiles induced by aflatoxin B_1. Biochem Pharmacol 1969 ; 18:2357-2361.

83. Svoboda D, Grady HJ, Higginson J. Aflatoxin B_1 injury in rat and monkey liver. Am J Pathol 1966 ; 49:1023-1052.

84. Doherty WP, Campbell TC. Aflatoxin inhibition of rat liver mitochondria. Chem Biol Interact 1973 ; 7:63-77.

85. Pai MR, Bai NY, Venkitasubramanian TA. Effect of aflatoxins on oxidative phosphorylation by rat liver mitochondria. Chem.-Biol. Interacts. 10: 123-131 (1975)

86. Obidoa O, Siddiqui HT. Aflatoxin inhibition of avian hepatic mitochondria. Biochem Pharmacol 1978 ; 27:547-550.

87. Obidoa O, Obonna EE. Dihydroaflatoxin inhibition of energy-linked reduction of endogenous nicotinamide nucleotides in isolated rat liver mitochondria. Food Cosmet Toxicol 1979 ; 17:501-504.

88. Obidoa O, Obunwo CC. Action of aflatoxin on some redox enzymes and complexes of avian liver mitochondria. Biochem Med 1979 ; 22:27-32.

89. Pokrovsky AA, Kravchenko LV, Tutelyan VA. Effect of aflatoxin on rat liver lysosomes. Toxicon 1972 ; 10:25-30.

90. Pitout MJ, Schabot JC. Influence of aflatoxin B_1 and aflatoxin B_2 on rat liver lysosomal acid deoxyribonuclease. Biochem Pharmacol 1973 ; 22:1801-1805.

91. Hemminki K. Nucleic acid adducts of chemical carcinogens and mutagens. Arch Toxicol 1983 ; 52:249-285.

วารสารเภสัชวิทยา
ปีที่ ๘ เล่มที่ ๑ ม.ค.-เม.ย.๒๕๒๙

แอสปาร์เทม : สารแต่งรสหวานชนิดใหม่

นิสามณี สัตยาบัน

ภาควิชาเภสัชวิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า

ปัจจุบัน อาหารเพื่อสุขภาพได้เริ่มมีบทบาทในเมืองไทยเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ผู้คนโดยเฉพาะในกรุงเทพมหานคร พยายามเสาะหาวิตามินและอาหารเพื่อสุขภาพ (health foods) อื่น ๆ เช่น ธาตุสังกะสี, วีทเยอร์ม, วิตามิน อี, บริวเวอร์ยีสต์ ฯลฯ ที่อ่านพบในเอกสารจากประเทศสหรัฐอเมริกาและอังกฤษ โดยเชื่อกันว่าการกินอาหารประเภทนี้เป็นประจำจะทำให้มีสุขภาพดี ไม่เป็นโรคหัวใจ เบาหวาน ความดันโลหิตสูง หลอดโลหิตอุดตัน ฯลฯ ซึ่งจะช่วยให้อายุยืนยาวขึ้น

บทความเกี่ยวกับแอสปาร์เทม (aspartame) นี้ จึงมุ่งหวังให้ผู้สนใจเกี่ยวกับสุขภาพดังกล่าว ได้รู้จักสารอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งกำลังได้รับความนิยมใช้ในชีวิตประจำวันกันมากในสหรัฐอเมริกา และอีกหลายๆประเทศในยุโรป สารนี้ใช้เพิ่มรสหวานแทนน้ำตาลในเครื่องดื่มสำหรับลดน้ำหนัก (diet soft drink) ตลอดจนใช้ในอาหารสำเร็จรูปบางชนิด เช่น ช็อกโกเลต, ลูกกวาด, พุดดิ้ง ฯลฯ โดยเข้ามาแทนที่ซัคคารินที่เคยนิยมใช้ในอาหารลดความอ้วน

ในประเทศไทย อาหารประเภทลดน้ำหนัก (diet food) ยังไม่เป็นที่นิยมมากนัก แต่ก็เริ่มมีการใช้แอสปาร์เทมควบคุมแคลอรี่ในอาหาร เพื่อให้มีรูปร่างและน้ำหนักได้สัดส่วน ใช้กันในศูนย์ส่งเสริมสุขภาพหลายแห่ง

<u>ประวัติ</u>

แอสปาร์เทมถูกค้นพบโดยบังเอิญโดย Dr. James Schlatter นักวิทยาศาสตร์ของบริษัท จี.ดี.เซอร์ล เมื่อ ค.ศ.1965 และได้รับการรับรองจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาในปี ค.ศ.1981

Thai J. Pharmacol.
Vol.8 No.1 Jan.-Apr. 1986

โครงสร้างและส่วนประกอบ

แอสปาร์เทมเป็น เมทิล เอสเทอร์ ของ ไดเปปไทด์ ซึ่งประกอบด้วยกรดอมิโนสองตัวเชื่อมต่อกัน คือ แอล-แอสปาทิล-แอล-เฟนิลอลานีน กรดอมิโนทั้งสองตัวนี้เป็นส่วนประกอบของสารอาหารโปรตีนที่พบทั่วไปในธรรมชาติ กรดแอสปาร์ติกเป็นสารที่ร่างกายสามารถสร้างขึ้นได้เอง จากกลูโคสและแอมโมเนีย หรือจากกรดอมิโนตัวอื่น ส่วนเฟนิลอลานีนจัดเป็นกรดอมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย เพราะร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์ได้เอง ต้องได้จากอาหารเท่านั้น เมทิล เอสเทอร์ ก็เป็นส่วนประกอบที่พบในผลิตภัณฑ์จากพืช มักพบเป็นสารที่มีรสในผลไม้ ผัก น้ำผลไม้และเหล้า

คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์

แอสปาร์เทม เป็นผงผลึกสีขาว ไม่มีกลิ่น ละลายได้ในน้ำ ละลายดีในสารละลายที่เป็นกรดมากกว่าสารละลายที่เป็นกลาง และละลายในสารละลายที่อุ่นมากกว่าสารละลายที่เย็น หวานกว่าน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 3% ถึง 200 เท่า รสชาติคล้ายน้ำตาลมากกว่าสารที่มีรสหวานตัวอื่น ๆ เช่น ซัยคลาเมทและซัคคาริน มีรสเฝื่อนหลังการกิน (aftertaste effect) น้อยมากจนเกือบจะไม่มีเลย มีคุณสมบัติเสริมรสชาติอาหารประเภทผลไม้ให้เด่นขึ้น

แอสปาร์เทมในรูปผงแห้งจะคงตัวได้ดี พบว่า ณ อุณหภูมิ 40°ซ (104°ฟ) ระยะเวลา 1 ปี จะมีการสลายตัวเล็กน้อย เมื่อแอสปาร์เทมสลายตัวจะสูญเสียกลุ่มเมทิลไปเหลือเพียงไดเปปไทด์ ซึ่งมีแนวโน้มที่จะสูญเสียน้ำและพยายามจับกันเป็นวง ได้เป็นไดคีโตไพเพอราซีน ซึ่งเป็นตัวที่เกรงกันว่าจะทำให้เกิดอาการพิษ แต่จากการศึกษายังไม่พบอาการพิษจากสารดังกล่าว

การสลายตัวของแอสปาร์เทมเกิดได้เร็วในสารละลายที่เป็นด่าง ได้สารใหม่ที่ไม่มีรสหวาน ซึ่งแตกต่างจากน้ำตาลที่สลายแล้วยังได้สารที่มีรสหวานอยู่

แอสปาร์เทม $\xrightarrow[\text{สูญเสียน้ำ}]{}$ ไดคีโตไพเพอราซีน (ไม่มีรสหวาน) $\longrightarrow$ กรดแอสปาติก + เฟนิลอลานีน (ไม่มีรสหวาน)

พบว่าในสารละลาย pH = 4 (เช่น น้ำอัดลมพวกรูทเบียร์) ที่อุณหภูมิห้อง (68°ฟ หรือ 20°ซ) ความหวานของแอสปาร์เทมจะลดลง 20% ในเวลา 4-5 เดือน

เภสัชจลนศาสตร์

แอสปาร์เทมจัดเป็นสารพวกโปรตีนที่ให้รสหวาน (protein sweetener) ไม่มีส่วนประกอบของคาร์โบฮัยเดรท, โซเดียมหรือไขมัน และมีโครงสร้างเป็นไดเปปไทด์ จึงเชื่อว่าจะถูกเปลี่ยนแปลงที่เมทิล เอสเตอร์

แอสปาร์เทมถูกทำลายได้น้อยโดยกรดในกระเพาะ แต่ถูกเปลี่ยนแปลงในลำไส้เล็กโดยเอนซัยม์ คัยโมทริปซินและไดเปปไทด์ ฮัยโดรเลส ได้เป็นกรดอมิโนซึ่งเป็นส่วนประกอบเดิมของมัน คือ

- กรดแอสปาติกซึ่งจะถูกเปลี่ยนต่อไปจนได้คาร์บอนไดออกไซด์ (ประมาณ 60-80% ของขนาดที่ได้รับ) และบางส่วนออกมาในลมหายใจในรูปเดิม
- เฟนิลอลานีนจะไปรวมกับโปรตีนในร่างกายเป็นส่วนใหญ่ และถูกขับออกเพียง 20-25%

พบว่า การบริโภคแอสปาร์เทมในขนาดสูง ๆ ถึง 4 กรัม/วัน เป็นเวลานาน ไม่น่าจะมีผลต่อเมตาบอลิสมของเฟนิลอลานีนในคนปกติ เมื่อเปรียบเทียบกับซัคคาริน พบว่าสารนี้ถูกดูดซึมได้ดีจากทางเดินอาหาร และถูกขับออกในรูปเดิมเกือบหมดภายในเวลา 48 ชั่วโมง

ประโยชน์และการใช้

เนื่องจากแอสปาร์เทมถูกเปลี่ยนแปลงในร่างกายได้เช่นเดียวกับกรดอมิโนอื่น ๆ จึงมีผู้จัดสารนี้เป็นสารอาหารอย่างหนึ่ง ในขณะที่นักวิจัยบางกลุ่มยังถือเป็นสารที่มิใช่อาหารเช่นเดียวกับซัคคารินและซัยคลาเมท

พลังงานที่ได้จากแอสปาร์เทมมีปริมาณต่ำเพียง 4 แคลอรีต่อกิโลกรัม และมีความหวานกว่าน้ำตาลถึง 200 เท่า ดังนั้นปริมาณที่ใช้แต่งรสหวานจึงน้อยมาก ทำให้นิยมใช้แอสปาร์เทมแต่งรสในอาหารที่ใช้ลดน้ำหนัก นอกจากนี้ยังมีประโยชน์ในการเพิ่มรสหวานให้กับอาหารที่ใช้น้ำตาลแต่งรสไม่ได้ เช่น อาหารหวานที่จะสูญเสียคุณสมบัติสำคัญบางอย่าง ถ้าเติมน้ำตาลปริมาณมาก ๆ ลงไป

ปัจจุบันแอสปาร์เทมได้รับการอนุญาตให้จำหน่ายได้ในหลายประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา, แคนาดา, ฝรั่งเศส, เบลเยี่ยม, ลักแซมเบริก์, สวิสเซอร์แลนด์, อาฟริกาใต้, เดนมาร์ก, สวีเดน, บราซิล, เม็กซิโก, ฟิลิปปินส์, นอร์เวย์, เยอรมันนี, สิงคโปร์และไทย ภายใต้ชื่อทางการค้าว่า Nutrasweet (ใช้แต่งรสทางอุตสาหกรรม) และ Equal (ใช้แต่งรสอาหารและ

เครื่องดื่มที่ปรุงเอง) สำหรับในประเทศไทยใช้ชื่อทางการค้าว่า Equal เพียงอย่างเดียว

อาหารที่นิยมแต่งรสด้วยแอสปาร์เทม มีเช่น

1. อาหารประเภท โคลด์ เบรคฟาสท์, ซีเรียลส์, เยลลี่, พุดดิ้ง, ชา, กาแฟ หมากฝรั่ง และน้ำอัดลมประเภทลดน้ำหนักหลายชนิด เช่น โคคา-โคลา, เป๊ปซี่-โคลา, เซเว่น-อัพ, แคนาดาดราย ฯลฯ นิยมกันมากในสหรัฐอเมริกาและแคนาดา

2. ผลไม้บางชนิด เช่น สตรอเบอรี่ โดยใช้โรยก่อนแช่แข็งหรือรับประทาน โดยไม่ทำให้คุณสมบัติและรูปทรงของผลไม้เสียไป ใช้แต่งรสโยเกิร์ตประเภทแคลอรีต่ำ

3. อาหารของผู้ป่วยโรคเบาหวาน

ปัญหาที่พบ

1. บางครั้งปริมาณของแอสปาร์เทมมีน้อยเกินไป จึงไม่เพียงพอที่จะทำให้อาหารคงรูปที่ต้องการได้ จึงต้องใช้ร่วมกับน้ำตาล เช่น ในการทำไอศกรีมหรือเค็ก เป็นต้น

2. ราคาแพงกว่าน้ำตาลและซัคคารินมาก

3. ทนต่อภาวะความเป็นกรดด่างและความร้อนสูงได้น้อยกว่าน้ำตาล และเมื่อสลายตัวจะได้สารที่ไม่มีรสหวาน จึงไม่เหมาะที่จะใช้ในผลิตภัณฑ์ที่เป็นด่างหรือเป็นกลาง และต้องผ่านกรรมวิธีที่ต้องใช้ความร้อนสูง ๆ เช่น อบ, ย่าง, ทอด หรือสารละลายที่ปราศจากกรด ที่เก็บไว้นาน ๆ

4. แอสปาร์เทมทดแทนน้ำตาลได้ในแง่ของความหวานอย่างเดียว ไม่อาจทดแทนในด้านปริมาณ, คุณสมบัติในการถนอมอาหาร และการรักษารูปทรงของอาหารได้

อาการข้างเคียงและพิษ

โดยมากมักเป็นอาการที่เกิดเนื่องจากกรดอมิโนในส่วนประกอบ ได้แก่

1. กรดแอสปาร์ติกซึ่งจัดเป็นกรดอมิโนที่กระตุ้นประสาท (neuro-excitatory amino acid) ซึ่งจะเพิ่มความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทบางบริเวณ เป็นผลให้สมองเสื่อม เกิดเนื้องอกได้ในเด็ก จึงห้ามใช้ในเด็ก และผู้ใหญ่บางรายอาจทำให้ปวดศีรษะบ่อย ๆ ถ้าใช้ปริมาณมากเกินไป

2. เมื่อบริโภคแอสปาร์เทมปริมาณมาก อาจเกิดเฟนิลคีโตนูเรีย (phenylketonuria) จากเฟนิลอลานีนได้ในคนที่มีความบกพร่องทางกรรมพันธุ์ อุบัติการในทารกประมาณ 1:15000 ดังนั้นอาหาร

และเครื่องดื่มที่ผสมสารนี้จึงต้องมีคำเตือนระบุไว้บนฉลากว่าอาจเกิดเฟนิลคีโตนูเรียได้

3. อาจพบอาการปวดศีรษะ, ท้องผูก, ทางเดินอาหารอักเสบ, คัน, คัดจมูก ในผู้ป่วยบางราย

สรุป

แอสปาร์เทมจัดเป็นสารปรุงรสตัวใหม่ที่ให้พลังงานต่ำ มีข้อดีและปลอดภัยกว่าสารแต่งรสประเภทน้ำตาลเทียมอื่น ๆ เช่น ซัคคารินซึ่งค้นพบเมื่อปี 1879 และการใช้ถูกจำกัดลงในปัจจุบัน หรือ ซัยคลาเมทซึ่งถูกห้ามใช้ไปตั้งแต่ปี 1970 เพราะพบว่าอาจเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง

ความนิยมในการใช้แอสปาร์เทมเริ่มขยายวงกว้างขึ้นเรื่อย ๆ จนยอมรับกันในหลายประเทศ สำหรับประเทศไทย แอสปาร์เทมได้ขึ้นทะเบียนกับสำนักคณะกรรมการอาหารและยา เป็นสารอาหารเช่นเดียวกับในสหรัฐอเมริกาและอีกหลายประเทศ ฉะนั้นจึงสามารถซื้อขายได้อย่างเสรี เช่นเดียวกับ น้ำตาล เกลือ น้ำผึ้ง ฯลฯ แต่เพื่อความไม่ประมาท ก่อนใช้สารนี้ผู้บริโภคควรตระหนักถึงคุณสมบัติ ความคงตัว และอาการข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้น เนื่องจากการศึกษาถึงความปลอดภัยของแอสปาร์เทมในคนยังคงดำเนินอยู่ในหลายประเทศ จึงยังสรุปไม่ได้แน่นอน สำหรับผู้ป่วยเบาหวานการใช้สารดังกล่าวควรได้รับคำแนะนำและการดูแลจากแพทย์

ที่สำคัญคือไม่ควรใช้แอสปาร์เทมอย่างพร่ำเพรื่อ เพราะความคงตัวของสารนี้ไม่เท่ากับน้ำตาล จึงไม่อาจใช้แทนน้ำตาลได้ในทุกกรณีได้ โดยต้องคำนึงถึงสภาวะกรดด่าง ความร้อนและกรรมวิธีในการปรุงอาหารด้วย

ขนาดบริโภคที่ค่อนข้างปลอดภัยและไม่พบอาการข้างเคียง ไม่ควรเกินวันละ 0.5 กรัม

บรรณานุกรม

1. Png HL. Aspartame-an ideal sweetener ? Consuma 1984; 3:14-5.
2. Robert-Sargeant S. The case for aspartame. Food Processing 1983; 25-7.
3. Nehrling JK, Kobe P, McLane MP, Olson RE, Kamath S, Horwitz DL. Aspartame use by persons with diabetes. Diabetes Care 1985; 8:415-7.

อภินันทนาการ

จาก

ธนาคารทหารไทย จำกัด
สาขาศรีย่าน

1054/5 ถนนนครไชยศรี แขวงถนนนครไชยศรี

เขตดุสิต กทม.10300

โทร. 243-1446 , 243-1447 , 241-3867

Highlights from an International Symposium

Non-Narcotic Analgesics Today
An Update on Benefits and Risks

Yogyakarta, Indonesia, 23-26 February 1986

The permission from ADIS Press
to publish some parts of the Symposium
Highlights is gratefully acknowledged.

Comparing the Pharmacology of Non-Narcotic Analgesics

Despite non-narcotic analgesics being the most widely used drugs and many having been used for several decades, their generally ascribed mechanisms of action are not unequivocally accepted, Professor *K. Brune*, of the University of Erlangen-Nürnberg, Erlangen, West Germany, told his audience. Most non-narcotic analgesics are derived from aspirin and other acidic non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) , aniline derivatives such as paracetamol (acetaminophen) and non-acidic pyrazolones. Many of these drugs have stood the test of time and have demonstrated efficacy with an accepted profile and incidence of side effects. It is important, stressed Professor Brune, to consider clinically relevant pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of analgesics to identify their specific advantages and disadvantages. He used aspirin, paracetamol, ibuprofen and dipyrone (metamizole) as long established examples to illustrate his approach. Aspirin and ibuprofen are particularly useful in alleviating pain related to inflammation, whereas dipyrone appeared particularly effective in spastic pain and paracetamol less active than the others as an analgesic. Dipyrone and paracetamol are widely used as antipyretics.

Important pharmacokinetic characteristics of non-narcotic analgesics in man were rapid and reliable absorption, near complete bioavailability, adequate distribution without preferential concentration in organs associated with side effects, rapid elimination by the kidneys and liver, and a low propensity for drug interactions. Although all non-narcotic analgesics complied with these ideals to some extent, they were not equally suitable for routine analgesia. A long and variable elimination half-life reduced the usefulness of piroxicam and phenylbutazone, and delayed absorption decreased the value of some others.

In returning to the 4 example drugs, Professor Brune pointed out that salicylic acid, a metabolite of aspirin, and 4-methylaminoantipyrine, the active metabolite of dipyrone, reached almost 100% bioavailability, whereas paracetamol and ibuprofen did not. The requirement for reliable elimination from the body was not met by all 4 example drugs since salicylic acid cumulation may follow high doses of aspirin. Impaired kidney or liver function may aggravate this risk and elimination of paracetamol may be prolonged in patients with decreased liver function. Such reductions in the efficiency of elimination do not interfere with ibuprofen, whereas their influence on dipyrone is not known.

Of the 4 drugs, only aspirin appears to bear the risk of potentially serious drug interactions, said Professor Brune. However, none is without side effects and each causes specific potentially serious effects on rare occasions, although few epidemiological studies are available to confirm their incidence. The prolonged inhibition of platelet aggregation by aspirin necessitates its avoidance in patients with blood clotting disorders and, like ibuprofen, in patients with peptic ulceration. Patients whose intolerance of aspirin appears as bronchoconstriction should avoid ibuprofen (and

other NSAIDs). Dipyrone should be used for only a few days in the elderly, who seem more likely to develop type I agranulocytosis, and paracetamol is best avoided in alcoholics. Professor Brune suggested that analgesic mixtures should be avoided in the treatment of pain, since their efficacy and risks had never been subjected to epidemiological scrutiny.

Pulmonary Side Effects of Non-Narcotic Analgesics: Allergy and Pseudoallergy

The important aspects of allergic and pseudoallergic reactions to non-narcotic analgesics were presented by Professor *B.A. Peskar* of Ruhr-University, Bochum, West Germany, who concentrated on the relatively rare pulmonary reactions to these drugs. Some patients react to the ingestion of non-narcotic analgesics with bronchoconstriction and asthmatic attacks, although an allergic mechanism was responsible in only a few of these. In the majority the basis for the pulmonary side effects was pseudoallergic. Several hypotheses have been advanced to explain the molecular mechanism of pseudoallergy, said Professor Peskar, including drug-induced stimulation of kinin receptors, activation of the complement system and interference with eicosanoid biosynthesis. The latter hypothesis is attractive, he said, because inhibition of fatty acid cyclo-oxygenase seems to be an important property of the non-narcotic analgesics and could explain why susceptible persons exhibit similar sensitivity to drugs of different chemical structure.

It remains unknown, however, said Professor Peskar, whether the crucial drug effect on arachidonic acid metabolism is inhibition of synthesis of a bronchodilating eicosanoid such as prostaglandin E_2 or diversion away from cyclo-oxygenase products towards increased synthesis of bronchoconstricting leukotrienes. The latter explanation was considered attractive by Professor Peskar, who pointed out that increased leukotriene formation and simultaneous inhibition of prostaglandin synthesis by various NSAIDs, including high concentrations of pyrazolones and paracetamol, had been observed in macrophages. However, none of the hypotheses explained why only a minority of patients with predisposing conditions experienced pulmonary side effects.

Professor Peskar then addressed the practical therapeutic aspects of the two types of reaction by reminding his audience that, whereas patients with true allergy need avoid only the specific allergens, pseudoallergic aspirin-sensitive patients should avoid all NSAIDs that are effective inhibitors of cyclo-oxygenase. If such patients require treatment with anti-inflammatory drugs, aspirin desensitisation can be tried. It should be remembered, however, continued Professor Peskar, that after desensitisation patients remain asthmatic and require regular therapy.

Renal Toxicity of Non-Narcotic Analgesics

Professor *P. Kincaid-Smith,* from the University of Melbourne and The Royal Melbourne Hospital, Australia, told her audience that the renal toxicity of non-narcotic analgesics involves acute, subacute and chronic damage. Information on the renal effects of aspirin and NSAIDs in healthy subjects is conflicting, but in high renin states, reductions in glomerular filtration rate and renal plasma flow have been reported consistently. Oedema is the most common symptom associated with the administration of therapeutic doses of NSAIDs, being more pronounced in patients with underlying renal disease or high renin states. Hyperkalaemia, which may be life-threatening is associated with decreased plasma renin and aldosterone, and has most often occurred during indomethacin treatment of gout.

Acute renal failure, as distinct from the nephrotic syndrome, is probably caused by haemodynamic changes and often reverses rapidly after withdrawal of the drug. This acute deterioration in renal function usually occurs in patients with underlying renal disease in whom maintenance normal renal circulation depends on an adequate secretion of prostaglandin E_2 and prostacyclin. Other predisposing factors include advancing age, high renin states, gout, renal artery stenosis and, particularly, concomitant diuretics. Although acute renal failure has been attributed to many NSAIDs, Professor Kincaid-Smith said that its incidence appears to correlate with the consumption of any particular drug in a community. The frequent implication of phenylbutazone may, she suggested, be connected with its uricosuric activity.

The greatest interest in acute renal failure associated with NSAIDs has related to acute interstitial nephritis; the nephrotic syndrome, which commonly occurs in patients with previously normal renal function, appears after 2 to 18 months of drug treatment, recovers slowly after drug withdrawal and is probably an idiosyncratic reaction. In two-thirds of reported cases, fenoprofen has been implicated, zomepirac and tolmetin being suspected most often among the other widely used NSAIDs. The pathology of this subacute syndrome has attracted much interest, said Professor Kincaid-Smith, the changes resembling those of lipoid nephrosis.

The two chronic clinical syndromes discussed by Professor Kincaid-Smith, analgesic nephropathy and uroepithelial carcinoma, have been attributed to long term abuse of analgesic mixtures. Analgesic nephropathy, which is essentially a chronic progressive form of renal papillary necrosis, has a major incidence in countries where caffeine-containing powders are sold widely 'over the counter' and taken in large amounts, and occurs often in patients with rheumatoid arthritis. In such patients renal papillary necrosis is found frequently at autopsy and in a study conducted by Professor Kincaid-Smith there was either macroscopic or microscopic evidence of the syndrome in over 80% of cases. Initially, analgesic nephropathy was attributed to phenacetin, but the unabated mortality from the syndrome subsequent to phenacetin restriction in some countries and the gradual decrease in end-stage renal failure from analgesic nephropathy following regulated sale of analge-

Thai J. Pharmacol.
Vol.8 No.1 Jan.-Apr. 1986

sic mixtures containing aspirin, paracetamol, caffeine, salicylamide or phenacetin, supports the contention from experimental studies that other analgesics are at least partly responsible. Professor Kincaid-Smith reiterated that abuse of analgesic mixtures has also been implicated in uroepithelial tumours, which are found most often in females, but that this relationship has not always been confirmed.

Role of Prostaglandin Synthesis Inhibition in NSAID-Associated Renal Syndromes

In an appropriate sequel to the description of clinical syndromes associated with the renal toxicity of NSAIDs, Professor *C.A.Patrono* from the Catholic University School of Medicine, Rome, Italy (Visiting Professor at the Royal Postgraduate Medical School, University of London, England) explained the role of prostaglandin synthesis inhibition in their pathogenesis. He pointed out that, while there was adequate information causally relating drug-induced changes in renal function to concomitant decreases in prostaglandin synthesis, such data do not provide unequivocal proof that inhibition of renal prostaglandin synthesis leads to the development of chronic renal injury. It is now generally accepted that prostaglandin synthesis in the kidney is localised to specific sites and that prostaglandins synthesised in the cortex (primarily PGI_2; prostacyclin) regulate cortical function (mesangial relaxation and contraction, vasodilatation and vasoconstriction), while those synthesised in the medulla (PGE_2) regulate medullary function (excretion of sodium chloride and water). Measurement of urinary unmetabolised prostaglandins or their stable hydration products by radioimmunoassay provides the best clinical assessment of the state of renal prostaglandin production.

Professor Patrono explained that in healthy persons, renal function is not critically dependent on intact renal cyclo-oxygenase activity, whereas under a variety of clinical conditions such as volume depletion, congestive heart failure, cirrhosis with ascites and the nephrotic syndrome, inhibition of modulatory prostaglandin activity by drugs that inhibit renal cyclo-oxygenase can acutely reduce glomerular filtration rate and renal blood flow by 30 to 50%. Administration of aspirin, but not of sodium salicylate, reduced urinary PGE excretion and a similar effect occurs with most commonly used NSAIDs - except sulindac - when given at full anti-inflammatory dosage, said Professor Patrono. Few data are available on the effects on renal prostaglandin synthesis of the pyrazolones, pyrazolidines or *p*-aminophenol derivatives. Some of the mechanisms proposed by Professor Patrono to explain the selective sparing of renal cyclo-oxygenase included differential sensitivity of renal cyclo-oxygenase, differential rate of recovery of glomerular cyclo-oxygenase after irreversible inactivation (as occurs with low

dose aspirin), and selective intrarenal inactivation of an active metabolite of a drug (as occurs with sulindac).

The long term consequences of renal prostaglandin synthesis inhibition are more difficult to assess, stressed Professor Patrono, although theoretically such inhibition might be responsible for medullary ischaemia possibly contributing to the picture of analgesic nephropathy. Furthermore, the long term consequences of selective versus non-selective cyclo-oxygenase inhibition remain unknown. The infrequency of renal syndromes associated with sulindac compared with their somewhat higher incidence in patients treated with other NSAIDs suggests that reduced renal prostaglandin synthesis bears a cause-effect relationship to the reported functional changes. However, he pointed out, the disproportionate involvement of fenoprofen in the NSAID-induced nephrotic syndrome indicates that mechanisms other than inhibition of renal prostaglandin synthesis may contribute to the nephrotoxic potential of any drug.

Risk of Ulcer Complications with NSAIDs

Professor *M.J.S. Langman* from the Queen's Medical Centre, Nottingham, England, presented the findings of a recently completed case-control study, which determined the risk of peptic ulcer complications among users of aspirin and other NSAIDs. He pointed out that the conflicting data produced over the years, suggesting that the risk of upper gastrointestinal bleeding or perforation associated with anti-inflammatory drug intake could be either negligible or substantial, arose largely because of inadequate controls. Early retrospective case-control studies which appeared to show a substantial risk of gastric bleeding associated with aspirin intake failed to compare the drug intake of patients with that of individuals in the community. Since the reasons for analgesis intake were also not considered in these studies, it was conceivable that patients would be taking the analgesic to relieve ulcer pain. In such circumstances, subsequent gastric bleeding would not be caused by the analgesic intake. Professor Langman and his colleagues set out to overcome these study design deficiencies by choosing age- and sex-matched community controls and by using paracetamol as a positive control. Analysis of the derived data indicated that about one-third of aspirin intake in patients with bleeding is equivalent to that in controls and is by deduction non-causal; another third, by reference to parallel increases in paracetamol intake, represented drug intake consequent upon the presence of the bleeding lesion and was thus also non-causal. The remaining third was unexplained and likely to be causal.

As regards NSAIDs, Professor Langman stated that the perception of clinicians has been that such drugs were commonly associated with upper gas-

Thai J. Pharmacol.
Vol.8 No.1 Jan.-Apr. 1986

trointestinal bleeding and with ulcer perforation. However, he said, there has been no unanimity about the likely causal drugs and no properly controlled studies that enabled calculation of the risk. Again determined to right this situation,Professor Langman, by including matched community controls and limiting comparisons to individuals aged 60 years or more, was able to show that the riks of ulcer complications among such individuals treated with NSAIDs were appreciable. Assuming that the findings in the Nottingham population were representative of those generally in the United Kingdom, there might be about 2000 cases of bleeding induced by NSAIDs each year in the total UK population. The insubstantial risk of ulcer complications suggested by postmarketing surveillance studies has arisen, said Professor Langman, because the apparently large case series studieed are dwarfed by the general extent of prescribing and because such surveys have not concentrated on those at greatest risk - the elderly.

Role of Leukotrienes and Prostaglandins in NSAID-Induced Acute Gastrointestinal Mucosal Damage

An overview of the experimental evidence examining the role of prostaglandins and leukotrienes in the acute damage of the gastric mucosa induced by non-narcotic analgesics was presented by Professor *B.M. Peskar* of Ruhr-University, Bochum, West Germany. Since gastrointestinal tissues have a high synthesising capacity for prostaglandins (PG), some of which have been shown to protect the gastrointestinal mucosa against potentially harmful substances, it has been suggested that the generation of prostaglandins is crucial in maintaining mucosal integrity.

The hypothesis that aspirin and like substances disrupt the gastric mucosal barrier, thus promoting back diffusion of acid into mucosal tissue, has been overshadowed by another well supported hypothesis that inhibition of cyclo-oxygenase, and consequently of prostaglandin synthesis, reduces the capacity of the gastric mucosa to resist injury. This is supported by experimental studies in which the concomitant administration of PGE_2 and aspirin reduced the overt mucosal damage and microbleeding relative to that induced by aspirin alone. NSAIDs which inhibit both gastrointestinal and systemic prostaglandin production cause gastrointestinal mucosal damage, whereas those drugs that inhibit systemic prostaglandin synthesis (reduced concentration of circulating PGmetabolite ketodihydroprostaglandin $F_{2\alpha}$), while having minimal effect on gastric PGE_2, are less ulcerogenic. In this context, Professor Peskar pointed out that paracetamol, which does not inhibit gastrointestinal prostaglandin formation, causes no damage to gastric mucosa, whereas aspirin and indomethacin inhibit gastrointestinal prostaglandins and are more damaging to the mucosa. Factors such as tissue-specific differences in the sensitivity of cyclo-oxygenase and pharmacokinetic properties modify the inhibi-

tory activity of analgesic and anti-inflammatory drugs on gastrointestinal prostaglandin formation.

The active metabolite of dipyrone (metamizole) has been found to minimally decrease gastrointestinal prostaglandins in some studies but not in other, and it was suggested by Professor Peskar that species or methodological differences may account for these findings. It was postulated that increased production of leukotriene C_4 might encourage gastric mucosal damage, since its stimulation by ethyl alcohol paralleled induction of mucosal ulceration, and inhibition of alcohol-stimulated leukotriene C_4 by carbenoxalone or a lipoxygenase inhibitor attenuated the mucosal damage. Although Professor Peskar considered that inhibitors of cyclo-oxygenase could increase leukotriene formation by shifting the substrate arachidonic acid to the lipoxygenase pathyway, she conceded that the role of leukotrienes in NSAID-induced acute gastrointestinal mucosal damage had yet to be established.

Liver Damage

The clear message from Professor *L.F. Prescott* from the Royal Infirmary, Edinburgh, Scotland, was that although the non-narcotic analgesics can produce a variety of hepatic lesions, clinically significant liver damage is uncommon with usual therapeutic use. The pattern of hepatotoxicity caused by the salicylates, NSAIDs, paracetamol and the pyrazolones differs, but many of these drugs can cause generalised reactions which involve the liver. Depending on the drugs in question, the risks of liver injury may be conditioned by factors such as age, sex, dose and duration of treatment. Hepatotoxicity associated with the use of salicylates and most NSAIDs has been reported most often in females with collagen diseases, but this may simply reflect the greater use of these drugs in such patients. Paracetamol-induced liver damage occurs almost exclusively as a result of overdosage.

Professor Prescott pointed out that pathological changes seen in hepatic reactions to non-narcotic analgesics are generally variable and nonspecific, except for the microvesicular fatty changes in hepatocytes of patients with Reye's syndrome attributed to salicylate, the acute centrilobular necrosis caused by paracetamol in overdosage, and the marked cholestasis produced by benoxaprofen. About half of the patients given salicylate develop minor abnormalities of liver function that are related to plasma salicylate concentration and are usually rapidly reversible. However, said Professor Prescott, in a small proportion of predominantly young patients, liver damage is more severe and closely resembles that seen with Reye's syndrome, which has a high mortality rate. Since the young seem particularly sensitive to the adverse metabolic and hepatic effects of salicylates, Professor Prescott suggested, provocatively, that aspirin not be given to children.

Professor Prescott reiterated that, in substantial overdosage, paracetamol can cause acute hepatic necrosis. Without specific treatment, some 8% of adults suffer severe liver damage and 1 to 2% die with hepatic failure and encephalopathy. The average acute single threshold dose for severe liver damage is about 250 mg/kg in adults but is probably greater in children. Severe paracetamol-induced liver damage is characterised by a dramatic increase in plasma aminotransferase activity up to 10,000 U/L or more, prolongation of the prothrombin time and a modest increase in plasma bilirubin concentration. Maximum abnormalities of liver function are delayed until the third day, after which recovery is usually rapid and complete. In very severely poisoned patients who do not receive early specific therapy, hepatic failure with encephalopathy may occur on the fourth to sixth days. Paracetamol causes liver damage by conversion to a reactive metabolite (N-acetylbenzoquinoneimine) which binds covalently to hepatic proteins and inactivates sulfhydryl-containing enzymes. Glutathione plays a crucial protective role by preferential conjugation with this metabolite: hepatic necrosis does not occur until glutathione is depleted. The administration of sulfhydryl compounds such as N-acetylcysteine within 8 to 10 hours effectively prevents liver damage and death, said Professor Prescott. Liver damage has been attributed to the therapeutic use of paracetamol but in most reports the dose was excessive and many patients were chronic alcoholics (who seem to be at increased risk). In these cases the features were typical of acute overdosage.

Liver damage has been reported with most NSAIDs and pyrazolone analgesics (butazones), but a consistent and characteristic pattern of hepatotoxicity is evident with relatively few. Professor Prescott emphasised that a rank order of relative risk cannot be established and the incidence in relation to use is not known. Benoxaprofen (now withdrawn) produced a characteristic syndrome which was often fatal, and over the years there have been many reports of hepatotoxicity with phenylbutazone after both therapeutic use and overdosage. Of the other drugs in these groups, glafenine, diclofenac, clomethacin, sulindac and pirprofen seem to carry the greatest risk of hepatotoxicity. The mechanisms are unknown.

Blood Dyscrasias Secondary to NSAIDs

In a presentation on blood dyscrasias secondary to NSAIDs, Professor *P.A. Miescher* from the Geneva University Hospital, Switzerland, told his audience that drug reactions may be classified as either reactions to the pharmacological properties of the drug or those caused by a drug-dependent immune mechanism. Reactions belonging to the first category seldom occur with NSAIDs and usually do so when the drug is given in excessive dosage or

to an individual who is highly susceptible to a certain pharmacological action. By far the largest proportion of NSAID-induced reactions is of the immune type, said Professor Miescher. He also commented that the risk of immunisation varies between drugs, those which are strongly bound to proteins being more likely to form drug-specific antibodies. The strongly bound pyrazolidines (butazones) are particularly prone to produce severe immunological complications. Once immunisation has occurred, re-exposure to the offending drug may lead to allergic reactions, the nature of which depends on the degree of sensitisation, the type of immune reaction and the *in vivo* half-life of the causative drug. Professor Miescher informed his audience that 5 different mechanisms can be distinguished: (a) IgE-mediated drug reactions, (b) IgG- and IgM-induced blood cell damage, (c) passive agglutination-type mechanism of drug-induced blood cell damage, (d) partial autoantibody-induced drug reactions and, finally, (e) drug-induced autoantibody formation.

Professor Miescher continued with a discussion of the haematological side effects of NSAIDs according to the mechanisms by which they produced agranulocytosis, thrombocytopenia, haemolytic anaemia, aplastic anaemia or pure red cell anaemia. In the 1920s, aminopyrine was found to cause agranulocytosis characterised by a rapid onset with flu-like symptoms. This type I agranulocytosis is rapidly reversible provided that the drug is stopped upon appearance of the early symptoms (sore throat). The pyrazolidines (butazones), phenothiazines and chloramphenicol, on the other hand, produce agranulocytosis of either type II or a mixed type. After drug withdrawal, recovery from type II agranulocytosis is slower than from type I, and the prognosis less favourable. The acetic acid derivatives indomethacin, sulindac, tolmetin and zomepirac have occasionally been implicated in agranulocytosis, as have other NSAIDs including fenoprofen, fenbufen, ibuprofen, naproxen and mefenamic acid. Thrombocytopenia, like agranulocytosis, can be divided into types I and II, explained Professor Miescher, with type I having the faster recovery. Indomethacin, clomethacin, sulindac and tolmetin, have most often been associated with thrombocytopenia. Haemolytic anaemia, a less common side effect, has been reported with methyldopa and mefenamic acid, but the autoantibody production seen with these drugs is rarely found with other analgesics.

The most serious haematological reaction is aplastic anaemia, said Professor Miescher, since it causes the highest mortality. Fortunately, however, its incidence is low. Current data suggest the involvement of immune phenomena and that it is more likely to develop with drugs producing type II agranulocytosis than with those involved in type I. Professor Miescher reminded those present that the side effects of the various drugs must always be considered in relationship to their total consumption as well as to the population at risk. There was a tendency for physicians to incriminate the newest drug in a patient who developed a blood dyscrasia, but in many instances a causal relationship could not be established. It is hoped, concluded Professor Miescher, that future careful evaluation of adverse drug reaction reports will provide a more accurate incidence of blood dyscrasias occurring with the implicated drugs.

Thai J. Pharmacol.
Vol.8 No.1 Jan.-Apr. 1986

Prescription Event Monitoring

A large scale attempt to link exposure to selected drugs, identified by means of prescriptions, with subsequent events recorded in patients' case records was described by Mr. *N.S.B. Rawson* from the Drug Surveillance Research Unit, Southampton, England. Patients being treated with any of the 4 drugs monitored at any one time are identified manually by the Prescription Pricing Authority. The identity of the selected drugs is not revealed until receipt of the required number of prescriptions. A maximum of 4 questionnaires, known as 'green forms', are sent to any one doctor who indicates when the drug was first prescribed and for what indication, its efficacy, and any events which occurred during or after treatment. Such events are not restricted only to those thought to be due to drugs. Since the scheme began in 1982, about 200,000 'green forms' relating to one or other of more than 12 drugs have been received by the unit.

The results of studies with 5 NSAIDs, benoxaprofen, zomepirac, slow release indomethacin ('Osmosin'), fenbufen and piroxicam, were presented by Mr Rawson, who stated that as the first 3 drugs mentioned had been withdrawn from the market before monitoring began, the study concerned the follow-up period of 4 to 18 months. Osteoarthritis, the most common indication, accounted for 18% of patients taking zomepirac and 46 to 48% of those using the other drugs. Rheumatoid arthritis was treated more often with benoxaprofen than with any of the other drugs, while zomepirac was often used as an analgesic in terminal cancer. Mr Rawson considered the rate of reporting within this voluntary scheme to be good,with 57 to 68% of mailed questionnaires being returned. Derived data clearly illustrated the tendency of benoxaprofen to cause photosensitivity, rash, onycholysis and nail changes. Gastrointestinal events occurred with similar frequency for all 5 drugs and there were only 4 deaths from peptic ulcer complications among the 55,642 patients studied. One of the pitfalls of assessing the events was highlighted with the example of the persistently high incidence of dyspepsia and gastritis after cessation of 'Osmosin', a drug developed to decrease such events in patients who experience gastrointestinal symptoms with other NSAIDs.

It is important to remember, said Mr Rawson, that the prescription event monitoring system described will identify only those events which occur in at least 1 in 1000 patients. Although the service was criticised for failing to measure the incidence of benoxaprofen-induced fatal hepatorenal disorders, it did detect these conditions in patients treated with benoxaprofen.

Intensive Medicines Monitoring Programme in New Zealand

A description of a postmarketing surveillance scheme conducted in New Zealand and known as the Intensive Medicines Monitoring Programme (IMP), was presented by Professor *I.R.Edwards* from the University of Otago, Dunedin, New Zealand. This programme was instigated to monitor for 3 years medicines selected because of their novel chemistry or pharmacology, their relationship to other drugs which previously caused clinical problems,or their potentially extensive usage.

Originally, pharmacists were requested to record details of the patient and prescribing doctor, the medicine,the dose and the duration of the prescription, each time a prescription for a selected drug was dispensed. Concurrently, prescribing doctors were asked to forward details of any unexpected clinical events, whether or not they believed them to be medicine-related. Unlike in the programme described by Mr Rawson, doctors and pharmacists are advised of the drugs currently on the IMP.

The usual rate of returns from pharmacists is about 80%, but from doctors is about 5%, and there is a tendency to report apparent reactions requiring cessation of treatment rather than events. The main reasons for non-reporting, said Professor Edwards, were the 'Seven Deadly Sins' previously described by professor W. Inman-complacency, fear of litigation, guilt, ambition, ignorance, diffidence and lethargy. In an attempt to improve on this poor response, data linkage systems, and a special self-carbonated duplicate prescription form to be used only for IMP medicines, have been introduced. The inclusion of an event indicator box to be ticked by the doctor has enabled active follow-up by the Medical Assessor's office of all positive responses and has resulted in a 15-fold increase in event reporting. Consequently, the duplicate prescription system will be introduced throughout the country over the next 3 years.

Drugs monitored by the scheme have included mianserin, nifedipine, captopril and amiodarone, but unfortunately, said Professor Edwards, no non-narcotic analgesics have been studied. Thus far, the IMP has alerted doctors to new events requiring active follow-up, led to the establishment of adverse drug reaction profiles, and indicated risk/benefit relationships. Despite the potential for abuse of confidentiality, this inexpensive system has been running successfully for 10 years.

Thai J. Pharmacol.
Vol.8 No.1 Jan.-Apr. 1986

Serious ADRs Associated with Non-Narcotic Analgesics

An estimate of the risk of serious adverse events or death associated with non-narcotic analgesic administration, based on data from clinical experience in West Germany, was presented by Professor *H.Kewitz* of the Freie Universität Berlin, West Germany. Professor Kewitz reiterated the point made by other speakers, that the real incidence of serious ADRs associated with analgesic use can best be determined by case-control epidemiological studies. In an example of hospital derived data, Professor Kewitz indicated that 1% of 6000 patients referred to the medical department had experienced a serious ADR attributed to analgesic ingestion. These patients were from a population of 200,000 to 300,000 served by that hospital. Among another group of 6000 inpatients, who received analgesics during their stay in hospital, ADRs were noted in 4.5 to 8.2% of those treated with paracetamol, indomethacin or aspirin and in 1% treated with dipyrone (metamizole) or tilidine. Gastrointestinal side effects were reported most frequently.

Professor Kewitz referred briefly to the international case-control study on agranulocytosis and aplastic anaemia (I.S.A.A.A.), which involved a total population of 19.5 million people in 7 countries followed over a period of 5 years. While the results of this study are yet to be published, preliminary findings suggested that the incidence of agranulocytosis was 6 per year per million of population while the incidence of aplastic anaemia was half this value. The proportion of these blood dyscrasias due to analgesic use is not clear, but since the overall mortality among patients with agranulocytosis was 5%,the risk is low. In another study involving 3649 patients with colic pain, the frequency of bronchospasm or shock within 48 hours of injection of pyrazolones, opioids or other analgesics was 0.2% to 0.5%.

It was stressed by Professor Kewitz that although only some of the reported events were attributable to analgesic use, no reliable differentiation between disease-related and drug-induced effects could be achieved. A multiple logistic regression analysis which considered patient's age, sex, severity of colic, hospital admission and concomitant use of other drugs, revealed no significant differences between the drug groups. None of the 7 deaths that occurred was related to drug treatment. From these data, Professor Kewitz concluded that serious ADRs to analgesics, usually 'allergic', occurred in 2 in 1000 patients.

The Regulatory Challenge

The challenge for drug regulatory authorities is to strike a balance between what is ideally desirable and that which is reasonably attainable within the limits set by resources and usefulness, said Professor *P.K.M. Lunde* of the University of Oslo, Norway. The major objective is to protect the public by selecting the safest possible and most cost-effective drugs and by ensuring that such drugs are used to greatest advantage. Regulators face many influencing factors, including the sometimes conflicting interests of politicians, the medical professions, teaching institutions, pharmaceutical manufacturers and consumers. In addition, the lay press and mass media increasingly voice a variety of interests and opinions,the influence of which-along with the other forces-varies both between and within countries. While the regulatory bodies clearly acknowledge the rights of individuals to make up their own minds, those authorities must be careful that attitudes alone do not form the basis for regulatory actions or medical practice.

It must always be remembered, said Professor Lunde, that drugs are not a substitute for deficient health services, and that drugs-although usually considered beneficial-may be harmful if inappropriately used and promoted. For example, he said, some fixed dose combinations are so imbalanced in their content or include such a large number of ingredients, that they greatly increase the risk of toxic or hypersensitivity reactions. Professor Lunde reiterated that there is a fine balance between restrictive and constructive measures, since the flourishing private drug and health sector must be contained while promoting a credible public health sector and some degree of confrontation with the vested interests is inevitable.

If it is to be effective, a drug regulatory agency must enlist the participation of the appropriate professionals and consumers, representing expert skills and common sense. There is a constant need for global collaboration and communication within and beyond the field of drugs and for improving the education of health professionals and the public. Politicians must not be given the impression, said Professor Lunde, that any drug-and therapy-orientated problem can be solved simply by allocation of sufficient resources.

Progress has been made, and there is now available a draft model WHO curriculum on national drug policy and rational drug use, for critical testing within universities and other institutions responsible for the education of health workers. In concluding, Professor Lunde said that it is vital that any national drug policy retain sufficient flexibility so that decisions can be modified in the light of subsequent experience.

Thai J. Pharmacol.
Vol.8 No.1 Jan.-Apr. 1986

Regulatory Decisions and the Consumer

An insight into what the British consumer can reasonably expect of their drug regulatory authorities was provided by Professor *M.D.Rawlins* of the University of Newcastle Upon Tyne, England. While consumers can reasonably expect regulatory judgements on drug quality, efficacy and relative safety for prescription drugs, and finer judgement on these drugs from their prescribers, with OTC medicines consumers must rely on the professional judgement of regulatory authorities. Thus, said Professor Rawlins, the safety of OTC products must be well established and of greater magnitude than for prescribed medicines.

The five principal consumer expectations at the time of marketing are that (a) a drug should be of good quality; (b) it should have an established efficacy for its claimed indications; (c) it should have satisfied the regulatory authorities'standards of safety; (d) it should have undergone professional assessment of benefit/risk; and (e) doctors should have been adequately informed of how best to use the drug and be aware of any potential problems evident on the basis of available data. Additionally, consumers expect to be protected from extravagant promoter claims of efficacy and safety. Once a drug is marketed, there is the obvious consumer expectation of continued surveillance by the regulators to re-evaluate benefit/risk ratios, which at present is being achieved by means of spontaneous reporting systems.

With the NSAIDs, said Professor Rawlins, ADR reports represent a comparatively high proportion of total reports; 20 to 30% of those received by the Committee on Safety of Medicine between the years 1977 and 1981. Such reports followed a clear pattern, being high during the first year of introduction and gradually declining with time, both in total and as events per million prescriptions. In descending order of frequency, NSAID-induced events involve the gastrointestinal tract, liver, blood, skin and kidneys. When examining spontaneous ADRs, regulatory authorities look for novel effects, such as anaphylaxis with zomepirac which led to its subsequent withdrawal; risk factors such as age, dose, duration of treatment; and, controversially, use reports to make comparisons between available NSAIDs. Although controversial, such use of these data has shown that during the first 5 years of marketing of 13 NSAIDs, the number of reports per drug has varied from 275 down to 13 per million prescriptions. The 3 drugs associated with a high reporting rate were withdrawn from the market, but not without some controversy, said Professor Rawlins. At the other end of the scale, ibuprofen is now available as an OTC product. There are several sources of bias which confound the interpretation of these data, including potential aberrations caused by careful postmarketing surveillance studies for some drugs but not others, special claims for safety by the manufacturers, and adverse publicity which may increase the reporting rate for a particular drug.

Finely-tuned judgement needs to be exerted by prescribing doctors when the balance between safety and efficacy is unclear or when close patient monitoring is needed to avoid toxicity, and only when extensive and prolonged clinical experience indicates such judgement to be unnecessary can the consumer expect wider and more convenient OTC availability with appropriate labelling.

Decision-making and the Regulatory Bodies: Viewpoint from Sweden

A regulatory authority view of the adequacy of the Swedish system of assessing risk associated with drug administration was presented by Professor *K. Strandberg* of the National Board of Health and Welfare, Uppsala, Sweden. He stressed that to be effective, postmarketing surveillance of drugs must be customised for the specific problems of that country. He outlined the approaches used in Sweden, where spontaneous ADR reporting data and those from drug utilisation and patient-and disease-orientated registers have provided much useful information on safety problems with different drugs.

The registers, which provide information from the whole or a random sample of the population, involve relatively simple reporting techniques, and include total sales, prescription sample, diagnosis and therapy, mortality, cancer, malformation and patient registers. The cost of obtaining this information is low, since it is collected primarily for other purposes such as health care planning. The system of spontaneous ADR reporting is well supported by Swedish physicians, as reflected by reports of the Guillain-Barre syndrome associated with zimeldine. While acknowledging the advantages and disadvantages of the spontaneous reporting system, Professor Strandberg said that the number of reports had increased consistently to the present level of around 3000 per year. Although under-reporting and selective reporting were also generally considered to be disadvantageous, the latter had been advantageous in identifying risk factors in glibenclamide-induced hypoglycaemia.

In touching upon the controversial subject of using ADR data for comparative analyses among related drugs, also discussed by Professor Rawlins, it was pointed out by Professor Strandberg that while one school of thought holds the view that spontaneous ADR reports should not be used at all for comparative analyses, his department considered these reports to be hypotheses generating and so leading to some cautiously monitored comparisons. In one such instance an apparently excessive incidence of ADRs associated with phenformin was shown to be erroneous after phenformin was restricted and the subsequent increase in metformin usage was found to be

accompanied by a parallel increase in ADRs. However,since lactic acidosis and fatal reactions remained more frequent with phenformin, and no difference in patient characteristics was detected from the prescription survey, it was decided to withdraw phenformin from the Swedish market in 1978.

Monitoring of the available NSAIDs over several years has revealed ADR profiles that are qualitatively similar, although quantitative differences with respect to skin, liver and central nervous system effects were evident with some drugs. Professor Strandberg stressed, however, that the data generated are not able to determine whether or not the findings are genuine reflections of the inherent properties of the drugs. He also warned that those people who insist on conclusive scientific validation should realise that to accomplish this before any action is taken may be impossible, usually because of the time required.

The greatest disadvantage with the patient and disease registers, said Professor Strandberg, is the frequently inaccurate diagnoses, whereas a general disadvantage is the delay in obtaining the data, ranging from about 3 months for the drug utilisation register to an unacceptable 3 to 4 years for the cancer register. The available systems are very useful, and can be improved by further education of physicians and complemented by provision for initiation of case control studies when problems indicate their necessity.

คำแนะนำสำหรับผู้เขียนเรื่องลงวารสาร

วัตถุประสงค์

"วารสารเภสัชวิทยา" เป็นวารสารทางวิชาการของสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย มีวัตถุประสงค์เพื่อเผยแพร่ผลงานวิชาการทางเภสัชวิทยาและสาขาวิชาอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง ส่งเสริมความร่วมมือทางวิชาการระหว่างสมาชิกในสถาบันต่าง ๆ และผู้สนใจ

เรื่องที่ตีพิมพ์

1. รายงานวิจัย (Original Article) เป็นรายงานผลงานวิจัยของผู้เขียนเอง ซึ่งยังไม่เคยตีพิมพ์หรือกำลังรอการตีพิมพ์ในวารสารอื่น
2. รายงานผู้ป่วย (Case Report) เป็นรายงานผลการศึกษาในผู้ป่วย ในเรื่องที่เกี่ยวข้องกับวิชาเภสัชวิทยา
3. บทความปริทัศน์ (Review Article) เป็นการรวบรวมข้อมูลและสรุปวิจารณ์ในเรื่องใดเรื่องหนึ่งอย่างละเอียด ลึกซึ้ง และก้าวหน้าในด้านนั้น ๆ
4. บทความทั่วไป (General Article) อาจเป็นการสรุปความรู้ความเข้าใจในเรื่องใดเรื่องหนึ่ง ซึ่งมีประโยชน์ต่อการเรียนการสอน หรือต่อสมาชิกและประชาชนที่สนใจ
5. เวทีทัศน์ (Point of View) เป็นการวิจารณ์หรือเสนอข้อคิดเห็นในสาระสำคัญทางเภสัชวิทยา หรือที่เกี่ยวข้องกับการเรียนการสอนวิชาเภสัชวิทยา หรือการดำเนินงานของสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย
6. จดหมายถึงบรรณาธิการ (Letter to Editor) เป็นการวิจารณ์หรือเสนอข้อคิดเห็นที่เกี่ยวข้องกับการจัดทำวารสารเภสัชวิทยา หรือเรื่องที่ตีพิมพ์ในวารสาร ซึ่งคณะบรรณาธิการอาจพิจารณาให้ผู้ที่เกี่ยวข้องตอบข้อวิจารณ์หรือข้อเสนอแนะนั้น ๆ
7. วิจารณ์หนังสือ (Book Review) เป็นข้อวิจารณ์หรือแนะนำหนังสือที่ตีพิมพ์ทั้งภายในประเทศและในต่างประเทศ ซึ่งคณะบรรณาธิการเห็นว่าให้ประโยชน์ต่อผู้อ่าน
8. บทบรรณาธิการ (Editorial) เป็นบทความหรือข้อคิดเห็นในเรื่องที่เกี่ยวข้องกับวิชาเภสัชวิทยา วารสารเภสัชวิทยา หรือสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย ซึ่งคณะบรรณาธิการจะพิจารณาเป็นเรื่อง ๆ ไป

เงื่อนไข

1. ต้นฉบับที่ส่งให้พิจารณาต้องไม่เคยตีพิมพ์มาก่อน หรือกำลังรอการตีพิมพ์ในวารสารหรือหนังสืออื่น ๆ และจะต้องไม่ส่งไปตีพิมพ์ที่อื่นภายหลังจากที่คณะบรรณาธิการได้ตอบรับเรื่องดังกล่าวแล้ว
2. เรื่องที่ตีพิมพ์แล้วเป็นสมบัติของสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย และเป็นผู้สงวนสิทธิ์ทุกประการ
3. ข้อความและความคิดเห็นในเรื่องที่ตีพิมพ์ในวารสารเป็นของผู้เขียน ซึ่งคณะบรรณาธิการไม่จำเป็นจะต้องเห็นพ้องด้วย
4. วารสารจะส่งสำเนาเรื่องเฉพาะรายงานการวิจัย รายงานผู้ป่วยและบทความปริทัศน์ที่ตีพิมพ์แล้วจำนวน 25 ฉบับให้ผู้เขียนตามที่อยู่ที่ระบุไว้

การเตรียมต้นฉบับ

1. ต้นฉบับอาจเป็นภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษก็ได้ ถ้าเป็นภาษาไทยจะต้องมีบทคัดย่อหรือเรื่องย่อภาษาอังกฤษอยู่ด้วย และมีชื่อเรื่อง ชื่อ ชื่อสกุล และสถาบันที่ทำงานของผู้เขียนอยู่ด้วยทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ยกเว้นเรื่องที่เป็น เวทีทัศน์ จดหมายถึงบรรณาธิการ วิจารณ์หนังสือ และบทบรรณาธิการ อาจไม่ต้องมีบทคัดย่อหรือเรื่องย่อก็ได้
2. ต้นฉบับควรพิมพ์ดีดบรรทัดเว้นบรรทัด (2-space) บนกระดาษขาวอย่างสั้น และพิมพ์หน้าเดียว ภายในกรอบขนาด 15 x 20 ซม. ตัวเลขควรใช้เลขอาราบิคทั้งหมด
3. รายงานวิจัยหรือรายงานผู้ป่วยควรมีโครงสร้างตามลำดับดังนี้ ชื่อเรื่อง ชื่อและสถาบันที่ทำงานของผู้เขียน บทคัดย่อ (ABSTRACT) บทนำ (INTRODUCTION) วิธีการ (METHODS) ผลการศึกษา (RESULTS) วิจารณ์ (DISCUSSION) สรุป (CONCLUSION) คำขอบคุณ (ACKNOWLEDGEMENTS) และเอกสารอ้างอิง (REFERENCES)
4. บทความปริทัศน์ควรมีโครงสร้างตามลำดับดังนี้ ชื่อเรื่อง ชื่อและสถาบันที่ทำงานของผู้เขียน เรื่องย่อ (SUMMARY) บทนำและเนื้อเรื่อง (ซึ่งไม่จำกัดลักษณะ) สรุป คำขอบคุณ และเอกสารอ้างอิง
5. บทความทั่วไป เวทีทัศน์ จดหมายถึงบรรณาธิการ และบทบรรณาธิการ ไม่จำกัดหัวข้อการเขียน และอาจใช้การอ้างอิงแบบบรรณานุกรม (BIBLIOGRAPHY หรือ READING LIST) ก็ได้
6. เอกสารอ้างอิง ให้ใช้ระบบตัวเลขภายในวงเล็บ เรียงตามลำดับการอ้างถึงในเนื้อเรื่อง โดยใช้แนวทางของ International Committee of Medical Journal Editors (ดูใน Br Med J 1982 ; 284 : 1766-70.) ดังนี้

6.1 การอ้างอิงเอกสารจากวารสาร ถ้ามีผู้เขียนไม่เกิน 6 คน ให้เขียนชื่อทุกคน ถ้ามีชื่อผู้เขียนตั้งแต่ 7 คน ให้เขียนชื่อเฉพาะ 3 คนแรก ตามด้วยคำ "และคณะ" (et al.) และให้จัดลำดับดังนี้ ชื่อสกุลผู้แต่ง อักษรย่อชื่อต้น (ชื่อซึ่งเขียนเป็นภาษาไทยใช้เรียงชื่อต้น ชื่อสกุล) ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร (ชื่อย่อของวารสารภาษาอังกฤษใช้ตาม Index Medicus) ปี เล่มที่ หน้าแรก-หน้าสุดท้าย ดังตัวอย่าง

บพิตร กลางกัลยา. บทบาททางสรีรวิทยาของ Opioid peptides และการตีความจากผลของ Naloxone. วารสารเภสัชวิทยา 2524 ; 3 : 85-93.

Anden NE, Corrodi H, Fuxe K. Evidence for central noradrenaline receptor stimulation by clonidine. Life Sci 1970 ; 9 : 513-23.

ในกรณีที่ไม่มีมีชื่อผู้แต่ง ให้อ้างอิงดังนี้

Anonymous. Coffee drinking and cancer of the pancreas (Editorial). Br Med J 1981 ; 283 : 628.

6.2 การอ้างอิงหนังสือ

6.2.1 การอ้างอิงหนังสือที่มีหรือไม่มีบรรณาธิการ

Dausset J, Colombani J, eds. Histocompatibility testing 1972. Copenhagen : Munksgaard, 1973 : 12-8.

Eisen HN. Immunology : an introduction to molecular and cellular prineiples of the immune response. 5 th ed. New York : Harper and Row, 1974 : 406.

6.2.2 การอ้างอิงบทในหนังสือ

Jaffe JH, Martin WR. Opioid analgesics and antagonists. In : Gilman AG, Goodman LS, Gilman A, eds. The pharmacological basis of therapeutics. 6 th ed. New York : MacMillan Publishing, 1980 : 494-534.

6.2.3 การอ้างอิง monograph

Hunninghake GW, Gadek JE, Szapiel SV, et al. The human alveolar macrophage. In : Harris CC ed. Cultured human cells and tissues in biomedical research. New York : Academic Press, 1980 : 54-6. (Stoner GD, ed. Methods and perspective in cell biology ; vol 1).

6.3 การอ้างอิงวิทยานิพนธ์ (Thesis or Dissertation)

Cairns RB. Infrared spectroscopic studies of solid oxygen. Berkeley, California : University of California, 1965. 156 pp. Dissertation.

6.4 การอ้างอิงต้นฉบับที่ได้รับการตอบรับแล้ว แต่ยังมิได้ตีพิมพ์ให้เขียนวลี "in press" หรือ "อยู่ระหว่างการตีพิมพ์" ภายในวงเล็บท้ายชื่อวารสารนั้น ๆ สำหรับการอ้างอิงต้นฉบับที่ยังไม่ได้รับการตอบรับให้เขียนวลี "unpublished observations" หรือ "ข้อมูลที่ยังไม่ได้ตีพิมพ์" ภายในวงเล็บในเนื้อเรื่องตอนที่มีการอ้างถึง

7. ตารางและ/หรือรูปประกอบการตีพิมพ์พร้อมคำอธิบาย ควรพิมพ์อยู่ในเนื้อเรื่องตามตำแหน่งที่ต้องการ รูปเขียนควรเขียนด้วยหมึกอินเดียนบนกระดาษขาวอย่างดี รูปถ่ายควรเป็นรูปขาวดำบนกระดาษอย่างเรียบ ทั้งตาราง รูปและคำอธิบายควรมีขนาดพอเหมาะที่จะตีพิมพ์ลงในกรอบขนาด 1 หน้าของวารสารได้โดยตรง (ไม่เกิน 15 x 20 ซม.) ตาราง และ/หรือรูปซึ่งนำมาจากผลงานที่ตีพิมพ์แล้วจะต้องอ้างถึงแหล่งที่มาด้วย

การส่งต้นฉบับ

ให้ส่งต้นฉบับจำนวน 2 ชุด ต่อกรรมการในคณะบรรณาธิการได้ทุกท่าน หรือจะส่งทางไปรษณีย์ถึงบรรณาธิการ พ.อ.ทัศนัย สุริยจันทร์ ภาควิชาเภสัชวิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า ถนนราชวิถี กทม. 10400 บรรณาธิการจะส่งคำตอบรับ และ/หรือข้อเสนอแนะในการแก้ไขต้นฉบับมายังผู้เขียน ซึ่งในกรณีที่มีการแก้ไข ผู้เขียนอาจแก้ไขตามคำแนะนำหรืออธิบายยืนยันหรือเขียนเพิ่มเติมตามที่เห็นสมควร แล้วส่งคืนยังบรรณาธิการโดยด่วน เพื่อพิจารณาตีพิมพ์ในวารสารต่อไป

อภินันทนาการ จาก

ห้างหุ้นส่วนจำกัด ชัชรีย์

45/58 ซอยศรีนครพัฒนา ถนนสุขาภิบาล 1 แขวงคลองกุ่ม
เขตบางกะปิ กทม. 10240 โทร. (02) 374-7048, 374-1877

รับสั่งและจำหน่าย

- เครื่องแก้วและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์
- เคมีภัณฑ์ทั่วไปสำหรับห้องทดลอง
- เคมีภัณฑ์วิจัยสำหรับงานเฉพาะอย่าง
- เคมีภัณฑ์วิจัยของ **SIGMA CHEMICAL COMPANY**
  ALDRICH CHEMICAL COMPANY
  MAKOR CHEMICAL LTD.
- **USP STANDARD CHEMICALS & TOXINS**