



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เภสัชและพิษวิทยาทางสัตวแพทย์)

ปริญญา

เภสัชและพิษวิทยาทางสัตวแพทย์
สาขา

เภสัชวิทยา
ภาควิชา

เรื่อง เภสัชจลนศาสตร์และการตกค้างของยาออกซีเตตราไซคลินในกุ้งก้ามกราม

Pharmacokinetics and Residue Depletion of Oxytetracycline in Giant Freshwater
(*Macrobrachium rosenbergii*)

นามผู้วิจัย นางสาวนฤมล กลางแก้ว

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์อำนาจ พัวพลเทพ, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์อำนาจ พัวพลเทพ, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สิงสีทงี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

เภสัชจลนศาสตร์และการตกค้างของยาออกซีเตตราไซคลินในกุ้งก้ามกราม

Pharmacokinetics and Residue Depletion of Oxytetracycline in Giant Freshwater Prawn
(*Macrobrachium rosenbergii*)

โดย

นางสาวนฤมล กลางแก้ว

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เภสัชและพิษวิทยาทางสัตวแพทย์)

พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นฤมล กลางแก้ว 2553: เกษษณศาสตร์และการตกค้างของยาอ็อกซีเตตราซัยคลินในกุ้งก้ามกราม
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เภสัชและพิษวิทยาทางสัตวแพทย์) สาขาเภสัชและพิษวิทยาทาง
สัตวแพทย์ ภาควิชาเภสัชวิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์อำนาจ พัวพลเทพ,
Ph.D. 102 หน้า

กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) จัดเป็นกุ้งพื้นเมืองของประเทศไทย ซึ่งเป็นกุ้งแม่น้ำและ
เป็นกุ้งชนิดที่มีความนิยมสำหรับการทำฟาร์มเพาะเลี้ยง เพื่อส่งออกไปขายยังต่างประเทศและสำหรับผู้บริโภค
ภายในประเทศ ปัจจุบันมีการทำฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามเพิ่มสูงขึ้น จึงพบปัญหาของการติดเชื้อโรคไวรัสและ
แบคทีเรียหากเลี้ยงภายใต้สิ่งแวดล้อมที่ไม่ดี ฉะนั้นจึงมีการนำยาปฏิชีวนะมาใช้เพื่อป้องกันและรักษาโรคใน
ฟาร์มกุ้ง ซึ่งการใช้ยาปฏิชีวนะที่ไม่เหมาะสมในฟาร์มกุ้ง อาจทำให้เกิดปัญหาการตกค้างของยาในเนื้อเยื่อกุ้งและ
การคือยาของเชื้อแบคทีเรีย อ็อกซีเตตราซัยคลินเป็นยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ได้กว้างและนิยมนำมาใช้ในการรักษาโรค
ติดเชื้อแบคทีเรียในปลาและกุ้ง ซึ่งอ็อกซีเตตราซัยคลินเป็นยาหนึ่งในสามชนิดที่สำนักงานคณะกรรมการ
อาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา (USFDA) รับรองให้สามารถใช้ได้ในสัตว์น้ำ ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้
จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาอ็อกซีเตตราซัยคลินในกุ้งก้ามกราม (*M.
rosenbergii*) ภายหลังการให้ยาเข้ากล้ามเนื้อและทางปาก ขนาด 11 และ 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว
นอกจากนี้ยังศึกษาถึงการตกค้างของยาโดยการผสมยาอ็อกซีเตตราซัยคลินในอาหารขนาด 4 กรัมต่อกิโลกรัม
น้ำหนักอาหาร ให้กินติดต่อกันเป็นเวลา 5 วัน แล้วทำการวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นของยาอ็อกซีเตตรา
ซัยคลินในฮีโมลิมฟ์และกล้ามเนื้อกุ้ง โดยวิธีทางจุลชีววิทยา พบว่ายาอ็อกซีเตตราซัยคลินมีระดับความเข้มข้น
สูงสุดในฮีโมลิมฟ์เท่ากับ 69.12 และ 9.60 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ด้วยขนาด 11 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว
ขณะที่มีความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 125.5 และ 23.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม ด้วยขนาด 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
น้ำหนักตัว ภายหลังจากให้ยาโดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อและป้อนเข้าปาก ตามลำดับ ส่วนค่าครึ่งชีวิตของยาอ็อกซี
เตตราซัยคลินในฮีโมลิมฟ์มีค่าเท่ากับ 9.07 และ 8.14 ชั่วโมง ภายหลังจากให้ยาโดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อและ
ป้อนเข้าปากด้วยขนาด 11 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว แต่มีค่าเท่ากับ 11.47 และ 9.97 ชั่วโมง ภายหลังจากให้ยา
ด้วยขนาด 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ตามลำดับ ส่วนระดับความเข้มข้นของยาอ็อกซีเตตราซัยคลิน
สูงสุดในเนื้อเยื่อกุ้งก้ามกรามเท่ากับ 12.49 และ 6.77 ไมโครกรัมต่อกรัม ด้วยขนาด 11 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนัก
ตัว ขณะที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 20.92 และ 9.35 ไมโครกรัมต่อกรัม ภายหลังจากให้ยาโดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อและป้อนเข้า
ปาก ด้วยขนาด 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ตามลำดับ ส่วนค่าครึ่งชีวิตของยาอ็อกซีเตตราซัยคลินในเนื้อ
เยื่อกุ้งก้ามกรามมีค่าเท่ากับ 29.66 และ 26.93 ชั่วโมง ด้วยขนาด 11 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว แต่เท่ากับ 31.58
และ 27.85 ชั่วโมง ภายหลังจากให้ยาโดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อและป้อนเข้าปากด้วยขนาด 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
น้ำหนักตัว ตามลำดับ และจากการศึกษาทดลองครั้งนี้พบว่าการผสมยาอ็อกซีเตตราซัยคลินในอาหาร ขนาด 4
กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักอาหาร ให้กินติดต่อกันเป็นเวลา 5 วัน เป็นขนาดที่เหมาะสมที่แนะนำให้ใช้สำหรับการรักษา
โรคในการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามและเพื่อหลีกเลี่ยงจากการตกค้างของยาในเนื้อเยื่อกุ้งก้ามกราม ควรหยุดให้ยาผสม
อาหาร 8 วันก่อนการบริโภค

Narumol Klangkaew 2010: Pharmacokinetics and Residue Depletion of Oxytetracycline in Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). Master of Science (Veterinary Pharmacology and Toxicology), Major Field: Veterinary Pharmacology and Toxicology, Department of Pharmacology. Thesis Advisor: Associate Professor Amnart Poapolathep, Ph.D. 102 pages.

The giant freshwater shrimp (*Macrobrachium rosenbergii*), a native species of Thailand, is the most popular freshwater shrimp for commercial cultivation. Freshwater shrimp farming is carried out to export the shrimp for commercial purpose or to supply for the local requirements in Thailand. With the increase in shrimp production, *M. rosenbergii* has become susceptible to various viral and bacterial diseases under adverse environmental conditions. Antibiotics are used to improve diseases control and treatment in shrimp farming. This raises the problems of tissue residues and evolving antimicrobial strains of bacteria in association with inappropriate dosages. Antimicrobial agents including broad spectrum antibiotics, such as oxytetracycline (OTC), are widely used to treat bacterial infections in fish and shrimp. The US Food and Drug Administration (FDA) approved three antibiotics, including OTC, for use in aquatic animals. The purpose of the present study was to investigate the hemolymph and muscle tissue kinetic of OTC in *M. rosenbergii* following either intramuscular (i.m.) or oral (p.o.) administration at two dosages of 11 and 22 mg/kg body weight (b.w.). In addition, the residue depletion patterns of OTC were examined after medicated-feed treatment at the feeding level of 4 g/kg of feed for 5 consecutive days. The concentration of OTC in hemolymph and muscle tissues of shrimp was mainly measured using a microbiological assay. Peak hemolymph concentrations (C_{max}) were 69.12 and 9.60 µg/ml at a single dose of 11 mg/kg b.w. whereas they were 125.5 and 23.5 µg/ml after i.m. and p.o. administration at a single dose of 22 mg/kg b.w., respectively. The elimination half-lives of OTC were 9.07 and 8.14 h at a dosage of 11 mg/kg b.w. but 11.47 and 9.97 h after i.m. and p.o. administration at a dosage of 22 mg/kg b.w., respectively. Peak muscle concentrations were 12.49 and 6.77 µg/g at a dosage of 11 mg/kg b.w. whereas they were 20.92 and 9.35 µg/g after i.m. and p.o. administration at a dosage of 22 mg/kg b.w., respectively. The elimination half-lives of OTC in muscle tissue of shrimp were 29.66 and 26.93 h at a dosage of 11 mg/kg b.w. but 31.58 and 27.85 h after i.m. and p.o. administration at a dosage of 22 mg/kg b.w., respectively. Taken together, the dose of 4 g/kg of feed for 5 consecutive days can be recommended for therapeutic dosage regimen in giant freshwater shrimp aquaculture. To avoid the OTC residue in shrimp muscle, it should take at least 8 days postcessation of medicate feed to wash out the drug from the muscle of *M. rosenbergii*.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลืออย่างยิ่ง ทั้งด้านวิชาการ และด้านการดำเนินงานวิจัย จากบุคคลและกลุ่มบุคคลต่าง ๆ ได้แก่ รองศาสตราจารย์ น.สพ.ดร. อำนวย พัวพลเทพ หัวหน้าภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสทางการศึกษา ให้คำแนะนำปรึกษาในด้านวิชาการและด้านการดำเนินงานวิจัย ช่วยแก้ปัญหาและให้กำลังใจผู้วิจัยมาโดยตลอด ให้การสนับสนุนเงินทุนวิจัยซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี รวมทั้งช่วยตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีราพร อนันตะเศรษฐกุล รองหัวหน้าภาควิชา สัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร.กาญจนา อิ่มศิลป์ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประธานการสอบ และรองศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร.สิรินทร หิปปโซคอนันต์ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทย ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำด้านวิชาการ และให้กำลังใจมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตร ศาสตร์ ที่ประสิทธิ์ประสาทความรู้ ตลอดทั้งคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัย และสถานีประมงน้ำจืด อำเภอดุสิต จังหวัดชัยภูมิ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ สารเคมีและอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง

ขอขอบคุณคณาจารย์ และคุณคลฤดี นายศิริ นักวิทยาศาสตร์ คณะเทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ในงานวิจัย

สำหรับคุณงามความดีที่เกิดจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้กับบิดา มารดาซึ่งเป็น ที่เคารพยิ่ง ครอบครัวกลางแก้วและบุตรอันเป็นที่รัก ตลอดจนจนอาจารย์ที่เคารพทุกท่าน ที่ประสิทธิ์ ประสาทความรู้และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีเสมอมา รวมทั้งพี่ม่อน พี่เหี่ยวและเพื่อน ๆ ที่ให้ กำลังใจ สุดท้ายนี้ คุณค่าและประโยชน์จากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ขอมอบแด่มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นฤมล กลางแก้ว

เมษายน 2553

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	27
อุปกรณ์	27
วิธีการ	32
ผลและวิจารณ์	45
ผล	45
วิจารณ์	56
สรุปและข้อเสนอแนะ	61
สรุป	61
ข้อเสนอแนะ	62
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	63
ภาคผนวก	71
ภาคผนวก ก ขึ้นตอนการทดลองยาอีกซี่เตตราซัยคลินในกึ่งก้ามกราม โดยวิธีทางจุลชีววิทยา และ CHARM II assay	72
ภาคผนวก ข การทำ Negative Control และ Positive Control	89
ภาคผนวก ค การเตรียมสารละลาย	93
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	102

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สินค้าส่งออกสำคัญ 13 รายการแรกของไทย ปี พ.ศ. 2546 - 2553 (มูลค่า : ล้านบาท)	6
2	สินค้าส่งออกสำคัญ 13 รายการแรกของไทย ปี พ.ศ. 2546 - 2553 (สัดส่วน : ร้อยละ)	7
3	สินค้าเกษตรกรรมส่งออกสำคัญของไทยเรียงตามมูลค่า ปี พ.ศ. 2546 - 2549 (มูลค่า : ล้านบาท)	8
4	สินค้าเกษตรกรรมส่งออกสำคัญของไทยเรียงตามมูลค่า ปี พ.ศ. 2550 - 2553 (มูลค่า : ล้านบาท)	9
5	ปริมาณการส่งออกกุ้งของไทย ปี พ.ศ. 2549 - 2552 (ตัน : ล้านบาท)	10
6	ตลาดส่งออกสำคัญของไทย ปี พ.ศ. 2543 - 2552 (มูลค่า : ล้านบาท)	11
7	ตลาดส่งออกกุ้งสดแช่เย็น แช่แข็งและแปรรูป (ไม่รวมกุ้งกระป๋อง) ที่สำคัญของ ประเทศไทย ปี พ.ศ. 2550 – 2552 (มูลค่า : ล้านเหรียญสหรัฐ)	12
8	การตรวจวิเคราะห์สารปฏิชีวนะออกซิเตตราซัยคลิน ปี พ.ศ. 2537 - 2541	16
9	สารเคมีและสารชีวภาพที่ใช้ในฟาร์มเลี้ยงกุ้งประเทศไทย	17
10	ชนิดและจำนวนยาปฏิชีวนะที่มีการใช้ในฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งในไทย	18
11	ยาปฏิชีวนะที่อนุญาตให้ใช้ในสัตว์น้ำเพื่อบริโภคของประเทศหรือหน่วยงาน ต่าง ๆ	19
12	คุณภาพของน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งก้ามกราม	32
13	กลุ่ม วิธีการและขนาดของยาที่ใช้กุ้งก้ามกราม	33
14	ค่าเฉลี่ย ($\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน, SEM) ของพารามิเตอร์ที่สำคัญทาง เภสัชจลนศาสตร์ของยาออกซิเตตราซัยคลินในอีโมลิฟี่กุ้งก้ามกราม เมื่อให้ยา เข้ากล้ามเนื้อและป้อนให้กิน ขนาด 11 และ 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว	48
15	ค่าเฉลี่ย ($\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน, SEM) ของพารามิเตอร์ที่สำคัญทาง เภสัชจลนศาสตร์ยาออกซิเตตราซัยคลินในเนื้อกุ้งก้ามกราม เมื่อให้ยาเข้า กล้ามเนื้อและป้อนให้กิน ขนาด 11 และ 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว	52

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
16	ค่าเฉลี่ย ($\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน, SEM) ของความเข้มข้นของยา ออกซีเตตราไซคลินในเนื้อกึ่งก้ามกราม เมื่อให้ยาผสมอาหารด้วยขนาด 4 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักอาหาร อัตรา 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักกุ้งทั้งหมด วันละ 2 ครั้ง นานติดต่อกัน 5 วัน	54 57
17	ค่าครึ่งชีวิตของยาออกซีเตตราไซคลินในฮีโมลิม์ฟของกุ้งชนิดต่าง ๆ	57
18	ค่าครึ่งชีวิตของยาออกซีเตตราไซคลินในเนื้อกุ้งชนิดต่าง ๆ	
ตารางผนวกที่		
ก1	คุณภาพของน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งก้ามกราม	74
ก2	คุณภาพอาหารกุ้งก้ามกราม	74
ข1	ระดับความเข้มข้นของสารมาตรฐานออกซีเตตราไซคลินในเนื้อกึ่งก้ามกราม โดยวิธี CHARM II assay	92
ค1	การใช้อยาปฏิชีวนะสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศต่างๆ	96
ค2	การใช้อยาปฏิชีวนะสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศอินเดีย	97
ค3	การใช้อยาปฏิชีวนะสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศอินโดนีเซีย	98
ค4	การใช้อยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชนิด yellowtail, rainbow trout และ kuruma prawn ในประเทศญี่ปุ่น	99
ค5	การใช้อยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศจีน	101

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะและสีของกึ่งกำมGRAM	4
2	กราฟมูลค่าการส่งออกกึ่งสดแช่เย็น แช่แข็งและแปรรูป ปี พ.ศ. 2546 - 2552 (มูลค่า : ล้านเหรียญสหรัฐ) ปี พ.ศ. 2546 - 2552	13
3	โครงสร้างของยาอ็อกซีเตตราซัยคลิน	20
4	การวางกระชังกึ่งกำมGRAMในแต่ละช่วงเวลา	36
5	ตำแหน่งการให้ยาเข้ากล้ามเนื้อในกึ่งกำมGRAM	37
6	การป้อนยาเข้าปากกึ่งกำมGRAM	38
7	การเจาะเก็บฮีโมลิมฟบริเวณขาเดินคู่ที่ 2 - 5	40
ภาพผนวกที่		
ก1	การทำเครื่องหมายจานเพาะเชื้อ	83
ก2	การหยดตัวอย่างลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ	84
ก3	การบันทึกข้อมูลการหยดตัวอย่าง	84
ข1	กราฟมาตรฐานแสดงความเข้มข้นของอ็อกซีเตตราซัยคลินในฮีโมลิมฟ กึ่งกำมGRAM	91
ข2	กราฟมาตรฐานแสดงความเข้มข้นของอ็อกซีเตตราซัยคลินในเนื้อกึ่งกำมGRAM	91

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

μg	=	Microgram
μl	=	Microlitre
AUC	=	Area under the curve
CCRVDF	=	Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Food
C_{max}	=	Maximal concentration
C_n	=	Y intercept
C_p	=	Concentration of drug in the plasma (mg/l)
D	=	Dose amount
DMSO	=	Dimethyl sulfoxide
DO	=	Dissolved oxygen
EDTA	=	Disodium ethylenediaminetetraacetate
EPA	=	Environmental Protection Agency
F (%)	=	Systemic availability
F	=	Fraction of dose absorbed
FAO	=	Food and Agriculture Organization
FDA	=	Food and Drug Administration
g	=	Gram
HCl	=	Hydrochloric acid
HPLC	=	High Performance Liquid Chromatography
i.m.	=	Intramuscular
i.s.	=	Intravenous
JECFA	=	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
Kel	=	Elimination rate constant
LOD	=	Limit of detection
MIC	=	Minimum Inhibitory Concentration
MRL	=	Maximum residue limit
MSUEB	=	MSU Extraction Buffer

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

MSUMA	=	MSU Multi-Antimicrobial Concentrate Standard
O.D.	=	Optical density
OR	=	Oral
OTC	=	Oxytetracycline
p.o.	=	Per os
ppb	=	Part per billion
ppm	=	Part per million
SEM	=	Standard Error of Sample Mean
T	=	Temperature
$t_{1/2ab}$	=	Absorption half life
$t_{1/2\alpha}$	=	Distribution half life
$t_{1/2\beta}$	=	Elimination half life
TMSU	=	Tablet Reagent
TPNC	=	Tissue Performance Negative Concentrate
Vd	=	Volume of distribution
WHO	=	World Health Organization
λ_a	=	Absorption rate
λ_n	=	Rate constant

เภสัชจลนศาสตร์และการตกค้างของยาออกซีเตตราซัยคลินในกุ้งก้ามกราม

Pharmacokinetics and Residue Depletion of Oxytetracycline in Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*)

คำนำ

สัตว์น้ำโดยเฉพาะกุ้ง (กุ้งกุลาดำ, กุ้งขาว, กุ้งแชบ๊วยและกุ้งก้ามกราม) ถือเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่มีความสำคัญที่ประเทศไทยมีศักยภาพในการส่งออก และสามารถทำรายได้เข้าประเทศได้อย่างมหาศาล ปีละหลายหมื่นล้านบาท แต่ปัญหาที่สำคัญในการเลี้ยงกุ้งที่พบได้บ่อยคือ การตกค้างของยาต้านจุลชีพซึ่งมีผลในการกีดกันทางการค้าและเป็นข้อต่อรองในการส่งออกไปขายยังต่างประเทศ ทำให้เกิดความเสียหายต่อเศรษฐกิจของประเทศ รวมถึงสุขภาพอนามัยต่อผู้บริโภค อย่างไรก็ตามกรมประมงได้ทำการเพาะพันธุ์กุ้งก้ามกรามได้สำเร็จ เกษตรกรจึงหันมาเลี้ยงกุ้งก้ามกรามแทน ซึ่งก็ไม่สามารถหลีกเลี่ยงปัญหาของโรคติดเชื้อได้ จึงมีความจำเป็นในการใช้ยาต้านจุลชีพเพื่อรักษาโรคที่อุบัติขึ้น แต่ปัจจุบันพบว่าข้อมูลการใช้ยาและสารเคมีในกุ้งก้ามกรามมีการศึกษาวิจัยค่อนข้างน้อยมาก เมื่อเทียบกับข้อมูลยาในกุ้งกุลาดำ รวมถึงการกำหนดค่าปริมาณสูงสุดที่อนุญาตให้มีการตกค้างในเนื้อกุ้ง (Maximum residue limit: MRL) ยาต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพที่นิยมใช้รักษาโรคทั้งในสัตว์บกและสัตว์น้ำ เช่น ยาออกซีเตตราซัยคลิน (oxytetracycline) เป็นยาที่ได้รับการอนุญาตให้ใช้ในสัตว์น้ำจาก Food and Drug Administration (FDA) และ Environmental Protection Agency (EPA) ประเทศสหรัฐอเมริกา รวมถึงประกาศของควบคุมยากระทรวงสาธารณสุขประเทศไทย และ Codex ได้กำหนดค่า MRL ของยาออกซีเตตราซัยคลินในเนื้อสัตว์ที่นำมาบริโภค เท่ากับ 0.1 ไมโครกรัมต่อกรัม ($\mu\text{g/g}$) (EEC 2377/90, Codex Alimentarius) เพื่อลดปัญหาการตกค้างของยาที่สามารถก่อให้เกิดเชื้อดื้อยาต่อผู้บริโภค นอกจากนั้น จากการศึกษาวิจัยพบว่าแต่ละชนิดมีความแตกต่างของกระบวนการดูดซึม การกระจายตัว การขับถ่ายรวมถึงการตกค้างของยาในเนื้อเยื่อของสัตว์แต่ละชนิด (มาลินี และคณะ 2537, 2540; Brillantes *et al.*, 2001; Allen and Hunn, 1986; Limpoka *et al.*, 1994; Poapolathep *et al.*, 2008a, b, c) ดังนั้นจึงทำการศึกษาคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์และการตกค้างของยาออกซีเตตราซัยคลินในกุ้งก้ามกราม โดยใช้กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) คณะแพศ อายุ 6-7 เดือน น้ำหนักเฉลี่ยตัวละ 20-30 กรัม จำนวน 5 กลุ่มการทดลอง ได้รับปริมาณยาออกซีเตตราซัยคลินแตกต่างกันดังนี้ กลุ่มการทดลองที่ 1 และ 2 ได้รับยาโดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ขนาด 11 และ 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว กลุ่มการทดลองที่

3 และ 4 ได้รับยาโดยป้อนเข้าปากโดยตรง ขนาด 11 และ 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว กลุ่มการทดลองที่ 5 ได้รับยาโดยผสมในอาหาร ขนาด 4 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักอาหารตามลำดับ

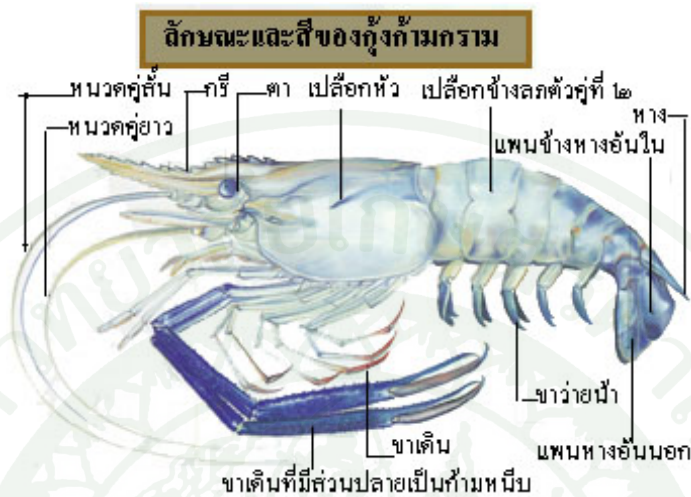
เพราะฉะนั้นเพื่อประโยชน์ในแง่ประสิทธิภาพของการใช้ยาในสัตว์น้ำแต่ละชนิด โดยเฉพาะกุ้งก้ามกรามและเพื่อลดปัญหาการตกค้างของยาที่สามารถก่อให้เกิดเชื้อดื้อยาต่อผู้บริโภค ซึ่งเป็นการคุ้มครองความปลอดภัยของสุขภาพอนามัยของผู้บริโภค และมีการนำข้อมูลการใช้ยาในกุ้งกุลาดำมาประยุกต์ใช้กับการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม อย่างไรก็ตามมีการศึกษาและรายงานว่ายาแต่ละชนิดมีความแตกต่างทางด้านสรีระหรือกายภาพของของสัตว์ที่ใช้ (Reed *et al.*, 2004) กระบวนการดูดซึม การกระจายตัวของยา การเปลี่ยนแปลงทางเมตาบอลิซึม การขับออกของยารวมถึงการตกค้างของยาในเนื้อเยื่อของสัตว์แต่ละชนิด (Baggot, 1977; Brander, 1991) รวมถึงสภาพแวดล้อมของน้ำที่ใช้เลี้ยง อาทิเช่น ความเป็นกรด-ด่างของน้ำ อุณหภูมิ ค่า alkalinity ปริมาณของแอมโมเนีย ในไตรท์ และความกระด้างของน้ำที่มีความแตกต่างกัน ซึ่งล้วนเป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อประสิทธิภาพของยาในสัตว์แต่ละชนิด (มาลินี, 2535, 2540; มาลินีและคณะ 2537; อำนาจและคณะ 2540; Limpoka *et al.*, 1994) โดยการศึกษาทดลองถึงคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์และการตกค้างของยาอีกสี่เตตราไซคลินในกุ้งก้ามกรามนี้ จะวิเคราะห์ระดับยาในฮีโมลิมฟ์ (hemolymph) และเนื้อกึ่งทดลองโดยวิธีทางจุลชีววิทยา (Microbiological Assay) และ CHARM II assay ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวและถูกต้องเป็นที่ยอมรับได้ มีค่าใช้จ่ายต่ำกว่า เมื่อเทียบกับการวิเคราะห์ยาโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) นอกจากนี้ผลจากการศึกษาวิจัยนี้ยังสามารถนำไปปรับใช้ในฟาร์มเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในประเทศไทยและสากล

อย่างไรก็ตามข้อมูลการใช้ยาที่ได้จากการศึกษาในสัตว์เพียงชนิดเดียว ไม่ควรนำมาใช้กับสัตว์ชนิดอื่น โดยเฉพาะสัตว์น้ำควรส่งเสริมให้มีการศึกษาวิจัยในสัตว์น้ำแต่ละชนิด

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญทางเภสัชจลนศาสตร์ในการใช้ยาออกฤทธิ์เตตราไซคลินในกึ่งกัมกรามอย่างถูกต้องและสมบูรณ์ สำหรับใช้ในการควบคุมและป้องกันโรคให้มีประสิทธิภาพและเป็นการรองรับการขยายตัวของอุตสาหกรรมเภสัชกรรมกึ่งกัมกรามในอนาคต
2. เพื่อให้ได้ข้อมูลการดูดซึม การกระจายตัว การเปลี่ยนแปลงทางเมตาบอลิซึมและการขับออกของยาออกฤทธิ์เตตราไซคลินในกึ่งกัมกราม เมื่อให้ยาโดยวิธีที่แตกต่างกัน
3. เพื่อให้ได้ข้อมูลการตกค้างของยาในเนื้อกึ่งกัมกรามซึ่งเป็นกึ่งที่นิยมบริโภค เพื่อเป็นแนวทางในการกำหนดระยะเวลาปลอดยาและใช้ในการกำหนดค่าปริมาณสูงสุดของยาสัตว์ตกค้างในอาหารที่ยอมรับได้ (Maximum Residue Level: MRL) เพื่อสุขภาพอนามัยและความปลอดภัยของผู้บริโภค

การตรวจเอกสาร



ภาพที่ 1 ลักษณะและสีของกุ้งก้ามกราม (คัดมาจากการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน เล่ม 13, 2540)

ลักษณะทางอนุกรมวิธานและชีววิทยาของกุ้งก้ามกราม

Phylum	Arthropoda
Class	Crustacea
Order	Decapoda
Family	Palaemonidae
Genus	<i>Macrobrachium</i>
Species	<i>rosenbergii</i>

กุ้งก้ามกราม มีชื่อสามัญ (common name) Giant Freshwater Prawn ชื่อวิทยาศาสตร์ *Macrobrachium rosenbergii* De Man มีชื่อสามัญไทย เช่น กุ้งนาง กุ้งหลวง กุ้งใหญ่ กุ้งก้ามกราม ลักษณะภายนอกทั่วไปส่วนหัวและอกคลุมด้วยเปลือกชิ้นเดียวกัน ลำตัวมีลักษณะเป็นปล้องจำนวน 6 ปล้อง เปลือกสีเขียวอมฟ้าหรือม่วง กริโค้งขึ้นลักษณะห้วยเป็นฟันเลื่อย ด้านบนมีจำนวนระหว่าง 13 - 16 ซี่ ด้านล่างมีจำนวนระหว่าง 10 - 14 ซี่ โคนกรีกว้างและหนากว่าปลายกริ ยาวถึง

แผ่นฐานหมวดหมู่ที่ 2 หมวดมี 2 คู่ หมวดคู่แรกของโคนหนาแบ่งเป็น 3 ซ้อปล้อง ปล้องที่ 3 แยกเป็นเส้นหมวด 2 เส้น หมวดคู่ที่ 2 ยาวกว่าหมวดคู่ที่ 1 แบ่งเป็น 5 ซ้อปล้อง ความยาวของแผ่นฐานหมวดหมู่ที่ 2 ยาวเป็น 3 เท่าของความกว้างแผ่นฐานหมวดหมู่ที่ 2 ขาเดินมี 5 คู่ โดยขาคู่ 1 และ 2 ตรงปลายเป็นก้ามสีน้ำเงินเข้ม ตลอดก้ามมีผิวขรุขระ กุ้งเพศผู้มีก้ามใหญ่กว่าเพศเมีย ทำหน้าที่ในการจับอาหารป้อนเข้าปากและป้องกันศัตรู ส่วนคู่ที่ 3, 4 และ 5 ปลายแหลมธรรมดาและขาว่ายน้ำ 5 คู่ ส่วนแพนหางมีลักษณะแหลม ปลายด้านข้างเป็นแพนออกไป 2 ข้างสีชมพูอมแดง (กรมประมง, 2545)

นิเวศวิทยา

กุ้งก้ามกรามมีถิ่นกำเนิดในเขตร้อน ทวีปเอเชียตอนใต้ พบทั่วไปในประเทศไทย พบว่า เวียดนาม เขมร มาเลเซีย บังกลาเทศ อินเดีย อินโดนีเซียและฟิลิปปินส์ ตลอดจนหมู่เกาะต่างๆ ในมหาสมุทรอินเดียและมหาสมุทรแปซิฟิกตอนใต้ กุ้งก้ามกรามในประเทศไทยแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในแหล่งน้ำจืดธรรมชาติ ตามลุ่มแม่น้ำเจ้าพระยา แม่น้ำแม่กลอง แม่น้ำบางปะกง แม่น้ำท่าจีน แม่น้ำปรางบุรีและแม่น้ำนครนายก และลำคลองต่างๆ ที่ติดกับแม่น้ำ (โกวิทย์, 2549) ภาคกลางพบที่จังหวัดฉะเชิงเทรา นนทบุรี ปทุมธานี อุทัยธานี ชัยนาท อ่างทอง นครสวรรค์ ราชบุรี สุพรรณบุรี สมุทรสาครและสมุทรสงคราม ภาคตะวันออกพบที่แม่น้ำจันทบุรี แม่น้ำระยอง จ.ระยอง และแม่น้ำเวฬุ จ.ตราด ภาคเหนือเคยพบกุ้งก้ามกรามที่แม่น้ำเมย จ.ตาก ซึ่งเป็นสาขาของแม่น้ำสาละวิน อำเภอแม่สอด จ.ตาก นอกจากนี้ยังพบในที่ที่มีทางน้ำไหลขึ้นลงติดต่อกับทะเลในภาคใต้พบที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี ปัตตานี ทะเลสาบสงขลา พัทลุง ชุมพร ภูเก็ต นครศรีธรรมราช ประจวบคีรีขันธ์ ปัจจุบันปริมาณกุ้งก้ามกรามตามแหล่งธรรมชาติมีจำนวนลดลงมาก เนื่องจากสาเหตุหลายประการ เช่น การทำประมงผิดวิธีและมลภาวะเป็นพิษ เป็นต้น (กรมประมง, 2545)

ความสำคัญทางเศรษฐกิจ

สัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย คือกุ้งก้ามกราม เป็นสัตว์น้ำจืดที่มีการส่งออกมาก เพราะเนื้อมีรสชาติดีสามารถประกอบอาหารได้หลากหลาย เช่น ต้มยำทอด ปลา ยำ เฝอ หรือแปรรูปตามความนิยม เป็นที่ต้องการของตลาดบริโภคทั้งภายในและภายนอกประเทศ

ตารางที่ 1 สินค้าส่งออกสำคัญ 13 รายการแรกของไทย ปี พ.ศ. 2546 - 2553 (มูลค่า : ล้านบาท)

มูลค่า : ล้านบาท

รายการ	สินค้าส่งออกสำคัญ 13 รายการแรกของไทย ปี พ.ศ. 2546 - 2553							
	2546	2547	2548	2549	2550	2551	2552	2553 (ม.ค-ก.พ.)
1.เครื่องคอมพิวเตอร์ อุปกรณ์และ								
ส่วนประกอบ	339,944.51	368,866.98	474,445.19	565,806.93	597,059.91	605,313.98	545,521.33	53,470.18
2. รถยนต์ อุปกรณ์และส่วนประกอบ	164,705.81	220,788.13	310,306.53	362,374.31	447,109.39	513,154.20	378,374.77	39,202.48
3. ยางพารา	115,796.95	137,454.19	148,679.86	205,483.11	194,338.73	223,628.23	146,263.60	22,066.84
4. แผงวงจรไฟฟ้า	191,540.28	196,444.27	238,454.60	267,598.31	290,349.51	237,972.57	219,508.87	8,515.63
5. ผลิตภัณฑ์ยาง	64,668.24	78,014.15	94,094.26	117,269.50	125,960.69	149,894.85	152,800.05	15,347.27
6. เหล็ก เหล็กกล้าและผลิตภัณฑ์	70,222.27	99,577.92	115,513.31	134,035.23	157,685.96	176,877.00	169,056.10	15,152.60
7. ข้าว	75,776.13	108,328.33	92,993.72	98,179.00	119,215.43	203,219.08	172,207.65	14,855.29
8. เครื่องจักรกลและส่วนประกอบ	51,716.62	67,083.79	84,509.13	100,867.03	149,901.18	139,367.21	113,337.22	14,701.67
9. เม็ดพลาสติก	89,204.82	124,783.11	167,914.20	171,394.06	179,511.99	181,158.74	151,979.11	14,105.15
10. เคมีภัณฑ์	65,897.44	82,841.51	105,732.82	130,475.48	135,072.99	141,693.83	152,208.92	13,272.99
11. อัญมณีและเครื่องประดับ	104,525.63	106,278.32	29,339.28	139,864.58	185,149.57	274,093.15	333,719.63	11,312.67
12. น้ำมันสำเร็จรูป	42,404.82	71,073.94	94,995.55	138,785.62	140,716.09	259,739.09	184,670.58	10,878.66
13. อาหารทะเลกระป๋องและแปรรูป	88,789.14	90,688.37	100,284.20	113,050.15	109,024.26	128,923.85	126,711.69	9,722.97
รวมส่งออก 13 รายการ	1,465,192.65	1,752,223.01	2,157,262.64	2,545,483.30	2,831,095.70	3,235,035.78	2,846,359.49	531,307.38
อื่น ๆ	1,760,580.60	1,967,615.85	2,105,779.92	2,209,207.06	2,231,722.52	2,385,370.42	2,152,358.90	375,922.09
รวมส่งออกทั้งสิ้น	3,225,773.25	3,719,838.86	4,263,042.56	4,754,690.36	5,062,818.22	5,620,406.20	4,998,718.39	907,229.47

ที่มา : ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร สำนักงานปลัดกระทรวงพาณิชย์ ร่วมกับกรมศุลกากร (กรมส่งเสริมการค้าส่งออก กระทรวงพาณิชย์, ม.ป.ป.)

ตารางที่ 2 สินค้าส่งออกสำคัญ 13 รายการแรกของไทย ปี พ.ศ. 2546 - 2553 (สัดส่วน : ร้อยละ)

สัดส่วน : ร้อยละ

รายการ	สินค้าส่งออกสำคัญ 13 รายการแรกของไทย ปี พ.ศ. 2546 - 2553							
	2546	2547	2548	2549	2550	2551	2552	2553 (ม.ค.-ก.พ.)
1.เครื่องคอมพิวเตอร์ อุปกรณ์และส่วนประกอบ	10.22	9.52	10.69	11.46	11.26	10.34	10.50	11.79
2. รถยนต์ อุปกรณ์และส่วนประกอบ	4.95	5.70	6.99	7.34	8.43	8.77	7.28	8.65
3. ขางพารา	3.48	3.55	3.35	4.16	3.67	3.82	2.81	4.62
4. แผงวงจรไฟฟ้า	5.76	5.07	5.37	5.42	5.48	4.07	4.22	3.93
5. ผลิตภัณฑ์ยาง	1.94	2.01	2.12	2.38	2.38	2.56	2.94	3.44
6. เหล็ก เหล็กกล้าและผลิตภัณฑ์	2.11	2.57	2.60	2.71	2.97	3.02	3.25	3.20
7. ข้าว	2.28	2.80	2.10	1.99	2.25	3.47	3.31	2.99
8. เครื่องจักรกลและส่วนประกอบ	1.56	1.73	1.90	2.04	2.83	2.38	2.18	2.87
9. เม็ดพลาสติก	2.68	3.22	3.78	3.47	3.39	3.10	2.92	2.96
10. เคมีภัณฑ์	1.98	2.14	2.38	2.64	2.55	2.42	2.93	2.84
11. อัญมณีและเครื่องประดับ	3.14	2.74	2.91	2.83	3.49	4.68	6.42	3.06
12. น้ำมันสำเร็จรูป	1.28	1.83	2.14	2.81	2.65	4.44	3.55	2.80
13. อาหารทะเลกระป๋องและแปรรูป	2.67	2.34	2.26	2.29	2.06	2.20	2.44	2.06
รวมส่งออก 13 รายการ	44.05	45.24	48.6	51.56	53.4	55.28	54.77	55.43

ที่มา : ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร สำนักงานปลัดกระทรวงพาณิชย์ ร่วมกับกรมศุลกากร (กรมส่งเสริมการค้าส่งออก กระทรวงพาณิชย์, ม.ป.ป.)

ตารางที่ 3 สินค้าเกษตรกรรมส่งออกสำคัญของไทยเรียงตามมูลค่า ปี พ.ศ. 2546 - 2549 (มูลค่า : ล้านบาท)

สินค้าเกษตรกรรม (ถั่วลิสง, ทุเรียน, ฝรั่ง)

มูลค่า : ล้านบาท

รายการ	สินค้าเกษตรกรรมส่งออกสำคัญของไทยเรียงตามมูลค่า ปี พ.ศ. 2546 - 2549							
	2546		2547		2548		2549	
	อันดับ	มูลค่า	อันดับ	มูลค่า	อันดับ	มูลค่า	อันดับ	มูลค่า
ยางพารา	1	115,796.95	1	414,523.88	1	148,679.86	1	205,483.11
ข้าว	2	75,776.13	2	137,454.19	2	92,993.72	2	98,179.00
กุ้งสดแช่เย็น แช่แข็ง	3	35,921.21	4	108,328.33	3	37,730.33	4	42,828.26
ผลิตภัณฑ์มันสำปะหลัง	4	27,083.95	3	32,530.20	4	33,938.20	3	43,396.64
ไก่แปรรูป	6	15,703.65	5	34,518.05	5	27,338.53	5	28,706.63
ปลาหมึกสดแช่เย็น แช่แข็ง	7	13,50.74	6	20,821.46	6	14,280.11	6	14,009.28
เนื้อปลาสดแช่เย็น แช่แข็ง	8	12,635.57	7	15,166.85	7	13,093.23	8	11,756.45
ผลไม้สดแช่เย็น แช่แข็งและแห้ง	9	9,092.38	8	11,482.25	8	11,814.31	7	12,038.63
ผักสดแช่เย็น แช่แข็งและแห้ง	10	5,418.52	9	7,034.21	9	7,386.97	9	7,154.20
ปลาสด แช่แข็ง แช่แข็ง	11	4,032.41	11	4,686.85	10	5,198.66	10	5,874.15
สัตว์น้ำจำพวกครัสตาเซีย	12	3,310.84	12	3,583.76	11	3,533.32	11	3,317.43
ใบยาสูบ	13	2,829.79	13	2,844.75	13	2,547.35	13	2,766.53

ที่มา : ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร สำนักงานปลัดกระทรวงพาณิชย์ ร่วมกับกรมศุลกากร (กรมส่งเสริมการค้าส่งออก กระทรวงพาณิชย์, ม.ป.ป.)

ตารางที่ 4 สินค้าเกษตรกรรมส่งออกสำคัญของไทยเรียงตามมูลค่า ปี พ.ศ. 2550 - 2553 (ปัจจุบัน) (มูลค่า : ล้านบาท)

สินค้าเกษตรกรรม (ถั่วลิสง, ปศุสัตว์, ประมง)

มูลค่า : ล้านบาท

รายการ	สินค้าเกษตรกรรมส่งออกสำคัญของไทยเรียงตามมูลค่า ปี พ.ศ. 2550 - 2553							
	2550		2551		2552		2553 (ม.ค. - ก.พ.)	
	อันดับ	มูลค่า	อันดับ	มูลค่า	อันดับ	มูลค่า	อันดับ	มูลค่า
ยางพารา	1	194,338.73	1	223,628.23	2	146,263.60	1	42,685.56
ข้าว	2	119,215.43	2	203,219.08	1	172,207.65	2	27,640.72
กุ้งสดแช่เย็น แช่แข็ง	4	42,418.14	5	42,755.25	5	46,098.82	5	6,393.20
ผลิตภัณฑ์มันสำปะหลัง	3	48,552.24	4	47,764.93	3	51,602.22	3	12,439.88
ไก่แปรรูป	5	31,982.65	3	50,275.42	4	47,456.14	4	6,979.71
ปลาหมึกสดแช่เย็น แช่แข็ง	6	14,403.68	8	12,531.91	8	11,187.00	8	1,658.12
เนื้อปลาสดแช่เย็น แช่แข็ง	8	11,433.16	6	14,467.46	7	12,731.61	6	2,049.24
ผลไม้สดแช่เย็น แช่แข็งและแห้ง	7	13,500.08	7	13,583.15	6	17,818.01	7	1,843.49
ผักสดแช่เย็น แช่แข็งและแห้ง	10	6,867.14	11	6,886.52	11	6,702.62	10	1,160.25
ปลาสด แช่แข็ง แช่แข็ง	9	7,609.79	9	8,953.71	10	7,374.25	11	1,083.90
สัตว์น้ำจำพวกครัสเตเชีย	13	3,295.04	12	3,420.13	13	2,935.12	14	463.53
ใบยาสูบ	12	3,362.93	13	3,204.08	15	2,733.66	17	334.03

ที่มา : ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร สำนักงานปลัดกระทรวงพาณิชย์ ร่วมกับกรมศุลกากร (กรมส่งเสริมการค้าส่งออก กระทรวงพาณิชย์, ม.ป.ป.)

จากตารางที่ 1 อาหารทะเลกระป๋องและแปรรูปเป็นสินค้าที่มีปริมาณการส่งออกที่มีมูลค่าอยู่อันดับ 13 ใน 13 อันดับของสินค้าส่งออกที่นำรายได้เข้าประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546 - 2553

จากตารางที่ 2 อาหารทะเลกระป๋องและแปรรูปเป็นสินค้าที่มีปริมาณการส่งออกอยู่อันดับ 13 ใน 13 รายการแรกโดยคิดเป็นร้อยละของสินค้าส่งออกสำคัญของไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546 - 2553

จากตารางที่ 3 และ 4 พบว่าปริมาณการส่งออกสินค้าเกษตรกรรมในส่วนกุ้งสดแช่เย็นแช่แข็ง อยู่ในอันดับ 3 - 5 ซึ่งเป็นสินค้าส่งออกสำคัญที่นำรายได้เข้าประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546 - 2553

ตารางที่ 5 ปริมาณการส่งออกกุ้งของไทยปี พ.ศ. 2549 - 2552 (ตัน : ล้านบาท)

ปี พ.ศ.	ปริมาณการส่งออก (ตัน)	มูลค่า (ล้านบาท)
2549 - 2550	336,818.14	86,274.73
2550 - 2551	350,008.99	80,313.40
2551 - 2552	354,285.28	83,280.06

ที่มา : กรมส่งเสริมการค้าส่งออก กระทรวงพาณิชย์ (ม.ป.ป.)

จากตารางที่ 5 พบว่า การส่งออกกุ้งไทยนั้นมีปริมาณนับล้านตันภายในเวลา 4 ปี (2549 - 2552) ซึ่งคิดเป็นมูลค่ามากกว่าสองแสนล้านบาท ซึ่งนับว่ากุ้งเป็นสินค้าที่นำรายได้เข้าประเทศที่มีมูลค่ามหาศาล

ตารางที่ 6 ตลาดส่งออกกุ้งทุกประเภทที่สำคัญของประเทศไทย ปี พ.ศ. 2543 - 2552 (มูลค่า : ล้านบาท)

มูลค่า : ล้านบาท

ปี พ.ศ.	ตลาดส่งออกสำคัญทุกประเภทของประเทศไทย (ล้านบาท)			
	อาเซียน	ญี่ปุ่น	สหรัฐอเมริกา	สหภาพยุโรป
2543	536,909.66	406,442.22	591,675.75	ไม่มีข้อมูล
2544	557,801.15	439,830.20	584,496.96	ไม่มีข้อมูล
2545	582,130.28	427,023.43	579,071.63	454,479.47
2546	684,943.21	471,956.25	565,094.87	507,836.16
2547	852,487.24	541,487.66	622,496.98	579,457.51
2548	975,867.90	602,899.87	680,321.96	603,096.27
2549	1,029,179.98	623,930.99	740,695.70	685,248.24
2550	1,129,092.27	625,037.13	669,511.38	747,952.79
2551	1,319,391.23	661,565.54	667,746.82	769,773.59
2552	1,106,539.54	536,151.40	567,709.06	618,785.71

ที่มา : ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร สำนักงานปลัดกระทรวงพาณิชย์ โดยความร่วมมือจากกรมศุลกากร (กรมส่งเสริมการส่งออก กระทรวงพาณิชย์, ม.ป.ป.)

จากตารางที่ 6 พบว่าตลาดส่งออกกุ้งทุกประเภท (กุ้งแช่แข็ง กุ้งต้มและกุ้งแปรรูป) ที่สำคัญของไทยไปยังประเทศต่าง ๆ คิดตามมูลค่า ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2543 - 2552 กลุ่มอาเซียนและประเทศญี่ปุ่นมีปริมาณการส่งออกเพิ่มขึ้นในทุก ๆ ปี ส่วนประเทศสหรัฐอเมริกาและสหภาพยุโรปซึ่งถือว่าเป็นตลาดที่สำคัญของการส่งออกกุ้งไทยแต่ปริมาณการส่งออกไม่แน่นอน โดยปริมาณการส่งออกเพิ่มขึ้นและลดลง อาจเนื่องมาจากมีผู้ส่งออกกุ้งคู่แข่งในการตลาดนานาชาติประเทศ

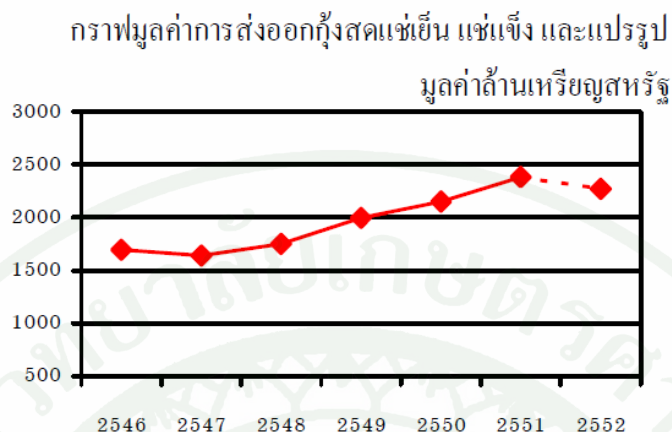
ตารางที่ 7 แสดงตลาดส่งออกกุ้งสดแช่เย็น แช่แข็งและแปรรูป (ไม่รวมกุ้งกระป๋อง) ที่สำคัญของประเทศไทย ปี พ.ศ. 2550 - 2552 (มูลค่า : ล้านดอลลาร์สหรัฐ)

ตลาดส่งออกที่สำคัญ	ตลาดส่งออกกุ้งสดแช่เย็น แช่แข็งและแปรรูป (มูลค่าดอลลาร์สหรัฐ) ปี พ.ศ. 2550 - 2552		
	2550	2551	2552 (ม.ค.-ก.ย.)
สหรัฐอเมริกา	1,113.10	1,202.73	886.39
ญี่ปุ่น	374.01	468.99	383.81
แคนาดา	155.64	141.91	100.65
สหราชอาณาจักร	64.45	79.34	68.71
เยอรมนี	66.76	70.86	61.36
ออสเตรเลีย	57.70	51.15	40.35
เกาหลีใต้	81.56	68.70	39.65
เบลเยียม	28.36	31.07	31.21
สเปน	6.91	32.41	27.17
ฝรั่งเศส	16.26	28.50	22.68
รวม 10 ประเทศ	1,962.95	2,175.66	1,661.98
อื่น ๆ	188.73	204.53	155.71
มูลค่ารวม	2,151.68	2,380.19	1,817.69

ที่มา: กรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์ (ม.ป.ป.)

จากตารางที่ 7 พบว่า ตลาดหลักในการส่งออกสินค้ากุ้ง คือ ประเทศสหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น แคนาดา เยอรมนีและสหราชอาณาจักร คิดเป็นสัดส่วนรวมร้อยละ 82.58 (กรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์, ม.ป.ป.) ปัจจุบันตลาดการค้าแบบเสรีมีการแข่งขันมากขึ้น ทำให้สินค้ามีการพัฒนาคุณภาพเพื่อให้เป็นที่ต้องการของลูกค้า ซึ่งปัจจัยด้านคุณภาพเป็นปัจจัยจำกัดในการส่งออกสู่ต่างประเทศ หากมีการพัฒนาคุณภาพโอกาสการส่งออกอาจมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังเปิดโอกาสให้สินค้าสัตว์น้ำอื่นๆ มีการขยายตัวตามด้วย ดังจะเห็นได้จากมูลค่าการส่งออกกุ้งข้างต้น การวิเคราะห์ปริมาณยาสัตว์ตกค้างในเนื้อกุ้งกุลาดำก่อนการส่งออกต่างประเทศที่ผ่านมาเป็นข้อดกกลางทางการค้าที่มีผลบังคับใช้อย่างเข้มงวดตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546 เนื้อกุ้งก่อนการส่งออกต้องผ่านการวิเคราะห์ปริมาณยาสัตว์ตกค้าง โดยวิธี quantitative analysis และ chemical analysis โดย

การใช้ High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) หรือ Gas Chromatography (GC) (นิรนาม, ม.ป.ป.)



ภาพที่ 2 กราฟมูลค่าการส่งออกกุ้งสดแช่เย็น แช่แข็งและแปรรูป (มูลค่า : ล้านเหรียญสหรัฐ)

ที่มา: กรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์ (ม.ป.ป.)

จากภาพที่ 2 พบว่า ปริมาณการส่งออกกุ้งสดแช่เย็น แช่แข็งและแปรรูปคิดเป็นมูลค่าล้านเหรียญสหรัฐมีปริมาณเพิ่มขึ้นตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2547 แสดงให้เห็นถึงความต้องการในการบริโภคเนื้อกุ้งในสหรัฐอเมริกา ซึ่งถือเป็นตลาดหลักในการส่งสินค้าออกไปยังต่างประเทศ

ปัญหาการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม

1. การอนุบาลกุ้ง - การจับกุ้งส่งขาย อาจเกิดปัญหาเหล่านี้ระหว่างการเพาะเลี้ยงได้ เช่น

1.1 การจัดการส่วนต่าง ๆ ไม่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงกุ้ง ทำให้เกิดปัญหาต่างๆ ตามมาได้ เช่น คุณภาพน้ำที่ใช้ในการอนุบาลกุ้งก้ามกราม สภาพพื้นบ่อ การปล่อยลูกกุ้งในปริมาณหนาแน่นเลี้ยงกุ้งก้ามกรามแบบหนาแน่นสูง แล้วทยอยจับขายตลอดการเลี้ยง 12-14 เดือน เพื่อให้ได้ผลผลิตตลอดปีและรายได้เพิ่มขึ้น ก่อให้เกิดปัญหากับสุขภาพกุ้ง อัตราการตายสูง กุ้งอ่อนแอ ทำให้การเจริญเติบโตช้า และกุ้งมีขนาดเล็กทำให้ผลผลิตที่ได้มีคุณภาพไม่ดีไม่เป็นไปตามความต้องการของตลาดและผู้บริโภค (ชลอ, ม.ป.ป.)

1.2 อาหารและอัตราการให้อาหาร อาหารที่ให้อาหารควรมีคุณภาพและส่วนประกอบของอาหารที่เหมาะสมกับช่วงอายุของกุ้งที่ทำการเพาะเลี้ยง ไม่มีการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราและเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ควรให้อาหารในปริมาณที่พอเหมาะ ไม่ควรให้มากหรือน้อยเกินไป เพราะถ้าให้อาหารปริมาณมากและเหลือตกค้าง จะทำให้น้ำสกปรก เกิดการสะสมของอาหารและเกิดแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค รวมทั้งก่อให้เกิดก๊าซแอมโมเนียซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้กุ้งอ่อนแอ (กรมประมง, 2545)

1.3 ความสะอาดของบริเวณโรงเพาะฟักกุ้ง ไม่ควรปล่อยให้เกิดความสกปรกในบริเวณโรงเพาะเลี้ยงและรอบ ๆ บริเวณโรงเพาะฟักกุ้ง รวมทั้งไม่ให้มีสัตว์ที่เป็นพาหะนำโรคชนิดต่าง ๆ ด้วย

2. โรคต่าง ๆ ที่เกิดขึ้น

2.1 อาจเกิดจากสาเหตุโน้มนำจากปัจจัยหลายอย่าง เช่น การจัดการ คุณภาพน้ำ คุณภาพและส่วนประกอบของอาหาร สารพิษจากเชื้อราและจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ สภาพของพื้นบ่อ ฯลฯ (ชลอ, ม.ป.ป.) แล้วเกิดการติดเชื้อแบคทีเรียที่ภายหลัง สัตว์น้ำที่เป็นโรคติดเชื้อแบคทีเรีย ส่วนใหญ่ไม่ก่อให้เกิดการตายอย่างฉับพลัน (ลิลา และ ชัยวุฒิ, 2547)

2.2 เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ เช่น

- ไฮโดรซัย เช่น *Obelia* เป็นต้น

- โปรโตซัว เช่น *Zoothamnium sp.*, *Epistylis sp.*, *Vorticella sp.*, *Acienta sp.* และ *Tokophrya sp.* เป็นต้น

- แบคทีเรีย ที่ก่อให้เกิดโรค เช่น *Vibrio sp.*, *Aeromonas sp.*, *Pseudomonas sp.* และ *Leucethrix sp.* เป็นต้น (กรมประมง, 2545)

แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคส่วนใหญ่เป็นพวก *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio anguillarum* และ *Vibrio Harveyi* (Reed et al., 2004) ทำให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น ขี้ขาว แก้มดำ ที่จีและคอบวมค่อนอก (บริษัทออลเวท, ม.ป.ป)

- เชื้อรา เช่น *Leginidium sp.* และ *Fusarium sp.* เป็นต้น

- ไวรัส เช่น ไวรัสหัวเหลือง (Yellow-Head Baculovirus (YBV)) และ Taura Syndrome Virus (TSV) เป็นต้น (ลิลา และ ชัยวุฒิ, 2547)

- Red tide เช่น *Gymnodinium sp.*, *Gonelas sp.* และ *Noctiluca sp.* เป็นต้น (กรมประมง, 2545)

3. การใช้อยาปฏิชีวนะและสารเคมีต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยง รวมถึงการให้ยาและสารเคมีเป็นสารส่งเสริมการเจริญเติบโตและในการรักษาโรคติดเชื้อในกุ้ง เกษตรกรควรปรึกษานักวิชาการเพื่อวิเคราะห์สาเหตุและวิธีการรักษาควรปฏิบัติตามคำแนะนำของนักวิชาการ และไม่ควรให้ยาเกินความจำเป็นหรือใช้อยาปฏิชีวนะที่ไม่อนุญาตให้ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ รวมถึงขนาดหรือปริมาณของยาและสารเคมีที่ใช้ การให้ยาหรือสารเคมีในขนาดที่สูงหรือต่ำเกินไป อาจก่อให้เกิดการตกค้างของยาหรือสารเคมี ในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่มากเกินกว่าระดับการตกค้างของยาสูงสุดที่อนุญาตตามข้อกำหนด ซึ่งก่อให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพอนามัยของผู้บริโภคจากการใช้ยาต้านจุลชีพในสัตว์ที่คนนำมาบริโภค และป้องกันการเกิดการดื้อยาของจุลชีพ โดยการป้องกันหรือลดการถ่ายทอดจุลชีพที่ดื้อยาหรือยีนของการดื้อยาภายในสัตว์ชนิดนั้น สู่คนทั้งทางตรงและทางอ้อม (นิรนาม, 2550)

เมื่อเกิดปัญหาดังกล่าวทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงมีต้นทุนการผลิตเพิ่มขึ้น รวมถึงผลผลิตลดน้อยลง เกษตรกรจึงให้ยาปฏิชีวนะป้องกันก่อนเกิดโรค และการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจำเป็นต้องใส่ยาปฏิชีวนะในน้ำ เพื่อช่วยทำลายแบคทีเรียที่จะก่อให้เกิดผลกระทบต่อกุ้งและเมื่อปล่อยน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะ ทำให้ยาปฏิชีวนะที่มีปริมาณและความเข้มข้นต่ำตกค้างในสิ่งแวดล้อมรอบ ๆ แหล่งเพาะเลี้ยง ซึ่งอาจไปกระตุ้นให้แบคทีเรียชนิดอื่นในบริเวณนั้น เกิดการดื้อยาได้ และแบคทีเรียเหล่านั้น สามารถถ่ายทอดการดื้อยาสู่แบคทีเรียชนิดอื่น (บัญญัติ, 2549) และก่อให้เกิดปัญหาการดื้อของแบคทีเรียต่อยาปฏิชีวนะได้ รวมทั้งระยะเวลาที่ให้อยาปฏิชีวนะและการนำผลผลิตมาจำหน่ายโดยไม่มีระยะเวลาหยุดยักก่อนนำกุ้งจำหน่าย ก่อให้เกิดการตกค้างของยาปฏิชีวนะหรือสารเคมีในเนื้อกุ้งก้ามกราม เมื่อผู้บริโภคนำกุ้งมาประกอบอาหารก่อให้เกิดการตกค้างของยาในร่างกาย หากได้รับยาในปริมาณต่ำและเป็นระยะเวลานาน ปัญหาดังกล่าวคือการดื้อยาของแบคทีเรียที่เกิดโรคในคนเกิดการดื้อยาได้

ปัญหาการส่งออก

เมื่อมีการใช้อยาปฏิชีวนะและก่อให้เกิดสารตกค้างในตัวกุ้ง และเมื่อส่งออกกุ้งไปขายยังต่างประเทศ ซึ่งมีมาตรการเข้มงวดในการกักกันสินค้าเพื่อตรวจสอบสารตกค้างและตรวจพบสารตก

ค้างในกึ่งส่งออก สินค้าทั้งหมดที่นำเข้าจะถูกทำลาย ทำให้เกิดความเสียหายต่อเศรษฐกิจการค้าระหว่างประเทศอย่างมาก สำหรับข้อมูลการตรวจวิเคราะห์ สารปฏิชีวนะออกซีเตตราไซคลิน (oxytetracycline) ตกค้างในกึ่งกุลาค้าแช่เยือกแข็งส่งออก ระหว่างปี พ.ศ. 2537 - 2541 (ตารางที่ 8) จำนวนทั้งสิ้น 5,205 ตัวอย่าง พบสารออกซีเตตราไซคลินคิดเป็นร้อยละ 1.15 ของตัวอย่างทั้งหมด ค่าที่ตรวจพบอยู่ในช่วง 0.10 - 3.31 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตัวอย่างที่ตรวจพบปริมาณออกซีเตตราไซคลินสูงกว่าค่า MRL เท่ากับร้อยละ 0.77 ของตัวอย่างทั้งหมด เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์ในตัวอย่างแต่ละปีดังนี้

ตารางที่ 8 การตรวจวิเคราะห์สารปฏิชีวนะออกซีเตตราไซคลิน ปี พ.ศ. 2537 - 2541

ปี พ.ศ.	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนที่พบ (ร้อยละ)	ระดับความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
2537	1478	1.49	0.16 – 0.49
2538	1567	0.77	0.14 – 1.46
2539	1055	1.14	0.13 – 3.31
2540	628	1.75	0.13 – 0.69
2541	477	0.63	0.10 – 2.05

แสดงให้เห็นถึงการตกค้างของออกซีเตตราไซคลินในกึ่งส่งออก จำเป็นที่ภาครัฐและภาคเอกชนต้องให้ความเข้าใจในการควบคุมการใช้ และการตกค้างของยาเพื่อไม่ให้เกิดปัญหาในการส่งออก ซึ่งปัญหาการตกค้างของยาด้านจุลชีพในกึ่ง มักเกิดจากความไม่เข้าใจในการใช้ยาด้านจุลชีพที่ถูกต้อง เพื่อป้องกันและรักษาโรคในฟาร์มเลี้ยงกึ่ง

มีการศึกษาสารเคมีและสารชีวภาพที่ใช้ในฟาร์มเลี้ยงกึ่งในประเทศไทย (ตารางที่ 9) จากฟาร์มเพาะเลี้ยงกึ่งจำนวน 76 แห่ง (74 เปอร์เซนต์) พบว่ามีการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะกลุ่ม sulfonamides, fluoroquinolone, tetracycline (ตารางที่ 10) เพื่อป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรีย (Gräslund *et al.*, 2003)

ตารางที่ 9 สารเคมีและสารชีวภาพที่ใช้ในฟาร์มเลี้ยงกุ้งจำนวน 76 ฟาร์มในประเทศไทย

ชนิดสารเคมีและสารชีวภาพ	จำนวนฟาร์ม
Fertilisers	48
Pesticides and disinfectants	73
Antibiotic	56
Soil and water treatment compounds	76
Microorganism products	65
Immunostimulants	5
Vitamins	58
Feed additives	59
Uncertain group	4

ที่มา Gräslund *et al.* (2003)

ตารางที่ 10 การสำรวจชนิดและจำนวนยาปฏิชีวนะที่มีการใช้ในฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งจำนวน 76 ฟาร์มในประเทศไทย

ชนิดยาปฏิชีวนะ	จำนวนฟาร์ม
Sulfonamides	10
- Sulfamethazine	1
- Unidentifide sulfonamides	9
Fluoroquinolones	34
- Norfloxacin	28
- Enrofloxacin	9
- Ciprofloxacin	2
- Perfloxacin	1
Non-fluorinated quinolones	2
- Oxolinic acid	2
Unidentified quinolone	1
Tetracycline	20
- Oxytetracycline	17
- Chlortetracycline	1
- Tetracycline	2
Chloramphenicol	2
Gentamicin	3
Trimethoprim	1
Tiamulin	1
Unidentified antibiotics	25

ที่มา Gräslund *et al.* (2003)

ตารางที่ 11 ยาปฏิชีวนะที่อนุญาตให้ใช้ในสัตว์น้ำเพื่อบริโภคของประเทศหรือหน่วยงานต่าง ๆ

หน่วยงาน / ประเทศ	ยาปฏิชีวนะที่อนุญาตให้ใช้ในสัตว์น้ำ	อ้างอิงจาก
- Food and Drug Administration (FDA) USA	Oxytetracycline dehydrate, Florfenicol และ Sulfadimethoxine/ormetoprim	FAO/NACA/WHO (1999)
- China	Sulfonamide, Nystatine, Terramycin, Aureomycin, Penicillin, Streptomycin, Doxycycline, Erythromycin and Oxolinic acid	Hernández (2005)
- India	Oxytetracycline, Sulfadiazine+trimethoprim and Chlor-tetracycline	Hernández (2005)
- Indonesia	Oxytetracycline, Erythromycin, Streptomycin, Neomycin, Enrofloxacin	Hernández (2005)
- United Kingdom	Oxytetracycline, Oxolinic acid, Amoxicillin และ Co-trimazine (trimethoprim+sulfadiazine)	FAO/NACA/WHO (1999)
- Norway	Benzyl penicillin/dihydrostreptomycin, Florfenicol, Flumequine, Oxolinic acid, Oxytetracycline, Trimethoprim-sulphadiazine (1:5)	Alderman, D.J. and T.S. Hastings (1998); FAO/NACA/WHO (1999)

จากตารางที่ 11 พบว่าในแต่ละประเทศมีการอนุญาตให้ใช้ยาปฏิชีวนะที่แตกต่างกันในสัตว์น้ำ ซึ่งในส่วนของประเทศไทยโดยคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข ดำเนินการรับรองมาตรฐานยาสำหรับสัตว์น้ำหรือการขึ้นทะเบียนตำรับยาสัตว์น้ำ จัดทำเอกสารกำกับมาตรฐานสำหรับกุ้งและปลา ได้แก่ เอกสารกำกับยา oxytetracycline, enrofloxacin, sulfadimethoxine/ormetoprim และ sulfadimethoxine/trimethoprim รวมถึงยาและสารเคมีหลายชนิดที่ได้รับการขึ้นทะเบียนตำรับยาหรืออาหารเสริมสำหรับสัตว์น้ำ ยาหรือสารออกฤทธิ์ที่นำมาใช้ในฟาร์มกุ้งต้องเป็นชนิดที่สามารถใช้ในสัตว์ที่เป็นอาหาร (food producing animal) (นิรนาม, ม.ป.ป)

เภสัชจลนศาสตร์

เภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetics) หมายถึง การศึกษาอิทธิพลของร่างกายที่มีผลต่อยาหรือสารต่างๆ ที่เข้าสู่ร่างกาย เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับยาในพลาสมากับเวลา ภายหลังการให้ยา โดยมีกระบวนการสำคัญที่ร่างกายกระทำต่อยา 4 กระบวนการ คือ การดูดซึมยา (drug absorption) การแพร่กระจายตัวของยา (drug distribution) การเปลี่ยนแปลงทางเมตาโบลิซึม (drug biotransformation) และการขับออกของยา (drug excretion)

1. การดูดซึมยา หมายถึง กระบวนการเคลื่อนตัวของยาจากบริเวณที่ให้เข้าสู่กระแสเลือด ซึ่งยาจะต้องมีคุณสมบัติในการละลายในไขมันได้ดี ไม่แตกตัวเป็นไอออน (nonionized form) และโมเลกุลขนาดเล็กสามารถผ่านช่อง (pore) เล็ก ๆ ของเยื่อชีวภาพ (biological membrane) ได้ การที่ยาจะออกฤทธิ์และเกิดผลต่อร่างกายขึ้นกับปัจจัยดังนี้

1. ยาต้องมีการดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย

2. ตำแหน่งหรือบริเวณที่ยาจะออกฤทธิ์ ต้องมีความเข้มข้นของยามากพอที่จะทำปฏิกิริยากับตัวรับ

3 ปัจจัยอื่น เช่น วิธีการให้ยา ผลึกภัณฑ์ยา สุขภาพสัตว์ คุณสมบัติทางเคมีของยา

ชีวปริมาณออกฤทธิ์ (Bioavailability) เป็นพารามิเตอร์ที่สำคัญทางเภสัชจลนศาสตร์ แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดยาและประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของยา และยังเป็นค่าที่บ่งบอกถึงอัตราและปริมาณการดูดซึมของยาเข้าสู่ระบบหมุนเวียนเลือด

2. การแพร่กระจายตัวของยา (drug distribution) หมายถึง ยาจะมีการแพร่กระจายไปยังเนื้อเยื่อที่ยาจะไปออกฤทธิ์ ระดับความเข้มข้นของยาในบริเวณหรือตำแหน่งนั้น ขึ้นกับความสามารถในการแทรกตัวผ่าน capillary endothelium ความสามารถในการเคลื่อนผ่านเยื่อชีวภาพ และการขจัดยาออกนอกร่างกาย

ยาที่มีขนาดโมเลกุลขนาดเล็กและละลายได้ดีในไขมัน การกระจายตัวจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ยาที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่จะมีการกระจายตัวเฉพาะในหลอดเลือดเท่านั้น พารามิเตอร์ที่เป็นกรณีเปรียบเทียบการแพร่กระจายตัวไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย คือ volume of distribution (Vd) หรืออาจเรียกกันว่า apparent volume of distribution เพราะการกระจายตัวของยาไปยังน้ำหล่อเลี้ยงของร่างกายนั้นจะมีบางส่วนจับตัว (binding) กับโปรตีนตามเนื้อเยื่อต่าง ๆ ซึ่งทางเภสัชจลนศาสตร์ หมายถึง อัตราส่วนคงที่ของปริมาณยาที่อยู่ในร่างกายและระดับความเข้มข้นของยาในกระแสเลือด

Vd มีหน่วยเป็นลิตรต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว (l/kg) ถ้าค่า Vd ที่ได้จากการคำนวณมีค่าต่ำ บ่งบอกถึงการแพร่กระจายตัวของยาในเนื้อเยื่อไม่ดี ปริมาณยาส่วนใหญ่อยู่ในพลาสมาหรือระดับยาที่จับกับโปรตีนในพลาสมาสูง ความสามารถในการซึมผ่านเยื่อชีวภาพต่ำหรือยาที่มีการสะสมในเนื้อเยื่อที่เป็นไขมันมาก ทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงหรือขับออกจากร่างกายได้ ส่วนโปรตีนที่ยาส่งส่วนใหญ่เข้าไปจับ คือ อัลบูมิน (albumin)

แบบจำลองการกระจายตัวของยา (compartment models) หมายถึง แบบจำลองที่แสดงถึงการแพร่กระจายตัวของยา หรืออธิบายกระบวนการเปลี่ยนแปลงของยาในร่างกายภายหลังให้ยาเข้าสู่ร่างกาย ซึ่งประกอบด้วยพื้นที่หรือบริเวณที่มีการกระจายตัวของยาอยู่ 2 ส่วนหลัก ๆ คือ

1. Central compartment หมายถึง เนื้อเยื่อที่มีเลือดไปเลี้ยงมาก ๆ เช่น ปอด ตับ ไต เป็นต้น
2. Peripheral compartment หมายถึง เนื้อเยื่อที่มีเลือดไปเลี้ยงน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ central compartment เช่น กระดูก กล้ามเนื้อ ผิวหนัง ไขมันและอวัยวะอื่น ๆ ของร่างกาย เป็นต้น

แบบจำลองทางเภสัชจลนศาสตร์ที่แสดงถึงกระบวนการถ่ายเทของยาในร่างกาย ภายหลังจากให้ยาเข้าสู่ร่างกายสัตว์ แบ่งออกได้เป็น 3 แบบ คือ

1. One compartment models การถ่ายเทของยาอย่างรวดเร็วระหว่างเลือดกับเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของร่างกาย การแพร่กระจายของยาจะกลับเข้าสู่ระบบหมุนเวียนเลือดอย่างรวดเร็ว

2. Two compartment models กระบวนการแพร่กระจายตัวของยาลังเข้าสู่ร่างกาย วัดระดับความเข้มข้นของยาในกระแสเลือด เท่ากับ C_1 หลังยามีการแพร่กระจายไปยังเนื้อเยื่อต่างๆ ของร่างกาย วัดระดับความเข้มข้นของยาในกระแสเลือดเท่ากับ C_2 และเกิดกระบวนการขจัดยาออกนอกร่างกาย ทำให้ระดับความเข้มข้นของยาในกระแสเลือดลดลงด้วย

3. Multi-Compartment Models (Three Compartment Models) แบบจำลองนี้พบบ่อยในขั้นต้น ใช้แสดงหรืออธิบายเกี่ยวกับยาที่มีการแพร่กระจายไปยัง deep tissue ที่มีความซับซ้อนมากกว่าแบบ one compartment models และ two compartment models

3. การเปลี่ยนแปลงทางเมตาบอลิซึมของยา (drug biotransformation) หมายถึง เป็นการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเคมีของโมเลกุลยา สารที่เกิดขึ้นหลังเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเมตาบอลิซึมเรียกว่า เมตาบอไลต์ (metabolite) มีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดี ละลายในไขมันได้น้อยลง เป็นโมเลกุลที่มีขั้วและถูกขับออกทางปัสสาวะและน้ำดี

การเปลี่ยนแปลงยาส่วนใหญ่เกิดขึ้นที่ตับ โดยการทำงานของเอนไซม์ใน smooth endoplasmic reticulum ในตับ ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงยาทั้งที่เป็นประโยชน์หรือพิษต่อร่างกาย

ลักษณะการเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงทางเมตาบอลิซึมของยาในร่างกาย สามารถแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ

1. Phase I reaction (non-synthetic reaction) ขั้นตอนปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น คือ oxidation, reduction และ hydrolysis จะได้เมตาบอไลต์ที่มีฤทธิ์น้อยลงหรือไม่มีเลย หรืออาจมีฤทธิ์มากขึ้นก็ได้

2. Phase II reaction (conjugation หรือ synthetic reaction) ขั้นตอนปฏิกิริยานี้เป็นการ

รวมตัวของยาหรือเมตาบอไลต์กับสารประกอบในร่างกาย (conjugating agent) อาจเป็น glucuronic acid, acetate, glycine หรือ sulfate ซึ่งการเปลี่ยนแปลงมักทำให้ยาอยู่ในรูปที่ไม่มีฤทธิ์ และเพิ่มการขับออกภายนอกร่างกาย

4. การขับถ่ายยาออกจากร่างกาย (drug excretion) หมายถึง การขจัดยาหรือเมตาบอไลต์ที่ถูกเปลี่ยนแปลงทางเมตาบอลิซึม ซึ่งยาที่จะถูกขับออกทางปัสสาวะได้ดีต้องละลายในน้ำได้ดี อวัยวะที่ทำหน้าที่ในการขับยาออกจากร่างกายส่วนใหญ่ คือ ไต การขับออกของยานั้นจะขึ้นอยู่กับปัจจัย 2 ประการที่สำคัญ คือ

1. คุณสมบัติการละลายในไขมันของยา
2. ปริมาณยาที่แตกตัวเป็นไอออนของยา

อัตราเร็วในการขจัดยาออกจากร่างกาย (rate of drug elimination) การหาปริมาณยาที่ถูกขับออกจากร่างกาย นำค่าครึ่งชีวิตของยา (elimination half life; $t_{1/2\beta}$) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับค่า elimination rate constant หรือ $K_{(el)}$ ถ้าค่าครึ่งชีวิตของยามีค่าน้อยลง ทำให้ค่า elimination rate constant หรือ $K_{(el)}$ มีค่ามากขึ้น

การขับถ่ายยาและเมตาบอไลต์ของยาสามารถขับออกได้หลายทาง ได้แก่

1. การขับถ่ายยาโดยผ่านทางไต (renal excretion) เป็นกระบวนการหลักในการขจัดยาที่สามารถแตกตัวเป็นไอออนในความเป็นกรด-ด่างปกติของร่างกาย และมีขีดจำกัดในการละลายในไขมัน ยาบางชนิดอาจถูกขับออกทางไตในรูปที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง เช่น ยาปฏิชีวนะ cephalosporins, aminoglycosides, oxytetracycline เป็นต้น

กลไกการขับถ่ายยาผ่านทางไต เกิดได้หลายวิธี เช่น การกรองผ่านโกลเมอรูลัส (glomerular filtration) ของโมเลกุลยอิสระในพลาสมา การขับออกที่ส่วนต้นของท่อไต (proximal tubular cells) และการดูดซึมกลับที่ส่วนปลายของหน่วยไต (distal portion of nephron) เป็นต้น

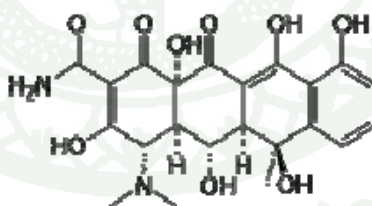
ส่วนประกอบที่สามารถละลายในไขมันได้ดีและแตกตัวเป็นไอออนได้สูงในพลาสมา จะถูกขับออกจากร่างกายผ่านทางไตอย่างรวดเร็ว สารประกอบที่สามารถละลายในไขมันได้ดีสูงและแตกตัวเป็นไอออนได้ดีหรือไม่แตกตัวในพลาสมา จะถูกขับออกจากร่างกายผ่านทางไตช้ามาก เนื่องจากมียาบางส่วนถูกดูดซึมกลับสู่กระแสเลือด

2. การขับถ่ายยาผ่านทางน้ำดี (biliary excretion) บางส่วนของยาที่มีคุณสมบัติการละลายน้ำได้ดีและมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 500 จะมีการดูดซึมกลับเข้าไปในหลอดเลือดของตับ แล้วขับออกทางน้ำดีโดยอาศัยพลังงานและตัวพาเป็นตัวช่วย

3. การขับถ่ายยาทางอื่น เช่น ทางลำไส้ ทางน้ำลาย ทางปอด ทางน้ำนม และทางเหงื่อ เป็นต้น

Oxytetracycline

ยาในกลุ่มเตตราไซคลิกไลน์ใช้แพร่หลายในสัตว์ ได้แก่ เตตราไซคลิก (tetracycline), อ็อกซีเตตราไซคลิก (oxytetracycline), คลอเตตราไซคลิก (chlortetracycline) และด็อกซีไซคลิก (doxycycline)



ภาพที่ 3 โครงสร้างของยาอ็อกซีเตตราไซคลิก

อ็อกซีเตตราไซคลิกผลิตจากเชื้อ *Streptomyces rimosus* ที่แยกได้จากดิน ในปี พ.ศ. 2495 ขอบเขตในการออกฤทธิ์กว้าง (broad spectrum) ต่อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ริกเกตเซีย (rickettsia) โปรโตซัว (protozoa) และไวรัสบางชนิด (มาลินี, 2540) แต่ไม่มีผลต่อยีสต์ ราเหือก (molds) และเชื้อราอื่นๆ

ยาเตตราซัยคลินมีลักษณะเป็นผลึกสีเหลือง น้ำหนักโมเลกุล 460.44 รสขมและละลายน้ำได้ดีเมื่ออยู่ในรูปเกลือโซเดียมหรือไฮโดรคลอไรด์ หรือละลายได้ดีในภาวะที่เป็นกรด มีฤทธิ์สูงสุดที่ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ระหว่าง 5.5 - 6 และเกิดการสลายตัวได้ง่ายหากอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างไม่เหมาะสม เตตราซัยคลินออกฤทธิ์โดยไปขัดขวางการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ของแบคทีเรียทำให้มีผลยับยั้งหรือขัดขวางการเจริญเติบโตหรือการขยายตัวของแบคทีเรีย และถ้าปริมาณยามีความเข้มข้นสูงจะไปขัดขวางการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทุกชนิดด้วย

กลุ่มยาเตตราซัยคลินแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ดังนี้

1. ยาที่ผลิตจากจุลชีพ ผลิตโดยเชื้อ *Streptomyces spp.* ได้แก่ อ็อกซีเตตราซัยคลินและคลอเตตราซัยคลิน
2. ยาทั้งสังเคราะห์ เป็นยาที่ส่วนนิวเคลียสของโครงสร้างแยกได้จากจุลชีพ *Streptomyces* และส่วนที่เหลือได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีจากส่วนนิวเคลียสที่แยกได้จากจุลชีพ ยาในกลุ่มนี้ได้แก่ เตตราซัยคลิน ด็อกซีซัยคลิน ดีเมททิลคลอเตตราซัยคลิน เมทราซัยคลิน มิโนซัยคลินและโรลิเตตราซัยคลิน

การผสมยาในอาหารสัตว์น้ำที่นิยมมี 2 รูปแบบ คือ

- การคลุกยากับอาหารแล้วเคลือบด้วยน้ำมันปลา ไข่ขาวหรือกล้วย (สุปราณี และคณะ, 2545)
- การใช้ยาผสมในอาหารสำเร็จรูปแล้วฝังลมให้แห้งหรือหมาก่อนนำไปใช้ ไม่ควรให้โดนแสงแดดโดยตรง เพื่อป้องกันการสลายตัวของยา (สุปราณี และคณะ, 2545)

ในกึ่งกลาดำแนะนำให้ใช้ยาอ็อกซีเตตราซัยคลินผสมอาหาร ขนาด 3-5 กรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักอาหาร เนื่องจากระดับความเข้มข้นของยาอ็อกซีเตตราซัยคลินสามารถคงอยู่เหนือระดับ MIC ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Brillantes *et al.*, 2001)

ปัจจุบันมีรายงานการศึกษายาอ็อกซีเตตราซัยคลินในสัตว์น้ำหลายชนิด ส่วนใหญ่เป็น การศึกษาในกุ้งกุลาดำโดยให้อาหารผสมยา เช่น การศึกษาการแพร่กระจายอ็อกซีเตตราซัยคลินใน กุ้งกุลาดำ (อาสรา, 2536) ตรวจสอบการตกค้างของยาอ็อกซีเตตราซัยคลินในเนื้อกุ้งกุลาดำ ที่ให้ยา ผสมอาหารกุ้งที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ นานติดต่อกันเป็นเวลา 7 วัน โดยวิธี microbiological assay และวิธี HPLC (มณฑิรา, 2543) รายงานผลของยาอ็อกซีเตตราซัยคลินต่อการเจริญเติบโตและ การตกค้างในกุ้งกุลาดำ (วรรณภา, 2544) และรายงานการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์เปรียบเทียบและ การดูดซึมของยาอ็อกซีเตตราซัยคลินในกุ้งกุลาดำ โดยการฉีดเข้ากระแสเลือด (intramuscular administration) และป้อนเข้าปาก (oral administration) วิเคราะห์หาปริมาณยา ณ ช่วงเวลาต่าง ๆ กัน โดยวิธี HPLC (Sangrungruang *et al.*, 2004) และการศึกษาในกลุ่มด้านจุลชีพ การตกค้างของยา และระยะปลอดยาในกุ้งกุลาดำ โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ป้อนให้กินและผสมยาในอาหารเม็ดติด ต่อกัน 5 วัน (มาลินี และคณะ, 2537) กุ้งแชบ๊วย โดยศึกษาปริมาณการตกค้างของอ็อกซีเตตราซัยคลินในกุ้งแชบ๊วย โดยวิธี HPLC (วลัย และ ปิยาลัย, ม.ป.ป) กุ้งขาว โดยการศึกษาการเปรียบ เทียบผลตรวจยาปฏิชีวนะตกค้างหลังการหยุดยาอ็อกซีเตตราซัยคลิน ซัลฟาเม็ทท็อกซาโซล ซัลฟา เม็ทท็อกซาโซล+ทรีเมโทพริมและเอ็นโรฟล็อกซาซินในกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) โดยวิธี microbiological assay และชุดตรวจสอบยาปฏิชีวนะตกค้างแซมเทสต์ (ธงชัย, 2548) และมีรายงาน การศึกษาค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์ของยาอ็อกซีเตตราซัยคลินในอีโมลิมฟ์กุ้ง *Penaeus monodon* (Sangrungruang *et al.*, 2004) ในกุ้ง *Penaeus japonicus* (Uno, 2004) เช่นเดียวกับรายงานในกุ้ง ชนิดอื่น (Chiayvareesajja *et al.*, 2006; Reed *et al.*, 2006; Uno, 2002)

ความเป็นพิษ

เมื่อผู้บริโภครับประทานเนื้อสัตว์ที่มียาตกค้าง อาจเกิดผลกระทบต่อระบบทางเดินอาหาร เช่น มีอาการท้องร่วง เป็นพิษต่อกระดูก ฟัน ไต และทำให้ภูมิคุ้มกันของร่างกายลดลงหรือ บกพร่อง (immunosuppressive effect) (สถาบันอาหาร, 2546) และมีผลทำลายตับและทำให้เกิดการ คื้อยาได้ (Weifen *et al.*, 2004)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ภาคสนาม

1.1 อุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงกุ้งก้ามกราม

1.1.1 โรงเรือนเลี้ยงกุ้ง แบบปิด ซึ่งมีหลังคาและพลาสติกกันลมโดยรอบ ทำความสะอาดและฆ่าเชื้อตามหลักมาตรฐานสากล

1.1.2 บ่อเลี้ยงกุ้ง บ่อซีเมนต์ กว้าง 2 เมตร สูง 0.8 เมตร มีรูและท่อพลาสติกตรงกลางเพื่อปล่อยน้ำ

1.1.3 กระชังสำหรับใส่กุ้ง เป็นกระชังพลาสติก พื้นบุด้วยตาข่าย มีช่องสำหรับใส่และนำกุ้งออกมา

1.1.4 กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) คณะเพศ ไม่มีโรค แข็งแรง สุขภาพดี อายุ 6-7 เดือน

1.1.5 อุปกรณ์ให้ออกซิเจน

1.1.6 คุณภาพของน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งก้ามกราม (ตารางผนวก ที่ 1)

1.1.7 อาหารกุ้งก้ามกราม (ตารางผนวกที่ 2)

1.2 ยาออกซิเตตราซัยคลิน (บริษัท Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA)

1.3 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการเก็บอีโมลิฟและเนื้อกุ้งก้ามกราม

1.3.1 หลอดฉีดยาขนาด 1 และ 3 มิลลิลิตร

1.3.2 เข็มฉีดยาเบอร์ 22 หรือ 23 ยาว 1 นิ้ว

1.3.3 เข็มป้อนยาสำหรับการให้กินโดยตรง

1.3.4 สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (heparin)

1.3.5 หลอดทดลองสำหรับเก็บเลือดขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร

1.3.6 ถังพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่างเนื้อกึ่ง

1.3.7 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) (รุ่น H-11NA KOKUSAN บริษัท KOKUSAN, Japan)

1.3.8 หลอดเก็บพลาสมาขนาด 2 มิลลิลิตร (microtube)

1.3.9 ตู้แช่แข็ง - 20 องศาเซลเซียส (บริษัท SANYO Thailand)

2. อุปกรณ์ห้องปฏิบัติการ

2.1 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดยาลูกศรที่ตรวจหาพิษจากฮีโมโกลินและเนื้อกึ่งกล้ามเนื้อเพื่อวิเคราะห์โดยวิธีทางจุลชีววิทยา

2.1.1 สารละลาย Na_2EDTA -Mc Ilvaine Buffer (A) pH 4.0 (ภาคผนวก)

2.1.2 Tryptic Soy Broth รุ่น Bacto™ (ยี่ห้อ BD บริษัท Becton, France)

2.1.3 Muller Hinton Agar รุ่น Difco™ (ยี่ห้อ BD บริษัท Becton, France)

2.1.4 น้ำกลั่น (distilled water)

2.1.5 Hydrochloric acid

2.1.6 เครื่องปั่นละเอียดเนื้อเยื่อ (Homogenizer) (รุ่น T 25-S1 Blade-type Homogenizer บริษัท IKA, Germany)

2.1.7 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) (รุ่น H-103N SERIES บริษัท KOKUSAN, Japan)

2.1.8 เครื่องชั่งน้ำหนัก 2 ตำแหน่ง (รุ่น BJ 1000 C บริษัท Precisa, Switzerland)

2.1.9 เครื่องกวนสารละลายแบบมีความร้อน (hot plate stirrer) (รุ่น RH digital KT/C บริษัท IKA, Germany)

2.1.10 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) (บริษัท BECKMAN, USA)

2.1.11 หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร

2.1.12 เครื่องนึ่งไอน้ำความดันสูง (autoclave) (รุ่น HA 240 M บริษัท HIRAYAMA, Japan)

2.1.13 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิได้ (waterbath) (รุ่น BS-01 บริษัท Medic, Thailand)

2.1.14 เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) (รุ่น G-560E บริษัท Scientific, USA)

2.1.15 เครื่องวัดอัตราการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (รุ่น Novaspec II บริษัท Pharmacia, England)

2.2 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

2.2.1 ตู้บ่มเชื้อปรับอุณหภูมิได้ (incubator) (รุ่น B 26 บริษัท Memmert, Germany)

2.2.2 Auto pipette ขนาด 20-200 ไมโครลิตร (ยี่ห้อ Gilson)

2.2.3 เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) (รุ่น G-560E บริษัท Scientific, USA)

2.2.4 อุปกรณ์วัด inhibition zone (vernier caliper)

2.3 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดตัวอย่างเนื้อกึ่งก้ามกรามเพื่อหาปริมาณการตกค้างของยาออกซีเตตราซัยคลิน โดย Charm II assay

ใช้ชุดทดสอบชนิด Charm II Tetracycline Test for Tissue (บริษัท Charm Sciences, USA) ประกอบด้วย

2.3.1 MSU Extraction Buffer (MSUEB)

2.3.2 Tissue Performance Negative Concentrate (TPNC)

2.3.3 MSU Multi-Antimicrobial Concentrate Standard (MSUMA)

2.3.4 M 2 Buffer

2.3.5 เครื่องปั่นละเอียดเนื้อเยื่อ (Homogenizer) (รุ่น T 25-S1 Blade-type Homogenizer บริษัท IKA, Germany)

2.3.6 เครื่องชั่งน้ำหนัก 2 ตำแหน่ง (รุ่น BJ 1000 C บริษัท Precisa, Switzerland)

2.3.7 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิได้ (waterbath) (รุ่น BS-01 บริษัท Medic, Thailand)

2.3.8 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (รุ่น IEC Centra CL-2 centrifuge International Equipment, USA หรือ KOKUSUN รุ่น H-103N SERIES บริษัท KOKUSAN, Japan)

2.3.9 หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร

2.4 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณยาออกซีเตตราซัยคลินในเนื้อกึ่งก้ามกรามโดย CHARM II assay

2.4.1 Tablet Reagent (TMSU) ใช้ชุดทดสอบชนิด Charm II Tetracycline Test for Tissue (บริษัท Charm Sciences, USA)

2.4.2 Deionized water หรือ Milli-Q water (รุ่น PURELAB Ultra ยี่ห้อ ELGA, UK)

2.4.3 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (incubator) (บริษัท CHARM SCIENCES, USA)

2.4.4 หลอดทดลอง ขนาด 16 x 125 มิลลิเมตร

2.4.5 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (รุ่น IEC Centra CL-2 centrifuge บริษัท International Equipment, USA)

2.4.6 เครื่อง CHARM II (รุ่น CHARM 7600 COUNTER บริษัท CHARM SCIENCES, USA)

วิธีการ

1. สัตว์ทดลอง

การทดลองใช้กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) คณะแพศ ไม่มีโรค แข็งแรง สุขภาพดี อายุ 6 - 7 เดือน น้ำหนักเฉลี่ยตัวละ 20 - 30 กรัม จำนวน 2,000 ตัว โดยซื้อจากฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในจังหวัดกาฬสินธุ์ นำมาเลี้ยงนาน 7 - 10 วัน เพื่อปรับสภาพที่สถานีประมงน้ำจืด อำเภोजตุรัส จังหวัดชัยภูมิ ในโรงเรือนเลี้ยงกุ้งแบบปิด ซึ่งมีหลังคาและพลาสติกกันลมโดยรอบ ทำความสะอาดและฆ่าเชื้อตามหลักมาตรฐานสากล เลี้ยงกุ้งทดลองในบ่อซีเมนต์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 เมตร ลึก 0.8 เมตร ระดับน้ำสูง 30 เซนติเมตร ภายในบ่อมีระบบให้ออกซิเจนตลอดเวลา เลี้ยงกุ้งก้ามกรามก่อนการทดลองโดยให้อาหารปกติไม่ผสมยาออกซิเตตราซัยคลิน วันละ 2 ครั้ง ในอัตรา 1 เปอร์เซ็นต์ (%) ของน้ำหนักตัว ตรวจสอบการตกค้างของยาออกซิเตตราซัยคลิน โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ในแต่ละกลุ่ม กุ้งก้ามกรามจะอยู่ในสภาพแวดล้อมเดียวกัน น้ำที่ใช้มีคุณภาพตามตารางที่ 12

ตารางที่ 12 คุณภาพของน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งก้ามกราม

ค่าพารามิเตอร์น้ำที่ใช้เลี้ยง	อยู่ระหว่าง
pH	7.5 – 8.5
อุณหภูมิ	28 – 30 องศาเซลเซียส
Alkalinity	20 – 60 มิลลิกรัมต่อลิตร
DO	4 – 6 มิลลิกรัมต่อลิตร
Hardness	30 – 150 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองโดยให้ยาและเก็บตัวอย่างกุ้งทดลองที่สถานีกรมประมงน้ำจืด อำเภोजตุรัส จังหวัดชัยภูมิ เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์และการตกค้างของยาออกซิเตตราซัยคลินในกุ้งก้ามกราม โดยแบ่งกุ้งทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 350 ตัว โดยแต่ละกลุ่มจะได้รับยาดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 กลุ่ม วิธีการและขนาดของยาที่ให้กึ่งกัมกราม

กลุ่ม	วิธีการให้ยา	ขนาดของยาที่ใช้
1	ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (IM)	11 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว
2	ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (IM)	22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว
3	ป้อนให้กิน (PO)	11 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว
4	ป้อนให้กิน (PO)	22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว
5	ผสมยาในอาหาร (Medicated Feed)	4 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักอาหาร

3. การจัดการด้านสภาพแวดล้อม เลี้ยงกึ่งในสภาพอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมทั่วไป

4. การเก็บตัวอย่าง

เจาะเก็บฮีโมลิมฟ์กึ่งภายหลังการให้ยาในแต่ละกระชังตามเวลาดังต่อไปนี้คือ 0, 5, 10, 20, 30, 45 นาที, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 20, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 84, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 288, 312, 336, 360 และ 384 ชั่วโมง ของการทดลองกลุ่มที่ 1 - 4 กลุ่มการทดลองที่ 5 เก็บตัวอย่างหลังการให้ยาผสมอาหารนานติดต่อกัน 5 วัน วันละ 4 ครั้ง ที่เวลา 07:00 11:00 17:00 และ 22:00 นาฬิกา นาน 23 วัน บริเวณส่วนหัว ขาเดินคู่ที่ 2 - 5 เคลือบหลอดนิตยา และหัวเข็มด้วยเฮพารินภายหลังการได้รับยา เพื่อหาระดับปริมาณยาออกซีเตตราซัยคลินในฮีโมลิมฟ์และปริมาณของยาที่ตกค้างในเนื้อกึ่งกัมกราม โดยตัวอย่างที่เก็บได้จะนำมาแช่แข็งที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส (°C) เพื่อวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ โดยวิธี microbiological agar-diffusion technique โดยใช้เชื้อ *Bacillus cereus* (ATCC 11778) เป็นตัวบ่งชี้ และ CHARM II assay

5. การคำนวณค่าพารามิเตอร์ที่สำคัญทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาออกซีเตตราซัยคลิน

การทดลองศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของยาออกซีเตตราซัยคลิน โดยให้ยาเพียงครั้งเดียวเข้าทางกล้ามเนื้อและป้อนให้กิน เมื่อได้รับยาขนาด 11 และ 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวตามลำดับ และให้ยาผสมอาหาร ขนาด 4 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร นานติดต่อกัน 5 วัน

5.1 ค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์ (Bioavailability) หมายถึง อัตราและปริมาณที่ยาถูกซึมเข้าสู่ระบบหมุนเวียนโลหิต หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ (%) หาได้จากความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของยาในพลาสมากับเวลา โดยคำนวณจากการเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟ (AUC : area under the curve) ที่ได้จากการทดลอง คำนวณพื้นที่ใต้กราฟของการให้ยาโดยการป้อนให้กินเทียบกับการให้ยาเข้าทางกลืนเนื้อในขนาดที่เท่ากันในกลุ่มทดลองโดยใช้สมการ

$$\text{Relative oral bioavailability} = (\text{AUC p.o.})/(\text{AUC i.m.}) \times 100$$

5.2 ค่าครึ่งชีวิตของการดูดซึมยา (Absorption half-life, $t_{1/2ab}$) หาได้จากสมการ

$$t_{1/2ab} = 0.693/\lambda_n \quad (h) \quad (1)$$

5.3 ค่าอัตราเร็วคงที่ในการขจัดยาออกนอกร่างกาย (K_{el}) เป็นพารามิเตอร์ที่ใช้ในการอธิบายถึงอัตราเร็วในการขจัดยาออกนอกร่างกาย โดยเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของยาที่มีอยู่ในร่างกาย ณ เวลานั้น ๆ โดยใช้สมการ

$$K_{(el)} = 0.693/ t_{1/2\beta} \quad (h^{-1}) \quad (2)$$

5.4 ค่าครึ่งชีวิตของการขจัดยาออกนอกร่างกาย (Elimination half-life, $t_{1/2\beta}$) เป็นพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ที่อธิบายถึงระยะเวลาที่ผ่านไป แล้วทำให้ครึ่งหนึ่งของยาที่มีอยู่ในร่างกายมีการขจัดยาออกจากร่างกาย โดยคำนวณจากสมการ

$$t_{1/2\beta} = 0.693/K_{(el)} \quad (h) \quad (3)$$

5.5 ปริมาตรการกระจายตัวของยา (Volume of distribution, V_d) หมายถึง อัตราส่วนคงที่ของปริมาณยาที่อยู่ในร่างกายกับระดับความเข้มข้นของยาในกระแสเลือด โดยมีหน่วยเป็นลิตรต่อกิโลกรัม (l/kg) สามารถหาค่านี้ได้จากสมการ

$$V_d = \text{FD/AUC} \times K_{(el)} \quad (l/kg) \quad (4)$$

5.6 อัตราการขจัดยา (Clearance, Cl) เป็นพารามิเตอร์ที่บ่งชี้ถึงความสามารถในการขจัดยาออกจากร่างกาย โดยมีหน่วยเป็นลิตรต่อกิโลกรัมต่อชั่วโมง (l/kg/h) ซึ่งสามารถหาได้จากสมการ

$$Cl = \frac{FD/\Sigma}{\frac{C_n}{\lambda_n}} \quad (l/kg/h)$$

5.7 ระดับความเข้มข้นสูงสุดของยา (Maximal concentration, C_{max}) หาได้จากสมการ

หรือ

$$C_{max} = \text{maximum observed concentration}$$

$$C_{max} = \frac{FD}{Vd} (e^{-K_{(el)} * t_{max}}) \quad (\mu g/ml, g)$$

5.8 เวลาที่ความเข้มข้นของยาสูงสุด (time point at C_{max} , t_{max}) หาได้จากสมการ

$$t_{max} = \text{time point at } C_{max}$$

$$t_{max} = \frac{2.303}{\lambda_a - K_{(el)}} * \log \left(\frac{\lambda_a}{K_{(el)}} \right) \quad (\text{min, h})$$

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาออกซึ่งเตตราไซคลินในเนื้อกึ่งกล้ามเนื้อ มาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของขนาดยาที่ให้ โดยใช้ Student *t*-test หรือ Welch *t*-test

1. ขั้นตอนการเตรียมกึ่งกัมกรามเพื่อใช้ในการทดลอง

ทำการเลี้ยงกึ่งกัมกรามที่ปรับสภาพที่สถานีประมงน้ำจืด อำเภอจตุรพักตรพิมาน จังหวัดชัยภูมิ นาน 7 วันในโรงเรือนเลี้ยงกึ่งแบบปิด ซึ่งมีหลังคาและพลาสติกกันลมโดยรอบ ทำความสะอาดและฆ่าเชื้อตามหลักมาตรฐานสากล ในบ่อซีเมนต์ กว้าง 2 เมตร สูง 0.8 เมตร ระดับน้ำสูง 0.3 เมตร มีรูและท่อพลาสติกตรงกลางเพื่อปล่อยน้ำทิ้ง จำนวน 38 บ่อ เปิดระบบให้ออกซิเจนตลอดเวลา วางกระชังตาข่ายพลาสติก พื้นบุด้วยตาข่าย มีช่องสำหรับเปิดและปิด ใส่กระชังจำนวน 5 ใบต่อ 1 บ่อ จำนวนกึ่ง 8 ตัวต่อ 1 กระชัง (ภาพที่ 4) แยกตามช่วงเวลาทดลอง ชั่งน้ำหนักกึ่งตามกลุ่มการทดลอง จดน้ำหนักและหาค่าเฉลี่ยของกึ่งแต่ละกระชัง เพื่อให้ปริมาณยาตามขนาดยาที่ทำการทดลองในแต่ละกลุ่ม ให้อาหารที่ไม่มียาผสมก่อนการทดลอง เก็บฮีโมโกลินและเนื้อกึ่งกัมกรามที่ไม่มียาเป็นกลุ่มควบคุม (control) เพื่อเปรียบเทียบและหาค่ามาตรฐานของยาออกซี้เตตราซัยคลินในฮีโมโกลิน และในเนื้อกึ่งกัมกรามโดยวิธีทางจุลชีววิทยา



ภาพที่ 4 การวางกระชังกึ่งกัมกรามในแต่ละช่วงเวลา

2. การเตรียมยาออกซี้เตตราซัยคลินเพื่อใช้ในการทดลอง

1. เพื่อให้ยาเข้ากล้ามเนื้อและป้อนให้กิน ขนาด 11 และ 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว

ทำการชั่งตวงยาออกซี้เตตราซัยคลิน น้ำหนัก 0.66 กรัม (660 มิลลิกรัม) ทำละลายโดยใช้ DMSO ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำเกลือ (normal saline: NSS) ปริมาตร 27

มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเติมน้ำเกลือจนครบ 330 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น เท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. เพื่อผสมยาในอาหาร ขนาด 4 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักอาหาร

ทำการชั่งตวงยาออกซิเตตราซัยคลิน น้ำหนัก 4 กรัม ทำละลายโดยใช้ DMSO ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำเกลือปริมาตร 27 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเติมน้ำเกลือจนครบ 120 มิลลิลิตร จีดฟันทาออกซิเตตราซัยคลินที่ละลายด้วยน้ำเกลือผสมอาหารเม็ด น้ำหนัก 1 กิโลกรัม จนหมด ผึ่งตากลมให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 37 องศาเซลเซียส เก็บใส่ภาชนะไว้ในที่แห้ง และไม่ถูกแสงแดด โดยก่อนใช้ต้องทำการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของยาในอาหารว่าได้ขนาดที่เตรียมหรือไม่

3. การทดลองให้ยาออกซิเตตราซัยคลินในกึ่งกัมกราม

กลุ่มการทดลองที่ 1 และ 2 การให้ยาออกซิเตตราซัยคลินเข้ากล้ามเนื้อขนาด 11 และ 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว

ศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของยาออกซิเตตราซัยคลิน โดยให้ยาเข้ากล้ามเนื้อกึ่งกัมกราม ที่ทำการแยกกระชังโดยใส่กึ่งจำนวน 8 ตัวต่อกระชัง เพื่อทำการเก็บตัวอย่างฮีโมลิมฟ์และเนื้อกึ่งกัมกราม ตามช่วงเวลาดังต่อไปนี้ 0, 5, 10, 20, 30, 45 นาที 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 20, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 84, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 288, 312, 336, 360 และ 384 ชั่วโมงตามลำดับ ซึ่งต้องบันทึกเวลาในการให้ยาแต่ละครั้ง เพื่อกำหนดเวลาในการเก็บตัวอย่างฮีโมลิมฟ์และเนื้อกึ่งกัมกราม ให้ทำการฉีดยาเข้ากล้ามเนื้อบริเวณอกอย่างช้า ๆ (ภาพที่ 5) เมื่อให้ยาเสร็จแล้วนำกึ่งใส่ลงในกระชัง ปิดฝากระชังให้เรียบร้อย และทำการให้ยากึ่งในกระชังช่วงเวลาต่อไปจนครบ เมื่อถึงเวลาเก็บตัวอย่างตามที่กำหนดไว้ให้น้ำกระชังของเวลานั้นขึ้นมา และทำการเจาะเก็บฮีโมลิมฟ์ (ตามขั้นตอนการเจาะเก็บฮีโมลิมฟ์ในกึ่งกัมกราม) เมื่อเจาะเก็บฮีโมลิมฟ์เสร็จแล้วทำการเก็บเนื้อกึ่งกัมกราม (ตามขั้นตอนการเก็บเนื้อกึ่งกัมกราม)



ภาพที่ 5 ตำแหน่งการให้ยาเข้ากล้ามเนื้อในกุ้งก้ามกราม

กลุ่มการทดลองที่ 3 และ 4 การให้ยาออกซีเตตราซัยคลิน โดยป้อนยาเข้าปากโดยตรง ขนาด 11 และ 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว

ศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของยาออกซีเตตราซัยคลิน โดยป้อนยาเข้าปากกุ้งก้ามกรามโดยตรง ที่ทำการแยกกระชังโดยใส่กุ้งจำนวน 8 ตัวต่อกระชัง เพื่อทำการเก็บตัวอย่างฮีโมลิมฟ์และเนื้อกุ้งก้ามกราม ตามช่วงเวลาดังต่อไปนี้ 0, 5, 10, 20, 30, 45 นาที 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 20, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 84, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 288, 312, 336, 360 และ 384 ชั่วโมงตามลำดับ โดยใช้เข็มป้อนยาใส่เข้าปากกุ้งก้ามกรามโดยตรง (ภาพที่ 6) ซึ่งต้องบันทึกเวลาในการให้ยาแต่ละครั้ง เพื่อกำหนดเวลาในการเก็บตัวอย่างฮีโมลิมฟ์และเนื้อกุ้งก้ามกราม ทำการป้อนยาเข้าปากกุ้งก้ามกรามอย่างช้า ๆ เมื่อให้ยาเสร็จแล้วนำกุ้งใส่ลงในกระชัง ปิดฝากระชังให้เรียบร้อย และทำการให้ยากุ้งในกระชังช่วงเวลาต่อไปจนครบ เมื่อถึงเวลาเก็บตัวอย่างตามที่กำหนดให้นำกระชังของเวลานั้นขึ้นมา และทำการเจาะเก็บตัวอย่างฮีโมลิมฟ์ (ตามขั้นตอนการเจาะเก็บฮีโมลิมฟ์ในกุ้งก้ามกราม) เมื่อเจาะเก็บฮีโมลิมฟ์เสร็จแล้วให้ทำการเก็บเนื้อกุ้งก้ามกราม (ตามขั้นตอนการเก็บเนื้อกุ้งก้ามกราม)



ภาพที่ 6 การป้อนยาเข้าปากุ้งก้ามกรามโดยตรง

กลุ่มการทดลองที่ 5 การให้ยาออกซีเตตราซัยคลินผสมอาหารสำเร็จรูป ขนาด 4 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักอาหาร

ศึกษาการตกค้างของยาออกซีเตตราซัยคลิน โดยการผสมยากับอาหารสำเร็จรูปกุ้งก้ามกราม (บริษัทแลปอินเตอร์ ประเทศไทย) กุ้งจะได้รับอาหารผสมยาวันละ 2 ครั้ง โดยให้อัตรา 1 เปอร์เซ็นต์ (%) ของน้ำหนักกุ้งทั้งหมด นานติดต่อกัน 5 วัน หลังจากนั้นให้อาหารที่ไม่มียาผสม ทำการสุ่มเจาะเก็บตัวอย่างฮีโมลิมฟ์และเนื้อกุ้งก้ามกรามวันละ 4 ครั้ง จำนวนกุ้งครั้งละ 8 ตัว ที่เวลา 07:00 13:00 17:00 และ 22:00 เป็นเวลานาน 23 วัน ฮีโมลิมฟ์และเนื้อกุ้งก้ามกรามจะถูกเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการสกัดเนื้อกุ้งก้ามกรามและวิเคราะห์ผลต่อไป

4. การเจาะเก็บตัวอย่างฮีโมลิมฟ์ในกุ้งก้ามกราม

เคลือบหลอดฉีดยาร่วมหัวเข็มด้วยสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (heparin) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เพื่อใช้ในการเก็บตัวอย่างฮีโมลิมฟ์เมื่อถึงเวลาตามกำหนดภายหลังจากการให้ยา นำกระชังกุ้งของเวลานั้นใส่กุ้งลงในกระชอน จับกุ้งเหมือนการให้ยาใช้หลอดฉีดยาเจาะบริเวณขาเดิน คู่ที่ 2 - 5 (ภาพที่ 7) จะได้ของเหลวสีขาวใสจนถึงสีฟ้าเทา (ฮีโมลิมฟ์) เก็บตัวอย่างให้ได้ปริมาณ 1 - 3 มิลลิลิตร นำฮีโมลิมฟ์ของกุ้งจำนวน 8 ตัว ในช่วงเวลาที่เจาะเก็บได้มารวมกันในหลอดทดลอง และปลายหลอดฉีดยาที่ด้านข้างของหลอดทดลอง ค่อยๆ ใสฮีโมลิมฟ์ลงในหลอดทดลองจนหมด ปิดฝาหลอดทดลอง พร้อมทั้งบันทึกรหัสตัวอย่าง วันและเวลาให้ถูกต้อง นำหลอดทดลอง

ที่บรรจุฮีโมลิมฟ์แช่น้ำแข็ง (4 องศาเซลเซียส) เพื่อป้องกันการสลายตัวของยา ตั้งหลอดทดลองไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 - 15 นาที ก่อนนำออกไปปั่นเก็บฮีโมลิมฟ์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ใช้ความเร็วรอบ 1,750 g นาน 15 นาที จะได้ของเหลวใสดูดเก็บใส่หลอดเก็บพลาสติกและนำไปเก็บที่ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป โดยวิธีทางจุลชีววิทยา



ภาพที่ 7 การเจาะเก็บฮีโมลิมฟ์บริเวณขาเดินคู่ที่ 2 - 5

5. การเก็บเนื้อกึ่งกัมกราม

เตรียมถุงพลาสติก เขียนรหัสตัวอย่าง วันและเวลาให้ตรงกับกึ่งกัมกรามที่ทำการเก็บตัวอย่างในแต่ละกลุ่ม เพื่อป้องกันการผิดพลาด นำน้ำแข็งใส่ถังเพื่อทำให้กึ่งตาย (knock) นำกึ่งที่ทำการเจาะเก็บตัวอย่างฮีโมลิมฟ์แล้วใส่ลงในถัง รอจนกึ่งไม่คืบนำขึ้นมาแกะหัวและลอกเปลือกออก แยกเก็บเนื้อกึ่งกัมกรามเป็น 3 กลุ่ม ๆ ละ 3, 3 และ 2 ตัว ตามลำดับ ของช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่าง ใส่ในภาชนะเก็บตัวอย่างที่เตรียมไว้บันทึกกลุ่มการทดลองและเวลาที่ทำการเก็บ แช่แข็งที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไปโดยวิธีทางจุลชีววิทยาและ CHARM II assay

6. ขั้นตอนการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารชนิดเหลว

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงแล้วในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (broth) ใช้ที่เขี่ยเชื้อ (loop) นำมาทำลายเชื้อด้วยการลนไฟ จุ่มลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว และปลายที่เขี่ยเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชนิดแข็ง (agar) ให้เป็นเส้นลากไปมา โดยไม่ให้เส้นทับกันในจานเพาะเชื้อ เพื่อให้ได้เชื้อที่ขึ้นเป็นโคโลนี (colony) เดี่ยว ๆ เพาะบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20-24 ชั่วโมง เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว โดยชั่งปริมาณ 30 กรัม ผสมน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ต้มจนเป็นเนื้อเดียวกัน ใส่หลอดแก้วและปิดฝา ฆ่าเชื้อและสิ่งปนเปื้อนด้วยเครื่องนึ่งไอน้ำความดันสูง (autoclave) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และเก็บที่อุณหภูมิ 4 - 7 องศาเซลเซียส นำที่เขี่ยเชื้อและเชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะบ่มเชื้อแล้ว จุ่มลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวให้เชื้อกระจายตัว ลงไฟฆ่าเชื้อที่เขี่ยเชื้อ ปลายหลอดทดลองและปิดฝา เขย่าด้วยเครื่องผสมสารละลาย (vortex) ให้เชื้อกระจายตัว เพาะบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 - 24 ชั่วโมง สังเกตเชื้อแบคทีเรียมีการเจริญขึ้นหรือไม่ โดยเปรียบเทียบกับสื่ออาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่ไม่ได้ทำการเพาะเชื้อ

- ถ้าเชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโตดี สื่ออาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวจะขุ่นและเห็นเส้นใยกระจายอยู่ในหลอดทดลองเป็นจำนวนมาก

- ถ้าเชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโตไม่ดี สื่ออาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวจะใสไม่ขุ่น เส้นใยจะไม่ค่อยมีหรือมีจำนวนน้อย

นำเชื้อแบคทีเรียที่เพาะบ่มทำอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณยาลูกศรที่ตรวจพบในซีโมลิฟและในเนื้อกึ่งกัมกรามต่อไป

7. ขั้นตอนการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 38 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องกวนสารละลายแบบควบคุมความร้อน (stirrer hot plate) ปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งไอน้ำความดันสูง อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที รวมทั้งอุปกรณ์อื่น ๆ นำเชื้อแบคทีเรียที่เพาะบ่มเชื้อมาผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวเพื่อเจือจางความเข้มข้น ตั้งค่า optical density (O.D.) ค่าความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร นำเชื้อใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ผสมให้เข้ากันและเทอาหารเลี้ยงเชื้อในจานเพาะเชื้อปริมาณ 20 มิลลิลิตร วิเคราะห์ผลหรือเก็บใส่ภาชนะมิดชิดแช่เย็นอุณหภูมิ 4 - 7 องศาเซลเซียส เพื่อทำการวิเคราะห์ผลต่อไป

วิเคราะห์ยาปฏิชีวนะโดยวิธีทางจุลชีววิทยา

หลักการ

อาศัยหลักการ agar diffusion assay ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ ทราบปริมาณยา รวดเร็ว และมีความถูกต้องในระดับหนึ่ง เป็นการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ โดยให้ยาปฏิชีวนะปริมาณหนึ่ง ซึมเข้าไปในเนื้อวุ้นที่ได้เพาะเชื้อจุลินทรีย์ บ่มเพาะที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย ยาปฏิชีวนะจะยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบนผิวเนื้อวุ้น ทำให้ไม่มีแบคทีเรียขึ้น เกิดเป็นวงกลมใสว่าง รอบๆ บริเวณที่หยอดยาปฏิชีวนะ (inhibition zone หรือ clear zone) และมีปริมาณลดลงเป็นสัดส่วนกับระยะทางจากจุดเริ่มต้นภายหลังการบ่มเพาะเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความไวของเชื้อที่ทดสอบ และนำความกว้างของ inhibition zone มาเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน เพื่อคำนวณปริมาณความเข้มข้นของยาที่ทำการศึกษา เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากโดยดัดแปลงมาจาก National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS) และ Bennett *et al.*, 1966.

ขั้นตอนการสกัดตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ยาออกซิจีเตตราซัยคลินโดยวิธีทางจุลชีววิทยา

นำเนื้อกึ่งทดลองในแต่ละช่วงเวลา มาสกัดหาปริมาณยาออกซิจีเตตราซัยคลินที่ตกค้างในเนื้อกึ่ง โดยเติม buffer pH 4.0 (ภาคผนวก) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ปั่นเนื้อกึ่งก้ามกรามด้วยเครื่องปั่นละเอียดเนื้อเยื่อ (homogenizer) นาน 1 นาที แช่ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 80 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที จากนั้นแช่ในน้ำเย็น นาน 10 นาที ปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ความเร็วรอบ 1,750 g นาน 10 นาที เทของเหลวใส (supernatant) ลงในหลอดทดลอง นำของเหลวใสหยดลงในหลุมของจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อจุลินทรีย์ผสมอยู่ วิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ (triplicate) หรือนำส่วนใสเก็บที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ผล โดยวิธี microbiological agar - diffusion technique โดยใช้เชื้อ *Bacillus cereus* (ATCC 11778) เป็นตัวบ่งชี้

ขั้นตอนการวิเคราะห์ยาออกซิจีเตตราซัยคลินในอีโมลิมพ์และเนื้อกึ่งก้ามกรามโดยวิธีจุลชีววิทยา

นำจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อจุลินทรีย์ผสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เจาะอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็น 4 หลุม ขนาดหลุมละ 0.5 เซนติเมตร นำอีโมลิมพ์ในแต่ละช่วงเวลา หยดลงในหลุม ปริมาตร 50

ไมโครลิตร วิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ โดยมีสารมาตรฐานออกซีเตตราซัยคลิน เป็นตัวกำหนด ปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเพาะเชื้อเป็นเวลา 20 - 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมา อ่านค่ารัศมีหรือความกว้างของบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญเติบโต ด้วยอุปกรณ์ (vernier caliper) วัด inhibition zone และบันทึกผลเพื่อวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป ในการทดสอบหาปริมาณยาออกซีเตตราซัยคลินในสีโมลิฟและเนื้อกึ่งก้ำกรามโดยวิธีทางจุลชีววิทยา พบว่ามีค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Limit of detection) ที่ตรวจวัดได้เท่ากับ 0.25 ไมโครกรัมต่อกรัม

ขั้นตอนการสกัดตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ยาออกซีเตตราซัยคลินโดยวิธี CHARM II assay

ชั่งเนื้อกึ่งก้ำกราม น้ำหนัก 10 กรัม เติม MSU Extraction Buffer (MSUEB) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปั่นเนื้อกึ่งก้ำกรามด้วยเครื่องปั่นละเอียดเนื้อเยื่อ นาน 1 นาที แช่ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 80 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที และแช่ในน้ำเย็น นาน 10 นาที ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็ว รอบ 1,750 g (3.3 x 1,000 รอบต่อนาทีของเครื่อง IEC Centra CL-2 centrifuge) นาน 10 นาที เทของเหลวใส่ที่ได้ลงในหลอดทดลอง หากมีเศษเนื้อปริมาณมาก กรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 1 วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ของเหลวใส่ด้วยกระดาษลิตมัสให้ค่าอยู่ในช่วง 7.5 ถ้าค่าความเป็นกรด-ด่าง มีค่าต่ำกว่า 7.5 ให้เติม M 2 Buffer ปริมาตร 10 - 30 ไมโครลิตร ถ้าค่าความเป็นกรด-ด่าง มีค่าสูงกว่า 7.5 ให้เติม 1 M HCl ปริมาตร 5 - 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและวัดค่าความเป็นกรด-ด่างใหม่ จนกว่าจะได้ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.5 เก็บส่วนของเหลวใส่แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

ขั้นตอนการวิเคราะห์ยาออกซีเตตราซัยคลินโดย CHARM II assay

ในการวิเคราะห์ยาออกซีเตตราซัยคลินควรมีค่า positive control และ negative control ทุกครั้ง (ภาคผนวก) และควรทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง 2 ซ้ำ เพื่อความถูกต้อง แม่นยำและป้องกันการผิดพลาด วิธีการดังนี้

นำเม็ดยาชุดทดสอบสำหรับวิเคราะห์ยาออกซีเตตราซัยคลินเม็ดยาขาว ใส่ลงในหลอดทดลองทุกหลอด เติมน้ำกลั่นปริมาตร 0.3 $\pm$ 0.1 มิลลิลิตร เขย่าหรือผสมให้เม็ดยาสีขาวแตกตัว เติมของเหลวใส่ที่สกัดจากเนื้อกึ่งก้ำกราม ปริมาตร 4.0 $\pm$ 0.25 มิลลิลิตร ใส่เม็ดยาสีส้ม (marked T->) ลงในหลอดทดลองที่ใส่ของเหลวใส่ ผสมให้เข้ากันนาน 10 วินาที นำเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ ตั้งที่ 35 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 1,750 g (3.3 x

1,000 รอบต่อนาที ด้วยเครื่อง IEC Centra CL-2 centrifuge) นาน 10 นาที เทส่วนใสที่ได้ทิ้ง ระวัง
 อย่างให้ตะกอนที่ก้นหลอดแตกตัวหรือแยกตัว เติมน้ำกลั่นปริมาตร 0.3 ± 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้า
 กัน เพื่อให้ตะกอนเกิดการกระจายตัว เติม Opti-Fluor ปริมาตร 3.0 ± 0.5 มิลลิลิตร ปิดจุกยางผสม
 ให้เข้ากัน นำหลอดทดลองเข้าเครื่องอ่านผล รอผลในการอ่านค่า 1 นาที และบันทึกผล
 (ภาคผนวก) ในการทดสอบหาปริมาณยาออกซิทेटร่าซัยคลินในเนื้อกึ่งกัมกราม โดยวิธี CHARM
 II assay พบว่ามีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ เท่ากับ 0.1 ไมโครกรัมต่อกรัม

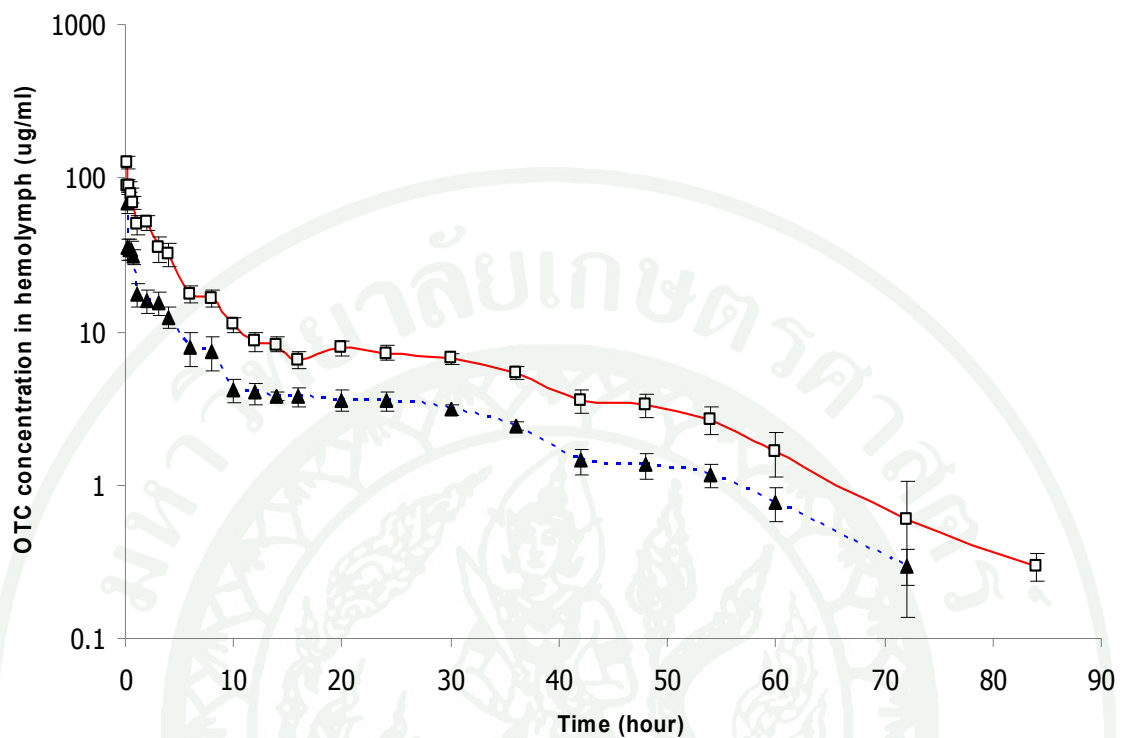


ผลและวิจารณ์

ผล

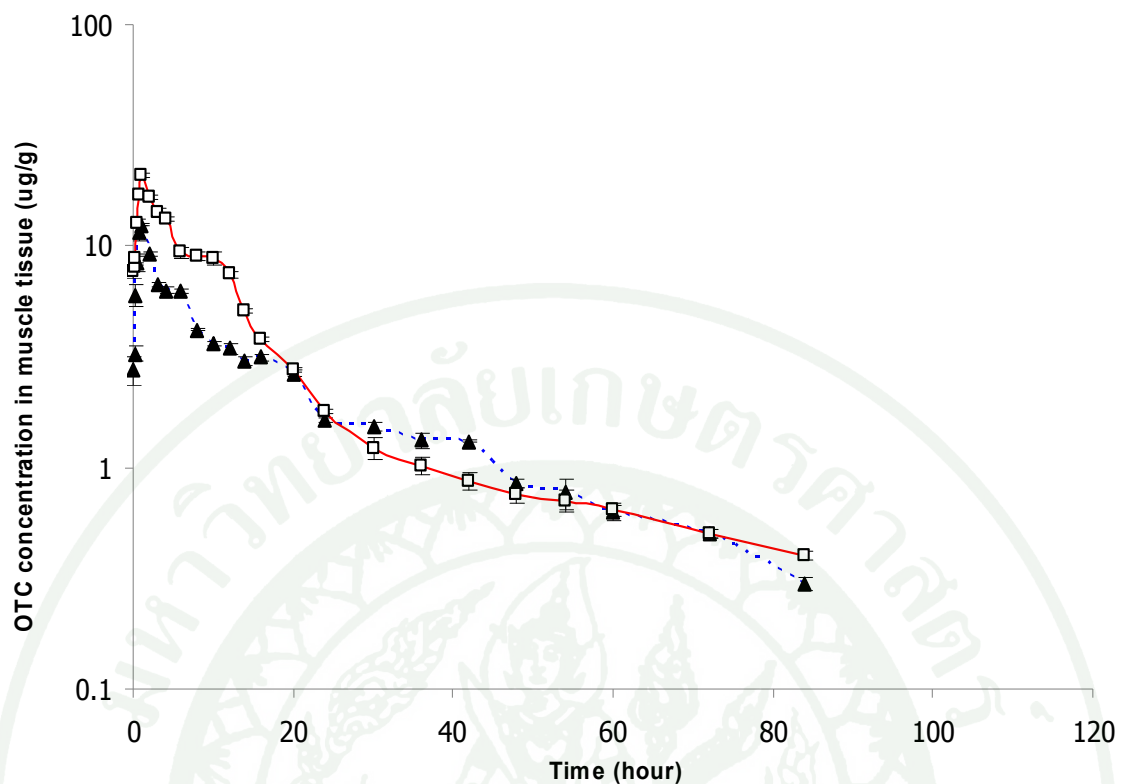
การศึกษาทดลองนี้เป็นการศึกษาถึงคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ และการตกค้างของยา ออกซีเตตราไซคลินในกึ่งกล้ามเนื้อ โดยแบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 5 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 กึ่งทดลองจะได้รับยาโดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ขนาด 11 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว กลุ่มที่ 2 กึ่งทดลองจะได้รับยาโดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ขนาด 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว กลุ่มที่ 3 กึ่งทดลองจะได้รับยาโดยการป้อนเข้าปากโดยตรง ขนาด 11 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว กลุ่มที่ 4 กึ่งทดลองจะได้รับยาโดยการป้อนเข้าปากโดยตรง ขนาด 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว และกลุ่ม ที่ 5 กึ่งทดลองจะได้รับยาโดยการผสมในอาหาร ขนาด 4 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักอาหาร ติดต่อกันเป็นเวลา 5 วัน โดยให้วันละ 2 ครั้ง จากนั้นได้ทำการเก็บตัวอย่างฮีโมลิมฟ์และเนื้อกึ่ง เพื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณยาออกซีเตตราไซคลินในตัวอย่าง โดยวิธีทางจุลชีววิทยา และ CHARM II assay ซึ่งผลการทดลองมีดังต่อไปนี้

ผลการทดลองของกลุ่มการทดลองที่ 1 และ 2



ภาพที่ 8 ระดับความเข้มข้นเฉลี่ย ($\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน, SEM) ของยาออกซีเตตราไซคลินในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งก้ามกราม ภายหลังการให้ยาเข้ากล้ามเนื้อด้วยขนาด 11 (▲) และ 22 (□) มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว (ค่าเฉลี่ยของยาออกซีเตตราไซคลินคำนวณคำนวณจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ จากตัวอย่างฮีโมลิมฟ์ที่นำมารวมกันในแต่ละเวลา)

จากภาพที่ 8 สามารถตรวจพบยาออกซีเตตราไซคลินในฮีโมลิมฟ์กุ้งก้ามกรามเป็นระยะเวลานาน 72 และ 84 ชั่วโมง โดยยามีความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 69.12 ± 5.14 และ 125.5 ± 14.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ภายหลังจากการให้ยาเข้ากล้ามเนื้อทั้งทดลองด้วยขนาด 11 และ 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวตามลำดับ



ภาพที่ 9 ระดับความเข้มข้นเฉลี่ย ($\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน, SEM) ของยาออกซีเตตราไซคลินในเนื้อกล้ามเนื้อ ภายหลังการให้เข้ายาเข้ากล้ามเนื้อด้วยขนาด 11 (▲) และ 22 (□) มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ($n=3$)

จากภาพที่ 9 สามารถตรวจพบยาออกซีเตตราไซคลินในเนื้อกล้ามเนื้อเป็นระยะเวลานาน 84 ชั่วโมง โดยยาที่มีความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 12.49 ± 2.6 และ 20.92 ± 3.2 ไมโครกรัมต่อกรัม ภายหลังจากการให้ยาเข้ากล้ามเนื้อทั้งทดลองด้วยขนาด 11 และ 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัวตามลำดับ

ตารางที่ 14 ค่าเฉลี่ย ($\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน, SEM) ของพารามิเตอร์ที่สำคัญทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาออกซีเตตราซัยคลินในฮีมอลิมพ์กึ่งก้ำมกราม เมื่อให้ยาเข้ากล้ามเนื้อและป้อนให้กิน ขนาด 11 และ 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว

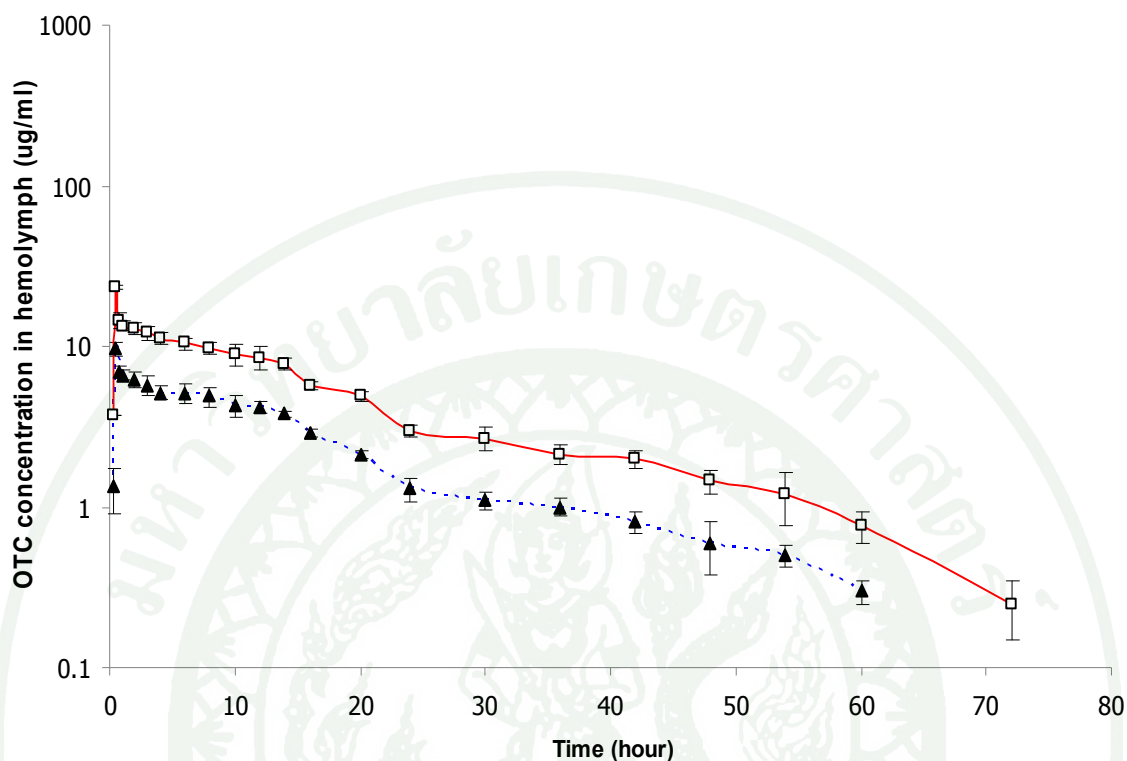
Pharmacokinetic Parameters (unit)	ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ		ป้อนให้กินโดยตรง	
	11 มิลลิกรัม	22 มิลลิกรัม	11 มิลลิกรัม	22 มิลลิกรัม
	ต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว	ต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว	ต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว	ต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว
$t_{1/2\beta}$ (h)	9.07 ± 1.56	11.47 ± 2.17	8.14 ± 1.05	9.97 ± 1.28
$t_{1/2\alpha}$ (h)	1.69 ± 0.32	5.24 ± 0.92	4.49 ± 0.83	2.49 ± 0.56
$t_{1/2ab}$ (h)	1.70 ± 0.21	5.17 ± 0.56	4.96 ± 0.67	2.55 ± 0.29
$Vd_{(area)}$ (l/kg)	0.56 ± 0.04	0.60 ± 0.08	1.04 ± 0.13	1.16 ± 0.19
Cl (l/kg/h)	0.042 ± 0.01	0.036 ± 0.01	0.088 ± 0.01	0.080 ± 0.01
Oral bioavailability	-	-	48.11 ± 5.66	45.04 ± 4.17
Kel (h^{-1})	0.08 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.09 ± 1.22	0.07 ± 0.01
C_{max} ($\mu g/mL$)	69.12 ± 5.14	125.5 ± 14.2	9.60 ± 1.22	23.5 ± 2.67
T_{max} (min)	5.0	5.0	30.0	30.0

ผลการศึกษาค้นคว้านี้ใช้วิธีทางจุลชีววิทยา เพื่อศึกษาเภสัชจลนศาสตร์และค่าพารามิเตอร์ที่สำคัญของยาออกซีเตตราซัยคลินในฮีมอลิมพ์กึ่งก้ำมกราม โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ขนาด 11 และ 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว พบว่ายาออกซีเตตราซัยคลินถูกดูดซึมเข้าสู่ฮีมอลิมพ์อย่างรวดเร็ว พบระดับยาสูงสุดในฮีมอลิมพ์ที่เวลา 5 นาที เมื่อคำนวณค่าพารามิเตอร์ที่สำคัญทางเภสัชจลนศาสตร์ โดยใช้โปรแกรม PK Solution 2.0TM พบว่ามีค่าครึ่งชีวิตของยา ($t_{1/2\beta}$) เท่ากับ 9.07 ± 1.56 และ 11.47 ± 2.17 ชั่วโมง อัตราการขจัดยา (Cl) มีค่า 0.042 ± 0.01 และ 0.036 ± 0.01 ลิตรต่อกิโลกรัมต่อชั่วโมง (l/kg/h) ค่าปริมาตรการกระจายตัวของยา (Vd) เท่ากับ 0.56 ± 0.04 และ 0.60 ± 0.08 ลิตรต่อกิโลกรัม (l/kg) ภายหลังจากให้ยาเข้ากล้ามเนื้อด้วยขนาด 11 และ 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวตามลำดับ

การป้อนยาให้กินขนาด 11 และ 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว พบว่ายา อ็อกซีเตตราซัยคลินถูกดูดซึมเข้าสู่โสมิมได้อย่างรวดเร็ว พบระดับยาสูงสุดในโสมิมที่ 30 นาที แต่ช้ากว่าภายหลังการให้ยาโดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อในขนาดยาเดียวกัน เมื่อคำนวณค่าพารามิเตอร์ ที่สำคัญทางเภสัชจลนศาสตร์โดยใช้โปรแกรม PK Solution 2.0™ พบว่ามีค่าครึ่งชีวิตของยา ($t_{1/2\beta}$) เท่ากับ 8.14 ± 1.05 และ 9.97 ± 1.28 ชั่วโมง อัตราการขจัดยา (CI) มีค่า 0.088 ± 0.01 และ 0.080 ± 0.01 ลิตรต่อกิโลกรัมต่อชั่วโมง (l/kg/h) ค่าปริมาตรการกระจายตัวของยา (V_d) เท่ากับ 1.04 ± 0.13 และ 1.16 ± 0.19 ลิตรต่อกิโลกรัม (l/kg) โดยมีค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์สัมพัทธ์ (relative oral bioavailability) เท่ากับ 48.11 ± 5.66 และ 45.04 ± 4.17 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังการให้ยาโดยป้อนให้ กินด้วยขนาด 11 และ 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวตามลำดับ

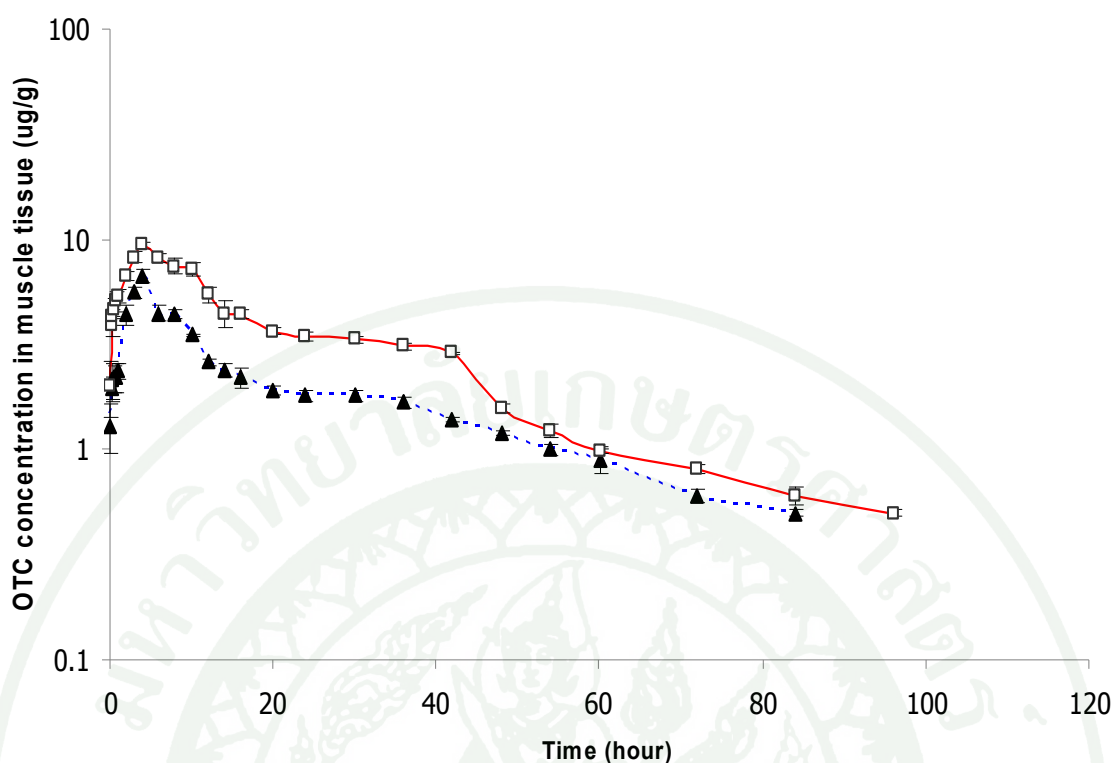
อย่างไรก็ตาม พบว่าค่า $t_{1/2\beta}$ และ $t_{1/2ab}$ ของยาอ็อกซีเตตราซัยคลิน ภายหลังการให้ยา ด้วยขนาด 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีค่าน้อยกว่าภายหลังการให้ยาด้วยขนาด 11 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ซึ่งผลดังกล่าวอาจเกิดจากค่าพารามิเตอร์ของน้ำที่ใช้เลี้ยงกึ่งทดลอง มีความแตกต่างกัน จึงมีผลต่อการดูดซึมของยาอ็อกซีเตตราซัยคลินในกึ่งที่ทดลอง

ผลการทดลองของกลุ่มการทดลองที่ 3 และ 4



ภาพที่ 10 ระดับความเข้มข้นเฉลี่ย ($\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน, SEM) ของยาออกซีเตตราไซคลินในฮีโมลิมฟ์กึ่งก้ามกราม ภายหลังการป้อนให้กินด้วยขนาด 11 (▲) และ 22 (□) มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว (ค่าเฉลี่ยของยาออกซีเตตราไซคลินคำนวณจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ จากตัวอย่างฮีโมลิมฟ์ที่นำมารวมกันในแต่ละเวลา)

จากภาพที่ 10 สามารถตรวจพบยาออกซีเตตราไซคลินในฮีโมลิมฟ์กึ่งก้ามกรามเป็นระยะเวลานาน 60 และ 72 ชั่วโมง โดยยาที่มีความเข้มข้นสูงสุด เท่ากับ 9.60 ± 1.22 และ 23.5 ± 2.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ภายหลังจากให้ยาโดยป้อนให้กินด้วยขนาด 11 และ 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวตามลำดับ



ภาพที่ 11 ระดับความเข้มข้นเฉลี่ย ($\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน, SEM) ของยาออกซีเตตราไซคลินในเนื้อกล้ามเนื้อ ภายหลังการป้อนให้กินด้วยขนาด 11 (▲) และ 22 (□) มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว ($n = 3$)

จากภาพที่ 11 สามารถตรวจพบยาออกซีเตตราไซคลินในเนื้อกล้ามเนื้อเป็นระยะเวลานาน 84 และ 96 ชั่วโมง โดยยามีความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 6.77 ± 2.1 และ 9.35 ± 2.4 ไมโครกรัมต่อกรัม ภายหลังจากให้ยาโดยป้อนให้กินด้วยขนาด 11 และ 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัวตามลำดับ

ตารางที่ 15 ค่าเฉลี่ย ($\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน, SEM) ของพารามิเตอร์ที่สำคัญทางเภสัชจลนศาสตร์ยาออกซิเตตราซัยคลินในเนื้อกึ่งกล้ามเนื้อ เมื่อให้ยาเข้ากล้ามเนื้อและป้อนให้กิน ขนาด 11 และ 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ($n = 3$)

Pharmacokinetic Parameters (unit)	ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ		ป้อนให้กินโดยตรง	
	11 มิลลิกรัม	22 มิลลิกรัม	11 มิลลิกรัม	22 มิลลิกรัม
	ต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว	ต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว	ต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว	ต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว
$t_{1/2\beta}$ (h)	29.66 ± 3.56	31.58 ± 3.57	26.93 ± 3.56	27.85 ± 4.01
$t_{1/2ab}$ (h)	4.23 ± 0.42	$8.85 \pm 0.96^{**}$	5.89 ± 0.82	3.82 ± 0.41
$Vd_{(area)}$ (l/kg)	2.75 ± 0.56	4.07 ± 0.25	2.66 ± 0.45	3.32 ± 0.52
Cl (l/kg/h)	0.064 ± 0.01	0.089 ± 0.01	0.068 ± 0.01	0.082 ± 0.01
AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h/g}$)	181.1 ± 15.2	289.7 ± 23.5	160.6 ± 17.6	266.5 ± 42.2
Kel (h^{-1})	0.023 ± 0.01	0.022 ± 0.01	0.026 ± 0.01	0.025 ± 0.01
$C_{\max}$ ($\mu\text{g/g}$)	12.49 ± 2.6	20.92 ± 3.2	6.77 ± 2.1	9.35 ± 2.4
$T_{\max}$ (h)	1.0	1.0	4.0	4.0

หมายเหตุ : การคำนวณทางสถิติเป็นการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลองที่ได้รับยาวิธีเดียวกัน แต่ขนาดยาต่างกัน

ผลการศึกษาทดลองนี้ใช้วิธีทางจุลชีววิทยา เพื่อศึกษาเภสัชจลนศาสตร์และค่าพารามิเตอร์ที่สำคัญของยาออกซิเตตราซัยคลินในเนื้อกึ่งกล้ามเนื้อ โดยการให้เข้ากล้ามเนื้อ ขนาด 11 และ 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว พบว่ายาออกซิเตตราซัยคลินถูกดูดซึมเข้าเนื้อกึ่งกล้ามเนื้อช้ากว่าอีโมลิฟ พบระดับยาสูงสุดในเนื้อกึ่งกล้ามเนื้อที่ 1 ชั่วโมง เมื่อคำนวณค่าพารามิเตอร์ที่สำคัญทางเภสัชจลนศาสตร์โดยใช้โปรแกรม PK Solution 2.0TM พบว่ามีค่าครึ่งชีวิตของยา ($t_{1/2\beta}$) เท่ากับ 29.66 ± 3.56 และ 31.58 ± 3.57 ชั่วโมง อัตราการขจัดยา (Cl) มีค่า 0.064 ± 0.01 และ 0.089 ± 0.01 ลิตรต่อกิโลกรัมต่อชั่วโมง (l/kg/h) ค่าปริมาตรการกระจายตัวของยา (Vd) เท่ากับ 2.75 ± 0.56 และ 4.07 ± 0.25 ลิตรต่อกิโลกรัม (l/kg) ภายหลังจากให้ยาเข้าทางกล้ามเนื้อด้วยขนาด 11 และ 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวตามลำดับ

การป้อนยาให้กินขนาด 11 และ 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว พบว่ายาอ็อกซีเตตราซัยคลินถูกดูดซึมเข้าเนื้อกึ่งกล้ามเนื้อได้ช้ากว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอีโมลิฟ พบระดับยาสูงสุดในเนื้อกึ่งกล้ามเนื้อที่ 4 ชั่วโมง เมื่อคำนวณค่าพารามิเตอร์ที่สำคัญทางเภสัชจลนศาสตร์โดยใช้โปรแกรม PK Solution 2.0™ พบว่ามีค่าครึ่งชีวิตของยา ($t_{1/2\beta}$) เท่ากับ 26.93 ± 3.56 และ 27.85 ± 4.01 ชั่วโมง อัตราการขจัดยา (CI) มีค่า 0.068 ± 0.01 และ 0.082 ± 0.01 ลิตรต่อกิโลกรัมต่อชั่วโมง (l/kg/h) ค่าปริมาตรการกระจายตัวของยา (V_d) เท่ากับ 2.66 ± 0.45 และ 3.32 ± 0.52 ลิตรต่อกิโลกรัม (l/kg) โดยมีค่าพื้นที่ใต้กราฟ (การดูดซึมยา, AUC) เท่ากับ 160.6 ± 17.6 และ 266.5 ± 42.2 ไมโครกรัม*ชั่วโมงต่อกรัม ภายหลังจากให้ยาโดยป้อนให้กินด้วยขนาด 11 และ 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ตามลำดับ

อย่างไรก็ตาม พบว่าค่า $t_{1/2\beta}$ และ $t_{1/2ab}$ ของยาอ็อกซีเตตราซัยคลิน ภายหลังจากการให้ยาด้วยขนาด 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีค่าน้อยกว่าภายหลังจากการให้ยาด้วยขนาด 11 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ซึ่งผลดังกล่าวอาจเกิดจากค่าพารามิเตอร์ของน้ำที่ใช้เลี้ยงกึ่งทดลองมีความแตกต่างกัน จึงมีผลต่อการดูดซึมของยาอ็อกซีเตตราซัยคลินในกึ่งที่ทดลอง

ผลการทดลองของกลุ่มการทดลองที่ 5

ตารางที่ 16 ค่าเฉลี่ย ($\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน, SEM) ของความเข้มข้นของยาออกซีเตตราซัยคลินในเนื้อกึ่งกัมกราม เมื่อให้ยาผสมอาหารด้วยขนาด 4 กรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักอาหารอัตรา 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักกึ่งทั้งหมด วันละ 2 ครั้ง นานติดต่อกัน 5 วัน (n = 4)

เวลา	ความเข้มข้นของยา (ไมโครกรัมต่อกกรัม)
ช่วงที่ได้รับยาผสมอาหาร	
วันที่ 1	0.82 ± 0.27
วันที่ 2	1.27 ± 0.55
วันที่ 3	1.01 ± 0.54
วันที่ 4	0.93 ± 0.39
วันที่ 5	1.58 ± 0.75
ช่วงหยุดยาผสมอาหาร	
วันที่ 6	1.14 ± 0.36
วันที่ 7	1.15 ± 0.31
วันที่ 8	0.49 ± 0.03
วันที่ 9	0.50 ± 0.06
วันที่ 10	0.43 ± 0.03
วันที่ 11	0.38 ± 0.13
วันที่ 12	0.1 ± 0.0
วันที่ 13	0.1 ± 0.0
วันที่ 14-23	ตรวจไม่พบยา

หมายเหตุ : ความเข้มข้นของยาออกซีเตตราซัยคลินตั้งแต่วันที่ 1 - 11 ตรวจวิเคราะห์โดยวิธีทางจุลชีววิทยา ส่วนวันที่ 12 - 23 ตรวจวิเคราะห์โดยวิธี CHARM II assay

ผลการศึกษาทดลองนี้ใช้วิธีทางจุลชีววิทยาและ CHARM II เพื่อศึกษาการตกค้างของยาออกซิเตตราซัยคลินในเนื้อกึ่งก้ามกราม โดยการให้ยาผสมอาหาร ขนาด 4 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักอาหาร วันละ 2 ครั้ง นานติดต่อกัน 5 วัน พบว่าสามารถตรวจพบยาออกซิเตตราซัยคลินในเนื้อกึ่งก้ามกรามภายใน 1 วัน ภายหลังจากได้รับอาหารผสมยา โดยมีระดับความเข้มข้นของยาเท่ากับ 0.82 ± 0.27 ไมโครกรัมต่อกรัม ระดับความเข้มข้นของยาออกซิเตตราซัยคลินเท่ากับ 1.27 ± 0.55 ไมโครกรัมต่อกรัม ในวันที่ 2, 1.01 ± 0.54 ไมโครกรัมต่อกรัม ในวันที่ 3, 0.93 ± 0.39 ไมโครกรัมต่อกรัม ในวันที่ 4 และพบว่ามีความเข้มข้นของยาสูงสุดเท่ากับ 1.58 ± 0.75 ไมโครกรัมต่อกรัม ในวันที่ 5 หรือวันสุดท้ายภายหลังจากได้รับยาโดยการผสมอาหาร ซึ่งระดับความเข้มข้นของออกซิเตตราซัยคลินลดลงตามลำดับ และสามารถตรวจพบยาออกซิเตตราซัยคลินในเนื้อกึ่งก้ามกรามได้อีก 8 วันภายหลังจากหยุดให้ยาผสมอาหาร

วิจารณ์

ในการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของยาออกซีเตตราซัยคลินในกึ่งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อและป้อนให้กิน ขนาด 11 และ 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว พบยาออกซีเตตราซัยคลินดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดของกึ่งก้ามกรามอย่างรวดเร็ว ระดับยาในซีโมลิมีฟเกิดขึ้นภายใน 5 นาที หลังให้ยาเข้ากล้ามเนื้อของยาทั้ง 2 ความเข้มข้น ระดับความเข้มข้นสูงสุดของยา (C_{max}) เมื่อให้เข้ากล้ามเนื้อ ขนาด 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว มีระดับความเข้มข้นสูงกว่าทุกกลุ่มการทดลอง คือ 125.5 ± 1.42 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อคำนวณค่าพารามิเตอร์ที่สำคัญทางเภสัชจลนศาสตร์ พบว่าค่า elimination half-life ($t_{1/2\beta}$) ในซีโมลิมีฟจะมีความใกล้เคียงกัน ประมาณ 8 - 11 ชั่วโมง ภายหลังจากให้ยาขนาด 11 และ 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัวเข้ากล้ามเนื้อและป้อนเข้าปากโดยตรง ซึ่งค่าครึ่งชีวิตของการขับออกของยาออกซีเตตราซัยคลินในซีโมลิมีฟในกึ่งก้ามกรามที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่ามีค่าน้อยกว่ากึ่งชนิดอื่นที่มีรายงาน อาทิ เช่น *Litopenaeus vannamei* มีค่าเท่ากับ 20.74 ชั่วโมง (Chiayvareesajja *et al.*, 2006), *Litopenaeus setiferus* เท่ากับ 22.27 ชั่วโมง (Reed *et al.*, 2004, 2006) ภายหลังจากได้รับยาโดยการป้อนให้กินด้วยขนาด 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว อย่างไรก็ตามพบว่าค่าครึ่งชีวิตของการขับออกในซีโมลิมีฟกึ่งก้ามกรามที่ทำการศึกษานี้ มีค่ามากกว่ากึ่งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 6.93 ชั่วโมง ภายหลังจากได้รับยาโดยการป้อนให้กินด้วยขนาด 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว (ดังตารางที่ 17)

ตารางที่ 17 ค่าครึ่งชีวิตของยาออกซีเตตราซัยคลินในฮีโมลิพของกุ้งชนิดต่าง ๆ

ชนิดกุ้ง	ขนาดยา	วิธีที่ให้	ค่าครึ่งชีวิต (ชั่วโมง)	เอกสารอ้างอิง
<i>Litopenaeus vannamei</i>	10 µg/g b.w.	i.s.	20.74	Chiayvareesajja <i>et al.</i> , 2006
<i>Penaeus japonicus</i>	25, 50 mg/kg b.w.	i.s., p.o	24.7-33.6	Uno, 2004
<i>Litopenaeus setiferus</i>	10 µg/g b.w.	i.s.	22.27	Reed <i>et al.</i> , 2004
	60 µg/g b.w.	i.v.	21.5	Reed <i>et al.</i> , 2006
<i>Penaeus monodon</i>	10 mg/kg b.w	i.s., p.o.	23.1-6.93	Sangrungruang <i>et al.</i> , 2004
<i>Penaeus japonicus</i>	50 mg/kg b.w.	p.o.	44.7	Uno, 2002

หมายเหตุ : i.s. และ i.v. หมายถึง intrasinus, p.o. หมายถึง per os

ตารางที่ 18 ค่าครึ่งชีวิตของยาออกซีเตตราซัยคลินในเนื้อกุ้งชนิดต่าง ๆ

ชนิดกุ้ง	ขนาดยา	วิธีที่ให้	ค่าครึ่งชีวิต (ชั่วโมง)	เอกสารอ้างอิง
<i>Litopenaeus vannamei</i>	10 µg/g b.w.	i.s.	20.90	Chiayvareesajja <i>et al.</i> , 2006
<i>Litopenaeus setiferus</i>	60 µg/g b.w.	i.v.	29.1	Reed <i>et al.</i> , 2006
<i>Penaeus japonicus</i>	50 mg/kg b.w.	p.o.	46.8	Uno, 2002

เภสัชจลนศาสตร์ของยาออกซีเตตราซัยคลินในเนื้อกึ่งก้ามกราม ภายหลังจากการให้ยาเข้ากล้ามเนื้อและป้อนให้กิน ขนาด 11 และ 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว พบว่าภายหลังจากให้ยาเข้ากล้ามเนื้อ ขนาด 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว จะมีระดับความเข้มข้นของยาสูงกว่าทุกกลุ่มการทดลอง ซึ่งค่าครึ่งชีวิตของการขับออกของยาออกซีเตตราซัยคลินในเนื้อกึ่งก้ามกรามที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เมื่อเทียบกับกึ่งชนิดอื่น พบว่ามีค่ามากกว่าในกึ่ง *Litopenaeus vannamei* มีค่าเท่ากับ 20.90 ชั่วโมง (Chiayvareesajja *et al.*, 2006) ภายหลังจากให้โดยการฉีดเข้า sinus และมีค่าน้อยกว่าในกึ่งชนิดอื่น อาทิ เช่น *Litopenaeus setiferus* และ *Penaeus japonicus* (ดังตารางที่ 18)

ค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์สัมพัทธ์ (relative oral bioavailability) ของยาออกซีเตตราซัยคลินในฮีโมลิมฟ์กึ่งก้ามกราม จากการป้อนให้กินโดยตรง มีค่าเท่ากับ 48.11 และ 45.04 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังจากการให้ยาด้วยขนาด 11 และ 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ตามลำดับ อย่างไรก็ตามพบว่า มีรายงานการศึกษาค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์ของยาออกซีเตตราซัยคลินในฮีโมลิมฟ์กึ่ง *Penaeus monodon* เท่ากับ 59.9 เปอร์เซ็นต์ (Sangrungruang *et al.*, 2004) ในกึ่ง *Penaeus japonicus* เท่ากับ 43.2 เปอร์เซ็นต์ (Uno, 2004) และกึ่ง *Litopenaeus setiferus* เท่ากับ 49.5 เปอร์เซ็นต์ (Reed *et al.*, 2006) ซึ่งปัจจัยที่ทำให้มีความแตกต่างของค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์สัมพัทธ์ของยาออกซีเตตราซัยคลินนี้ อาจเกิดจากชนิดของกึ่งและคุณภาพของน้ำที่ใช้ในการเลี้ยงที่มีความแตกต่างกัน เช่น ค่าความเค็ม ความกระด้าง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณของแคลเซียมและแมกนีเซียมของน้ำที่ใช้เลี้ยงกึ่งทดลอง ซึ่งอาจมีผลต่อการดูดซึมของยาออกซีเตตราซัยคลิน ส่วนค่าปริมาตรการกระจายตัวของยาออกซีเตตราซัยคลิน พบว่ามีการกระจายตัวจากฮีโมลิมฟ์ไปยังเนื้อกึ่งอย่างรวดเร็ว เช่นเดียวกับรายงานในกึ่งชนิดอื่น (Chiayvareesajja *et al.*, 2006; Reed *et al.*, 2006; Uno, 2002)

ส่วนกึ่งก้ามกรามได้รับยาออกซีเตตราซัยคลินผสมในอาหาร ขนาด 4 กรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักอาหาร อัตรา 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักกึ่งทั้งหมด วันละ 2 ครั้ง นานติดต่อกัน 5 วัน ระดับความเข้มข้นยาออกซีเตตราซัยคลินในกล้ามเนื้อตรวจด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาเท่ากับ 0.82 ± 0.27 ไมโครกรัมต่อกรัม ภายใน 24 ชั่วโมงหลังได้รับอาหารผสมยา และพบว่าระดับความเข้มข้นสูงสุด (C_{max}) 1.58 ± 0.75 ไมโครกรัมต่อกรัม ในวันสุดท้าย (วันที่ 5) ของการให้อาหารผสมยา และสามารถตรวจพบยาออกซีเตตราซัยคลินในเนื้อกึ่งอีก 8 วัน ภายหลังจากให้อาหารผสมยา ซึ่งสอดคล้องรายงานวิจัยอื่นที่พบระดับความเข้มข้นยาออกซีเตตราซัยคลินในเนื้อกึ่งก้ามกราม *M. rosenbergii* ภายใน 14 ชั่วโมงภายหลังจากให้ยา เมื่อให้ยาผสมอาหารขนาด 2.5 และ 5 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักอาหาร นานติดต่อกัน 7 วัน (Brillantes *et al.*, 2001) และรายงานใน Juvenile white shrimp (Corliss, 1979) ตรวจพบที่เวลา 48 และ 24 ชั่วโมง ภายหลังจากให้ยาผสมอาหาร

ขนาด 1, 5 และ 10 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักอาหาร ตามลำดับ ส่วนรายงานใน *Penaeus monodon* ที่ได้รับยาผสมอาหารขนาด 3, 5 และ 10 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักอาหาร นานติดต่อกัน 7 วัน พบยาออกฤทธิ์เตตราไซคลิกในวันที่ 2 ของทุกกลุ่มการทดลอง ระดับความเข้มข้นต่ำสุดในเนื้อกุ้งกุลาดำที่ตรวจได้ คือ 0.6 ไมโครกรัมต่อกรัม (มณฑิรา, 2543) และใน Juvenile blue shrimp (*Penaeus stylirostris*) พบระดับความเข้มข้นยาออกฤทธิ์เตตราไซคลิกในเนื้อกุ้งชนิดนี้ 4 วัน ภายหลังการให้ยาผสมอาหารขนาด 1.5 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักอาหาร นานติดต่อกัน 14 วัน (Mohny et al., 1997) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าไม่สามารถตรวจระดับยาออกฤทธิ์เตตราไซคลิกภายหลังการหยุดให้ยา 14 วันในกุ้ง *Penaeus vannamei* (Bermúdez-Almada et al., 1999) และใน *M. rosenbergii* ภายหลังการหยุดยา 13 วัน เมื่อให้ยาผสมอาหารขนาด 2.5 และ 5 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักอาหาร ติดต่อกันนาน 14 วัน (Brillantes et al., 2001) เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จากการศึกษาทดลองครั้งนี้กับรายงานวิจัยอื่น สรุปได้ว่าความแตกต่างของระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ตรวจพบยาออกฤทธิ์เตตราไซคลิก อาจเป็นผลมาจากขนาดยา ระยะเวลาในการให้ยา วิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ยาคุณภาพน้ำ รวมถึงชนิดของกุ้งทดลองที่นำมาศึกษาวิจัย

จากการศึกษาทดลองถึงการตกค้างของยาออกฤทธิ์เตตราไซคลิกในเนื้อกุ้งก้ามกราม ต้องใช้วิธีวิเคราะห์ปริมาณยา 2 วิธี คือ จุลชีววิทยาและ CHARM II assay เนื่องจากค่า LOD ของการวิเคราะห์ยาออกฤทธิ์เตตราไซคลิก โดยวิธีทางจุลชีววิทยาเท่ากับ 0.25 ไมโครกรัมต่อกรัม เพราะฉะนั้นในตัวอย่างที่มีระดับต่ำกว่า LOD ของการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาจึงต้องทำการวิเคราะห์โดยวิธี CHARM II assay ซึ่งมีค่า LOD เท่ากับ 0.1 ไมโครกรัมต่อกรัม ซึ่งมีความสอดคล้องกับระดับ MRL ของยาออกฤทธิ์เตตราไซคลิกที่กำหนดให้มีการตกค้างในเนื้อสัตว์ที่นำมาบริโภค (0.1 ไมโครกรัมต่อกรัม, EEC 2377/90 Codex Alimentarius) เพราะฉะนั้นจากการศึกษาทดลองการตกค้างของยาออกฤทธิ์เตตราไซคลิกในกุ้งก้ามกรามครั้งนี้ จึงสรุปว่าหากให้ยาผสมอาหารในขนาด 4 กรัมต่อน้ำหนักอาหาร วันละ 2 ครั้ง ติดต่อกัน 5 วัน (คิดเป็น 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวทั้งหมด) ยาจะคงอยู่ในเนื้อกุ้งก้ามกรามเป็นระยะเวลา 8 วัน ภายหลังจากหยุดให้ยาผสมอาหาร นอกจากนี้ยังเป็นขนาดที่แนะนำให้ใช้ในฟาร์มเลี้ยงกุ้งก้ามกราม เพื่อใช้รักษาโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งที่ไวต่อยานี้ เนื่องจากระดับความเข้มข้นของยาที่ให้นี้สามารถคงอยู่เหนือระดับ minimum inhibitory concentration ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Takahashi et al., 1985)

การศึกษาดูการตกค้างของยาออกฤทธิ์เตตราไซคลิกในกุ้งก้ามกรามครั้งนี้ เป็นการศึกษาเฉพาะในอีโมลิฟและเนื้อกุ้งก้ามกราม ซึ่งเนื้อกุ้งถือว่าเป็นส่วนที่มักนำมาบริโภค อย่างไรก็ตาม

พบว่าส่วนหัวของกึ่งนั้นก็มีผู้นิยมนำมาบริโภครด้วย และมีรายงานว่า hepatopancreas เป็นอวัยวะที่มีการสะสมของยาเมื่อกึ่งได้รับยาชนิดต่าง ๆ เข้าสู่ร่างกาย จึงมีระยะเวลาการตกค้างของยาอีกซึ่งตรวจได้ตรวจพบมากกว่าอวัยวะอื่น (Brillantes *et al.*, 2001; Chiayvareesajja *et al.*, 2006) เพราะฉะนั้นหากนำส่วนหัวของกึ่งก้ามกรามาบริโภค ควรมีระยะหยุดการให้ยาอีกซึ่งตรวจได้ตรวจพบมากกว่า 8 วัน



สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

ได้ทำการศึกษาทางเภสัชศาสตร์และการตกค้างของยาออกซีเตตราไซคลินในกึ่งกล้ามเนื้อ ภายหลังจากให้เข้ากล้ามเนื้อและป้อนให้กิน ขนาด 11 และ 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัวและผสมยาในอาหาร ขนาด 4 กรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักอาหาร ในอัตรา 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว ทั้งหมด วันละ 2 ครั้ง นานติดต่อกัน 5 วัน เพราะปัจจุบันข้อมูลทางเภสัชจลนศาสตร์และการตกค้างของยาปฏิชีวนะในกึ่งกล้ามเนื้อมีข้อมูลน้อยมาก (Brillantes *et al.*, 2001; Poapolathep *et al.*, 2008a, b, c) มีการศึกษาเกี่ยวกับเภสัชจลนศาสตร์และการตกค้างของยาออกซีเตตราไซคลินในสัตว์น้ำหลายชนิด (Brillantes *et al.*, 2001; Reed *et al.*, 2004; Uno, 2004; Chiayvareesajja *et al.*, 2006; Sangrungruang *et al.*, 2004; Grondel *et al.*, 1987; Elema *et al.*, 1996; Wang, 2004; Corliss, 1979; Poapolathep *et al.*, 2008) ผลการศึกษาทดลองครั้งนี้ ตรวจพบยาออกซีเตตราไซคลินในเนื้อกึ่งกล้ามเนื้อซึ่งมีระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ภายหลังจากให้ยาเข้ากล้ามเนื้อ ป้อนให้กิน และผสมในอาหาร แสดงว่ายาออกซีเตตราไซคลินที่ให้ด้วยขนาดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ สามารถดูดซึมเข้าสู่ระบบหมุนเวียนเลือดและเนื้อกึ่งกล้ามเนื้อได้ดี และเมื่อพิจารณาจากค่าพารามิเตอร์ที่สำคัญทางเภสัชจลนศาสตร์ พบว่ายาออกซีเตตราไซคลินมีความสามารถในการดูดซึมจากระบบหมุนเวียนเลือดเข้าสู่เนื้อกึ่งกล้ามเนื้อได้ในอัตราที่ค่อนข้างสูง และมีการแพร่กระจายไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกายได้อย่างรวดเร็วและถูกขับออกจากร่างกาย โดยค่าครึ่งชีวิตของยาออกซีเตตราไซคลินในฮิโมลิฟจะสั้นกว่าในเนื้อกึ่งกล้ามเนื้อ เพราะฉะนั้นถ้าต้องการให้ยาออกซีเตตราไซคลินถูกขับออกจากกล้ามเนื้อกึ่งกล้ามเนื้อ ประมาณ 99 เปอร์เซ็นต์ ต้องใช้เวลานาน ประมาณ 7 วัน ภายหลังจากให้ยาเข้ากล้ามเนื้อและป้อนให้กินครั้งเดียว ด้วยขนาด 11 และ 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว ซึ่งสอดคล้องกับขนาดที่ใช้ในการผสมอาหาร (4 กรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักอาหาร วันละ 2 ครั้ง ติดต่อกันเป็นเวลา 5 วัน) พบว่าภายหลังจากหยุดยาผสมอาหาร ยังสามารถตรวจพบยาออกซีเตตราไซคลินในเนื้อกึ่งกล้ามเนื้ออีก 8 วัน และหากให้ยาผสมอาหารด้วยขนาดยาตามการศึกษาทดลองครั้งนี้ จึงแนะนำให้หยุดยาเป็นระยะเวลา 8 วันก่อนนำเนื้อกึ่งกล้ามเนื้อไปบริโภค

ข้อเสนอแนะ

1. แนะนำให้ใช้อ็อกซีเตตราซัยคลินผสมอาหาร ขนาด 4 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักอาหาร เพราะระดับความเข้มข้นของยาตลอดการทดลองอยู่เหนือระดับ MIC (ค่า 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งให้ผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 49 สายพันธุ์ (Takahashi *et al.*, 1985)

2. แนะนำให้ใช้อ็อกซีเตตราซัยคลิน ขนาด 11 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ในการให้ยาเข้ากล้ามเนื้อหรือป้อนให้กิน เพราะการดูดซึม การกระจายตัว และการขับออกไม่มีความแตกต่างกันมากเมื่อให้ขนาด 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว เพื่อเป็นการป้องกันการตกค้างของยาต่อสภาพแวดล้อม ซึ่งอาจมีผลต่อการดื้อยาของแบคทีเรียในธรรมชาติด้วย

3. ควรศึกษาเพิ่มเติมการตกค้างของยาปฏิชีวนะ และสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งชนิดอื่น เพื่อป้องกันการตกค้างของยาและสารเคมีอื่น ๆ เมื่อได้รับจากการเลี้ยง รวมถึงการป้องกันและการรักษาโรคติดเชื้อชนิดต่างๆ เพื่อป้องกันการดื้อยาของแบคทีเรียและเป็นอันตรายต่อผู้ใช้

4. ควรศึกษาเพิ่มเติมทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาปฏิชีวนะในกุ้งสายพันธุ์อื่น เช่น กุ้งขาวแวนนาไม (*Penaeus vannamei*) เพราะเป็นกุ้งที่มีการเลี้ยงเพื่อบริโภคเป็นจำนวนมาก และยังมีข้อมูลพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ในกุ้งชนิดนี้ค่อนข้างน้อยมาก ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการกำหนดระยะเวลาปลอดยาเพื่อป้องกันการตกค้างของยา ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคเมื่อได้รับยาที่ตกค้างในเนื้อกุ้ง และป้องกันการเกิดการดื้อยา

5. ควรศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ยาปฏิชีวนะในสัตว์น้ำชนิดอื่น ๆ ที่นำมาบริโภค เพื่อเป็นข้อมูลในการกำหนดขนาดยาที่จะใช้ วิธีการให้ และระยะเวลาปลอดยา เพื่อผลในการป้องกันและรักษา รวมทั้งความปลอดภัยของผู้บริโภค

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมส่งเสริมการส่งออก กระทรวงพาณิชย์. ม.ป.ป. ข้อมูลและการส่งออก. แหล่งที่มา

<http://www.dephtai.go.th/>, 30 มกราคม 2553.

กรมประมง. 2545. บทความการเพาะเลี้ยงกุ้ง กุ้ง. แหล่งที่มา:

http://www.nicaonline.com/articles2/site/view_article.asp?idarticle=102, 15 กรกฎาคม 2551.

โกวิทย์ พุดทวี. 2549. บทความกุ้งก้ามกรามการเพาะเลี้ยงและการตลาด. แหล่งที่มา:

http://www.nicaonline.com/articles2/site/view_article.asp?idarticle=165, 20 ตุลาคม 2551.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. ม.ป.ป. อุตสาหกรรมกุ้งไทย. บทความทันโลกตอนก้าวทันกุ้ง. แหล่งที่มา

http://www.thailandshrimp.com/op_actworld_p10.html, 10 มกราคม 2553.

ธงชัย เนติชัยกิจ, สุรศักดิ์ ดิลกเกียรติ, ส่งศักดิ์ ศรีสง่า และนภาพร เลิศวรปรีชา. 2548. การเปรียบเทียบผลตรวจยาปฏิชีวนะตกค้างหลังการหยุดยาออกซีเตตราซัยคลิน ซัลฟาเม็ท ที่อกซาโซล ซัลฟาเม็ทที่อกซาโซล+ทรีเม็ทโทปริม และเอ็นโรฟล็อกซาซินในกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) โดยวิธีไมโครเบียล อินฮิบิชั่น ดิสค์ แอสเสย์ และชุดตรวจสอบยาปฏิชีวนะตกค้าง แชมเทสต์. วารสารสงขลานครินทร์ (สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี). 27: 283-290.

นิรนาม. 2550. ยาด้านจุลชีพกับภาวะเชื้อดื้อยา, น. 59-69. ใน การสัมมนาระดมความคิดเห็น.

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ร่วมกับ สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 6 มีนาคม 2550, โรงแรมมารวย การ์เด้น กรุงเทพฯ.

นรินาม. ม.ป.ป. การใช้ยาและสารเคมีในฟาร์มกุ้ง. แหล่งที่มา:

<http://www.vetcouncil.or.th/download/word/18510053.doc.>, 20 มกราคม 2553.

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2549. บทความแบบที่เกี่ยวกับการเลี้ยงปลาช่อน. สำนักบริการวิชาการ มหาวิทยาลัยบูรพา แหล่งที่มา

http://www.uniserv.buu.ac.th/forum2/topic.asp?TOPIC_ID=1480, 30 มกราคม 2553.

บริษัท ออลเวท จำกัด. ม.ป.ป. การเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. แหล่งที่มา :

http://www.kungthai.com/KungThai/con_detail.php?id=25, 15 กุมภาพันธ์ 2553.

มณฑิรา ถาวรชุตติการต์. 2543. ตรวจสอบการตกค้างของยาออกซีเตตราไซคลินในกุ้งกุลาดำที่ให้
ยาผสมอาหารที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ โดยวิธีทางจุลชีวและวิธีลิควิดโครมาโตกราฟี.
เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 33/2543, ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งทะเลจังหวัดระยอง กรม
ประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

มาลินี ลิ้มโกคา. 2535. เกษตรศาสตร์พื้นฐานในสัตว์บกและสัตว์น้ำ. โรงพิมพ์จรัสสินทวงศ์,
กรุงเทพฯ.

มาลินี ลิ้มโกคา, พิบูล ไชยอนันต์, สกล พงศกร, สุจิตรา พงศ์วิวัฒน์, กาญจน์ ธรรมพิพัฒน์กุล,
ดวงดาว วงศ์สมมาตร, จุไรรัตน์ รุ่งโรจน์รักษ์, จิตติยา แซ่ป้ง, อุดม สิทธิภูประเสริฐ, ปิยะ
พงศ์ โชติพันธุ์, ไตรเทพ วิชัยโกวิทเทพ และลิขิต ชูจิต. 2537. การศึกษาของกลุ่มด้านจุล
ชีพ การตกค้างของยาและระยะปลอดยาในกุ้งกุลาดำ, น. 2-31. ใน การประชุมเทคโนโลยี
ชีวภาพกับความหลากหลายทางชีวภาพศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่ง
ชาติ. 8-9 กันยายน 2537, โรงแรมรอยัลออคิด เซอรادتน์ กรุงเทพฯ.

มาลินี ลิ้มโกคา. 2540. การใช้ยาต้านจุลชีพในสัตว์บกและสัตว์น้ำ. โรงพิมพ์จรัสสินทวงศ์,
กรุงเทพฯ.

ลิลา เรื่องแป้น และ ชัยวุฒิ สุธาทองกง. 2547. **บทความโรคที่พบในฟาร์มเลี้ยงและทำให้กุ้งตายจำนวนมากอย่างรวดเร็ว.** ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสมุทรสาคร กรมประมง
แหล่งที่มา: http://www.nicaonline.com/articles7/site/view_article.asp?idarticle=102, 17
ตุลาคม 2551.

ลิลา เรื่องแป้น. 2548. **บทความปัญหาสารปฏิชีวนะกับการเพาะเลี้ยงกุ้ง.** ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสมุทรสาคร กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง แหล่งที่มา: http://www.nicaonline.com/articles2/site/view_article.asp?idarticle=157, 17 ตุลาคม 2551.

วรรณภา สมบุญสำราญ, สุพิศ ทองรอด และ สุภาพรณ บริลเลียนเตส. 2544. ผลของยาออกซีเตตราซัยคลินต่อการเจริญเติบโตและการตกค้างในกุ้งกุลาดำ. ใน การสัมมนาวิชาการประจำปี 2544. ณ ห้องประชุมกรมประมง กรุงเทพฯ.

วลัย คลี่ฉายา และ ปิยาลย์ เหมทานนท์. ม.ป.ป. **การศึกษาปริมาณการตกค้างของออกซีเตตราซัยคลินในกุ้งแชบ๊วย.** ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งนครศรีธรรมราช กรมประมง แหล่งที่มา: http://www.fisheries.go.th/cf-nakhon/newweb_index.php?option=com_content&view=article&id=15:shrimp&catid=16:shrimp&Itemid=7, 5 พฤษภาคม 2553.

สถาบันอาหาร องค์การเครือข่ายกระทรวงอุตสาหกรรม. 2546. **บทความมหันตภัย สารปฏิชีวนะ.** แหล่งที่มา http://www.nfi.or.th/publication/thairath/thairath_current196.html, 30 มกราคม 2553.

สุปราณี ชินบุตร, เต็มดวง สมศิริ และ พรเลิศ จันทรรักษ์กุล. 2545. **ยาและสารเคมีเพื่อการป้องกันและรักษาโรคสัตว์น้ำ.** สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง, กรุงเทพฯ.

สำนักงานประมงจังหวัดสุพรรณบุรี กรมประมง. 2551. **การเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม.** แหล่งที่มา: <http://www.fisheries.go.th/fpo-suphunburi/khamkam.htm>, 15 กรกฎาคม 2551.

สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน เล่ม 13. 2540. การเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. แหล่งที่มา:

<http://kanchanapisek.or.th/kp6/BOOK13/chapter10/t13-10-12.htm#sect4>, 10 กรกฎาคม 2551.

อำนาจ พัวพลเทพ, นฤมล กลางแก้ว และ นกสร เผ่าชูศักดิ์. 2540. การศึกษาคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์และระยะปลอดภัยของยาซัลฟาไดออกซิน และซัลฟาเมททอกซีไดอะซีนในเป็ด. ใน การประชุมวิชาการในงานเกษตรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 36. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อาสรา ใจเย็น, ชลอ ลีมสุวรรณ, พรเลิศ จันทรรักษ์กุล และ สุปราณี ชินบุตร. 2536. การศึกษาการแพร่กระจายออกซิเตตราซัยคลินในกึ่งกุลาคำ. ใน การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 31. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Alderman, D.J. and T.S. Hastings. 1998. Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance-potential for consumer health risks. **Int. J. Food Sci. Technol.** 33: 139-155.

Allen, J. L. and J.B. Hunn. 1986. Fate and Distribution Studies of Some Drugs used in Aquaculture. **Vet. Hum. Toxicol.** 28 (1): 21-24.

Anonymous. 2008. **Charm II test for antimicrobial drugs in tissue. Operator's Manual.** Charm Sciences, Inc. USA*.

Baggot, J.D. 1977. Principles of drug disposition in domestic animal, **The basic Veterinary Clinical Pharmacology**, Saunders, USA.

Bennett, J.R., J.L. Brodie, E.J. Benner and W.M.M. Kirby. 1966. Simplified, accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. **Appl. Microbiol.** 14: 170-177.

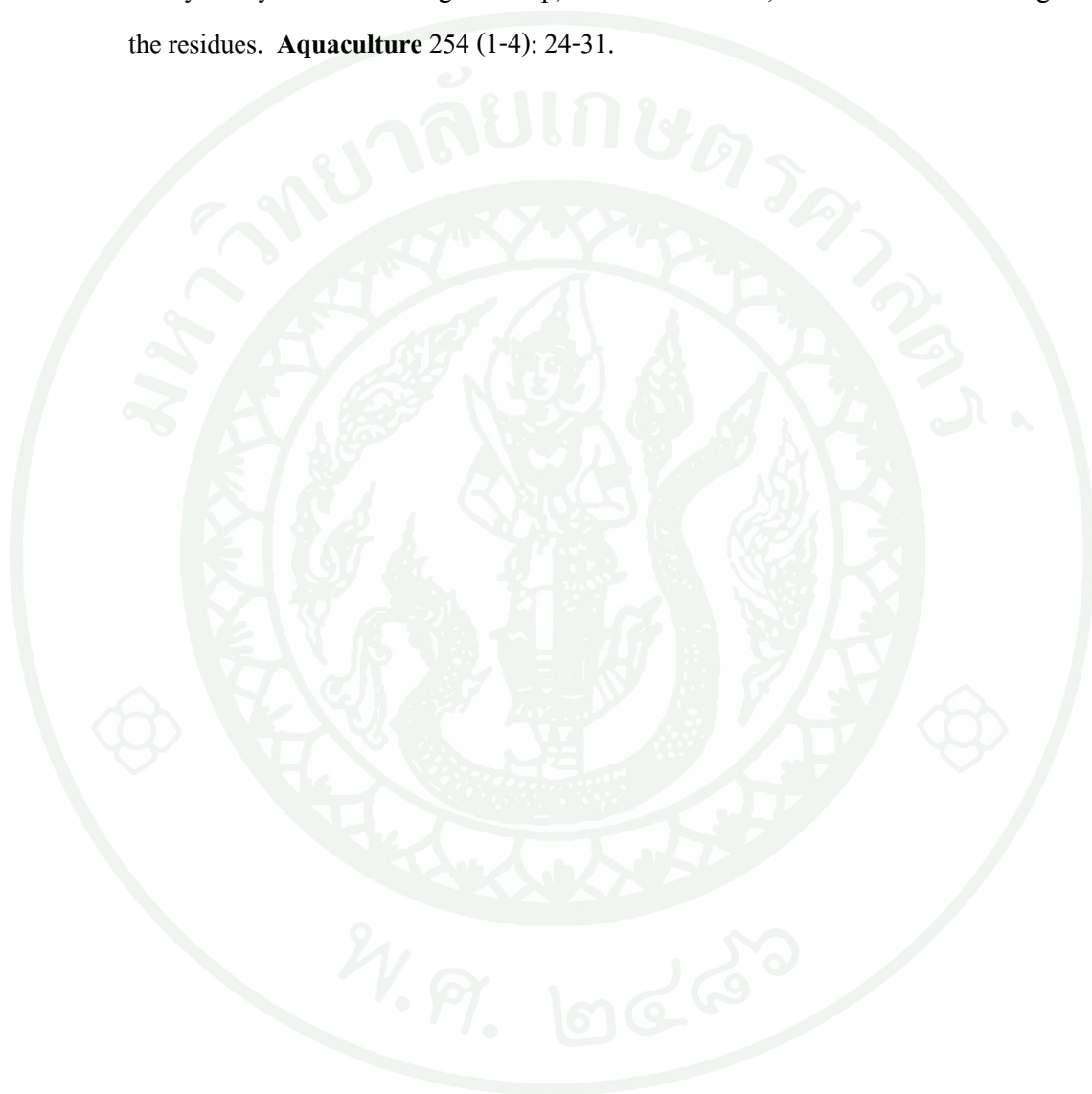
- Bermúdez-Almada, M.C., M.G. Pérez-Tello, A.I. Valenzuela-Quintanar and Vazquez-Moreno. 1999. Oxytetracycline Residues in Cultured White Shrimp Tissue by HPLC and a Microbial Receptor Assay. **Journal of Food Science** 64 (4): 638-640.
- Brander, G.C. 1991. **Veterinary Applied Pharmacology and Therapeutics**. 5th edition, London.
- Brillantes, S., V. Tanasomwang, S. Thongrod and N. Dachanantawitaya. 2001. Oxytetracycline Residues in Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). **J. Agri. Food Chem.** 49: 4995-4999.
- Corliss, J.P. 1979. Accumulation and depletion of oxytetracycline in juvenile white shrimp (*Penaeus setiferus*). **Aquaculture** 16 (1): 1-6.
- Elema, M.O., K.A. Hoff and H.G. Kristensen. 1996. Bioavailability of oxytetracycline from medicated feed to Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in seawater. **Aquaculture** 143 (1): 7 -14.
- FAO/NACA/WHO. 1999. Food safety issues associated with products from aquaculture: report of a joint FAO/NACA/WHO Study Group, 1999 (**WHO Technical Report Series, No. 883**).
- Gräslund, S., K. Holmstrom and A. Wahlstrom. 2003. A Field Survey of Chemicals and Biological Products used in Shrimp Farming. **Mar. Poll. Bull.** 46: 81-90.
- Hernández Serrano, P. 2005. Responsible use of antibiotic in aquaculture. **FAO Fisheries Technical Paper. No 469**, FAO, Rome.

- Limpoka, M., S. Pongsakon, S. Phongvivat, G. Thampipatanakul, D. Wongsommart, C. Rongrodejarnarak, T. Pung, U. Sittiphuprasert, P. Chotipund, T. Vichkovitten, L. Chuchit, O. Lawhavinit, P. Chainanan, R. Kanchanomai and T. Wongkalaung. 1994. Antimicrobial Drug in *Penaeus monodon* Fabricius. **THE 32nd KASETSART UNIVERSITY ANNUAL CONFERENCE**. 3-5 February. Kasetsart University, Bangkok. 428-438.
- Mohney, L.L., R.R. Williams, T.A. Bell and D.V. Lightner. 1977. Residues of oxytetracycline in cultured juvenile blue shrimp, *Penaeus stylirostris* (Crustacea: Decapod), fed medicated feed for 14 days. **Aquaculture** 149 (3-4): 193-202.
- Poapolathep, A., N. Klangkaew and N. Phaochoosak. 2000. A Study of the Pharmacokinetic Behaviors and Withdrawal Times of Sulfamonomethoxine, Sulfadiazine and Sulfamethazine in Healthy Chickens. **J. ISSAAS** 6: 15-22.
- Poapolathep, A., S. Poapolathep, K. Imsilp, N. Wannapat, N. Klangkaew, N. Kusutjarit and S. Kumagai. 2008a. Distribution and Residue Depletion of Oxytetracycline in Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium orsenbergii*). **Journal of Food Protection** 71: 870-873.
- Poapolathep, A., S. Poapolathep, U. Jermnak, K. Imsilp, N. Wannapat, Y. Sugita-Konishi and S. Kumagai. 2008b. Muscle tissue kinetics of oxytetracycline following intramuscular and oral administration at two dosages to giant freshwater shrimp (*Macrobrachium rosenbergii*). **J. Vet. Pharmacol. Therap.** 31: 517-522.
- Poapolathep, A., U. Jermnak, A. Chareonsan, C. Sakulthaew, N. Klangkaew, T. Kusaerm and S. Kumagai. 2008c. Dispositions and Residue Depletion of Enrofloxacin and its Metabolite Ciprofloxacin in Muscle Tissue of Giant Freshwater Prawns (*Macrobrachium rosenbergii*). **J. Vet. Pharmacol. Therap.** 32 (3): 229-234.

- Reed, L.A., T.C. Siewicki and J.C. Shah. 2004. Pharmacokinetics of oxytetracycline in the white shrimp, *Litopenaeus setiferus*. **Aquaculture** 232 (1-4): 11-28.
- Reed, L.A., T.C. Siewicki and J.C. Shah. 2006. The biopharmaceutics and oral bioavailability of two forms of oxytetracycline to the white shrimp, *Litopenaeus setiferus*. **Aquaculture** 258 (1-4): 42-54.
- Sokol, J. and E. Matisova. 1994. Determination of tetracycline antibiotics in animal tissue of food-producing animals by high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, 669: 75-80.
- Weifen, W., L. Hong, X. Changhu and K. Jamil. 2004. Elimination of Chloramphenicol, Sulphametoxazole and Oxytetracycline in Shrimp, *Penaeus chinensis* following medicated - feed treatment. **Environ Int.** 30: 367-373.
- Sangrungruang, K., A. Chotchuang and R. Ueno. 2004. **Comparative** pharmacokinetics and bioavailability of oxytetracycline in giant tiger prawn. **Fisheries science** 70 (3): 467-472.
- Takahashi, Y., T. Itami, A. Nakagawa, H. Nishimura and T. Abe. 1985. Therapeutic effects of oxytetracycline trial tablets against vibriosis in cultured Kuruma prawn *Penaeus japonicus* Bate. **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish** 51: 1639-1643.
- Uno, K. 1996. Pharmacokinetic study of oxytetracycline in healthy and vibriosis-infected ayu (*Plecoglossus altivelis*). **Aquaculture** 143: 33-42.
- . 2002. Oxytetracycline and oxolinic acid residues in kuruma prawn (*Penaeus japonicus*) and the effect of cooking procedures on the residues. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)** 43 (2): 62-67.

———. 2004. Pharmacokinetics of oxolinic acid and oxytetracycline in kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*. **Aquaculture** 230 (1-4): 1-11.

———, T. Aoki, W. Kleechaya, V. Tanasomwang and L. Ruangpan. 2006. Pharmacokinetics of oxytetracycline in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and the effect of cooking on the residues. **Aquaculture** 254 (1-4): 24-31.







ภาคผนวก ก

ขั้นตอนการทดลองยาอีอกซีเตตราไซคลินในอีโมลิฟและเนื้อกุ้งก้ามกราม

1. อุปกรณ์และวิธีการเก็บตัวอย่างอีโมลิฟและเนื้อกุ้งก้ามกราม

1.1 อุปกรณ์ภาคสนาม

1.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงกุ้งก้ามกราม

1. โรงเรือนเลี้ยงกุ้ง แบบปิด ซึ่งมีหลังคา และพลาสติกกันลมโดยรอบ ทำความสะอาดและฆ่าเชื้อตามหลักมาตรฐานสากล
2. บ่อเลี้ยงกุ้ง บ่อซีเมนต์ กว้าง 2 เมตร สูง 0.8 เมตร มีรูและท่อพลาสติกตรงกลางเพื่อปล่อยน้ำ
3. กระชังสำหรับใส่กุ้ง เป็นกระชังพลาสติก พื้นบุด้วยตาข่าย มีช่องสำหรับใส่และนำกุ้งออกมา
4. กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) คณะแพศ สุขภาพดี อายุ 6-7 เดือน
5. อุปกรณ์ให้ออกซิเจน
6. เทอร์โมมิเตอร์ (thermometer)
7. ที่ช้อนกุ้ง
8. ภาชนะใส่อาหารประจำกลุ่มทดลองแต่ละกลุ่ม
9. น้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งก้ามกราม

ตารางผนวกที่ ก1 คุณภาพของน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งก้ามกราม

ค่าพารามิเตอร์น้ำที่ใช้เลี้ยง	อยู่ระหว่าง
pH	7.5 – 8.5
อุณหภูมิ	28 – 30 องศาเซลเซียส
Alkalinity	20 – 60 มิลลิกรัมต่อลิตร
DO	4 – 6 มิลลิกรัมต่อลิตร
Hardness	30 – 150 มิลลิกรัมต่อลิตร

Inter 10. อาหารกุ้งก้ามกราม อีห้อ เฟรช 305 กุ้ง 120 วัน ชนิดเม็ดจมน้ำ บริษัท Lab

ตารางผนวกที่ ก2 คุณภาพอาหารกุ้งก้ามกราม

คุณภาพอาหาร	ปริมาณ (เปอร์เซ็นต์)
โปรตีน	ไม่น้อยกว่า 30
ไขมัน	ไม่น้อยกว่า 4
ความชื้น	ไม่มากกว่า 12
กาก	ไม่มากกว่า 6

1.1.2 สารเคมีออกซิดีเตดร้าซซคลิน (บริษัท Sigma Chemical Co. St Louis, Mo, USA)

1.1.3 อุปกรณ์และสารเคมีในการเก็บฮีโมลิมฟ์และเนื้อกุ้งก้ามกราม

1. หลอดฉีดขนาด 1 และ 3 มิลลิลิตร
2. เข็มฉีดยาเบอร์ 22 หรือ 23 ยาว 1 นิ้ว
3. เข็มป้อนยาสำหรับการให้กิน
4. สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (heparin)

5. หลอดทดลองสำหรับเก็บเลือดขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร
6. จุกปิดหลอดทดลอง
7. ที่วางหลอดทดลองเก็บเลือด (Rack)
8. ถุงมือผ้าเพื่อใช้จับกึ่ง
9. ตารางบันทึกการให้ยาและการเก็บตัวอย่างฮีโมลิมฟ์
10. กระดาษกำกับตัวอย่างหรือกระดาษ label
11. เครื่องชั่งน้ำหนัก 2 ตำแหน่ง (รุ่น BJ 1000C บริษัท Precisa, Switzerland)
12. ถังใส่น้ำแข็งและน้ำแข็ง
13. ถังพลาสติกสำหรับแช่ตัวอย่าง
14. ถุงพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่างเนื้อกึ่ง
15. ปากกาเคมีแบบกันน้ำ

1.1.4 อุปกรณ์ในการปั่นเก็บฮีโมลิมฟ์และเนื้อกึ่งก้ามกราม

1. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) (รุ่น H-11NA KOKUSAN บริษัท KOKUSAN, Japan)
2. หลอดแก้วสำหรับดูดสารละลาย (pasteur pipette)
3. จุกยางสำหรับดูดสารละลาย

4. หลอดเก็บพลาสมารวมขนาด 2 มิลลิลิตร

5. กระดาษกำกับตัวอย่างหรือกระดาษขาว

6. ถังพลาสติกสำหรับใส่ตัวอย่าง

7. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (บริษัท SANYO, Thailand)

1.2 อุปกรณ์ห้องปฏิบัติการ

1.2.1 สารเคมีและอุปกรณ์ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1. Tryptic Soy Broth รุ่น Batco™ (ยี่ห้อ BD บริษัท Becton, France)

2. Muller Hinton Agar รุ่น Difco™ (ยี่ห้อ BD บริษัท Becton, France)

3. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus* (ATCC 11778)

4. Hydrochloric acid (HCl)

5. น้ำกลั่น (distilled water)

6. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) (บริษัท BECKMAN, USA)

7. Beaker หรือ Erlenmayer flask

8. เครื่องนึ่งไอน้ำความดันสูง (autoclave) (รุ่น HA 240M บริษัท HIRAYAMA, Japan)

9. เครื่องกวนสารละลายแบบมีความร้อน (hot plate stirrer) (รุ่น RH digital KT/C บริษัท IKA, Germany)

10. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (petri-dish) ขนาด 15 x 100 มิลลิเมตร
11. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) (รุ่น BS-01 บริษัท Medic, Thailand)
12. เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) (รุ่น G-560 E บริษัท Scientific, USA)
13. หลอดนํ้าขนาด 25 มิลลิลิตร
14. เครื่องวัดอัตราการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (รุ่น Novaspec II บริษัท Pharmacia, England)

1.2.2 อุปกรณ์และสารเคมีในการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

1. ตู้บ่มเชื้อปรับอุณหภูมิได้ (รุ่น B-26 บริษัท Memmert, Germany)
2. Auto pipette ขนาด 20-200 ไมโครลิตร (ยี่ห้อ Gilson)
3. Pipette tip ขนาด 20-200 ไมโครลิตร
4. หลอดเจาะอาหารเลี้ยงเชื้อ
5. เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) (รุ่น G-560 E บริษัท Scientific, USA)
6. อุปกรณ์วัด inhibition zone

1.3 วิธีการทดลอง

1.3.1 ชั่งน้ำหนักถุงให้มีความใกล้เคียงกัน ใส่ถุงกระดาษละ 8 ตัว ทั้งหมด 40 กระดาษ โดยจะทำการเก็บอีโมลิฟและเนื้อกึ่งกัมกรตามช่วงเวลา ดังต่อไปนี้ คือ 0, 5, 10, 20, 30, 45 นาที, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 20, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 84, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 288, 312, 336, 360 และ 384 ชั่วโมง

1.3.2 จำนวนและเตรียมยา จดบันทึกการให้ยาในแต่ละเวลา การให้ยาควรให้ในเวลาใกล้เคียงกัน เพราะมีความสำคัญในการคำนวณหาค่าพารามิเตอร์ ณ เวลาที่เก็บตัวอย่าง

1.3.3 เคลือบเซพารินที่หลอดฉีดยาและหัวเข็ม เพื่อป้องกันการแข็งตัวของฮีโมลิมฟ์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

1.3.4 ก่อนให้ยาต้องทำการเก็บตัวอย่างกึ่งกลุ่มที่ยังไม่ให้ยา เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุม (control) โดยการเจาะเก็บฮีโมลิมฟ์จากตัวกึ่งก้ามกราม ส่วนหัวบริเวณขาเดินคู่ที่ 2 - 5 และนำเนื้อกึ่งก้ามกรามแช่แข็ง เพื่อใช้ทำสารมาตรฐานในเนื้อกึ่ง

1.3.5 นำฮีโมลิมฟ์ที่ได้ใส่ในหลอดทดลอง ปิดด้วยจุกยาง

1.3.6 นำฮีโมลิมฟ์ปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 1,750 g นาน 15 นาที

1.3.7 ดูดของเหลวใส (supernatant) ใส่หลอดเก็บพลาสมา ให้ได้ปริมาณมากที่สุดเท่าที่จะเก็บได้ และนำไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

1.3.8 วิเคราะห์ระดับยาในฮีโมลิมฟ์โดยวิธีทางจุลชีววิทยา

2. การสกัดยาจากเนื้อกึ่งก้ามกรามเพื่อวิเคราะห์โดยวิธีทางจุลชีววิทยา

2.1 อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องปั่นละเอียดเนื้อเยื่อ (homogenizer) (รุ่น T 25-S1 Blade-type Homogenizer บริษัท IKA, Germany)

2. สารละลาย Na_2EDTA -Mc Ilvaine Buffer (A) pH 4.0

3. เครื่องชั่งน้ำหนัก 2 ตำแหน่ง (รุ่น BJ 1000C บริษัท Precisa, Switzerland)

4. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) (รุ่น H-11NA KOKUSAN บริษัท KOKUSAN, Japan)

5. หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร

6. กระจกกรอง เบอร์ 1

7. ที่วางหลอดทดลอง (rack)

2.2 วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างเนื้อกึ่งกัมกราม น้ำหนัก 5 กรัม ใส่หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร
2. เติมน้ำละลาย Na_2EDTA -Mc Ilvaine Buffer (A) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร
3. ปั่นเนื้อกึ่งกัมกรามด้วยเครื่องปั่นละเอียดเนื้อเยื่อ นาน 1 นาที
4. นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 1,750 g นาน 10 นาที เก็บตัวอย่างส่วนใส (ทำขั้นตอน 2 - 4 อีกครั้ง)
5. นำตัวอย่างส่วนใสที่ได้ กรองผ่านกระจกกรองเบอร์ 1
6. วิเคราะห์ปริมาณยาในเนื้อกึ่งทดลองโดยวิธีทางจุลชีววิทยา

3. การวิเคราะห์ยาโดยวิธีทางจุลชีววิทยา

3.1 ขั้นตอนการเตรียมเชื้อเพื่อใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. นำเชื้อที่ต้องการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (broth) และนำมาเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง เพาะบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20-24 ชั่วโมง จนเป็นโคโลนี (colony)
2. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว เพื่อใช้ในการเลี้ยงเชื้อ โดยชั่ง tryptic soy broth น้ำหนัก 30 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปตั้งไฟอ่อน ๆ ต้มจนละลายกลายเป็นเนื้อ

เดียวกัน

3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ใส่หลอดทดลองขนาด 16 x 125 มิลลิเมตร
4. ปิดฝาหลอดทดลอง นำเข้าเครื่องนิ่งไอน้ำความดันสูง อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เพื่อฆ่าเชื้อโรคและสิ่งปนเปื้อน
5. เมื่ออบฆ่าเชื้อเสร็จ ตั้งทิ้งไว้จนเย็น ปิดฝาหลอดทดลองให้แน่นและนำเข้าตู้เย็นเก็บไว้ใช้ครั้งต่อไป
6. นำเชื้อที่บ่มเพาะเลี้ยงในตู้เพาะบ่มเชื้อออกมา และใช้ที่เขี่ยเชื้อ (loop) ลงไฟเพื่อฆ่าทำลายเชื้อ
7. แตะ loop บริเวณที่ไม่มีเชื้อขึ้น เพื่อลดความร้อนของ loop
8. ใช้ loop ตากเชื้อตรงโคโลนีที่ขึ้นกระจายแบบเดี่ยวให้ติดบริเวณหัว loop
9. เปิดฝาและทำการฆ่าเชื้อบริเวณปากหลอดทดลองอีกครั้ง
10. นำ loop ที่มีเชื้อจุ่มลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ให้เชื้อที่ติดอยู่กระจายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว
11. นำ loop ลงไฟ เพื่อฆ่าทำลายเชื้อที่อาจติดหลงเหลืออยู่ ทำหลาย ๆ ครั้งให้แน่ใจว่าเชื้อถูกทำลาย
12. ลงไฟที่ปากหลอดและปิดฝาหลอดทดลอง เขย่าด้วยเครื่องผสมสารละลาย เพื่อให้เชื้อมีการกระจายตัว
13. เพาะบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20-24 ชั่วโมง
14. เมื่อครบกำหนด สังเกตว่าเชื้อมีการเจริญขึ้นหรือไม่ โดยดูเทียบกับสีของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่ไม่ใส่เชื้อ

- ถ้าเชื่อมีการเจริญเติบโตดี สีของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวจะขุ่นและสามารถเห็นเส้นใยกระจายอยู่ในหลอดทดลองเป็นจำนวนมาก

- ถ้าเชื่อมีการเจริญเติบโตไม่ดี สีของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวจะใสไม่ขุ่น เส้นใยจะไม่ค่อยมีหรือมีจำนวนน้อยมาก

****** นำไปใช้ทำขั้นตอนที่ 8 ของการทำอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2 ขั้นตอนการทำอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 38 กรัม และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร
2. ตั้งไฟอ่อน ๆ ให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ด้วยเครื่องกวนสารละลายแบบควบคุมความร้อน (hot plate stirrer and magnetic bar)
3. เมื่อละลายจนเป็นเนื้อเดียวกัน นำลงตั้งทิ้งไว้ให้อุ่น
4. ทำการปรับเครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) โดยใช้ pH standard (std.) 2 ค่า ให้ค่า pH standard อยู่ระหว่างความเป็นกรด-ด่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่เราต้องการ เช่น
ถ้าเราต้องการอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH 6.0 ให้ใช้ pH standard 4 และ 7
ถ้าเราต้องการอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH 7.2 ให้ใช้ pH standard 7 และ 10
5. ทำการวัดความเป็นกรด-ด่าง ปรับและวัดจนได้ความเป็นกรด-ด่างตามที่เราต้องการ
6. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างแล้ว เข้าเครื่องนึ่งไอน้ำความดันสูง ทำการฆ่าทำลายเชื้อโดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เพื่อป้องกันการปนเปื้อน (contaminate)
7. นำอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ น้ำ ตั้งอุณหภูมิประมาณ 60 -70 องศาเซลเซียส ระวังอย่าให้อุณหภูมิต่ำกว่านี้ เพราะอาหารเลี้ยงเชื้ออาจจับกันเป็นวุ้นหรือแข็งตัว
8. เตรียมเชื้อที่บ่มเพาะเลี้ยงในตู้เพาะบ่มเชื้อ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20- 24 ชั่วโมง มาผสมให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่ไม่ได้ใส่เชื้อ เพื่อเจือจางความเข้มข้นของเชื้อ และหาค่า optical density (O.D.) ตามที่เราต้องการ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่ไม่มีเชื้อตั้ง

เป็น blank (ตั้งค่าเป็นศูนย์)

9. ตั้งค่าความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร

10. เมื่อได้ค่า O.D. แล้ว ให้เทเชื้อใส่ในกระบอกแก้ว ที่สะอาดและปิดฝาไว้

11. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ เทให้ปริมาตรพอดีกับปริมาตรที่เราต้องการ อาหารเลี้ยงเชื้อควรมีอุณหภูมิ ประมาณ 50 - 60 องศาเซลเซียส

12. เติมน้ำที่วัดค่า O.D. แล้วลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตรเชื้อ : อาหารเลี้ยงเชื้อ (1 : 250)

13. เขย่าเชื้อที่เติมเข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้มีการกระจายตัวของเชื้อผสมเข้ากันมากที่สุด ระวังอย่าให้อุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงมาก ป้องกันการจับตัวเป็นก้อนวุ้น

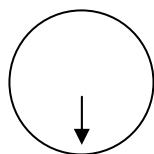
14. เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเพาะเชื้อ (petri dish) ขนาด 15 x 100 มิลลิเมตร ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

15. ใช้มือเขย่าจานเพาะเชื้อเบา ๆ ให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีการกระจายตัวเต็มพื้นที่ และยังช่วยในเรื่องการมีฟองอากาศในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย

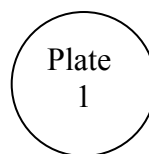
16. ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว ปิดฝา ถ้ายังไม่ใช้ทดลองให้เก็บใส่ถุงพลาสติก เพื่อป้องกันการปนเปื้อนและเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.3 ขั้นตอนการหยดตัวอย่างฮีโมลิมพ์

1. จานเพาะเชื้อที่เราจะใช้ให้นำมาเขียนลูกศรที่ฝาด้านล่างของจานเพาะเชื้อ เพื่อบอกตำแหน่งที่หยดยว่าอยู่ตำแหน่งไหน เพื่อป้องกันความผิดพลาดในการอ่านผล



ฝาด้านล่าง



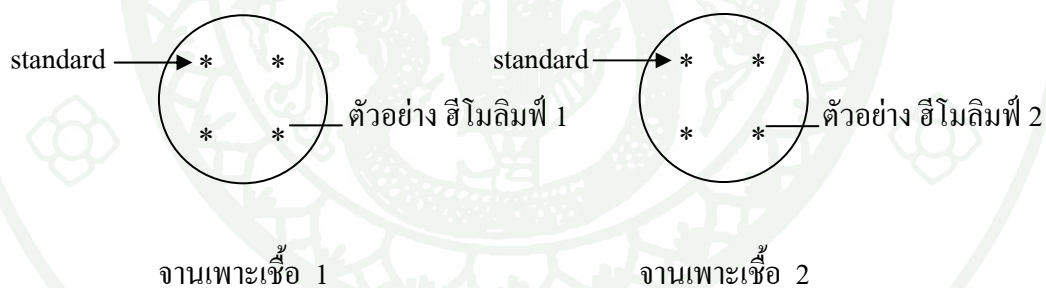
ฝาด้านบน

ภาพผนวกที่ ก1 การทำเครื่องหมายงานเพาะเชื้อ

2. เจาะหลุมบนอาหารเลี้ยงเชื้อในช่องที่เรากำหนดเพื่อหยดตัวอย่าง (ภาพผนวกที่ ก2) โดยวางเทียบกับกระดาษที่ใช้บันทึกข้อมูลตัวอย่าง

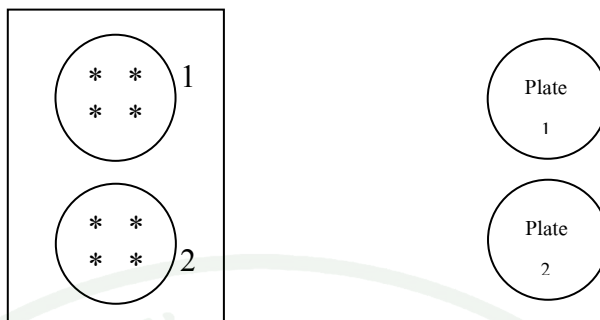
3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เจาะแล้ว ทิ้งลงในน้ำยาฆ่าเชื้อ

4. ใน 1 งานเพาะเชื้อสามารถเจาะได้ 4 หลุม กำหนดหลุมใดหลุมหนึ่งเป็นค่ามาตรฐาน (standard)



ภาพผนวกที่ ก2 การหยดตัวอย่างลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

5. เขียนหมายเลขและตัวอย่างที่ฝาดานเพาะเชื้อแต่ละอันว่าจะใช้หยดตัวอย่าง พร้อมกับเขียนลงบนกระดาษที่เราต้องบันทึกผลให้ตรงกัน ควรลงวันที่ที่ทำการทดลองทุกครั้งบนกระดาษบันทึกผล เพราะสามารถย้อนกลับมาดูค่าหรือข้อมูลได้ (ภาพผนวกที่ ก3)



กระดาดบันทึกผล

ภาพผนวกที่ ก3 การบันทึกข้อมูลการหยดตัวอย่าง

6. หยดตัวอย่างอีโมลิฟี่ครั้งแรก เพื่อความีปริมาณของตัวอย่างเท่าไร (inhibition zone) ควรหยดตัวอย่างละ 1 หลุม เพื่อให้ทราบว่าจะต้องทำการเจือจางตัวอย่างที่ทดสอบหรือไม่ โดยเทียบกับค่าของสารมาตรฐานที่เราหยดในแต่ละงานเพาะเชื้อ ถ้า inhibition zone ของตัวอย่างอีโมลิฟี่มีขนาดกว้างหรือใหญ่กว่าสารมาตรฐานที่หยด ต้องนำตัวอย่างอีโมลิฟี่นั้นมาเจือจาง (dilution)

7. หยดตัวอย่างอีโมลิฟี่ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ในหลุมที่ทำการเจาะแล้ว ควรใช้ปริมาตรเดียวกันตลอดการทดลองนั้น ๆ ให้ตัวอย่างอีโมลิฟี่อยู่ในระดับเดียวกับปากหลุม เพื่อให้มีการกระจายของตัวอย่างอีโมลิฟี่เป็นไปอย่างสม่ำเสมอ ซึ่งจะทำให้ผลการทดสอบมีความถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น

8. เมื่อหยดตัวอย่างอีโมลิฟี่และสารมาตรฐานเสร็จแล้ว นำเข้าตู้เพาะบ่มเชื้อ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 - 24 ชั่วโมง

9. เมื่อครบเวลาตามที่กำหนด อ่านค่าโดยใช้อุปกรณ์วัด inhibition zone วัดความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางที่เกิดขึ้นของตัวอย่างอีโมลิฟี่และสารมาตรฐาน อ่านผลและบันทึกผล

* หมายเหตุ : ขั้นตอนการวิเคราะห์ตัวอย่างยาอีกสี่เตตราซัยคลินในเนื้อกุ้ง จะใช้วิธีเดียวกับการวิเคราะห์ยาในอีโมลิฟี่โดยใช้สารที่สกัดได้จากเนื้อกุ้ง

4. การสกัดตัวอย่างเนื้อกึ่งกัมกราม เพื่อหาปริมาณการตกค้างของยาออกซีเตตราไซคลินโดย Charm II assay

4.1 อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องปั่นละเอียดเนื้อเยื่อ (homogenizer) (รุ่น T 25-S1 Blade-type Homogenizer บริษัท IKA, Germany)
2. MSU Extraction Buffer (MSUEB)
3. Tablet Reagent (TMSU)
4. Tissue Performance Negative Concentrate (TPNC)
5. MSU Multi-Antimicrobial Concentrate Standard (MSUMA)
6. M 2 Buffer
7. เครื่องชั่งน้ำหนัก 2 ตำแหน่ง (รุ่น BJ 1000C บริษัท Precisa Instruments Ltd., Switzerland)
8. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) (รุ่น BS-01 บริษัท Medic, Thailand)
9. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) (รุ่น H-11NA KOKUSAN บริษัท KOKUSAN, Japan หรือ IEC Centra CL-2 centrifuge International Equipment, USA)
10. หลอดทดลองขนาด 16 x 125 มิลลิเมตร
11. หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร
12. ที่วางหลอดทดลอง (Rack)

13. กระจกกรอง เบอร์ 1

14. Deionized water หรือ Milli-Q water (รุ่น PURELAB Ultra ยี่ห้อ ELGA, UK)

15. เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (incubator) (บริษัท CHARM SCIENCES, USA)

16. เครื่อง CHARM II (รุ่น CHARM 7600 COUNTER บริษัท CHARM SCIENCES, USA)

4.2 วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างเนื้อกึ่งกัมกรามสับละเอียด น้ำหนัก 10 กรัม ลงในหลอดพลาสติก ขนาด 50 มิลลิลิตร

2. เติมสารละลาย MSU Extraction Buffer (MSUEB) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

3. ปั่นเนื้อกึ่งกัมกรามด้วยเครื่องปั่นละเอียดเนื้อเยื่อ นาน 1 นาที

4. นำหลอดพลาสติกแช่ในน้ำร้อน อุณหภูมิ 80 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที

5. นำหลอดพลาสติกแช่ในน้ำเย็น นาน 10 นาที

6. นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็วรอบ 1,750 g นาน 10 นาที

7. เทของเหลวใส (supernatant) ลงในหลอดพลาสติกอีกหลอด เขียนเวลาให้ตรงกัน (ป้องกันการผิดพลาด) ถ้ามีเศษเนื้อติดมาเป็นปริมาณมาก สามารถกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

8. วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ของเหลวใสโดยใช้กระดาษลิตมัส ค่าควรอยู่ในช่วง 7.5

ถ้าค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่ำกว่า 7.5 ให้เติม M 2 Buffer ปริมาตร 10-30 ไมโครลิตร

ถ้าค่าความเป็นกรด-ด่าง สูงกว่า 7.5 ให้เติม 1 M HCl ปริมาตร 5-20 ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันและวัดค่าความเป็นกรด-ด่างใหม่ ทำจนกว่าจะได้ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.5

9. หากยังไม่ทำการวิเคราะห์ เก็บตัวอย่างส่วนใสในช่องแช่แข็ง อุณหภูมิ- 20 องศาเซลเซียส

5. การวิเคราะห์ผลโดย CHARM II assay

ในการวิเคราะห์ผลควรมีค่า positive control และ negative control ทุกครั้ง และควรทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง 2 ซ้ำ เพื่อป้องกันการผิดพลาด วิธีการดังนี้

1. เตรียมหลอดทดลองให้เพียงพอกับจำนวนตัวอย่างที่จะทำการวิเคราะห์
2. ใส่เม็ดยาชุดทดสอบอ็อกซีเตตราซัยคลินสีขาวลงในหลอดทดลอง
3. เติมน้ำกลั่น (Milli-Q) ปริมาตร 0.3 ± 0.1 มิลลิลิตร (300 ± 100 ไมโครลิตร) เขย่าหรือผสมนาน 10 วินาที เพื่อให้เม็ดยาแตกตัว
4. เติมตัวอย่างส่วนใสที่สกัดไว้ 4.0 ± 0.25 มิลลิลิตร (อาจใช้ positive control หรือ negative control)
5. ใส่เม็ดยาชุดทดสอบสีส้ม (marked T- >) ลงในหลอดทดลองที่ใส่ตัวอย่างส่วนใส
6. ผสมให้เข้ากัน โดยกดหลอดทดลองขึ้น - ลง นาน 10 วินาที
7. นำเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที
8. นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็วรอบ 1,750 g (3.3×1000 รอบต่อนาที ของเครื่อง รุ่น IEC Centra CL-2 centrifuge International Equipment, USA)

9. เทส่วนใสที่ได้ทิ้ง คั่วหลอดทดลองเพื่อให้ของเหลวไหลลงมาที่ปากหลอดทดลอง ใช้กระดาษทิชชูวางด้านล่างที่วางหลอดทดลอง เพื่อช่วยในการซับของเหลวที่ปากหลอดทดลอง (ควรรีบเทส่วนใสอย่างรวดเร็วและเบามือ เพื่อป้องกันไม่ให้ตะกอนด้านล่างแตกตัวหรือแยกตัว) ถ้ามีเศษไขมันเกาะอยู่บริเวณข้างหลอดทดลอง ให้ใช้สำลีพันปลายไม้เช็ดบริเวณข้างหลอด ระมัดระวังอย่าให้โดนตะกอนที่อยู่ก้นหลอดทดลอง

10. เติมน้ำกลั่น (Milli-Q) ปริมาตร 0.3 ± 0.1 มิลลิลิตร (300 ± 100 ไมโครลิตร) เขย่าหรือผสมนาน 10 วินาที เพื่อให้ตะกอนกระจายตัว (ขั้นตอนที่ 10-13 ควรทำที่หลอดทดลอง)

11. เติม Opti-Fluor ปริมาตร 3.0 ± 0.5 มิลลิลิตร ปิดจุกยาง เขย่าหรือผสมให้เข้ากัน

12. นำหลอดทดลองเข้าเครื่องอ่านผล รอผลในการอ่านค่า 1 นาที และบันทึกผลให้ตรงกับตัวอย่างที่อ่านค่า

13. ในการอ่านผลการวิเคราะห์ อ่าน cpm บน [^3H] channel เปรียบเทียบกับค่าของ control point กับ positive control และ negative control



ภาคผนวก ข

ขั้นตอนการทำ Negative Control และ Positive Control

1. การทำ Negative Control

1. เติม Tissue Performance Negative Concentrate (TPNC) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 16 x 125 มิลลิเมตร

2. เติม MSU Extraction Buffer (MSUEB) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร เพื่อทำ negative control

3. การใช้ negative control จะต้องตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15-25 องศาเซลเซียส ควรใช้ภายใน 8 ชั่วโมง

2. การทำ Positive Control

1. เติม TPNC ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร

2. เติม MSU Multi-Antimicrobial Concentrate Standard ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้ความเข้มข้น 100 ppb (0.1 ppm)

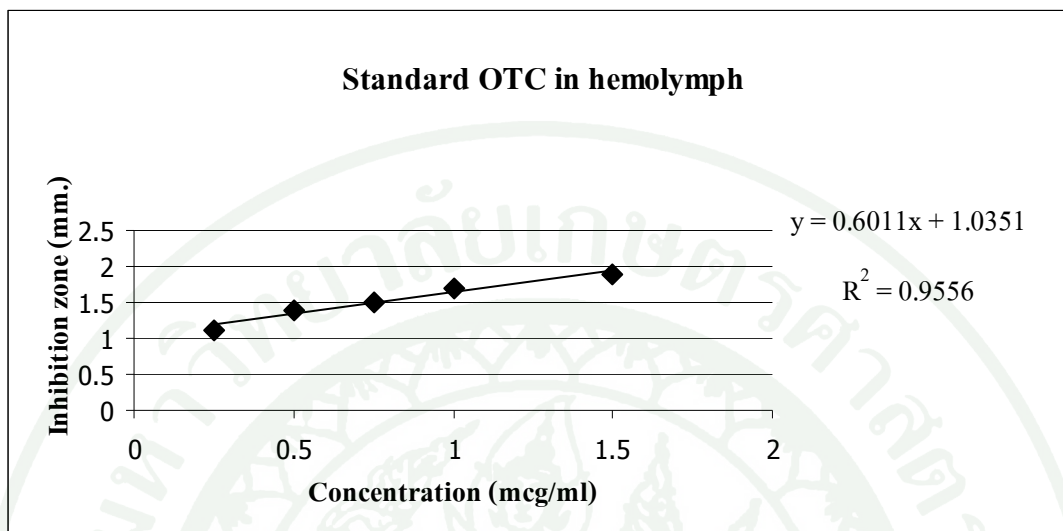
สิ่งสำคัญในการวัดระดับค่า Negative Control และ Positive Control

1. ค่า negative control จะต้องมีย่าน ± 20 เปอร์เซ็นต์ ของค่าเฉลี่ย positive control

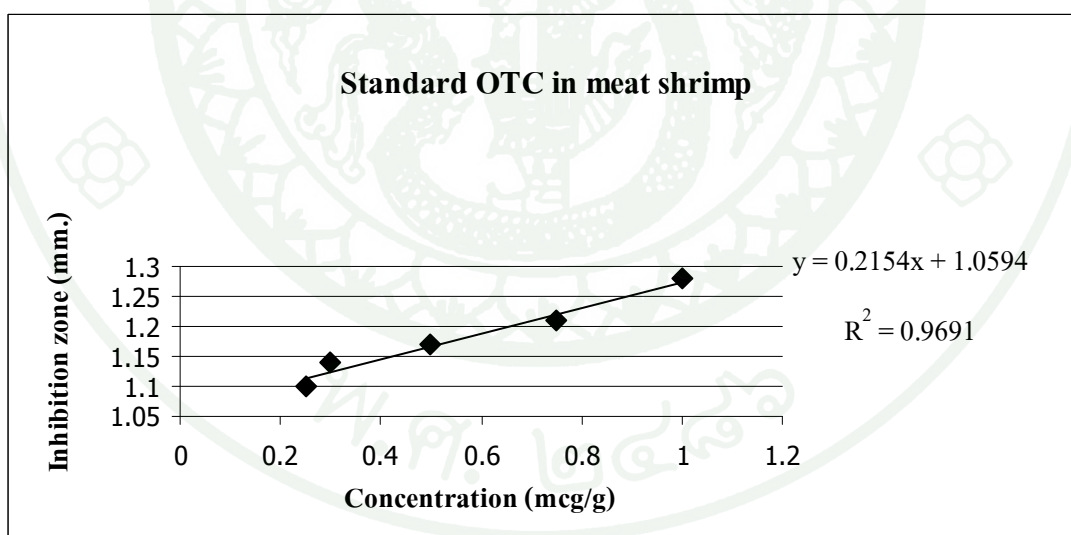
2. ค่า positive control จะต้องมีย่านต่ำกว่าค่า control point

3. ค่า control point จะต้องมีย่านไม่เกิน - 40 % ของค่าเฉลี่ย negative control

ภาพผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานแสดงความเข้มข้นของออกซีเตตราไซคลินในฮีโมลิมพ์
กุ้งก้ามกราม

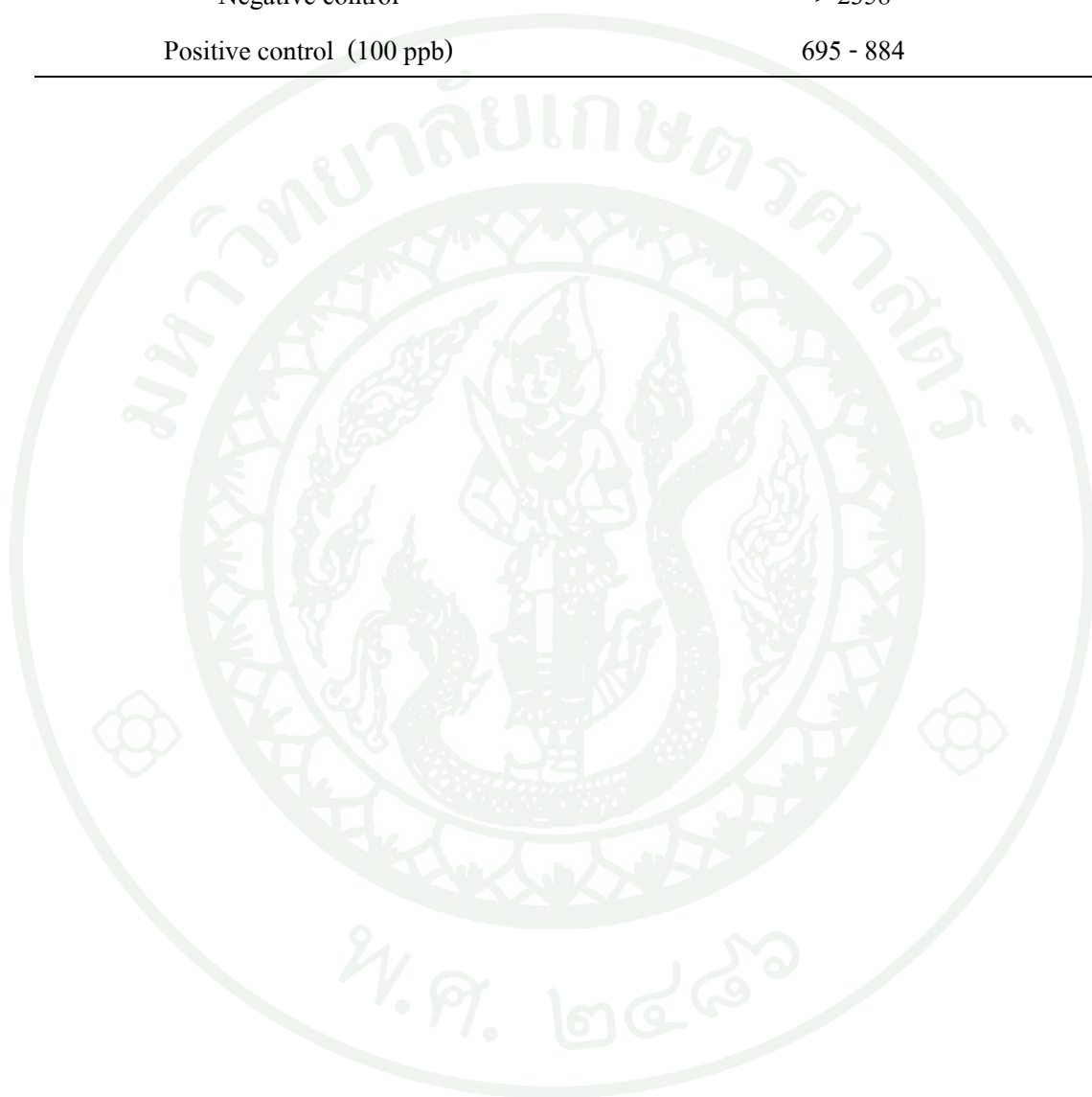


ภาพผนวกที่ ข2 กราฟมาตรฐานแสดงความเข้มข้นของออกซีเตตราไซคลินในเนื้อกุ้งก้ามกราม



ตารางผนวกที่ ข1 ระดับความเข้มข้นของยาอีอกซีเตตราซัยคลิน (cpm) ในเนื้อกึ่งก้ามกรามโดยวิธี
CHARM II assay

ระดับความเข้มข้น	ปริมาณ
Negative control	> 2358
Positive control (100 ppb)	695 - 884





1. การเตรียมสารละลาย (Buffer pH 4.0) เพื่อสกัดเนื้อกึ่งกัมกรามวิเคราะห์โดยวิธีทางจุลชีววิทยา

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	15	กรัม
Citric acid	13	กรัม
EDTA	3.72	กรัม
H_2O	969	มิลลิลิตร

ปรับความเป็นกรด-ด่าง ด้วย 0.1 M HCl

2. การเตรียมสารละลาย 1 M HCl ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

1. เตรียมน้ำกลั่น ประมาณ 500 มิลลิลิตร ใส่ volumetric flask ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร
2. เติม HCl ปริมาตร 37 มิลลิลิตร (37%) ผสมให้เข้ากัน
3. เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

3. การเตรียมสารละลาย 0.1 M HCl ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

1. เติมน้ำกลั่น ประมาณ 500 มิลลิลิตร ใส่ volumetric flask ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร
2. เติม 1 M HCl ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
3. เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

4. การเตรียมสารมาตรฐานและสารละลาย เพื่อใช้ในการวิเคราะห์โดยวิธี CHARM II

1. MSU Extraction Buffer (MSUEB) เก็บในที่แห้งอุณหภูมิ 2-6 องศาเซลเซียส เมื่อจะนำมาใช้ให้เติมน้ำกลั่น หรือ Deionized water ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ก่อนใช้ให้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

(เมื่อผสม MSUEB แล้ว สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0-7 องศาเซลเซียส ได้นาน 2 เดือน ห้ามแช่แข็ง)

2. Tablet Reagent (TMSU) เก็บที่อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่านั้น นำเม็ดยาทดสอบยาออกซิจีเตดร้าซัลคลินออกจากช่องแช่แข็งตามจำนวนที่จะใช้ทดลองก่อน 1 วัน โดยการแช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส เม็ดยาทดสอบสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้ แต่ไม่ควรนานเกิน 12 ชั่วโมง

3. Tissue Performance Negative Concentrate (TPNC) เก็บในที่แห้งอุณหภูมิ 2-6 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาใช้ให้เติมน้ำกลั่นหรือ Deionized water ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ในตู้เย็นหรือบนน้ำแข็งนาน 15 นาทีก่อนใช้ TPNC ใช้เพื่อเจือจางทำ positive control และ negative control เพื่อใช้เป็นค่ามาตรฐาน (สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0-7 องศาเซลเซียส ได้นาน 48 ชั่วโมง และสามารถเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่านั้นได้นาน 2 เดือน)

4. MSU Multi-Antimicrobial Concentrate Standard (MSUMA) เก็บในที่แห้งอุณหภูมิ 2-6 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาใช้ให้เติมน้ำกลั่นหรือ Deionized water ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ก่อนนำไปใช้ให้ตั้งไว้ในตู้เย็นหรือน้ำแข็งนาน 15 นาที (MSUMA สามารถเก็บที่อุณหภูมิ 0 - 7 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง และสามารถเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ - 15 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่านั้น ได้นาน 2 เดือน) MSU Multi-Antimicrobial Concentrate Standard ประกอบด้วย 4,000 ppb chlortetracycline

5. M 2 Buffer เมื่อนำมาใช้ให้เติมน้ำกลั่นหรือ Deionized water ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (M 2 Buffer สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0-7 องศาเซลเซียส ได้นาน 2 เดือน ห้ามแช่แข็ง)

ข้อมูลการใช้ยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ตารางผนวกที่ ค1 การใช้ยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศต่าง ๆ

ประเทศ	ยาปฏิชีวนะ	วัตถุประสงค์ของการใช้ยา	อ้างอิงจาก
United Kingdom	oxytetracyclin, oxolinic acid, amoxicillin and co-trimazine (trimethoprim-sulfadiazine)	not mentioned	FAO/NACA/WHO, 1997
Norway	benzylpenicillin+dihydrostreptomycin, florfenicol, flumequine, oxolinic acid, oxytetracycline and co-trimazine	not mentioned	FAO/NACA/WHO, 1997
United States (FDA approved)	sulfadimethoxine and ormethoprim	-to control furunculosis (<i>Aeromonas salmonicida</i>) in salmonids. -to control enterid septicaemia (<i>Edwardsiella ictaluri</i>) in catfish	Committee on drug use in feed animals, 1999
	oxytetracycline	-to control ulcer disease, furunculosis, bacterial haemorrhagic septicaemia and pseudomonas disease in salmonids. -to control bacterial haemorrhagic septicaemias and pseudomonas disease in catfish	
Mexico	enrofloxacin and oxytetracycline		Gomez-Gill <i>et al.</i> , 2001

ที่มา : Hernandez (2005)

ตารางผนวกที่ ค2 การใช้ยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทย

ยาปฏิชีวนะ	วัตถุประสงค์ของการใช้ยา	วิธีการให้ยา
oxytetracycline	<i>myxobolus spp.</i>	supplemented in the feed
sulfadiazine+trimethoprim	ulcerative and systemic type (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	water dispersible powder
chlortetracycline	not defined	supplemented in the feed
oxytetracycline	columnaris disease	supplemented in the feed

ที่มา : Hernandez (2005)

ตารางผนวกที่ ค3 การใช้ยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศอินโดนีเซีย

ยาปฏิชีวนะ	วัตถุประสงค์ของการใช้ยา	วิธีการให้ยา
oxytetracyclin ⁽¹⁾	bacterial fish and shrimp disease	bath and oral
chloramphenicol ⁽²⁾	bacterial disease in shrimp and ornamental fish	immersion
erythromycin	bacterial fish and shrimp disease	bath
streptomycin	bacterial disease in shrimp and ornamental fish	long bath
neomycin	bacterial disease in shrimp and ornamental fish	bath
enrofloxacin	high skills required	bath

Note ; ⁽¹⁾ Negative effects : antibiotic application has resulted in emergence of drug-resistant bacteria and detection of antibiotic residue in exported fish products has resulted in rejection for the Japanese market

⁽²⁾ Currently banned for use in aquaculture in Indonesia

Source : Southeast Asia Fisheries Development Center, Aquaculture Department, 2000

ที่มา : Hernandez (2005)

ตารางผนวกที่ ค4 การใช้ยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชนิด yellowtail, rainbow trout และ kuruma prawn ในประเทศญี่ปุ่น

ยาปฏิชีวนะ ⁽¹⁾	ชนิดสัตว์น้ำ	วิธีการให้ยา	ระยะเวลาอดยา (วัน)
amoxicillin	yellowtail	oral	5
ampicillin	yellowtail	oral	5
erythromycin	yellowtail	oral	30
oxytetracycline hydrochloride	yellowtail	oral	20
oxolinic acid	yellowtail	oral	16
spiramycin	yellowtail	oral	30
novobiocin	yellowtail	oral	15
flumequine	yellowtail	oral	-
lincomycin hydrochloride	yellowtail	oral	10
florfenicol	yellowtail	oral	5
thiamphenicol	yellowtail	oral	15
oxytetracycline hydrochloride	rainbow trout	oral	30
oxolinic acid	rainbow trout	oral	21
sulfadimethoxine	rainbow trout	oral	30
sulfamonomethoxine	rainbow trout	innersion	15
florfenicol	rainbow trout	oral	14

ตารางผนวกที่ ค4 (ต่อ)

ยาปฏิชีวนะ ⁽¹⁾	ชนิดสัตว์น้ำ	วิธีการให้ยา	ระยะเวลา (วัน)
oxytetracycline hydrochloride	kuruma prawn	oral	25
oxolinic acid	kuruma prawn	oral	30

Note : ⁽¹⁾ Items regulated by the drug laws

Source : Southeast Asian Fisheries Development Center, Aquaculture Department, 2000

ที่มา : Hernandez (2005)

ตารางผนวกที่ ค5 การใช้ยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศจีน

ยาปฏิชีวนะ	ยามาเชื้อในปลาและไข่	การแช่	การฉีด	การป้อนให้กิน
sulfonamide				+
nystatine	+			
terramycin	+	+		+
aureomycin	+			+
penicillin		+	+	
streptomycin	+	+	+	
doxycycline				+
erythromycin		+		+
chloramphenicol ⁽¹⁾		+	+	+
oxolinic acid				+

Note : ⁽¹⁾ Currently banned for use in aquaculture in China

Source : Southeast Asia Fisheries Development Center, Aquaculture Department, 2000

ที่มา : Hernandez (2005)

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวนฤมล กลางแก้ว
วัน เดือน ปี ที่เกิด	22 พฤศจิกายน 2514
สถานที่เกิด	จังหวัดชุมพร
ประวัติการศึกษา	วท.บ.วิทยาศาสตร์สุขภาพสัตว์ คณะเกษตรศาสตร์บางพระ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	นักวิทยาศาสตร์ ระดับ 6 ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	50 ถ.พหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร กทม. 10900 ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน