บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

1. สัตว์ทดลองและสภาพแวดล้อมสำหรับสัตว์ทดลอง

1.1 กุ้งกุลาดำโตเต็มวัย อายุ 3 เดือน น้ำหนักเฉลี่ย 14-16 กรัมต่อตัว จำนวน 240 ตัว จากชุดการเลี้ยง (crop) เดียวกัน ของศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งจังหวัดจันทบุรี

1.2 สภาพแวดล้อมที่ใช้เลี้ยงกุ้ง คือ การเลี้ยงในตู้กระจกสี่เหลี่ยมขนาด 12 x 25 x 15 นิ้ว ในสัดส่วนกุ้ง 18 ตัวต่อน้ำ 90 ลิตร โดยใช้ตาข่ายไนลอนเพื่อการพรางแสงสว่าง และให้อากาศด้วยหัวทรายตลอดเวลาที่ทำการทดลอง การให้แสงสว่างแบ่งเป็นช่วงสว่าง 16 ชั่วโมง (แสงจากธรรมชาติ 12 ชั่วโมง และแสงจากหลอดนีออน 4 ชั่วโมง) และช่วงมืด 8 ชั่วโมง

1.3 คุณภาพน้ำ : ควบคุมคุณภาพน้ำในตู้ทดลองตามตารางที่ 7 ซึ่งเป็นคุณภาพน้ำที่เหมาะสำหรับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำโตเต็มวัย (ชลอและพรเลิศ, 2547) เปลี่ยนถ่ายน้ำ 50% ของปริมาตรทั้งหมดทุกวันและควบคุมสภาพแวดล้อมให้มีสภาพใกล้เคียงกันตลอดการทดลอง

1.4 ปล่อยให้กุ้งมีการปรับตัวในตู้ทดลองก่อนเริ่มทำการทดลองเป็นเวลา 2 วัน ให้อาหารชนิดเดียวกับที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งก่อนการทดลองที่อัตรา 2.5% ต่อน้ำหนักตัวต่อวันและแบ่งให้วันละ 3 ครั้ง (5.00 น. 13.00 น. และ 21.00 น.) เคลือบผิวเม็ดอาหารด้วยน้ำมันปลาหมึก

ตารางที่ 7 คุณภาพน้ำที่ใช้เป็นเกณฑ์มาตรฐานในระหว่างการทดลอง

คุณภาพน้ำ	ค่าที่ใช้ในการทดลอง
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	27-30
ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	7.5-8.5
ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (mg/l)	7.5
ความเค็ม (‰)	30
ไนไตรท์ (ppm)	0.1-0.2
แอมโมเนียรวม (ppm)	0.5-1.0
แอลคาไลน์ (ppm)	80-160

2. สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

2.1 สารมาตรฐาน Florfenicol-amine (Schering-Plough, USA)

2.2 สารมาตรฐาน Florfenicol (Schering-Plough, USA)

2.3 Methanol (HPLC grade)(Lab Scan, Ireland)

2.4 Acetronitrile (HPLC grade)(Lab Scan, Ireland)

2.5 Ethyl acetate (HPLC grade)(Lab Scan, Ireland)

2.6 Dichromethane (HPLC grade)(Lab Scan, Ireland)

2.7 Water (HPLC grade)(Lab Scan, Ireland)

2.8 Hydrochloric acid 36.5 - 38.0% (Carlo erba, Spain)

2.9 Sodium hydroxide 50% w/w (Merck, Germany)

2.10 Potassium phosphate monobasic (crystal) (Merck, Germany)

2.11 Phosphoric acid, 85% v/v (Merck, Germany)

2.12 Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose (TCBS) (Eiken, Japan)

2.13 Tryptic Soy Agar (TSA) (Oxiod, England)

2.14 Meuller Hinton Agar (Oxiod, England)

2.15 Meat extract (Oxiod, England)

2.16 Yeast extract (Oxiod, England)

2.17 Agar (Oxiod, England)

2.18 Sodiumchloride (NaCl) (Carlo erba, Spain)

2.19 Hydrochloric acid 36.5 - 38.0% (Carlo erba, Spain)

2.20 Sodium hydroxide 50% w/w (Merck, Germany)

2.21 Potassium phosphate monobasic (crystal) (Merck, Germany)

2.22 Phosphoric acid, 85% v/v (Merck, Germany)

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์สำหรับเครื่อง HPLC

- HPLC column Zorbax® R_x C_8 ขนาด 4.6 มิลลิเมตร x 250 มิลลิเมตร pore size 5 ไมโครเมตร (Agilent, USA)
- HPLC Guard-Columns Zorbax® ขนาด 4.6 มิลลิเมตร x 125 มิลลิเมตร (Agilent, USA)
- HPLC vial (small pack) ขนาด 2 มิลลิลิตร

3.2 เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆ

- Volumetric flask ขนาด 10, 100, 1000 มิลลิลิตร
- Erlenmeyer flask ขนาด 125 มิลลิลิตร
- Beaker ขนาด 500, 1,000 และ 5,000 มิลลิลิตร
- Centrifuge tube ชนิดแก้วขนาด 50 มิลลิลิตรพร้อมฝาปิดชนิด Teflon-lined caps
- Centrifuge tube ชนิดพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร
- Extraction columns: Chem Elut™ 1219-8008 ขนาด 20 มิลลิลิตร (Varian, USA)
- Glass wool (Merck, Germany)
- กระบอกฉีดยา ชนิดพลาสติกขนาด 3 มิลลิลิตร
- Micropipette พร้อม tips ขนาด 200, 1,000, 5,000 ไมโครลิตร
- Syringe membrane filter ชนิด Polyvinylidene fluoride (PVDF) เส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร ขนาดกรอง 0.2 ไมโครเมตร (Orange Scientific, Belgium)
- RC-Vliesverstark mobile phase membrane filter เส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร ขนาดกรอง 0.45 ไมโครเมตร (Sartorius, Germany)
- อุปกรณ์เพาะเชื้อแบคทีเรีย
- ชุด Analytical Profile Identification (API) 20E และ API 20NE สำหรับการพิสูจน์เชื้อ vibrios โดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมี (Biomerieux, France)
- ชุดตรวจคุณภาพน้ำทางเคมี ammonium, nitrite และ alkaline (Aqua-VBC, Thailand)

4. เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

4.1 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography CLASS LC-10 พร้อม Ultraviolet-Visible detector รุ่น SPD-10A, ระบบประมวลผล CBM-10A, Sil-10A autoinjector, LC-10AC dual pump และ Degasser DGU-12A (Shimadzu, Japan)

4.2 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler, Germany)

4.3 เครื่อง Homogenizer POLYTRON 3000 (Kinematica AG, Switzerland)

4.4 เครื่อง Centrifuge (IEC, USA)

4.5 pH meter (Hanna Instruments, Singapore)

4.6 Vacuum manifold (Alltech, USA)

4.7 Sonicator TRANSSONIC 460/H (Elma, Germany)

4.8 Vacuum pump (Gelman Sciences, USA) พร้อมชุดกรอง

4.9 Vortex mixer Geinie 2 (Scientific Industries, USA)

4.10 ตะเกียงแอลกอฮอล์

4.11 Multipoint inoculator

วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินงานวิจัยจะประกอบด้วย 2 ส่วน คือ

<u>การทดลองที่ 1</u> การทดสอบประสิทธิภาพของ florfenicol ในห้องปฏิบัติการ

<u>การทดลองที่ 2</u> การเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยอาหารผสม florfenicol และการหาปริมาณ florfenicol-amine ในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมยาด้วยวิธี HPLC

การทดลองที่ 1 การทดสอบประสิทธิภาพของ florfenicol ในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของ florfenicol และ chloramphenicol ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ vibrios ที่แยกจากกุ้งป่วย (pathogenic vibrios) (Minimum Inhibitory Concentrations, MICs)

1. การเตรียมเชื้อ vibrios ที่ใช้ในการศึกษา

- เก็บตัวอย่างกุ้งป่วยจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งกุลาดำในเขตการเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย (รูปที่ 3) ที่มีกุ้งแสดงอาการป่วย เช่น ว่ายเกยขอบบ่อ กินอาหารลดลง หรือเป็นตัวอย่างกุ้งที่เกษตรกรส่งมาให้ตรวจ
- แยกเชื้อ vibrios โดยการเพาะเชื้อจาก hepatopancreas ของกุ้งป่วยลงใน Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose (TCBS) agar ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ vibrios บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C 20 ชั่วโมง เลือกเฉพาะเชื้อที่ขึ้นได้โคโลนีที่เป็นสีเขียวหรือสีเหลืองมาพิสูจน์เชื้อโดยการย้อมแกรม oxidase test และวิธีทางชีวเคมี (ตารางที่ 2)
- เก็บตัวอย่างกุ้งป่วย และเพาะเชื้อ vibrios จำนวนทั้งสิ้นประมาณ 100 ตัวอย่าง เพื่อการทดสอบหาค่า MICs

2. ทดสอบหาค่า MICs ของเชื้อ vibrios ต่อ florfenicol และ chloramphenicol โดยวิธี Antimicrobial Agar Dilution Susceptibility Tests ที่ความเค็ม 0‰ และความเค็ม 5‰ (National Committee of Clinical Laboratory Standard, 2000)

2.1 การเตรียมยาในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเค็ม 0‰

- เจือจางยาต้านจุลชีพด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 5,120 µg/ml และทำ Two-Fold Dilution ให้ได้ความเข้มข้นของยาเป็น 320 µg/ml - 5 µg/ml (ภาคผนวกที่ 1)
- ผสมยาที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงใน Mueller-Hinton Agar (MHA) ด้วยอัตราส่วน 1:10 โดยดูดสารละลายยามา 2 ml ใส่ลงใน MHA 18 ml จะได้ MHA ที่มียาตามความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบที่ต้องการ

2.2 การเตรียมยาในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเค็ม 5‰

- เจือจางยาต้านจุลชีพด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ผสมยาที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงใน MHA ที่เตรียมด้วยน้ำทะเลที่มีความเค็ม 5‰

(เช่นเดียวกับข้อ 2.1 การเตรียมยาในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเค็ม 0‰)

2.3 การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

- เตรียมเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน 3 ชนิดในการ inoculate แต่ละครั้งเพื่อควบคุมคุณภาพของงาน

เชื้อมาตรฐานที่ใช้ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC® (American Type Cultured Collection) 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213 และ *Vibrio parahemolyticus* ATCC® 17802 โดยเพาะเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ลงใน Tryptic Soy Agar (TSA) ส่วนเชื้อ *V. parahemolyticus* จะต้องผสมเกลือ 1% ลงใน TSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C นาน 20 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่ได้มาใส่ในน้ำเกลือ (NaCl) 0.9% ปรับให้ได้ความขุ่นเทียบเท่ากับ 0.5 McFarland ซึ่งจะมีเชื้ออยู่ประมาณ 10^8 CFU/ml เจือจางในน้ำเกลือลงอีก 10 เท่า ได้ปริมาณเชื้อประมาณ 10^7 CFU/ml (NCCLS, 2000)

- เพาะเชื้อ vibrios ลงใน Tryptic Soy Agar (TSA) ที่ผสมเกลือ 1% เช่นเดียวกันการเตรียมเชื้อมาตรฐาน *V. parahemolyticus*

2.4 การทดสอบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมยาต้านจุลชีพ

- ใส่เชื้อที่เตรียมในหลุม multipoint inoculator ซึ่งใส่เชื้อได้ 25 isolates โดยแบ่ง 3 isolates เป็นเชื้อมาตรฐาน และอีก 22 isolates เป็นเชื้อ vibrios ตัวอย่างที่ทดสอบ
- ถ่ายเชื้อจากหลุมลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่ผสมยาต้านจุลชีพแล้ว จะได้จุดเชื้อซึ่งมีเชื้อประมาณ 10^4 CFU/spot
- เมื่อใช้ Multipoint inoculator ถ่ายเชื้อลงใน MHA ที่ผสมยาต้านจุลชีพไว้แล้ว ทิ้งไว้จนจุดที่ถ่ายเชื้อแห้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C นาน 20 ชั่วโมง อ่านผลโดยดูความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้

2.5 เปรียบเทียบผลความไวรับของเชื้อ vibrios ต่อ florfenicol และ chloramphenicol และเปรียบเทียบความเข้มข้นของ florfenicol ที่ให้ผลระงับการเจริญของเชื้อ vibrios ในห้องปฏิบัติการที่ระดับความเค็ม 0‰ และ 5‰ โดยใช้โปรแกรม WHONET5 (WHO, 2000)

รูปที่ 3

• เขตการเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยและเขตการเก็บตัวอย่างกุ้งป่วยที่นำมาแยกเชื้อ vibrios เพื่อทำการศึกษาความไวรับของเชื้อต่อ florfenicol และ chloramphenicol

การทดลองที่ 2 การเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยอาหารผสม florfenicol และการหาปริมาณ florfenicol-amine ในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมยาด้วยวิธี HPLC

1. การให้ florfenicol ในกุ้งกุลาดำ โดยการผสมอาหาร

แบ่งกุ้งกุลาดำออกเป็น 2 กลุ่ม โดยการสุ่ม กลุ่มแรก คือ กลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปชนิดเดียวกับที่ใช้เลี้ยงกุ้งก่อนการทดลองเคลือบผิวด้วยน้ำมันปลาหมึก และกลุ่มที่สอง คือ กลุ่มทดลองที่ได้รับ florfenicol ผสมในอาหารชนิดเดียวกันและเคลือบผิวด้วยน้ำมันปลาหมึก

เลี้ยงกุ้งในสภาพแวดล้อมตามตารางที่ 7 ทำการตรวจคุณภาพน้ำและเปลี่ยนถ่ายน้ำในระหว่างการทดลองทุกวัน

แต่ละกลุ่มการทดลองจะให้อาหารกุ้งในอัตรา 2.5% ของน้ำหนักตัวต่อวัน โดยแบ่งให้อาหาร 3 มื้อต่อวัน คือ เวลา 5.00 น. 13.00 น. และ 21.00 น. โดยกลุ่มทดลองจะได้รับอาหารที่ผสม florfenicol ในวันที่ 3 ของการเลี้ยง โดยทำการผสมยาในอาหารให้ได้ความเข้มข้น florfenicol 0.8 กรัมในอาหาร 1 กิโลกรัม หรือเท่ากับ 20 มิลลิกรัมยาต่อน้ำหนักกุ้ง 1 กิโลกรัม (20 ppm) ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้น 10 เท่าของค่า MIC_{90} (จากการทดลองที่ 1) (ภาคผนวก 2) และทำการฉีดพ่นน้ำมันปลาหมึกเคลือบทับ เพื่อป้องกันการละลายของยาออกมาในน้ำ และให้อาหารผสมยาต่อเนื่องเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเลี้ยงกุ้งต่อด้วยอาหารที่ไม่ผสมยาเป็นเวลา 9 วัน

ทำการเก็บตัวอย่างกุ้งกุลาดำที่เวลาต่างๆ หลังให้อาหารผสมยาตามตารางที่ 8 หากมีช่วงการให้อาหารและเวลาเก็บตัวอย่างตรงกันจะเลื่อนเวลาเก็บตัวอย่างออกไปครึ่งชั่วโมง เพื่อลดการรบกวนการกินอาหารของกุ้งกุลาดำ และเก็บตัวอย่างจากกลุ่มควบคุมก่อนและหลังทำการทดลอง โดยสุ่มเก็บตัวอย่างครั้งละ 10 ตัว แช่เย็นทันที รวมตัวอย่างที่เก็บทั้งหมด 26 ชุด (กลุ่มทดลอง 24 ชุดและกลุ่มควบคุม 2 ชุด) ตัวอย่างแต่ละชุดทำการแยกส่วน hepatopancreas และส่วนกล้ามเนื้อออกจากกัน เก็บในช่องแช่แข็งอุณหภูมิไม่เกิน 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอการตรวจวิเคราะห์ต่อไปด้วยวิธี HPLC

ตารางที่ 8 การให้ florfenicol ผสมอาหารแก่กุ้งกุลาดำและช่วงเวลาการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ

	เวลา (ชั่วโมง)										
	5:00 (0 ชม)	5:30 (0.5 ชม)	6:00 (1 ชม)	7:00 (2 ชม)	9:00 (4 ชม)	13:00 (8 ชม)	13:30 (8.5 ชม)	17:00 (12 ชม)	21:00 (16 ชม)	21:30 (16.5 ชม	5:00 (24 ชม)
วันที่ 1	MF	1,2	3,4	5,6	7,8	MF	9,10	11,12 /	MF 19-22	13,14	15,16
วันที่ 2	MF	1,2	3,4	5,6	7,8	MF	9,10	11,12	MF	13,14	15,16
วันที่ 3	MF					MF	1,2		MF		
วันที่ 4	MF					MF	3,4		MF		
วันที่ 5	MF					MF	5,6		MF		
วันที่ 6	BF					BF			BF	7,8	
วันที่ 8	BF					BF	9,10		BF		
วันที่ 10	BF					BF	11,12		BF		
วันที่ 12	BF					BF	13,14		BF		
วันที่ 14	BF					BF	15,16	19-22	BF		

กุ้งกุลาดำอายุ 3 เดือน น้ำหนักตัวเฉลี่ย 14-15.5 กรัม/ตัว มีอัตราการกินอาหารปกติประมาณ 5% น้ำหนักตัว/วัน

สมมติฐาน

1.อัตราการกินอาหารในสัตว์ป่วยลดลงครึ่งหนึ่งจากอัตราการกินอาหารปกติ (เหลือ 2.5% น้ำหนักตัว/วัน)

2.ความสามารถในการนำยาไปใช้ได้ 10%, ทำการผสมยา 2 กรัม florfenicol ในอาหาร 2.5 กิโลกรัม

MF อาหารผสม florfenicol และเคลือบทับด้วยน้ำมันปลาหมึก

BF อาหารกุ้งกุลาดำเคลือบทับด้วยน้ำมันปลาหมึก

การเก็บตัวอย่าง : กุ้งกุลาดำ 5 ตัว / ตู้ ตามหมายเลขตู้ที่ระบุไว้

ตู้ทดลองที่ 1-18: กลุ่มทดลองที่ได้รับอาหารผสมยา (n=18/ น้ำเค็ม 5 ‰ ปริมาตร 90 ลิตร)

ตู้ทดลองที่ 19-22: กลุ่มควบคุม ได้รับอาหารปกติ (n=18/ น้ำเค็ม 5 ‰ ปริมาตร 90 ลิตร)

2. การวิเคราะห์ปริมาณ florfenicol-amine (FFA) ในกุ้งกุลาดำโดย HPLC / UV detection (Schering-Plough, 2002b)

<u>หลักการ</u>

วิธีการตรวจหาสารตกค้าง FFA ด้วย HPLC-UV ประกอบด้วย 5 ขั้นตอน คือ

1.การย่อยเนื้อเยื่อตัวอย่างด้วยกรดไฮโดรคลอริคร้อน

2.การสกัดส่วนที่ไม่ต้องการหลังจากย่อยด้วยกรดออกไปด้วย ethyl acetate

3.ปรับสภาพสารที่เหลือให้มีความเป็นด่าง (pH มากกว่า 12.5)

4.ทำความสะอาดตัวอย่างโดยกรองผ่านคอลัมน์และสกัด FFA ด้วย dichloromethane

5.ระเหยสารสกัดที่ได้และทำการละลายสิ่งที่เหลือด้วยสารละลาย 10 mM potassium phosphate (pH 4.0) ซึ่งใช้เป็น mobile phase ในการวิเคราะห์

2.1 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์

2.1.1 6N Hydrochloric Acid (HCl)

เตรียมกรดไฮโดรคลอริคความเข้มข้นสูงปริมาตร 500 มิลลิลิตร เติมลงในน้ำ 500 มิลลิลิตร อย่างช้าๆ และผสมให้เข้ากันอย่างระมัดระวัง สารละลายนี้สามารถเก็บในอุณหภูมิห้องและมีความคงตัวนาน 1 ปี

2.1.2 30% (W/W) Sodium Hydroxide (NaOH)

เตรียมสารละลาย 50%(W/W) NaOH ปริมาตร 600 มิลลิลิตร เติมลงในน้ำ 400 มิลลิลิตร อย่างช้าๆ และสามารถเก็บสารละลายนี้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 1 ปี

2.1.3 10 mM Potassium Phosphate (pH 4.0)

ละลาย potassium phosphate 2.72 ± 0.2 กรัม ในน้ำ deionized ปริมาตร 1,900 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 4.0 ± 0.2 ด้วยกรดฟอสฟอริค (H_3PO_4) สามารถเก็บสารละลายนี้ในอุณหภูมิห้องได้นาน 1 เดือน

2.1.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (ตารางที่ 9)

- เตรียมตัวอย่างสารละลายมาตรฐาน florfenicol-amine (FFA) โดยชั่งผงของสารมาตรฐาน 10 ± 0.1 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร

- เติม methanol (HPLC grade) 100 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ได้สารละลายความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น Stock solution A

- นำ Stock solution A 10 มิลลิลิตร เติมด้วย methanol (HPLC grade) ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ได้ Stock solution B ความเข้มข้นเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

- นำ Stock solution A และ Stock solution B มาเจือจางด้วย 10 mM potassium phosphate (pH 4.0) ใน volumetric flasks ขนาด 10 มิลลิลิตร ได้ working solution 8 ความเข้มข้น คือ 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 9 การเตรียมสารละลาย FFA-working solution

FFA-working solution	Stock Solution (µl)		Mobile phase A
(µg/ml)	A	B	(ml)
0.005	-	5	9.995
0.01	-	10	9.990
0.05	-	50	9.950
0.1	-	100	9.900
0.5	50	-	9.950
1.0	100	-	9.900
1.5	150	-	9.850
2.0	200	-	9.800

Mobile phase A = 10 mM Potassium Phosphate (pH 4.0)

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณ FFA โดยใช้สารละลายมาตรฐาน

2.2.1. นำสารละลายมาตรฐานที่ได้ (ตารางที่ 9) มาผ่านการกรองด้วย syringe membrane filter ขนาด 0.2 ไมครอน ลงใน HPLC vial แล้วตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ FFA ในสารละลายมาตรฐานด้วยเครื่อง HPLC-UV โดยใช้เฟสเคลื่อนที่แบบ bigradient ซึ่งมี mobile phase A คือ 10 mM Potassium phosphate (pH 4.0) และ mobile phase B คือ 100% acetronitrile (ตารางที่ 10)

Mobile phase (flow rate) 1 มิลลิลิตรต่อนาที

ความยาวคลื่น UV 220 นาโนเมตร

volume of injection 100 ไมโครลิตร

นำผลที่ได้จากการวิเคราะห์ปริมาณ FFA ในสารละลายมาตรฐานมาทำ standard curve แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นของ FFA (รูปที่ 4)

2.2.2. ทำการวิเคราะห์ซ้ำสารละลายมาตรฐานชุดเดิม ความเข้มข้นละ 3 ครั้ง เพื่อคำนวณหาความแตกต่างของวิธีวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน (intraday precision) (ตารางที่ 11)

2.2.3. ทำการวิเคราะห์ปริมาณ FFA ในสารละลายมาตรฐานชุดเดิมซ้ำในวันรุ่งขึ้น ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ซ้ำความเข้มข้นละ 3 ครั้ง เพื่อคำนวณหาความแตกต่างของวิธีวิเคราะห์ในระหว่างวัน (interday precision) (ตารางที่ 11)

2.2.4 คำนวณความเข้มข้นของ FFA จาก HPLC chromatogram

ตารางที่ 10 สัดส่วนการเคลื่อนที่ของ Mobile phase A และ B ในระหว่างการวิเคราะห์ปริมาณ FFA

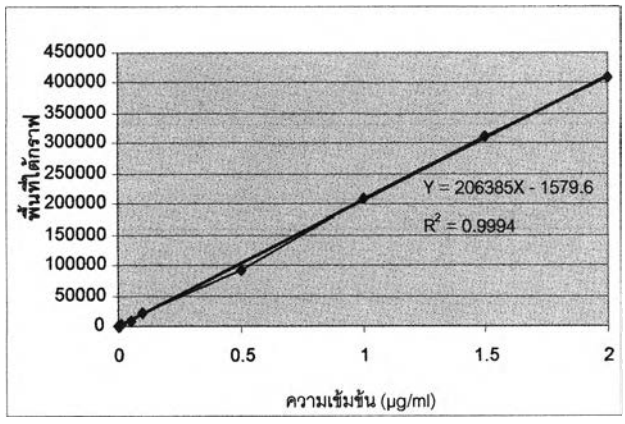
เวลา (นาที)	% Mobile phase	
	A*	B**
10.0	100	0
25.0	100	0
27.5	20	80
35.0	20	80
37.5	100	0
40.0	100	0

* Mobile phase A = 10 mM Potassium phosphate (pH 4.0)

** Mobile phase B = 100% acetronitrile 10 mM

I22161960

รูปที่ 4 Standard curve แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟจาก Chromatogram และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน FFA โดยโปรแกรมสำเร็จรูป CLASS-LC® software (Shimadzu, Japan)



FFA (ppm)	พื้นที่ใต้กราฟ
0.005	0
0.01	1790
0.05	9360
0.1	20699
0.5	93143
1.0	208869
1.5	312123
2.0	408086

สมการกราฟมาตรฐาน $y = ax + b$

Y = พื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐาน

X = ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (µg/ml)

a = ความชันของกราฟมาตรฐาน

b = จุดตัดของกราฟบนแกน y

2.3 การหาค่า Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ) ของวิธีวิเคราะห์ (Ambruster และคณะ, 1994)

การคำนวณหา Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ)

$$LOD = \frac{3.3\sigma}{S}$$

$$LOQ = \frac{10\sigma}{S}$$

σ หมายถึง Y-intercepts จากสมการเส้นตรงของ Standard curve (รูปที่ 4)

S หมายถึง slop จากสมการเส้นตรงของ Standard curve (รูปที่ 4)

จากสมการ Y = 206385X – 1579.6

แทนค่าในสมการ LOD = (3.3 * 1579.6) / 206385 = 0.025

LOQ = (10 * 1579.6) / 206385 = 0.077

การคำนวณค่า LOQ ต้องประกอบกับ coefficient of variation (CV) ของวิธีวิเคราะห์ไม่เกิน 15 เปอร์เซนต์ จึงจะยอมรับค่า LOQ ที่คำนวณได้ (Ambruster et al., 1994)

2.4 การประเมินความแปรปรวนของวิธีวิเคราะห์ในแต่ละวัน (intraday precision) และระหว่างวัน (interday precision)

การประเมินความแปรปรวนของวิธีวิเคราะห์จากค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation; CV) ดังสมการที่ 1, 2 และ 3 โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลาย FFA มาตรฐานความเข้มข้นต่ำสุดและสูงสุด คือ 0.01 และ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรฉีดเข้าเครื่อง HPLC ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เป็นเวลา 2 วัน ติดต่อกัน

$$CV\ (\%) = \frac{\text{Standard Deviation}}{\text{Mean}} * 100$$

intraday precision = เปอร์เซนต์ CV ของตัวอย่างในแต่ละวัน

interday precision = เปอร์เซนต์ CV ของตัวอย่างระหว่างวัน

ตารางที่ 11 intraday และ interday precision ของวิธีวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน FFA

ความเข้มข้นของ	วันที่	พื้นที่ใต้กราฟ (หน่วย)			mean	SD	CV (%)*	
FFA (µg/ml)		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3			interday	intraday
0.01	1	1790	2013	2119	1974	167.93	8.5	8.1
	2	1931	1849	1692	1824	121.45	6.7	
2.0	1	443798	433776	427457	435010.3	8240.13	1.9	1.8
	2	427190	444804	434331	435441.7	8859.37	2	

* เกณฑ์ที่ยอมรับ คือ ค่า CV ที่ได้ไม่ควรมากกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ (Ambruster *et al.*, 1994)

3. การวิเคราะห์ปริมาณ FFA ในตัวอย่าง (Schering-Plough, 2002b)

3.1 การประเมินความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy)

ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์จะแสดงในรูปของเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (recovery rate) ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติม florfenicol-amine (FFA) มาตรฐานความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเนื้อเยื่อตัวอย่างจากกลุ่มควบคุมการทดลอง (เนื้อเยื่อที่ไม่มี florfenicol) ทิ้งตัวอย่างไว้ 30 นาที ก่อนนำไปสกัดและวิเคราะห์ตามขั้นตอนในข้อ 3.2 และนำค่าพื้นที่ใต้กราฟของ FFA ที่ได้จากการวิเคราะห์มาคำนวณใน

$$\text{สูตรอัตราคืนกลับ (Recovery rate)} = \frac{(F_a - F_b) * 100}{F_c}$$

F_a = ปริมาณของ FFA ในตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานที่ได้จากการวิเคราะห์

F_b = ปริมาณของ FFA ในตัวอย่างที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐานที่ได้จากการวิเคราะห์

F_c = ปริมาณของสารละลายมาตรฐาน FFA ที่เติมลงในตัวอย่าง

ตารางที่ 12 ความเข้มข้นและอัตราการคืนกลับ (recovery) ของ FFA จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง* ที่เติม FFA มาตรฐาน 1 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักของตัวอย่าง

ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย	
	FFA ที่วิเคราะห์ได้ (ppm)	Recovery (%)
กล้ามเนื้อ	0.792	79.2
hepatopancreas	0.807	80.7
ตัวอย่างน้ำ	0.754	75.4

* ตัวอย่างได้รับการวิเคราะห์แล้วว่าไม่มี FFA ก่อนการเติม FFA มาตรฐาน เพื่อการวิเคราะห์อัตราการคืนกลับของ FFA ในตัวอย่างหลังจากการสกัด

3.2 การสกัดตัวอย่างและการวิเคราะห์ปริมาณ FFA (Schering-Plough, 2002b)

3.2.1 ตัดเนื้อเยื่อกุ้งเป็นชิ้นเล็กๆ และนำไปปั่นพร้อมน้ำแข็งแห้งให้ละเอียดจนเนื้อเยื่อมีลักษณะเป็นผง นำตัวอย่างที่ปั่นเป็นผงปริมาณ 2 ± 0.2 กรัม มาทำการแช่แข็งและละลาย 2-3 ครั้ง

3.2.2 เติมสารละลาย 6N HCl ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ต่อ 1 ตัวอย่างเนื้อเยื่อ (2 ± 0.2 กรัม) นำไปเขย่าด้วย vortex นาน 1 นาที

3.2.3 ต้มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 95-100°C นาน 2 ชั่วโมง โดยเขย่าตัวอย่างให้เข้ากันด้วย vortex ทุก 10-15 นาที เมื่อตัวอย่างผ่านขบวนการ acid hydrolysis อย่างสมบูรณ์จะมีลักษณะเป็นสารสีน้ำตาลไหม้จนถึงดำ ให้ตัวอย่างเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง

3.2.4 เติม ethyl acetate ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ต่อ 1 ตัวอย่าง เขย่าให้เข้ากันนาน 2 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 2,500 rpm นาน 5 นาที ดูดสารละลายชั้นบนซึ่งเป็นส่วน ethyl acetate ทิ้ง และปรับสารตัวอย่างส่วนที่เหลือให้ได้ pH มากกว่าหรือเท่ากับ 12.5 ด้วยการเติม 30% (W/V) NaOH อย่างช้าๆ

3.2.5 เตรียมคอลัมน์ Chem Elute® โดยบรรจุ glass wool ลงด้านบนของคอลัมน์ให้มีความหนาเท่ากับ 3/8 นิ้ว หรือ ประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วจึงต่อคอลัมน์ Chem Elute® เข้ากับ vacuum manifold ที่ควบคุมอัตราการผ่านของสารละลายเท่ากับ 1 หยดต่อวินาที

3.2.6 เทสารละลายตัวอย่างที่ผ่านขบวนการ acid hydrolysis และปรับ pH แล้ว (ข้อ 3.2.4) ผ่านลงคอลัมน์ Chem Elute® ปล่อยทิ้งไว้นาน 45 นาที เพื่อให้คอลัมน์สามารถดูดซึมสารละลายได้เต็มที่

3.2.7 เติม dichloromethane (CH_2Cl_2) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผ่านลงคอลัมน์ Chem Elute® โดยให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 1 หยดต่อวินาที (ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง) รอจนกระทั่งสารละลายทั้งหมดไหลออกจากคอลัมน์หมด และใช้ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ปริมาตร 125 มิลลิลิตร เป็นตัวรองรับสารที่สกัดไว้

3.2.8 นำขวดรูปชมพู่ที่มีสารละลายที่สกัดได้ ไประเหยแห้งด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 45-50°C และล้างขวดด้วย dichloromethane ซ้ำอีกครั้งเพื่อละลายสารสกัดที่ติดรอบขวดออกให้หมด

3.2.9 เติม 10 mM potassium phosphate (pH 4.0) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในตะกอนที่ได้จาก 1 ตัวอย่างและนำไปเขย่าให้เข้ากันด้วย vortex นาน 30 วินาที แล้วจึงแช่ใน ultrasonic water bath นาน 1 นาที

3.2.10 ใช้ syringes ขนาด 3 มิลลิลิตร ดูดสารละลายในข้อ 3.2.9 และกรองผ่านตัวกรองขนาด 0.2 ไมครอน ลง HPLC vial

3.3 การวิเคราะห์ปริมาณ florfenicol-amine ที่ละลายออกจากอาหาร

3.3.1 ชั่งอาหารกุ้งที่ผสม florfenicol และเคลือบน้ำมันปลาหมึก (จากการทดลองที่ 2 ข้อ 1) น้ำหนัก 1 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 5 ลิตร ซึ่งบรรจุน้ำทะเลความค็ม 5‰ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร

3.3.2 เก็บตัวอย่างน้ำหลังแช่อาหารผสมยา ที่เวลา 30, 60 และ 120 นาที

3.3.3 ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำ โดยใช้วิธีในการวิเคราะห์เหมือนข้อ 3.2

3.3.4 คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของยาที่ละลายออกจากอาหาร

ปริมาณ florfenicol ที่ละลายออกจากอาหาร (เปอร์เซนต์)

$$= \frac{\text{ความเข้มข้น FFA ที่วิเคราะห์ได้ในน้ำ} \times \text{ปริมาตรของน้ำทั้งหมด} \times 100}{\text{ปริมาณ florfenicol ทั้งหมดในอาหาร}}$$

3.4 การตรวจสอบยาตกค้างในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำหลังจากการให้ florfenicol ผสมอาหาร

การคำนวณ

นำค่าพื้นที่ใต้กราฟของสาร FFA ที่พบในตัวอย่างที่ได้การวิเคราะห์ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Class-LC software (Shimadzu, Japan) มาทำการคำนวณออกมาเป็นค่าความเข้มข้นของสาร FFA ต่อน้ำหนักของอวัยวะที่ตรวจโดยอ้างอิงจาก Linear least squares equations ของ Standard curve

$$\text{FFA (ppm)} = \frac{\text{peak report area} - \text{จุดตัดบนแกน y}}{\text{ความชันของกราฟ}}$$

พื้นที่ใต้กราฟของตัวอย่างที่ได้จาก chromatogram