บทที่ 4

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การทดสอบประสิทธิภาพของ florfenicol ในห้องปฏิบัติการ

การศึกษาประสิทธิภาพของ florfenicol ในห้องปฏิบัติการโดยทดสอบความเข้มข้นของ florfenicol ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ vibrios ที่แยกจาก hepatopancreas ของกุ้งกุลาดำป่วย รวมทั้งหมด 102 isolates ตัวอย่างกุ้งกุลาดำป่วยจากเขตพื้นที่การเพาะเลี้ยงทั่วประเทศระหว่างปี พ.ศ.2544 ถึง พ.ศ.2546 รวม 11 จังหวัด ได้แก่ กระบี่ จันทบุรี ชุมพร ตรัง นครศรีธรรมราช ประจวบคีรีขันธ์ ปราจีนบุรี ปัตตานี ระยอง สงขลา สุราษฎร์ธานี (รูปที่ 3) และจากประเทศเวียตนาม 11 isolates ผลการศึกษาพบว่าเชื้อ vibrios ทั้งหมด ได้แก่ *Vibiro alginolyticus* จำนวน 7 isolates *V.cholerae* จำนวน 14 isolates *V.damsela* จำนวน 14 isolates *V.fluvialis* จำนวน 27 isolates *V.parahaemolyticus* จำนวน 30 isolates และ *V.vulnificus* จำนวน 10 isolates (ตารางที่ 13)

จากการวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม WHONET5 พบว่าเมื่อทดสอบความไวรับของเชื้อ vibirios ต่อ florfenicol ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Meuller Hinton Agar (MHA) แสดงค่า MICs อยู่ในช่วง 0.5-2 µg/ml มีค่า MIC_{50} และ MIC_{90} เท่ากับ 1 µg/ml ที่ความเค็ม 0‰ และค่า MICs อยู่ในช่วง 0.5-4 µg/ml มีค่า MIC_{50} เท่ากับ 1 µg/ml และ MIC_{90} เท่ากับ 2 µg/ml ที่ความเค็ม 5‰ ส่วนผลการทดสอบความไวรับของเชื้อ vibiros ต่อ chloramphenicol แสดงช่วง MICs และค่า MIC_{50} ที่ความเค็ม 0‰ และความเค็ม 5‰ ไม่แตกต่างกัน คือ 0.5-8 µg/ml และ 1 µg/ml ตามลำดับ ส่วนค่า MIC_{90} เท่ากับ 2 µg/ml ที่ความเค็ม 0‰ และเท่ากับ 4 µg/ml ที่ระดับความเค็ม 5‰ (ตารางที่ 14) โดยค่า MICs ของเชื้อ vibrios แต่ละ isolate แสดงดังตารางที่ 15 และกราฟแท่ง (รูปที่ 5) แสดงการกระจายหรือความถี่ของค่า MICs ของยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดที่ใช้ทดสอบ

จากกราฟรูปที่ 5 แสดงการกระจายของค่า MICs พบว่า florfenicol มีการกระจายของค่า MICs น้อยกว่า chloramphenicol เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการทดสอบในน้ำจืดและในน้ำทะเลที่มีความเค็ม 5‰ พบว่าค่า MICs ของ florfenicol มีค่าสูงขึ้นเล็กน้อย เมื่อทำการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมน้ำทะเลความเค็ม 5‰ และพบว่าประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อ vibiros ที่ใช้ทดสอบมีความไวรับต่อ florfenicol โดยดูจากระดับความเข้มข้นของยาที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ มีระดับต่ำกว่าค่า break point (8-16 µg/ml) เช่นเดียวกับการทดสอบประสิทธิภาพของ chloramphenicol ซึ่งให้ผลทดสอบในรูปแบบเดียวกัน คือ เชื้อ vibrios ที่ทดสอบมากกว่า 90 เปอร์เซนต์ มีความไวรับต่อยาเช่นเดียวกัน

ตารางที่ 13 เชื้อ vibrios แยกจากกุ้งป่วยจำนวน 102 isolates เพื่อใช้ทดสอบหาระดับความเข้มข้นของ florfenicol และ chloramphenicol ที่ระงับการเจริญของเชื้อ

ชนิดของเชื้อ	แหล่งที่มา	จำนวน (isolates)
Vibrio alginolyticus	กระบี่	3
Vibrio alginolyticus	นครศรีธรรมราช	2
Vibrio alginolyticus	ระยอง	1
Vibrio alginolyticus	ประเทศเวียตนาม	1
Vibrio cholera	จันทบุรี	3
Vibrio cholera	ชุมพร	1
Vibrio cholera	ตรัง	3
Vibrio cholera	นครศรีธรรมราช	5
Vibrio cholera	ประจวบคีรีขันธ์	2
Vibrio damsela	จันทบุรี	2
Vibrio damsela	ชุมพร	3
Vibrio damsela	ตรัง	2
Vibrio damsela	นครศรีธรรมราช	1
Vibrio damsela	ปัตตานี	1
Vibrio damsela	ระยอง	1
Vibrio damsela	ประเทศเวียตนาม	4
Vibrio fluvialis	กระบี่	7
Vibrio fluvialis	จันทบุรี	3
Vibrio fluvialis	นครศรีธรรมราช	2
Vibrio fluvialis	ประจวบคีรีขันธ์	2
Vibrio fluvialis	ปัตตานี	1
Vibrio fluvialis	ระยอง	5
Vibrio fluvialis	สงขลา	2
Vibrio fluvialis	ประเทศเวียตนาม	5
Vibrio parahemolyticus	กระบี่	6
Vibrio parahemolyticus	จันทบุรี	1
Vibrio parahemolyticus	ชุมพร	4
Vibrio parahemolyticus	นครศรีธรรมราช	2
Vibrio parahemolyticus	ประจวบคีรีขันธ์	2
Vibrio parahemolyticus	ปัตตานี	4
Vibrio parahemolyticus	ระยอง	7
Vibrio parahemolyticus	สงขลา	1
Vibrio parahemolyticus	สุราษฎร์ธานี	2
Vibrio parahemolyticus	ประเทศเวียตนาม	1
Vibrio vulnificus	ตรัง	5
Vibrio vulnificus	ประจวบคีรีขันธ์	1
Vibrio vulnificus	ปัตตานี	2
Vibrio vulnificus	ระยอง	2

ตารางที่ 14 Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) ของ florfenicol และ chloramphenicol ต่อเชื้อ vibrios ที่แยกจาก hepatopancreas ของกุ้งป่วย

ชนิดยา	MICs (µg/ml)					
	MIC_{50} [1]		MIC_{90} [2]		MICs Range [3]	
	0‰	5‰	0‰	5‰	0‰	5‰
Florfenicol	1	1	1	2	0.5-2	0.5-4
Chloramphenicol	1	1	2	4	0.5-8	0.5-8

[1] Minimum Inhibitory 50% [2] Minimum Inhibitory 90% [3] Range of MICs observed in 102 pathogenic vibirio isolates

ตารางที่ 15 Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) ของ chloramphenicol และ florfenicol เมื่อทดสอบกับเชื้อ vibrios ที่แยกจากกุ้งป่วยในเขตการเลี้ยงต่างพื้นที่ของประเทศไทย และประเทศเวียตนาม

ชนิดของเชื้อ	แหล่งที่มา	chloramphenicol		florfenicol	
		MICs / 0‰*	MICs / 5‰*	MICs / 0‰*	MICs / 5‰*
1. *V. alginolyticus*	กระบี่	1	2	1	1
2. *V. alginolyticus*	กระบี่	1	1	1	1
3. *V. alginolyticus*	กระบี่	0.5	2	0.5	2
4. *V. alginolyticus*	นครศรีธรรมราช	1	1	1	1
5. *V. alginolyticus*	นครศรีธรรมราช	0.5	0.5	0.5	1
6. *V. alginolyticus*	ระยอง	1	1	1	1
7. *V. alginolyticus*	ประเทศเวียตนาม	2	4	1	2
8. *V. cholerae*	จันทบุรี	4	4	1	1
9. *V. cholerae*	จันทบุรี	1	1	1	1
10. *V. cholerae*	จันทบุรี	1	1	2	1
11. *V. cholerae*	ชุมพร	1	1	1	1
12. *V. cholerae*	ตรัง	1	1	1	1
13. *V. cholerae*	ตรัง	0.5	1	1	1
14. *V. cholerae*	ตรัง	1	1	1	1
15. *V. cholerae*	นครศรีธรรมราช	1	1	1	1
16. *V. cholerae*	นครศรีธรรมราช	1	2	1	1
17. *V. cholerae*	นครศรีธรรมราช	1	1	1	1
18. *V. cholerae*	นครศรีธรรมราช	1	1	1	1
19. *V. cholerae*	นครศรีธรรมราช	8	8	1	1
20. *V. cholerae*	ประจวบคีรีขันธ์	2	1	1	1
21. *V. cholerae*	ประจวบคีรีขันธ์	2	1	1	1
22. *V. damsela*	จันทบุรี	1	1	1	1
23. *V. damsela*	จันทบุรี	0.5	2	0.5	2
24. *V. damsela*	ชุมพร	1	2	1	1
25. *V. damsela*	ชุมพร	1	2	1	1
26. *V. damsela*	ชุมพร	8	8	2	1
27. *V. damsela*	ตรัง	1	1	1	1
28. *V. damsela*	ตรัง	1	1	1	1

* Salinity (part per thousand)

ตารางที่ 15 Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) ของ chloramphenicol และ florfenicol เมื่อทดสอบกับเชื้อ vibrios ที่แยกจากกุ้งป่วยในเขตการเลี้ยงต่างพื้นที่ของประเทศไทย และประเทศเวียตนาม (ต่อ)

ชนิดของเชื้อ	แหล่งที่มา	Chloramphenicol		florfenicol	
		MICs / 0‰*	MICs / 5‰*	MICs / 0‰*	MICs / 5‰*
29. *V. damsela*	นครศรีธรรมราช	1	1	1	1
30. *V. damsela*	ปัตตานี	0.5	1	0.5	1
31. *V. damsela*	ระยอง	1	1	1	2
32. *V. damsela*	ประเทศเวียตนาม	0.5	2	0.5	1
33. *V. damsela*	ประเทศเวียตนาม	0.5	2	0.5	2
34. *V. damsela*	ประเทศเวียตนาม	0.5	2	0.5	2
35. *V. damsela*	ประเทศเวียตนาม	0.5	2	0.5	1
36. *V. fluvialis*	กระบี่	2	8	1	1
37. *V. fluvialis*	กระบี่	8	8	1	2
38. *V. fluvialis*	กระบี่	4	8	1	2
39. *V. fluvialis*	กระบี่	2	1	1	4
40. *V. fluvialis*	กระบี่	1	1	1	1
41. *V. fluvialis*	กระบี่	1	1	1	1
42. *V. fluvialis*	กระบี่	2	1	1	1
43. *V. fluvialis*	จันทบุรี	1	1	0.5	1
44. *V. fluvialis*	จันทบุรี	2	1	1	1
45. *V. fluvialis*	จันทบุรี	1	2	1	1
46. *V. fluvialis*	นครศรีธรรมราช	8	8	2	2
47. *V. fluvialis*	นครศรีธรรมราช	1	1	1	1
48. *V. fluvialis*	ประจวบคีรีขันธ์	0.5	1	0.5	1
49. *V. fluvialis*	ประจวบคีรีขันธ์	1	1	1	1
50. *V. fluvialis*	ปัตตานี	2	1	1	1
51. *V. fluvialis*	ระยอง	1	1	1	1
52. *V. fluvialis*	ระยอง	1	1	1	1
53. *V. fluvialis*	ระยอง	0.5	1	1	2
54. *V. fluvialis*	ระยอง	1	1	0.5	1
55. *V. fluvialis*	ระยอง	0.5	2	0.5	1
56. *V. fluvialis*	สงขลา	2	1	1	1

* Salinity (part per thousand)

ตารางที่ 15 Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) ของ chloramphenicol และ florfenicol เมื่อทดสอบกับเชื้อ vibrios ที่แยกจากกุ้งป่วยในเขตการเลี้ยงต่างพื้นที่ของประเทศไทย และประเทศเวียตนาม (ต่อ)

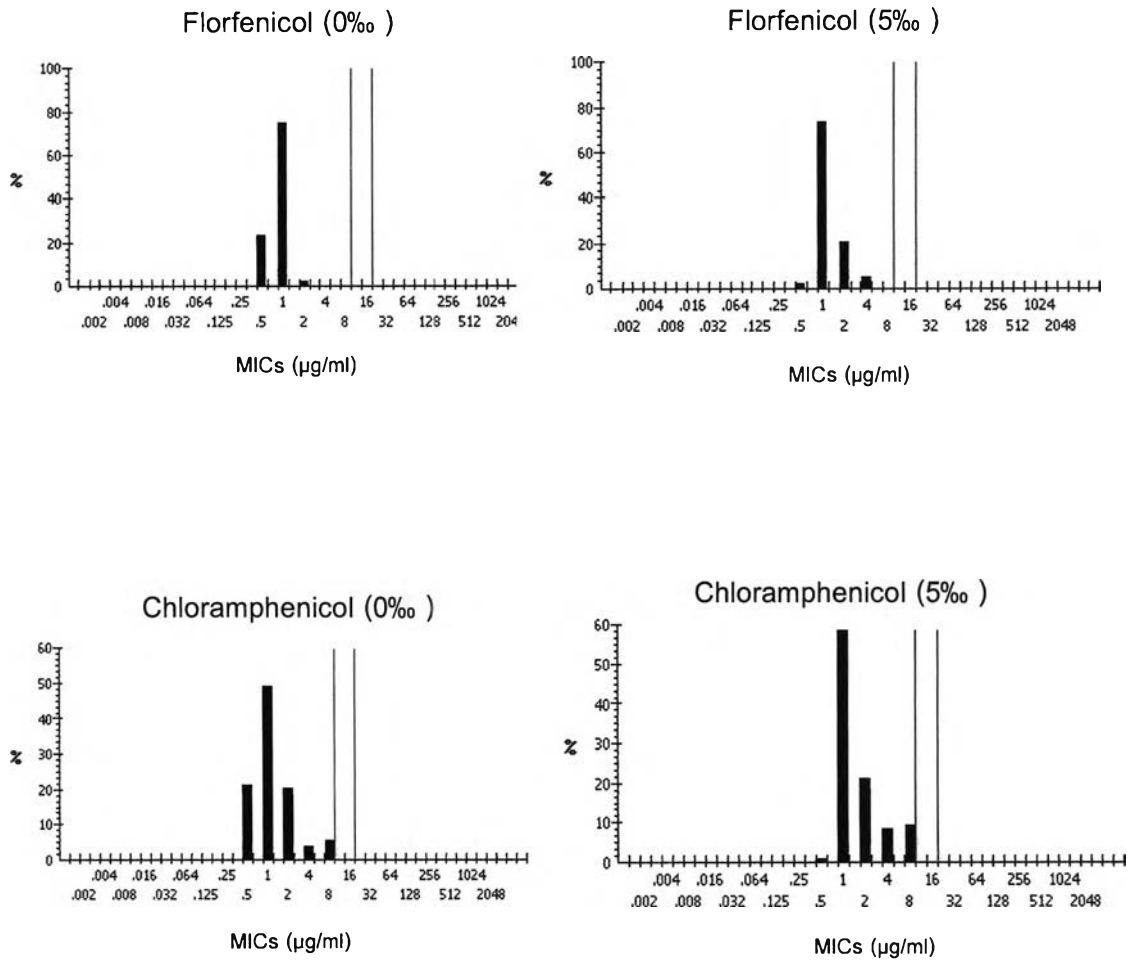
ชนิดของเชื้อ	แหล่งที่มา	chloramphenicol		florfenicol	
		MICs / 0‰ *	MICs / 5‰ *	MICs / 0‰ *	MICs / 5‰ *
57. *V. fluvialis*	สงขลา	1	1	1	1
58. *V. fluvialis*	ประเทศเวียตนาม	0.5	2	0.5	1
59. *V. fluvialis*	ประเทศเวียตนาม	0.5	2	0.5	1
60. *V. fluvialis*	ประเทศเวียตนาม	0.5	2	0.5	2
61. *V. fluvialis*	ประเทศเวียตนาม	0.5	1	0.5	0.5
62. *V. fluvialis*	ประเทศเวียตนาม	0.5	1	0.5	0.5
63. *V. parahaemolyticus*	กระบี่	1	1	1	4
64. *V. parahaemolyticus*	กระบี่	8	8	1	2
65. *V. parahaemolyticus*	จันทบุรี	1	2	1	2
66. *V. parahaemolyticus*	ชุมพร	0.5	2	0.5	1
67. *V. parahaemolyticus*	ชุมพร	0.5	2	1	1
68. *V. parahaemolyticus*	ชุมพร	1	2	1	1
69. *V. parahaemolyticus*	นครศรีธรรมราช	1	1	1	2
70. *V. parahaemolyticus*	นครศรีธรรมราช	1	1	1	2
71. *V. parahaemolyticus*	ประจวบคีรีขันธ์	2	1	1	4
72. *V. parahaemolyticus*	ประจวบคีรีขันธ์	2	1	1	1
73. *V. parahaemolyticus*	ปัตตานี	1	1	0.5	1
74. *V. parahaemolyticus*	ปัตตานี	2	1	1	1
75. *V. parahaemolyticus*	ปัตตานี	1	1	1	2
76. *V. parahaemolyticus*	ปัตตานี	1	1	1	2
77. *V. parahaemolyticus*	ระยอง	2	1	1	1
78. *V. parahaemolyticus*	ระยอง	0.5	1	1	1
79. *V. parahaemolyticus*	ระยอง	1	1	1	1
80. *V. parahaemolyticus*	ระยอง	1	1	1	1
81. *V. parahaemolyticus*	ระยอง	1	1	1	2
82. *V. parahaemolyticus*	ระยอง	2	1	1	1
83. *V. parahaemolyticus*	ระยอง	1	1	1	2
84. *V. parahaemolyticus*	สงขลา	2	1	1	1

* Salinity (part per thousand)

ตารางที่ 15 Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) ของ chloramphenicol และ florfenicol เมื่อทดสอบกับเชื้อ vibrios ที่แยกจากกุ้งป่วยในเขตการเลี้ยงต่างพื้นที่ของประเทศไทย และประเทศเวียตนาม (ต่อ)

ชนิดของเชื้อ	แหล่งที่มา	chloramphenicol		florfenicol	
		MICs / 0‰*	MICs / 5‰*	MICs / 0‰*	MICs / 5‰*
85. *V. parahaemolyticus*	สุราษฎร์ธานี	2	1	1	1
86. *V. parahaemolyticus*	สุราษฎร์ธานี	2	1	1	1
87. *V. parahaemolyticus*	ประเทศเวียตนาม	0.5	2	0.5	1
88. *V. parahaemolyticus*	กระบี่	1	1	0.5	1
89. *V. parahaemolyticus*	กระบี่	1	1	1	1
90. *V. parahaemolyticus*	กระบี่	1	1	0.5	1
91. *V. parahaemolyticus*	กระบี่	2	1	1	1
92. *V. parahaemolyticus*	ชุมพร	4	8	1	1
93. *V. vulnificus*	ตรัง	1	1	1	1
94. *V. vulnificus*	ตรัง	8	8	1	1
95. *V. vulnificus*	ตรัง	1	1	1	1
96. *V. vulnificus*	ตรัง	4	8	1	1
97. *V. vulnificus*	ตรัง	2	1	1	1
98. *V. vulnificus*	ประจวบคีรีขันธ์	0.5	2	0.5	1
99. *V. vulnificus*	ปัตตานี	2	1	1	1
100.*V. vulnificus*	ปัตตานี	1	1	1	1
101.*V. vulnificus*	ระยอง	1	2	1	1
102.*V. vulnificus*	ระยอง	2	4	1	1

* Salinity (part per thousand)



รูปที่ 5 กราฟแสดงการกระจายหรือความถี่ของค่า Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) ของ florfenicol และ chloramphenicol ต่อเชื้อ vibrios ที่แยกจาก hepatopancreas ของกุ้งป่วย เมื่อทดสอบใน Mueller-Hinton Agar (MHA) ที่เตรียมสารละลายที่ระดับความเค็ม 0‰ และความเค็ม 5‰

การทดลองที่ 2 การเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยอาหารที่ผสม florfenicol และการหาปริมาณ florfenicol-amine ในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำด้วยวิธี HPLC

การทดลองให้กุ้งกุลาดำได้รับยา florfenicol โดยการผสมยาในอาหาร ซึ่งควบคุมคุณภาพน้ำเลี้ยงตลอดการทดลองอยู่ที่ความเค็ม 30‰ ความเป็นกรดด่าง 7.5-8.5 อุณหภูมิของน้ำ 27-30°C ไนไตรต์ 0.1-0.2 ppm แอมโมเนียรวมอยู่ระหว่าง 0.5-1.0 ppm และค่าแอลคาไลน์ 80-160 ppm (ตารางที่ 7)

จากการทดลองนำสารละลายมาตรฐาน florfenicol-amine (FFA) จำนวน 8 ความเข้มข้น คือ 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ใช้เฟสเคลื่อนที่แบบ bigradient คือ mobile phase A คือ 10 mM potassium phosphate (pH 4.0) และ mobile phase B คือ 100% acetronitrile ความเร็วเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร Injected volume 100 µl พบว่าระยะเวลาที่เฟสเคลื่อนที่พาสารละลายมาตรฐานเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ (Retention time) เป็น 11.796-12.437 นาที โดยระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลายมาตรฐานที่เครื่องสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ คือ 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวกที่ 4) มี Peak area เฉลี่ยของ FFA ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น 1974, 14439.3, 18525, 81916.3, 191665, 279306.3 และ 435010.3 ตามลำดับ โดยที่ระดับความเข้มข้น 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์ของความผันแปร (%CV) มากที่สุด คือ 8.5 (ภาคผนวกที่ 3)

เมื่อนำ Peak area ของ FFA มา plot กราฟเพื่อหาความสัมพันธ์กับความเข้มข้นทั้ง 8 ความเข้มข้น ด้วยวิธี Linear least square method พบว่าได้สมการเชิงเส้นตรง Y = 206385X – 1579.6 และมีค่า R-square เป็น 0.9994 (รูปที่ 4)

ผลการศึกษาหาปริมาณการตกค้างของ FFA โดยให้กุ้งกุลาดำกินอาหารที่ผสมยา florfenicol ในขนาด 0.8 กรัม florfenicol ต่อกิโลกรัมอาหาร และให้อาหารปริมาณ 2.5% ของน้ำหนักตัวต่อวัน (ภาคผนวกที่ 2) เป็นเวลา 5 วันติดต่อกัน พบว่าสามารถตรวจพบ FFA ทั้งใน hepatopancreas และกล้ามเนื้อของกุ้งที่ได้รับยา โดยตรวจพบ FFA ในอวัยวะทั้งสองตั้งแต่ 30 นาที หลังจากการได้รับยาเป็นครั้งแรก จนกระทั่งถึงวันที่ 5 หลังจากการหยุดยาดังตารางที่ 16 และตารางที่ 17 ซึ่งแสดงความเข้มข้นเฉลี่ย (จาก 10 ตัวอย่าง) ของ FFA ใน hepatopancreas และกล้ามเนื้อที่เวลาต่างๆ หลังจากกุ้งได้รับยา พบความเข้มข้นเฉลี่ยสูงที่สุดของ FFA (C_{max}) ใน hepatopancreas เท่ากับ 0.7 ไมโครกรัมต่อกรัมเนื้อเยื่อ ที่เวลา 1 ชั่วโมง (t_{max}) หลังจากได้รับยาครั้งแรก และในกล้ามเนื้อเท่ากับ 0.05 ไมโครกรัมต่อกรัมเนื้อเยื่อ (C_{max}) ที่เวลา 4 ชั่วโมง (t_{max}) หลังจากได้รับยาครั้งแรก (รูปที่ 6) ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นเฉลี่ยของ FFA ในช่วงระยะเวลาโดยประมาณทุกๆ 24 ชั่วโมงของแต่ละวันตลอดระยะเวลาการให้ยา 5 วันติดต่อกัน แสดงว่า FFA มีปริมาณสูงที่ hepatopancreas และปริมาณน้อยลงที่กล้ามเนื้อ โดยพบ

ความเข้มข้นเฉลี่ยของ FFA 0.5-0.6 ไมโครกรัมต่อกรัม hepatopancreas และ 0.1-0.15 ไมโครกรัมต่อกรัมเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ (รูปที่ 6) และเมื่อดูความเข้มข้นของยาที่ได้รับตลอดช่วงเวลาที่ทำการให้อาหารผสมยา พบว่าความเข้มข้นของ florfenicol-amine ในเนื้อเยื่อที่ตรวจสอบ คือ hepatopancreas และกล้ามเนื้อ มีปริมาณที่สม่ำเสมอตลอดระยะเวลาของการให้ยา และความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบจะค่อยๆ ลดลงหลังหยุดการให้ยา จนไม่สามารถตรวจพบได้ในวันที่ 7 หลังการหยุดยา(รูปที่ 7)

การประเมินการสูญเสียของยาจากอาหารเนื่องจากการละลายของยาออกจากอาหารสู่น้ำ โดยการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ FFA ในน้ำ หลังจากการให้อาหารผสมยาในตู้ทดลอง พบว่ามีการสูญเสียของ florfenicol ส่วนหนึ่งจากการละลายของยาออกจากอาหารสู่น้ำดังตารางที่ 18 ซึ่งแสดงปริมาณ FFA ที่ตรวจพบในน้ำที่ช่วงระยะเวลาต่างๆ หลังจากที่อาหารผสมยาสัมผัสน้ำในระบบปิด และภายใน 1 ชั่วโมง หลังจากอาหารผสมยาสัมผัสน้ำปริมาตร 300 มิลลิลิตร สามารถตรวจพบ florfenicol-amine ในน้ำมากกว่า 50% ของปริมาณยาทั้งหมดที่มีในอาหาร 1 กรัมที่ใช้ในการทดลอง (0.8 มิลลิกรัมกรัม florfenicol) แม้ว่าจะมีการใช้น้ำมันปลาหมึกเคลือบอาหารก็ตาม

ตารางที่ 16 ความเข้มข้นของ florfenical-amine ที่วิเคราะห์ได้จากกล้ามเนื้อของกุ้งกุลาดำ ที่ได้รับ florfenicol ผสมอาหารเป็นเวลา 5 วัน

	florfenical-amine (µg/g)										
	5:00	5:30	6:00	7:00	9:00	13:00	13:30	17:00	21:00	21:30	5:00
	0 ชม	0.5 ชม	1 ชม	2 ชม	4 ชม	8 ชม	8.5 ชม	12 ชม	16 ชม	16.5 ชม	24 ชม
วันที่ 1	MF	0.022	0.023	0.036	0.041	MF	0.023	0.062	MF	0.045	0.022
วันที่ 2	MF	0.043	0.057	0.054	0.040	MF	0.120	0.049	MF	0.105	0.023
วันที่ 3	MF					MF	0.189		MF		
วันที่ 4	MF					MF	0.110		MF		
วันที่ 5	MF					MF	0.150		MF		
วันที่ 6	BF					BF			BF	0.073	
วันที่ 8	BF					BF	0.056		BF		
วันที่ 10	BF					BF	0.037		BF		
วันที่ 12	BF					BF	ND		BF		
วันที่ 14	BF					BF	ND		BF		

กุ้งกุลาดำอายุ 3 เดือน น้ำหนักตัวเฉลี่ย 14-15.5 กรัมต่อตัว อัตราการกินอาหารปกติ 5% น้ำหนักตัว/วัน

สมมติฐาน

1.ให้อาหารลดลงครึ่งหนึ่งจากอัตราการกินปกติ คือ เหลือ 2.5% น้ำหนักตัว

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

MF อาหารผสม florfenicol และเคลือบทับด้วยน้ำมันปลาหมึก

BF อาหารกุ้งกุลาดำเคลือบทับด้วยน้ำมันปลาหมึก

* วิธีในการวิเคราะห์หา florfenicol-amine อ้างอิงจาก Schering-Plough Research Institute, Lafayette, NJ, USA. (2002).

Limit of Detection (LOD) = 0.01 µg/g และ Limit of Quantitation (LOQ) = 0.05 µg/g

อัตราการคืนกลับของสาร = 75-80%

ND ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้หรือมีปริมาณสารที่ต้องการต่ำกว่าค่า LOD

ตารางที่ 17 ความเข้มข้นของ florfenical-amine ที่วิเคราะห์ได้จาก hepatopancreas ของกุ้งกุลาดำ ที่ได้รับ florfenicol ผสมอาหารเป็นเวลา 5 วัน

	florfenical-amine (µg/g)										
	5:00	5:30	6:00	7:00	9:00	13:00	13:30	17:00	21:00	21:30	5:00
	0 ชม	0.5 ชม	1 ชม	2 ชม	4 ชม	8 ชม	8.5 ชม	12 ชม	16 ชม	16.5 ชม	24 ชม
วันที่ 1	MF	0.593	0.710	0.578	0.545	MF	0.612	0.723	MF	0.643	0.499
วันที่2	MF	0.564	0.638	0.492	0.459	MF	0.504	0.691	MF	0.712	0.501
วันที่ 3	MF					MF	0.523		MF		
วันที่ 4	MF					MF	0.543		MF		
วันที่ 5	MF					MF	0.510		MF		
วันที่ 6	BF					BF			BF	0.402	
วันที่ 8	BF					BF	0.339		BF		
วันที่ 10	BF					BF	0.230		BF		
วันที่ 12	BF					BF	ND		BF		
วันที่ 14	BF					BF	ND		BF		

กุ้งกุลาดำอายุ 3 เดือน น้ำหนักตัวเฉลี่ย 14-15.5 กรัมต่อตัว อัตราการกินอาหารปกติ 5% น้ำหนักตัว/วัน

สมมติฐาน

1.ให้อาหารลดลงครึ่งหนึ่งจากอัตราการกินปกติ คือ เหลือ 2.5% น้ำหนักตัว

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

MF อาหารผสม florfenicol และเคลือบทับด้วยน้ำมันปลาหมึก

BF อาหารกุ้งกุลาดำเคลือบทับด้วยน้ำมันปลาหมึก

* วิธีในการวิเคราะห์หา florfenicol-amine อ้างอิงจาก Schering-Plough Research Institute, Lafayette, NJ, USA. (2002).

Limit of Detection (LOD) = 0.01 µg/g และ Limit of Quantitation (LOQ) = 0.05 µg/g

อัตราการคืนกลับของสาร = 75-80%

ND ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้หรือมีปริมาณสารที่ต้องการต่ำกว่าค่า LOD

ตารางที่ 18 ปริมาณ florfenicol-amine (FFA) ที่ละลายจากอาหาร 1 กรัม เมื่อทำการวิเคราะห์น้ำในระบบน้ำนิ่ง*

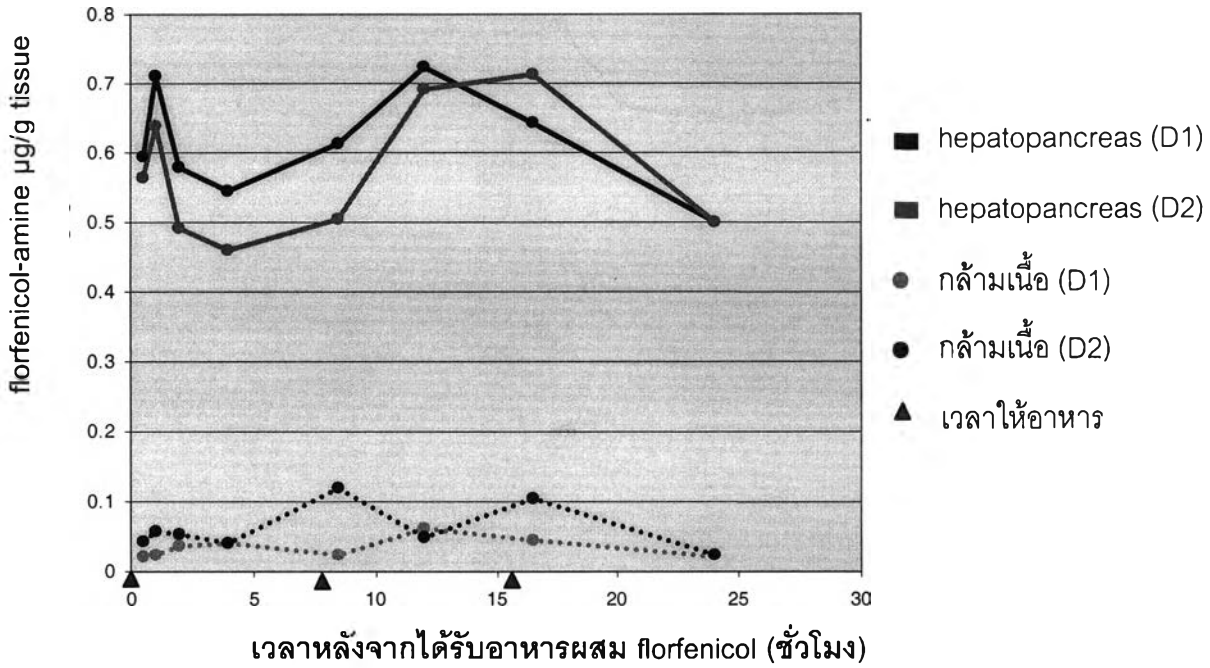
เวลา (นาที)**	ตัวอย่างน้ำ		
	FFA (ppm)	FFA (mg)***	FFA ที่เหลือในอาหาร (%)
0	0	0	0.8 (100)
15	0.989	0.297	0.503 (62.88)
30	1.201	0.360	0440 (55)
60	1.483	0.445	0.355 (44.38)

* อาหารผสม florfenicol ในขนาด 0.8 มิลลิกรัม florfenicol ต่อ1 กรัมอาหาร และเคลือบทับด้วยน้ำมันปลาหมึก โดยระบบน้ำนิ่งที่ใช้ทดสอบมีปริมาตร 300 มิลลิลตร

** ระยะเวลาหลังจากอาหารผสมยาสัมผัสน้ำในระบบน้ำนิ่ง

*** ปริมาณ FFA ทั้งหมดในน้ำปริมาตร 300 มิลลิลิตร

รูปที่ 6 ความเข้มข้นของ florfenicol-amine ใน hepatopancreas และกล้ามเนื้อกุ้งกุลาดำที่เวลาต่างๆภายใน 24 ชั่วโมง หลังจากกุ้งได้รับยา florfenicol โดยการให้ยาผสมในอาหาร



รูปที่ 7 ความเข้มข้นของ florfenicol-amine ใน hepatopancreas และกล้ามเนื้อกุ้งกุลาดำ ในแต่ละวันของการให้ยาผสมอาหารเป็นเวลา 5 วันติดต่อกัน (Day 1 -5) และในแต่ละวันของการหยุดยาเป็นระยะเวลา 9 วัน (W1-W9)