บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อนุกรมวิธานของกุ้งกุลาดำ

กุ้งสกุล *Penaeus* ได้ถูกบันทึกไว้ใน Official List of Generic Names in Zoology หมายเลข 498 โดย John Christ Fabricius เป็นผู้บรรยายลักษณะต่างๆ ไว้ เป็นคนแรกในปี ค.ศ. 1798 โดยกุ้งกุลาดำมีชื่อสามัญว่า Giant black tiger shrimp และมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Penaeus monodon* (Solis, 1988)

อนุกรมวิธานของกุ้งกุลาดำ (The Southeast Asian Fisheries Development Center, 1988)

Kingdom Animalia

Phylum Arthropoda

Subphylum Crustacea

Class Malacostraca

Subclass Eumalacostraca

Suborder Eucarida

Order Decapoda

Suborder Dendrobranchiata

Superfamily Penaeoidea

Family Penaeidae

Genus *Penaeus*

Species *monodon*

การติดเชื้อ vibrios และการก่อโรคของเชื้อ vibrios ในกุ้งกุลาดำ

แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำมีหลายกลุ่ม แต่มี 2 กลุ่มที่มีผลทำให้เกิดความสูญเสียมาก คือ กลุ่ม filamentous bacteria และ vibrio bacteria โดย vibiros ทำให้เกิดโรครุนแรงกว่าและมีอัตราการตายสูง เนื่องจาก filamentous bacteria ก่อโรคโดยเกาะอยู่ที่บริเวณเปลือกนอกของกุ้ง (fouling) ทำให้กุ้งเจริญเติบโตช้าและลอกคราบไม่ได้ ส่วนเชื้อ vibiros นั้นก่อโรคได้ทั้งแบบ external หรือ internal infection (Lavilla-Pigoto, 1995) โดยเชื้อ vibiros สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิปานกลาง

20-30 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิต่ำก็สามารถเจริญได้ (psychrophiles) และต้องการเกลือปริมาณ 5-700 mM ในการเจริญเติบโตแตกต่างกันแล้วแต่ชนิด จึงเรียกแบคทีเรียในกลุ่มนี้ว่า halophilic (สุมณฑา, 2545) เชื้อ vibiros เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile salts Sucrose (TCBS) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการจำแนกเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม vibiros ออกจากแบคทีเรียกลุ่มอื่น คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ vibiros แสดงดังตารางที่ 2

เชื้อ vibiros เป็นแบคทีเรียชนิดที่พบได้ในกุ้งกุลาดำและเป็นเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) สภาวะเครียดของกุ้งทำให้อัตราการตายของกุ้งป่วยมีความผันแปรต่างกันไปตั้งแต่เล็กน้อยจนถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (Jiravanichpaisal *et al.*, 1994) และเชื้อ vibiros ที่พบว่าทำให้เกิด septicemia ในสัตว์จำพวก crustacean ได้แก่ *V. parahaemolyticus* *V. alginolyticus* และ *V. anguillarum* (Eduardo *et al.*, 1998)

เชื้อ vibiros ที่พบว่าทำให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำที่เพาะเลี้ยงในเอเชีย ได้แก่ *V. alginolyticus* *V. anguillarum* *V. cholera (non-01)* *V. damsela* *V. fluvialis* *V. harveyi* *V. neresis* *V. parahaemolyticus* *V. splendicus* *V. tubiashii* *V. vulnificus* *Vibrio* spp. (Lavilla-Pigoto, 1995) และเชื้อ vibiros จากกุ้งกุลาดำป่วยในเขตการเลี้ยงแถบต่างๆของประเทศไทย ได้แก่ *V. alginolyticus* *V. anguillarum* *V. cholera* *V. damsela* *V. fluvialis* *V. harveyi* *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* (ณิธาวันและคณะ, 2546; Jiravanichpaisal *et al.* , 1995; Luangtongkum and Poonsuk, 1983) สามารถพบกุ้งที่มีการติดเชื้อทั้งแบบชนิดเดียวหรือแบบรวมจากเชื้อ vibiros สองชนิดขึ้นไป อาการของกุ้งป่วยที่พบ ได้แก่ ไม่มีแรงว่ายน้ำ กุ้งอาจเกาะอยู่ที่บริเวณผิวน้ำ หรือจมลงก้นบ่อ ไม่มีการดีดตัวหนีเมื่อมีสิ่งรบกวน กุ้งส่วนใหญ่มี zoothamnium สาหร่าย หรือเพรียงเกาะบริเวณเหงือกและเปลือก ทางเดินอาหารว่างเปล่า hepatopancreas มีขนาดเล็กลง ความรุนแรงของโรคในกุ้งโตพบอาการน้อยกว่าในกุ้งวัยอ่อน

เชื้อ vibiros หลายชนิดสามารถทำให้เกิดโรคในมนุษย์ เชื้อ vibrios ที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อจากอาหาร (food borne disease) ได้แก่ *V. parahaemolyticus*, *V. cholera*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus* และ *V. fluvialis* ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้อาศัยอยู่ในน้ำทะเลบริเวณชายฝั่งทะเลปิดและปนเปื้อนมากับอาหารทะเล (Elliot *et al.*, 1992)

การใช้ยาต้านจุลชีพในการรักษาการติดเชื้อ vibrios

การรักษาโรค vibirosis ในกุ้งกุลาดำให้ได้ผลดีควรเริ่มรักษาเมื่อติดเชื้อในระยะแรก อย่างไรก็ตามแนวทางดังกล่าวทำได้ยากในทางปฏิบัติเนื่องจากเชื้อ vibrios ชนิดก่อโรคสามารถเข้าสู่ระบบเลือดโดยที่กุ้งไม่แสดงอาการป่วยให้เห็น ทำให้เกษตรกรมีการใช้ยาปฏิชีวนะและ/หรือสารเคมีหลายๆ ชนิด

เพื่อการป้องกันและรักษาโรคในกุ้งโดยขาดการควบคุมและความเข้าใจในการใช้ยาอย่างถูกต้อง ดังการศึกษาของ Katrin และคณะ (2003) ซึ่งรายงานว่า 74% ของฟาร์มเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยมีการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีในขั้นตอนการเลี้ยง และมีการใช้ยาปฏิชีวนะแตกต่างกันหลายชนิด เช่น ยากลุ่ม chloramphenicol tetracycline quinolones sulphonamide และกลุ่มอื่นๆ

จากการศึกษาของณิธาวันและคณะ (2546) ซึ่งทำการทดสอบประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะ 10 ชนิด ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ vibrios ก่อโรคของกุ้งกุลาดำจำนวน 197 isolates โดยวิธี Antimicrobial Agar Dilution Susceptibility Tests ยาปฏิชีวนะที่นำมาทดสอบ คือ amoxicillin, chloramphenicol, ciprofloxacin, enrofloxacin, erythromycin, kanamycin, nalidixic acid, norfloxacin, tetracycline, และ trimethoprim/sulfamethoxazole พบว่า chloramphenicol, ciprofloxacin, enrofloxacin, kanamycin, norfloxacin, trimethoprim/sulfamethoxazole และ tetracycline มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibition Concentrations, MICs) เมื่อทดสอบกับเชื้อ vibrios ส่วนใหญ่ต่ำกว่าเกณฑ์อ้างอิงของ NCCLS ที่เทียบกับ *V. cholera* (break point) ต่างจาก nalidixic acid และ amoxicillin ซึ่งมีค่า MICs ต่อเชื้อ vibrios ส่วนใหญ่สูงกว่า break point ส่วน erythromycin มีค่า MICs ต่อเชื้อ vibrios ส่วนใหญ่อยู่ในช่วงของ break point โดยยาปฏิชีวนะที่มีค่า MICs ต่ำกว่า break point แสดงว่ายาชนิดนั้นมีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งเชื้อ vibrios ดังเช่น chloramphenicol ซึ่งมีค่า MIC_{90} เท่ากับ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และต่ำกว่า break point ที่อยู่ในช่วง 8-32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

แม้ว่า chloramphenicol จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ vibrios ก่อโรคได้ดี และมีการใช้ในประเทศไทยมานาน แต่ยาชนิดนี้ถูกประกาศห้ามใช้ในสัตว์ทุกชนิดที่เลี้ยงเพื่อเป็นอาหารของมนุษย์ (Food animal production) ซึ่งรวมถึงการห้ามใช้ chloramphenicol ในกุ้งกุลาดำด้วย เนื่องจากการตกค้างของ chloramphenicol ในเนื้อสัตว์หรือผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่ได้รับยาอาจก่อให้เกิดปัญหาต่อสุขภาพของมนุษย์ เช่น ปัญหาการดื้อยาของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในมนุษย์ (antimicrobial resistance) หรือการโน้มนำให้เกิด aplastic anemia โดยไม่ขึ้นกับปริมาณ chloramphenicol ที่ได้รับ (non-dose related) (Wongtawatchai *et al.*, in press; Spoo and Riviere, 1995) นอกจากนี้ สถาบันวิจัยมะเร็งนานาชาติ (International Agency of Research on Cancer; IARC) จัด chloramphenicol เป็นสารก่อมะเร็งสำหรับมนุษย์กลุ่มที่ 2A (Group 2A: the agent is probably carcinogenic to humans) (IARC, 1987) และสำหรับในประเทศไทยได้มีประกาศกระทรวงสาธารณสุขที่ 678/2531 เรื่อง เพิกถอนทะเบียนตำรับยา chloramphenicol สำหรับสัตว์ที่นำมาใช้บริโภค (กระทรวงสาธารณสุข, 2531) จึงควรมีการศึกษาถึงการนำยาต้านจุลชีพชนิดอื่นที่มีประสิทธิภาพมาใช้แทน chloramphenicol เพื่อการรักษาการติดเชื้อ vibiros ในกุ้งกุลาดำ ซึ่งปัจจุบันมีการศึกษาถึงยาชนิดอื่นในกลุ่ม chloramphenicol ที่มีประสิทธิภาพในระดับเดียวกับ chloramphenicol

แต่มีความเป็นพิษที่ไม่พึงประสงค์น้อยกว่า ได้แก่ ไธแอมเฟนิคอล (thiamphenicol) และฟลอเฟนิคอล (florfenicol)

ไธแอมเฟนิคอล (Thiamphenicol)

Thiamphenicol หรือ 2,2-dichloro-N[(1R,2R)-2-hydroxy-1-hydroxymethyl-2-(4-methyl sulphonylphenyl)-acetamide มีลักษณะภายนอกเป็นผลึกสีขาวปนเหลือง ละลายได้ดีในสารละลายเอธิลแอลกอฮอล์ (Francis, 1999) เมื่อดูลักษณะโครงสร้างพบว่า thiamphenicol เป็นยาปฏิชีวนะที่มีความคล้ายคลึงกับ chloramphenicol มากแตกต่างตรงตำแหน่งหมู่พาราไนโตรฟีนิลของ chloramphenicol ถูกแทนที่ด้วยหมู่ซัลโฟเมธิล ($R\text{-}SO_2\text{-}CH_3$) ทำให้ยาทั้ง 2 ชนิดนี้มีกลไกการเมตาบอไลท์ยาแตกต่างกัน โดย thiamphenicol จะไม่สามารถจับกับ glucuronyl transferase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ผลิตจากตับได้ ทำให้มากกว่า 95% ของ thiamphenicol ถูกขับออกทางปัสสาวะในรูปที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง และเนื่องจากโครงสร้างของยามีความคล้ายกับ chloramphenicol จึงพบว่า thiamphenicol สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะกดไขกระดูกได้หากมีการใช้ยาเป็นระยะเวลานาน แต่สามารถกลับเป็นปกติเมื่อหยุดการให้ยา (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products; EMEA, 1994) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียพบว่า thiamphenicol ให้ผลด้อยกว่า chloramphenicol โดยดูจากค่า MICs ในการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Fusobacterium* spp. และ *Haemophilus influenza* ทางห้องปฏิบัติการ (ตารางที่ 3) (Syriopoulou *et al.*, 1981; Pirizduran *et al.*, 1991) ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาตัวใหม่ต่อไป ซึ่งก็คือ ฟลอเฟนิคอล (florfenicol)

ตารางที่ 2 การจำแนกชนิดของเชื้อ vibrios ตามคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมี*

	V. alginolyticus	*V. cholerae*	*V. damsela*	*V. fluvialis*	*V. harveyi*	*V. parahaemolyticus*	*V. vulnificus*
Colony on TCBS	Yellow	Yellow	Green	Yellow	Green / Yellow [2]	Green	Green / Yellow●
Growth at 42°C	+	+	-	v	v	+	+
Gram stain	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Cell morphology	Short rod	Short rod	Short rod	Short rod	Short rod	Short rod	Short rod
Catalase	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+
Motility	+	+	+	+	+	+	+
Decarboxylation of							
- arginine	-	-	+	+	-	-	-
- lysine	+	+	d[1] / v[2]	-	+	+	+
- omithine	d[1] / +[2]	d[1] / +[2]	-	-	+	d[1] / +[2]	v[1] / +[2]
Citrate utilization	d	d	-	-	nd	d	d
H_2S production	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	+	+[1] / v[2]	+	-	-	-	-
Growth in NaCl							
- 0%	-	+	-	-	-	-	-
- 3%	+	+	+	+	+	+	+
- 6%	+	d[1] / -[2]	d[1] / v[2]	d[1] / +[2]	+	d[1] / +[2]	+
- 8%	+	-	-	v	v	+	-
- 10%	+	-	-	-	v	-	-
Acid production from							
- salicin	d	-	-	d	nd	-	+
- lactose	-	-	-	-	V	-	+
- arabinose	-	-	-[1] / +[2]	+	-	d[1] / +[2]	-
- sucrose	d[1] / +[2]	+	-	+	v	-	-
- sorbitol	-	-	-	-	nd	-	-
- mannitol	+	+	-[1]/ +[2]	+	+	+	d[1] / v[2]
- mannose	+	+	+	+	+	+	+
- D-Cellobiose	-	-	+	+	nd	v	+
Synthesis indole	+	+	-	d	nd	+	+
Synthesis urease	-	-	+	-	v	-[1] / v[2]	-
Synthesis gelatinase	+	+	-	+	+	+	+
ONPG	-	+	-	+	V	-	+
Susceptible to							
- 10 µg/kg O/ 129	R	S	S	R	R	R	S
- 150 µg/kg O/ 129	S	S	S	S	S	S	S

* รวบรวมโดยเจนนุช (2546)

+ = 85-100% ที่ให้ผลบวก

d = 16-80% ที่ให้ผลบวก

- = 0-15% ที่ให้ผลบวก

v = ผลแปรผัน

● = โคโลนีของเชื้อส่วนใหญ่มีสีเขียว

1 = อ้างจาก Forbes et al. (1998) และ Barrow and Feltham (1993) และ Wachsmuth et al. (1980)

2 = อ้างจาก Elliot et al. (1992)

S = มีความไวรับ

R = มีความต้านทาน

nd = no data

O/129 = Vibrio static agent : 2,4-diamino-6,7-di-isopropyl pterdine

ONPG = O-nitro-beta-D-galactopyranoside hydrolysis by beta-galactisidase

ตารางที่ 3 ค่า MICs ของ chloramphenicol และ thiamphenicol ต่อเชื้อ *Fusobacterium* spp. และ *Haemophilus influenza* ทางห้องปฏิบัติการ

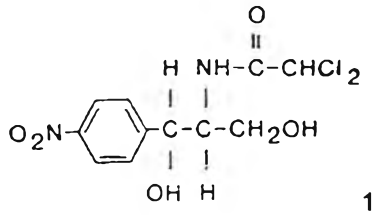
	MICs Range (μg/ml)	
	Fusobacterium spp.	*Haemophilus influenza*
Chloramphenicol	4-64	5-50
Thiamphenicol	8-128	5- >100

ฟลอเฟนิคอล (Florfenicol)

Florfenicol หรือ [R-(R*,S*)]-2,2-dichloro-N-[1-(fluoromethyl)-2-hydroxy-2-[4-(methyl sulfonyl) phenyl]ethyl]-acetamide เป็นยาต้านจุลชีพที่สังเคราะห์ขึ้นโดยวิธีทางเคมี มีสูตรโมเลกุล คือ $C_{12}H_{14}Cl_2FNO_4S$ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 358.21 ลักษณะภายนอกเป็นผลึกสีขาวปนเหลือง มีจุดหลอมเหลวที่ 153 C ความเป็นกรดด่าง 4.5-6.5 ละลายได้ดีในน้ำที่มีความเป็นกรดด่างประมาณ 7-8 หรือในสารละลายเมธิลแอลกอฮอล์ (The United States Pharmacopeial Convention, 2000)

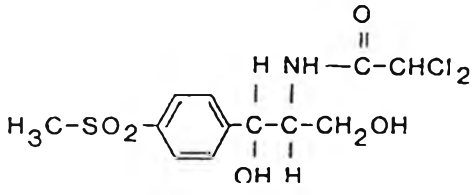
การสังเคราะห์ florfenicol เกิดขึ้นครั้งแรกในประเทศญี่ปุ่น มีจุดประสงค์เพื่อการยับยั้งการติดเชื้อแบคทีเรีย *Pasturella* spp. และ *Streptococcus* spp. ในกลุ่มปลา yellow tail ปลา mackerel และปลาแซลมอน (Fukui *et al.*, 1987) และเนื่องจากยาชนิดนี้เป็นอนุพันธ์ของ thiamphenicol ซึ่งมีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างเพื่อให้เป็นยาต้านจุลชีพที่เหมาะสมสำหรับสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภค (Adam, 1995; Plumb, 2002) โดยการแทนที่หมู่ไฮดรอกซิล (OH-group) ตรงตำแหน่ง C-3 ของโครงสร้าง thiamphenicol ด้วยฟลูออไรด์ ทำให้ florfenicol มีโครงสร้างคล้ายกับ chloramphenicol แตกต่างตรงตำแหน่งวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) คือ florfenicol มีหมู่ซัลโฟเมธิล (SO_3CH_3-group) แทนที่หมู่พาราไนโตรฟีนิล (p-nitro-group) ของ chloramphenicol (รูปที่ 1)

จากรายงานของ Yunis (1988) ที่ศึกษาถึงผลของ chloramphenicol และ thiamphenicol ต่อการสร้างเม็ดเลือดและไขกระดูกและอธิบายว่าเนื่องมาจากความแตกต่างของโครงสร้างตรงหมู่ซัลโฟเมธิลของ thiamphenicol ที่เข้ามาแทนที่หมู่พาราไนโตรฟีนิลของ chloramphenicol ทำให้ thiamphenicol ไม่มีผลต่อการสร้างเม็ดเลือด แต่ทั้ง chloramphenicol และ thiamphenicol ยังเป็นยาที่มีผลกดการทำงานของไขกระดูกชนิดที่สามารถคืนกลับเป็นปกติได้เมื่อหยุดการให้ยา ดังนั้นในทางทฤษฎี florfenicol จึงน่าจะมีฤทธิ์ต่อการทำงานไขกระดูกในแบบเดียวกับ thiamphenicol แต่ยังไม่มีรายงานการศึกษาเพิ่มเติม (Krishna *et al.*, 1981; Sams, 1994)



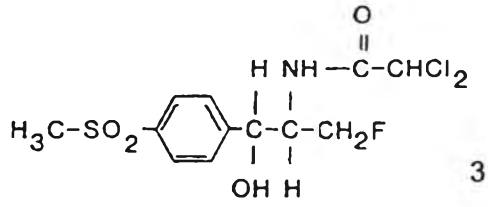
1

Chloramphenicol



2

Thiamphenicol



3

Florfenicol

รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของ chloramphenicol, thiamphenicol และ florfenicol

<u>กลไกการออกฤทธิ์</u>

Florfenicol เป็นยาต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์ครอบคลุมแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ มีกลไกการออกฤทธิ์คล้ายกับ chloramphenicol คือ ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย โดยการยับยั้งการสร้างโปรตีนด้วยการเข้าจับกับไรโบโซมของเซลล์แบคทีเรีย เกิดการยับยั้งการทำงานของสาร peptidyl transferase ทำให้การสร้างสายเปปไทด์ใหม่ในกระบวนการสร้างโปรตีนถูกขัดขวาง เนื่องจากไม่สามารถเปลี่ยนกรดอะมิโนที่มีอยู่ให้กลายเป็นสายเปปไทด์ได้ ส่งผลให้การสร้างโปรตีนของแบคทีเรียหยุดลงทันที และพบว่ายาชนิดนี้มีคุณสมบัติในการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดีและมีการรวมตัวกับโปรตีนในเลือดค่อนข้างต่ำประมาณ 18-23 เปอร์เซนต์ (Bretzlaff *et al.*, 1987) ดังนั้น florfenicol จึงสามารถกระจายตัวไปตามอวัยวะทั่วร่างกายได้เป็นอย่างดี สามารถตรวจพบ florfenicol ในเนื้อเยื่อเกือบทุกชนิด รวมทั้งในน้ำหล่อเลี้ยงส่วนต่างๆ ของร่างกาย เช่น น้ำหล่อเลี้ยงไขสันหนัง และ น้ำหล่อเลี้ยงลูกตา (Adams *et al.*, 1987; Craene *et al.*, 1997) จึงสามารถใช้ยานี้รักษาการติดเชื้อที่เยื่อหุ้มสมองได้

<u>การศึกษาประสิทธิภาพของ florfenicol</u>

เมื่อศึกษาถึงการออกฤทธิ์พบว่า florfenicol สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้เท่ากันหรือดีกว่า chloramphenicol และ thiamphenicol ในห้องปฏิบัติการ เปรียบเทียบจากผลการศึกษาที่แสดงระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimum Inhibition Concentrations, MICs) พบว่า florfenicol เมื่อทำการทดสอบกับเชื้อ *E.coli* และ

Salmonella spp. ให้ผลแสดงถึงประสิทธิภาพที่ดีกว่า chloramphenicol และ thiamphenicol หลายเท่า และเมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของยากับเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปลาป่วยในศูนย์ประมงของประเทศญี่ปุ่น พบว่า florfenicol มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับ chloramphenicol และมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในการทดลองนี้ดีกว่า thiamphenicol (Fukui *et al.*, 1987; Neu and Fu, 1980; Syriopoulou *et al.*, 1981; Pirizduran *et al.*, 1991)

ตารางที่ 4 ค่า Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) ของ florfenicol thiamphenicol และ chloramphenicol ต่อเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ	MICs (µg/ml)		
	florfenicol	thiamphenicol	chloramphenicol
E.coli [1]	4	>100	>50
Salmonella spp. [1]	5	>100	>100
Pseudomonas aeruginosa [2]	0.4	1.6	0.4
Vibrio anguillarum [2]	0.8	3.1	0.8
Edwardsiella tarda [2]	0.8	6.3	0.8

[1] อ้างจาก Syriopoulou *et al.* (1981) [2] อ้างจาก Fukui *et al.* (1987)

<u>การศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์</u>

Florfenicol มีการดูดซึมได้ดีหลังจากให้ยาโดยการกินในลูกวัว โดยทำการศึกษาในลูกวัวอายุ 1-8 สัปดาห์ พบว่าเมื่อให้ยาโดยวิธีกิน ยาชนิดนี้มีการดูดซึมได้ดีเกือบ 100 เปอร์เซนต์ เหมือนกับในสัตว์ชนิดอื่น แต่ถ้าได้รับยาพร้อมกับการให้นมทดแทนจะมีการดูดซึมยาเข้าร่างกายได้ลดลงเหลือเพียง 44-86 เปอร์เซนต์ (Varma *et al.*, 1986) ในสัตว์เคี้ยวเอื้องที่โตเต็มที่ florfenicol อาจจะถูกทำลายในกระเพาะส่วนรูเมน บางครั้งพบว่ายาอาจจะไม่ถูกดูดซึมเลย เนื่องจากยาที่ได้เกิดการสลายตัวโดยจุลชีพที่อยู่ในกระเพาะส่วนต้นก่อนจะมีการดูดซึม ซึ่งจากรายงานของ Samuriwo และคณะ (1990) กล่าวว่าชนิดของอาหารที่สัตว์เคี้ยวเอื้องได้รับมีผลอย่างมากต่อการสลายตัวของยาในกระเพาะรูเมน เนื่องจากชนิดของจุลินทรีย์ในกระเพาะอาหารจะต่างกันในสัตว์เคี้ยวเอื้องที่ได้รับอาหารไม่เหมือนกันและสัตว์ที่ได้รับอาหารข้นจะมีผลทำให้จุลินทรีย์ในกระเพาะส่วนรูเมนทำงานได้ดีกว่าสัตว์ที่ได้รับอาหารอัดเม็ด เมื่อตรวจหาปริมาณ florfenicol ในร่างกายหลังจากให้ยาโดยการกิน ขนาด 11 มิลลิกรัมยาต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ทุก 12 ชั่วโมง นานติดต่อกัน 7 ครั้ง พบความเข้มข้นของยาที่ระดับสูงในปัสสาวะ ไต และน้ำดี ส่วนสมองและน้ำไขสันหลังพบ florfenicol ในระดับต่ำ และในอวัยวะอื่นๆมีระดับความเข้มข้นของยา

ใกล้เคียงกับที่พบในพลาสม่า (Adams *et al*., 1987) และสามารถตรวจพบ florfenicol ในน้ำนมของโคนมหลังจากฉีดยาเข้าเส้นเลือดดำภายใน 3 ชั่วโมงหลังการให้ยา และภายใน 5 ชั่วโมงหลังจากฉีดยาเข้ากล้ามเนื้อ (Soback *et al*., 1995)

Martinsen และคณะ (1993) ทำการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของ florfenicol ในปลาแซลมอนโดยให้กินยาที่ผสมในอาหารขนาด 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว และฉีดยาเข้าหลอดเลือดในขนาดเดียวกัน พบว่า florfenicol มีการดูดซึมค่อนข้างช้าเมื่อเทียบกับสัตว์ชนิดอื่น โดยจะพบปริมาณยาสูงสุดในเลือดที่เวลา 10.3 ชั่วโมงหลังให้กินยา มีค่า bioavailability เท่ากับ 96.5 เปอร์เซนต์ และมีระดับความเข้มข้นยาในพลาสม่าสูงกว่าค่า MICs ที่ทำการทดสอบกับเชื้อ *Aeromonas salmonicida* และ *Vibrio anguillarum* นานถึง 36-40 ชั่วโมง Nordmo และคณะ (1998) ได้รายงานถึงประสิทธิภาพการใช้ florfenicol ในการรักษาโรค furunculosis ในปลาแซลมอน ซึ่งเป็นโรคสำคัญที่ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจในกลุ่มปลาแซลมอน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปลา brown trout และปลา rainbow trout ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas salmonicida* และศึกษาเพิ่มเติมโดยทำการฉีดเชื้อ *V. salmonicida* ความเข้มข้น 10^6 CFU ต่อตัวปลา พบว่าเมื่อให้ยาโดยการผสมอาหารให้กินในขนาด 2 มิลลิกรัม florfenicol ต่อกิโลกรัมอาหาร สามารถลดอัตราการตายได้ถึง 88 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับยา

Liu และคณะ (2003) ศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของ florfenicol ในสุกร โดยป้อนยาทางปากในขนาด 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวเพียงครั้งเดียว พบว่ายามีการดูดซึมและกระจายตัวอย่างรวดเร็ว โดยตรวจพบระดับยาสูงสุดในเลือดที่เวลา 3 ชั่วโมง และพบว่ามีค่าความสามารถในการนำยาไปใช้ (bioavailability) สูงถึง 113%

Shen และคณะ (2003) ทำการศึกษา florfenicol ในไก่เนื้อโดยให้กินยา 2 ขนาด คือ 15 และ 30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว พบว่ายามีการดูดซึมได้ดีเหมือนในสัตว์ชนิดอื่น ตรวจพบระดับ florfenicol สูงสุดในเลือดที่เวลา 60 และ 120 นาที หลังได้รับยาตามลำดับ และพบช่วงความเข้มข้นของยาที่มีผลในการรักษา คือ มากกว่า 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเลือดนานมากกว่า 11.3 ชั่วโมง

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบการใช้ florfenicol ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียในสัตว์ชนิดต่างๆ

ชนิดสัตว์ทดลอง	เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ	วิธีการให้ยา	อ้างอิง
โค, กระบือ	*Pasteurella multocida* *Haemophilus somnus* *Fusobacterium necrophorum*	ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ 20 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ทุก 48 ชั่วโมง	The United States Pharmacopeial Convention, 2000
ไก่เนื้อ	*Escherichia coli*	ผสมน้ำดื่ม 30 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน ; ติดต่อกัน 3 วัน	EMEA, 1999a
สุกร	*Actinobacillus pleuropneumoniae* *Pasteurella multocida*	ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ 15 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม	EMEA, 1999b
ปลา			
- Yellowtail	*Pasteurells piscicida*	อาหารผสมยา 20 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน ; ติดต่อกัน 4 วัน	Fukui *et al.*, 1987
- Salmon	*Aeromonas salmonicida*	อาหารผสมยา 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน ; ติดต่อกัน 7-10 วัน	The United States Pharmacopeial Convention, 2000
		อาหารผสมยา 2 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ให้อาหาร 0.5% ของน้ำหนักตัว ; ติดต่อกัน 10 วัน	Nordmo *et.al.*, 1998
- Cod	*Vibrio anguillarum*	อาหารผสมยา 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน ; ติดต่อกัน 10 วัน	Samuelsen and Bergh, 2003

เมตาบอลิซึม

Florfenicol ถูกเมตาบอไลท์ที่ตับและขับออกทางปัสสาวะในสัตว์บกทั่วไป เช่น โค สุกร จึงสามารถพบปริมาณยาสูงสุดที่ตับและไต โดยสารเมตาบอไลท์ที่มีการขับออกทางปัสสาวะคือ florfenicol-amine และ florfenicol alcohol ส่วน florfenicol oxamic acid และ monochloroflorfenicol ถูกขับออกทางอุจจาระ (The United States Pharmacopeial Convention, 2000) และเนื่องจาก florfenicol-amine เป็นสารเมตาบอไลท์หลักของ florfenicol ที่มีความคงตัวสูง สามารถอยู่ได้นานในตับและเนื้อเยื่อต่างๆ ประกอบกับวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณ florfenicol ต้องผ่านการทำ acid hydrolysis ซึ่งขบวนการนี้จะเปลี่ยน florfenicol ในรูปแบบต่างๆ ให้เป็น florfenicol-amine (Wrzesinski *et al.*, 2003) (รูปที่ 2) จึงกำหนดให้ใช้ florfenicol-amine เป็นตัวบ่งชี้การตกค้างในเนื้อเยื่อเพื่อใช้ในการคำนวณระยะเวลาหยุดยา

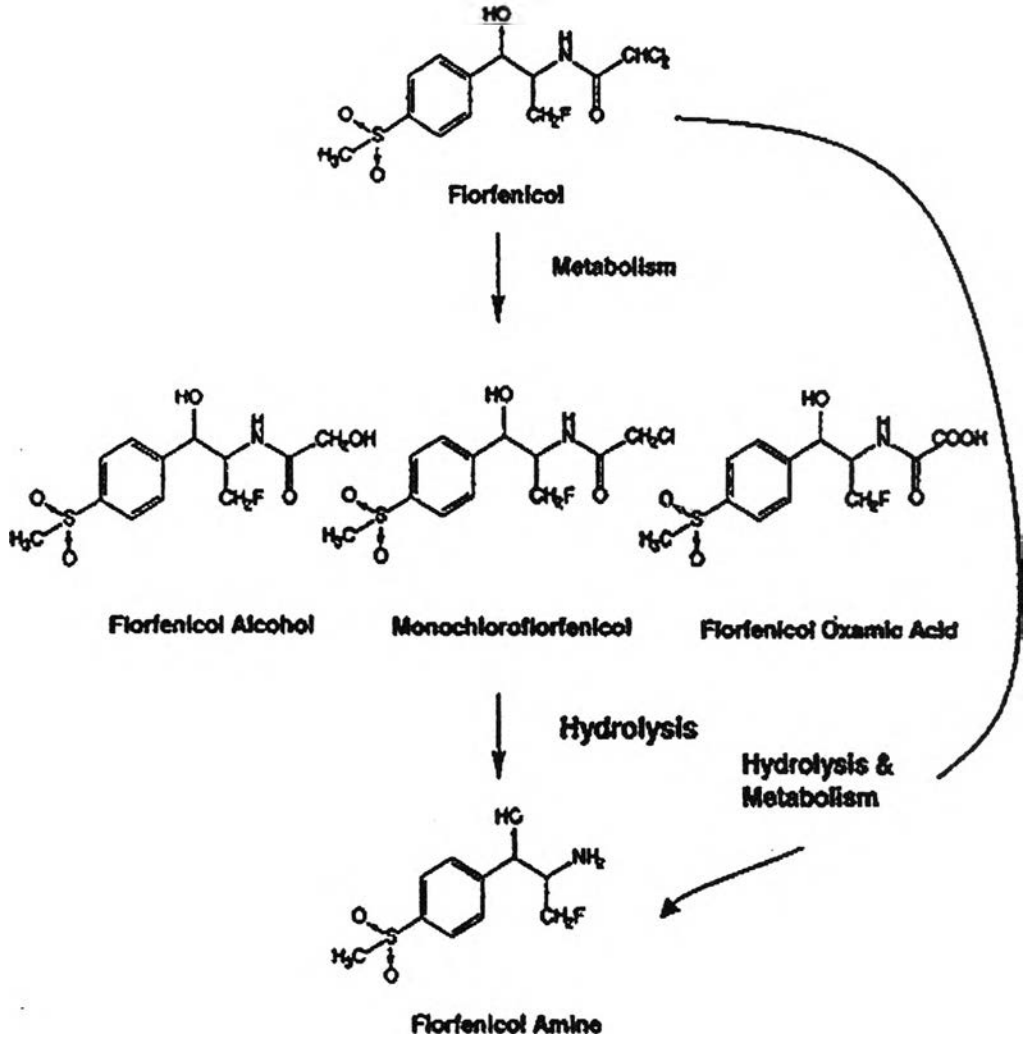
การศึกษาความเป็นพิษของยา

1. การศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products; EMEA, 1997)

การศึกษาทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของ florfenicol ในหนูถีบจักรและหนูขาว โดยให้ยาเพียงครั้งเดียว พบว่าหนูถีบจักรที่กินยาในขนาด 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ไม่พบการตายทั้งในหนูเพศผู้และเพศเมีย เมื่อให้ยาโดยการฉีดเข้าช่องท้องในขนาด 3,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว พบว่าหนูถีบจักรกลุ่มนี้มีการเคลื่อนไหวลดลง และน้ำหนักตัวลดลงหลังจากวันที่สองของการให้ยาไปแล้ว ส่วนในหนูขาวเมื่อให้ยาโดยการกินไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่สังเกตเห็น แต่มีการตายเมื่อให้ยาเข้าช่องท้องในขนาด 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว หรือในขนาดที่สูงขึ้นโดยพบว่าขนาดของ florfenicol ที่ฉีดเข้าช่องท้องแล้วทำให้หนูขาวตายครึ่งหนึ่ง (lethal dose 50; LD_{50}) ในหนูเพศผู้เท่ากับ 2,047 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ส่วนในหนูเพศเมียมีค่าเท่ากับ 1,865 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว อาการอื่นๆ ที่พบ คือ การตอบสนองลดลง มีการเคลื่อนไหวที่ช้าลง หนังตาตก ขนลุกตั้งชัน อุณหภูมิร่างกายลด และมีการหายใจที่ลึกขึ้น ติดตามดูอาการนาน 7 วันหลังจากการให้ยา เมื่อผ่าซากสัตว์ที่ตาย พบการบวมน้ำและการเปลี่ยนสีของไต โดยมีผลึกสีขาวลักษณะคล้ายหินปูนสะสมอยู่ที่บริเวณกรวยไตและกระเพาะปัสสาวะ

2. การศึกษาความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลัน (EMEA, 1997)

ทำการศึกษาในหนูขาว โดยให้ florfenicol ทางปากนานติดต่อกันทุกวันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าเมื่อให้ยาขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน ในหนูเพศผู้และเพศเมียแสดงการกินอาหารและมีการเจริญเติบโตลดลง มีการหลั่งน้ำลายออกมามากขึ้น ช่องท้องขยายตัว อุจจาระเหลว ซึ่งพบได้ในช่วงสัปดาห์ที่สองหลังการให้ยา มีการเปลี่ยนแปลงของระบบเลือด คือ มีการลดลงในระดับปานกลางของเม็ดเลือด ทั้งเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว และในหนูขาวเพศผู้พบว่าน้ำหนักของต่อมลูกหมากลดลง



รูปที่ 2 เมตาบอลิซึมของ florfenicol (Wrzesinski *et al*., 2003)

3. การศึกษาความเป็นพิษแบบเรื้อรัง (EMEA, 1997)

ทำการศึกษาในหนูขาว โดยให้ florfenicol เข้าทางปากติดต่อกันทุกวันนาน 13 สัปดาห์ พบว่าน้ำหนักตัวของหนูลดลงทั้งในหนูเพศผู้และเพศเมียเมื่อได้รับยาในขนาด 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน ค่าเม็ดเลือดแดงลดลง มีการฝ่อตัวของต่อมไธมัสและต่อมลูกหมาก เมื่อทำการตรวจทางจุลพยาธิพบการหดตัวและการฝ่อตัวของเยื่อบุท่อภายในต่อมลูกหมาก

ซึ่งจากการศึกษาข้างต้น สรุปได้ว่าระดับสูงสุดของ florfenicol ที่ให้ทางปากนานติดต่อกันมากกว่า 13 สัปดาห์ โดยไม่ทำให้เกิดความผิดปกติที่สังเกตได้ (No Observed Adverse Effect Level, NOAEL) มีระดับที่ 30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน

4. การระคายเคืองเฉพาะที่ (EMEA, 1997)

การศึกษาถึงคุณสมบัติที่ก่อความระคายเคืองต่อผิวหนังและเยื่อเมือกต่างๆ ในกระต่าย โดยหยดสารละลาย florfenicol ขนาด 100 มิลลิกรัม ใส่ลงในเยื่อตาขาว พบว่าที่เยื่อตาขาวมีการอักเสบและระคายเคืองเกิดขึ้นภายใน 1 ชั่วโมง ซึ่งเป็นลักษณะแบบชั่วคราวและไม่รุนแรง และทำการทดสอบที่ผิวหนัง โดยหยดสารละลาย florfenicol ขนาด 500 มิลลิกรัม พบลักษณะการระคายเคืองเป็นผื่นแดง มีการบวมของผิวหนังที่สังเกตเห็นได้ชัดเจน

5. ความเป็นสารก่อกลายพันธุ์ (Schering-Plough, 2002a)

การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของ florfenicol ด้วยวิธี Ames test เป็นการทดสอบการกลายพันธุ์แบบย้อนกลับ (backward or reverse mutation) ในแบคทีเรียโดยใช้เชื้อ *Salmonella typhimurium* ที่ถูกทำให้กลายพันธุ์ไปจนไม่สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโน histidine ได้ ทำให้ไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดกรดอะมิโนชนิดนี้ได้ ซึ่งหาก florfenicol มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์จะทำให้แบคทีเรียชนิดนี้เกิดการกลายพันธุ์ย้อนกลับสามารถสร้าง histidine ได้เอง ผลการทดสอบไม่พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียเจริญขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม florfenicol ในความเข้มข้นตั้งแต่ 1-50 ไมโครกรัมยา แสดงว่าไม่มีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นในการทดสอบนี้

6. การก่อให้เกิดความผิดปกติของตัวอ่อน (The Freedom of Information Act; FOIA, 1996)

ทำการศึกษาผลของ florfenicol ต่อระบบสืบพันธุ์ โดยให้ยาทางปากแก่หนูขาวที่ตั้งท้องประมาณ 6-17 วัน ซึ่งเป็นระยะที่สร้างอวัยวะต่างๆ พบว่า florfenicol ไม่มีผลต่อการฝังตัวของตัวอ่อน แต่มีผลต่อตัวแม่และลูกหนู ทำให้หนูมีน้ำหนักตัวลดลง เมื่อได้รับยาในขนาด 12-40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว และเกิดการพัฒนาของตัวอ่อนช้ากว่าปกติ โดยขนาดของยามากที่สุดที่ได้รับแล้วแม่หนูไม่แสดงอาการผิดปกติให้เห็น และไม่ทำให้เกิดลูกวิรูปอยู่ที่ขนาด 4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว

7. การทดสอบความปลอดภัย (Schering-Plough, 2001)

การศึกษาความปลอดภัยของ florfenicol ในปลา yellowtail โดยการให้ florfenicol ผสมในอาหารกินต่อเนื่อง 10 วัน ในขนาด 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว 30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว และ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว พบว่าขนาดยาที่ได้รับ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีผลลดการเคลื่อนไหวและความอยากอาหารในปลาที่ใช้ทดลอง ซึ่งยากลุ่มนี้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับของเม็ดเลือดในร่างกายให้ลดลง ส่วนปลาในอีกสองกลุ่มการทดลองที่เหลือไม่พบความผิดปกติใดๆ แสดงให้เห็นว่า florfenicol นี้มีระดับความปลอดภัยค่อนข้างสูงเมื่อใช้ในปลาชนิดนี้

ปัจจุบันมีการยอมรับให้ใช้ florfenicol และมีการขึ้นทะเบียนยาสัตว์ในประเทศนอร์เวย์ แคนาดา อังกฤษ ญี่ปุ่น และสหรัฐอเมริกา โดยมีการยอมรับให้ใช้ในรูปแบบของยาฉีดสำหรับรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียที่ระบบต่างๆ ของร่างกายในวัว เช่น โรคทางระบบทางเดินหายใจที่เกิดเนื่องจากเชื้อ *Pasteurella haemolytica* และ *P. multocida* อาการกีบอักเสบในวัวเนื่องจากเชื้อ *Fusobacterium* spp. และ *Bacteroides* spp. ส่วนในปลาแซลมอนมีการใช้ยาชนิดนี้โดยการผสมอาหารเพื่อรักษาการเกิดฝีตามตัว (Furunculosis) เนื่องจากการติดเชื้อ *Aeromonas salmonicida* และใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์หลายชนิดที่เลี้ยงเพื่อการบริโภค เช่น สุกร โค ไก่ ปลา และมีการกำหนดปริมาณสารตกค้างสูงสุดของ florfenicol ที่ยอมรับได้ในเนื้อเยื่อของสัตว์เหล่านี้ (Maximum Residue Limits, MRLs) (EMEA, 2002) (ตารางที่ 1)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีวิเคราะห์การตกค้างของ florfenicol

เนื่องจากจุดประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ต้องการหาปริมาณสารตกค้าง florfenicol-amine ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจได้ในระดับ part per million (ppm) เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการกำหนดระยะหยุดยาของ florfenicol จึงต้องใช้วิธีวิเคราะห์ทาง Physicochemical Assay

6.1 วิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Nagata และ Saeki (1992) ทำการตรวจหาปริมาณ chloramphenicol thiamphenicol และ florfenicol ตกค้างในกล้ามเนื้อของปลา yellowtail ด้วยวิธี Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้ Sep-pak Florisil cartridge ช่วยในขั้นตอนการสกัด และวิเคราะห์สารที่ต้องการด้วย Chromatorex ODS column โดยมี UV-Detectoer ที่ความยาวคลื่น 225-270 นาโนเมตร เป็นตัวตรวจจับสารที่ต้องการ มีอัตราการคืนกลับของสารที่ระดับความเข้มข้น 0.1 ppm มากกว่า 74% ค่า Limit of Detection[1] (LOD) อยู่ที่ระดับ 1 นาโนกรัม ต่อมา Vue และคณะ (2002) ได้ใช้ HPLC แบบ reverse phase พร้อม UV-Detector ในการวิเคราะห์หาปริมาณ florfenicol ในพลาสม่าของปลา rainbow trout พบว่าอัตราการคืนกลับอยู่ที่ 84-104% และค่า Limit of Quantitation[2] (LOQ) ที่ได้น้อยกว่า 30 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วน Van de Riet และคณะ (2003) ทำการตรวจสารตกค้าง chloramphenicol thiamphenicol florfenicol และ florfenicol-amine ในฟาร์มเลี้ยงสัตว์น้ำ ด้วยวิธี Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry โดยใช้คอลัมน์ reverse phase Hypersil C-18 และใช้ Mass Spectrometry ในการตรวจจับ ion ของสาร ได้ค่าการคืนกลับของสารเท่ากับ 71-107% ที่ระดับความเข้มข้น 2 นาโนกรัมต่อกรัม และมีค่า LOD เท่ากับ 0.1-1 นาโนกรัมต่อกรัม ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของ ion ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ขณะที่ Wrzesinski และคณะ (2003) ตรวจหาปริมาณ florfenicol-amine ในกล้ามเนื้อของปลา Channel Catfish ซึ่งต้องทำ acid hydrolysis ในขั้นตอนการสกัดเพื่อเปลี่ยน florfenicol และสารเมตาบอไลท์ ทุกรูปแบบให้กลายเป็น florfenicol-amine ก่อนทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC-UV Detector ได้ค่าการคืนกลับเท่ากับ 85.7-92.3% และค่า LOD เท่ากับ 0.044 ไมโครกรัมต่อกรัมเนื้อเยื่อ

[1] Limit of Detection หมายถึง ปริมาณของสารที่มีอยู่ในตัวอย่างที่สามารถวัดได้

[2] Limit of Quantitation หมายถึง ปริมาณของสารที่มีอยู่ในตัวอย่างที่สามารถวัดได้ โดยมีความถูกต้องและแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ทางสถิติ

6.2 วิธี Gas Chromatography (GC)

ปี ค.ศ. 1996 ได้มีรายงานการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ chloramphenicol thiamphenicol และ florfenicol ตกค้างในกล้ามเนื้อของปลา yellow tail ด้วยวิธี Capillary Gas Chromatography-Mass Spectrometry พบว่าอัตราการคืนกลับของสารที่ระดับความเข้มข้น 0.1 ppm ได้มากกว่า 65% โดยมี LOD อยู่ที่ระดับ 5 นาโนกรัมต่อกรัมเนื้อเยื่อ (Nagata and Oka, 1996) ในขณะที่ Pfenning และคณะ (2000) ทำการวิเคราะห์หาการตกค้างของ chloramphenicol thiamphenicol florfenicol และ florfenicol-amine ในกล้ามเนื้อของกุ้งกุลาดำ โดยใช้ Gas Chromatography ร่วมกับ Electron Capture Detector (ECD) พบว่าการคืนกลับของสารจะมากกว่า 84% ค่า LOD มีค่าเท่ากับ 0.7-1.3 นาโนกรัมต่อกรัม และมี LOQ เท่ากับ 5 นาโนกรัมต่อกรัม

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์สารตกค้างของ chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol และ florfenicol-amine ในเนื้อเยื่อจากสัตว์

วิธีวิเคราะห์	ชนิดสาร	ชนิดสัตว์ / เนื้อเยื่อที่วิเคราะห์	LOD	อ้างอิง
HPLC	Chloramphenicol Thiamphenicol Florfenicol	ปลา yellowtail; กล้ามเนื้อ	1 นาโนกรัมต่อกรัม (ppb)	Nagata and Saeki, 1992
	Florfenicol-amine	ปลา ChannelCatfish; กล้ามเนื้อ	0.044 ไมโครกรัมต่อกรัม (ppm)	Wrzesinski *et al.*, 2003
LC/MS	Chloramphenicol Thiamphenicol Florfenicol Florfenicol-amine	ปลา salmon; กล้ามเนื้อ ปลา rainbow trout; กล้ามเนื้อ	0.1-1 นาโนกรัมต่อกรัม (ppb)	Van de Riet *et al.*, 2003
GC/MS	Chloramphenicol Thiamphenicol Florfenicol	ปลา yellowtail; กล้ามเนื้อ	5 นาโนกรัมต่อกรัม (ppb)	Nagata and Oka, 1996
GC / ECD	Chloramphenicol Thiamphenicol Florfenicol Florfenicol-amine	กุ้งกุลาดำ; กล้ามเนื้อ	0.7-1.3 นาโนกรัมต่อกรัม (ppb)	Pfenning *et al.*, 2000