บทที่ 4

การทดลองที่ 2 เภสัชจลนศาสตร์ของออกซีเตตราซัยคลินในกุ้งขาวแวนนาไม ที่บริหารเข้าสู่ตัวกุ้งโดยวิธีฉีดเข้าแอ่งเลือดและการป้อนให้กินทางปาก และการจับตัวของยากับโปรตีนในเลือด

4.1 บทคัดย่อ

ออกซีเตตราซัยคลินเป็นยาปฏิชีวนะที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในการเลี้ยงกุ้งทะเล ศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของการให้ยาผ่านแอ่งเลือดและป้อนให้กินในกุ้งขาวแวนนาไมซึ่งเป็นกุ้งสายพันธุ์ที่ได้รับความนิยมเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย โดยปริมาณออกซีเตตราซัยคลินตรวจวัดด้วยเทคนิค HPLC มี คลอเตตราซัยคลินเป็นสารมาตรฐานควบคุมภายใน เภสัชจลนศาสตร์ของการให้ยาผ่านแอ่งเลือดเป็น 2 แบบ two-compartment pharmacokinetics model (r= 0.9991) ครึ่งชีวิตของการกระจายยา และการกำจัดยา มีค่าเท่ากับ 0.23 และ 16.42 ชั่วโมง ตามลำดับ และ three-compartment pharmacokinetics model (r= 0.9994) มีค่าครึ่งชีวิตการกำจัดยาออกจากร่างกาย (disposition half-life) เท่ากับ 113.60 ชั่วโมง เภสัชจลนศาสตร์ของการให้ยาโดยป้อนให้กินเป็น 2 แบบคือ two-compartment pharmacokinetics (r= 0.7068) โดยที่ hemolymph มีความเข้มข้นออกซีเตตราซัยคลินเพิ่มขึ้นสูงสุดหลังจากให้ยา 6 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 41.49ไมโครกรัมต่อกรัม ค่าคงที่อัตราการดูดซึมและการกำจัดยาเท่ากับ 1.06 และ 0.17 ต่อชั่วโมงตามลำดับ ค่าครึ่งชีวิตการกำจัดยา เท่ากับ 16.42 ชั่วโมง ชีวประโยชน์ของการรับประทานเท่ากับ 80.62 เปอร์เซ็นต์ และ three-compartment pharmacokinetics (r= 0.9538) ที่มีค่าคงที่อัตราดูดซึมยาเข้า digestive gland เท่ากับ 0.30 ต่อชั่วโมง เกิด first past metabolism ที่ digestive gland เท่ากับ 5.08 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณการจับตัวของยากับโปรตีนในเลือดที่ทำการทดลองในตัวกุ้งมีสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 24 (25.06 ± 8.95 เปอร์เซ็นต์) และต่ำที่สุดในชั่วโมงที่ 6 (18.54 ± 10.16 เปอร์เซ็นต์)

4.2 บทนำ

เภสัชจลนศาสตร์เริ่มมีการศึกษาในกุ้งมากขึ้น เหตุผลสำคัญเพราะการตกค้างของยาปฏิชีวนะในกุ้ง มีความพยายามจากหลายประเทศที่เป็นผู้ผลิตกุ้งที่สำคัญได้หันมาศึกษากันมากขึ้น แต่การศึกษาโดยส่วนใหญ่แล้วมีรูปแบบที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของแต่ละราย

การศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของออกซีเตตราซัยคลินนั้นมีการศึกษาในกุ้งหลายชนิดทั้งกุ้งกุลาดำ (Sangrungruang et al,.2004; Uno et al., 2005) กุ้งคุรุมา (Uno, 2004) แต่ยังไม่มีรายงานการศึกษาในกุ้งแวนนาไม ซึ่งปัจจุบันเป็นชนิดที่มีการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย และการศึกษาทั้งหมดที่ผ่านมายังมีความสับสนอยู่มาก เพราะแบบจำลองทางเภสัชจลนศาสตร์ของการให้ยาเข้าแอ่งเลือดและป้อนยาผสมอาหารให้กุ้งกิน ในกุ้งชนิดเดียวกันให้แบบจำลองที่ต่างกัน ส่วนใหญ่แล้ว แบบจำลองทางเภสัชจลนศาสตร์ของการให้ยาเข้าแอ่งเลือดเป็นแบบ two-compartment model (Sangrungruang et al,.2004; Uno, 2004; Uno et al., 2005) และ สำหรับการป้อนยาผสมอาหารให้กุ้งกินส่วนใหญ่ไม่อ้างอิง compartment (non-compartment model) (Uno, 2004; Uno et al., 2005) มีเพียงการศึกษาในกุ้งกุลาดำโดย Sangrungruang และคณะ (2004) ที่เป็นแบบ one-compartment model แต่แบบจำลองทางเภสัชจลนศาสตร์ของการให้ยาเข้าแอ่งเลือดเป็นแบบ two-compartment model ทั้งที่ในความจริงแล้วน่าจะใช้แบบจำลองที่สอดคล้องกัน

สรีรวิทยาและกระบวนการเมทาโบลิซึมของกุ้งทะเลเปลี่ยนแปลงขึ้นกับระยะการลอกคราบ (moult stage) (Singer and Lee, 1977 อ้างโดย Li and James, 1997) ต่างกับสัตว์มีกระดูกสันหลังที่สรีรวิทยา ค่อนข้างคงที่ ดังนั้นการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ในกุ้งจะต้องกระทำสภาพทางสรีระที่สม่ำเสมอ การศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ในกุ้งทะเลที่ผ่านมาไม่มีรายงานใดที่ควบคุมสรีรวิทยาของกุ้ง (Park et al., 1995; Sangrungruang et al,.2004; Uno, 2004; Uno et al., 2005) การศึกษาในกุ้ง Lobster ควบคุมสรีรวิทยา โดยใช้สัตว์ทดลองที่อยู่ในช่วง intermoult stage (Li and James, 1997) ส่วนการศึกษาครั้งนี้จะใช้กุ้งขาวแวนนาไมที่มีระยะลอกคราบอยู่ในช่วง C-D_0 (intermoult stage) เพราะเป็นช่วงที่สรีรวิทยาของกุ้งค่อนข้างสม่ำเสมอ (Carvalho and Phan, 1998)

ชีวประโยชน์ของยาออกซีเตตราซัยคลินบอกถึงสัดส่วนของยาที่ถูกดูดซึมเข้ากระแสเลือด กุ้งทะเลที่กินยาผสมอาหารมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ (*P. monodon*: Sangrungruang et al,. 2004; *P .japanicus*: Uno, 2004; *P. monodon* : Uno et al., 2005) และทั้งหมดเป็นยาออกซีเตตราซัยคลินในรูป ไฮโดรคลอไรด์ (hydrochloride form) ซึ่งเป็นรูปที่มีความสามารถในการละลายน้ำสูงกว่ารูปอื่นๆ Reed และคณะ (2006) ศึกษาชีวประโยชน์ของออกซีเตตราซัยคลิน

ในรูป dihydrate ในกุ้ง *Litopenaeus setiferus* พบว่ามีค่าสูงถึง 92 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งออกซีเตตราซัยคลินในรูป dihydrate ละลายน้ำได้น้อยกว่ามากเมื่อเทียบกับรูป hydrochloride

การศึกษาเภสัชจลนศาสตร์และชีวประโยชน์ (Bioavailability) ทำการทดลองสองการทดลองควบคู่กันไป คือการให้ยาเข้ากระแสเลือดโดยตรงและการให้แบบรับประทาน (Park et al., 1995) การให้ยาเข้ากระแสเลือดโดยตรงนั้นเพื่อศึกษาจลนศาสตร์ของยาเมื่อยาอยู่ในเลือดโดยที่ยาสามารถเข้าไปในร่างกายได้ 100% โดยส่วนใหญ่ในกุ้งนั้นใช้วิธีฉีดยาเข้าแอ่งเลือด ส่วนการรับประทานนั้นเพื่อพิจารณากระบวนการดูดซึมยาและชีวประโยชน์ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนของพื้นที่ใต้กราฟกับการให้ยาเข้าแอ่งเลือดจะให้ค่าชีวประโยชน์สมบูรณ์ (absolute bioavailability) แต่กระบวนการศึกษาการรับประทานโดยการป้อนยาให้กุ้งกินนั้นทำได้ยากเพราะกุ้งมีขนาดเล็ก ในเบื้องต้นจึงได้มีการศึกษาวิธีการให้อาหารผสมยาและปริมาณอาหารที่จะป้อนให้กุ้ง พบว่าที่ระดับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวกุ้งนั้นเป็นปริมาณที่อาหารเต็มกระเพาะกุ้งพอดี ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Park และคณะ (1995) ที่ให้กุ้งกินอาหารเองตามธรรมชาติแล้วพบว่ากุ้งกินอาหารในปริมาณนี้เช่นกัน

ส่วนสุดท้ายของการทดลองคือการจับตัวของยากับโปรตีนในเลือด เพราะค่าดังกล่าวจะมีผลต่อการกระจายยาในเลือด (Volume of distribution) แต่มีรายงานรูปแบบการจับตัวและชนิดของโปรตีนดังกล่าวน้อยมาก วัตถุประสงค์หลักของการทดลองนี้จึงเป็นการประเมินระดับการจับตัวของยากับโปรตีนในเลือดเบื้องต้นเท่านั้น

นอกจากนั้นการทดลองครั้งนี้ยังได้พิจารณาระดับของยาในกล้ามเนื้อและ digestive gland ควบคู่กันไปด้วย เพื่อศึกษาลำดับของการไหลเวียนยาหลังจากยาเข้ากระแสเลือดและจากการกินยา เพราะเป็นการทำความเข้าใจกลไกการไหลเวียนของยาในร่างกายกุ้งให้ชัดเจนยิ่งขึ้น อีกทั้ง 2 อวัยวะดังกล่าวยังเป็นส่วนที่มีความสำคัญมาก กล่าวคือ digestive gland เป็นอวัยวะหลักที่มีการดูดซึมยาและอาหารเข้าสู่กระแสเลือด อีกทั้งยังมีความเป็นไปได้ที่อวัยวะดังกล่าวนั้นจะทำหน้าที่เผาผลาญยาอีกด้วย ส่วนในกล้ามเนื้อนั้นเป็นส่วนสำคัญที่ต้องไม่มียาตกค้างก่อนส่งไปจำหน่าย การวัดปริมาณยาในเนื้อด้วยนั้นเพื่อความมั่นใจอีกระดับหนึ่งว่า ในช่วงเวลาหยุดยานั้นไม่มียาตกค้างในระดับที่วัดได้อยู่ในเนื้อกุ้ง

4.3 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

4.3.1 ศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของยาออกซีเตตราซัยคลินโดยการฉีดเข้าแอ่งเลือดโดยตรงและการป้อนยาผสมอาหารให้กิน

4.3.2 ศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของยาออกซีเตตราซัยคลิน ใน hemolymph, digestive gland และ กล้ามเนื้อ หลังยาเข้า hemolymph โดยการฉีดเข้าแอ่งเลือด

4.3.3 สร้างแบบจำลองทางเภสัชจลนศาสตร์ของการไหลเวียนยาในตัวกุ้งหลังจากฉีดเข้าแอ่ง เลือดโดยตรงและการป้อนยาผสมอาหารให้กิน

4.3.4 ศึกษาการจับตัวของยากับโปรตีนในเลือด

4.4 อุปกรณ์และวิธีการ

4.4.1 วัสดุอุปกรณ์และ สารเคมี

1. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณออกซีเตตราซัยคลินและการให้ยากุ้งนั้นใช้ชุดเดียวกับบทที่ 3

2. ไมโครไซริงก์ขนาด 50 ไมโครลิตร (Harmillton, USA)

3. บ่อทดลอง

ในเบื้องต้นใช้บ่อซีเมนต์ความจุ 4 ตัน จำนวน 2 บ่อ (ภาควิชาวาริชศาสตร์) โดยใช้ 1 บ่อเพื่อเลี้ยงกุ้งในกระชัง ส่วนที่เหลือใช้เตรียมน้ำทะเลเพื่อเปลี่ยนถ่าย เตรียมบ่อทดลองโดยล้างให้สะอาด แล้วใส่น้ำทะเลที่มีความเค็ม 20±2 พีพีที อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส พีเอช 7.6±0.5 แอมโมเนีย 0.05 พีพีเอ็ม ไนไตรท์ 0.020 พีพีเอ็ม ด่างทั้งหมด 200 พีพีเอ็ม และความกระด้างทั้งหมด 700 พีพีเอ็ม น้ำมีระดับความสูงจากพื้นบ่อ 60 เซนติเมตร ติดตั้งท่อลมและสายยางให้อากาศผ่านหัวทรายจำนวน 10 หัวต่อบ่อ ให้ออกซิเจนตลอดเวลา หลังจากนั้นติดตั้งกรงพลาสติก (กระชัง) ขนาด 20x20x50 เซนติเมตร ที่ด้านล่างหุ้มตาข่ายป้องกันอาหารหลุด จำนวน 64 ใบ โดยแขวนอยู่กับไม้ไผ่จำนวน 8 แถวๆละ 8 ใบ โดยที่ 3 ใน 4 ส่วนของกระชังดังกล่าวจมน้ำ ทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกๆ 7 วัน

4. ตู้กระจก

ใช้ตู้กระจกที่มีความจุขนาด 60 ลิตร จำนวน 16 ใบ (ภาควิชาชีวเคมี) รองพื้นตู้ด้วยเศษปะการังทุกตู้เพื่อดูดซับตะกอน เติมน้ำที่มีคุณสมบัติเช่นเดียวกันกับน้ำในบ่อซีเมนต์ ให้มีปริมาตร 3 ใน 4 ส่วนของตู้กระจก ให้อากาศผ่านท่อลม 2 ท่อ ตลอดเวลา ระหว่างการทดลองเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกๆ 2 วัน นำกุ้งที่ผ่านการลอกคราบจากบ่อซีเมนต์มาแล้ว 1 วัน มาเลี้ยง 1 ตัวต่อ 1 ตู้ เพื่อรอให้ยาโดยฉีดเข้าแอ่งเลือด และป้อนยาผสมอาหารเข้าปากโดยตรงต่อไป

5. กุ้งขาวแวนนาไม

ใช้กุ้งขาวแวนนาไม (*L. vannamei*) เพศผู้ น้ำหนักตัว 16±4.12 กรัม อายุการเลี้ยงประมาณ 3 เดือน ซึ่งคัดจากบ่อดิน (อ.ระโนด จ. สงขลา) ความยาวของคาราเปซ (carapace length) 2.30-3.00 เซนติเมตร บันทึกประวัติกุ้งทุกตัวตลอดการทดลอง ก่อนนำกุ้งมาเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ นำมาเลี้ยงให้คุ้นกับสภาพแวดล้อมในถังไฟเบอร์กลาสก่อน หลังจากนั้นแยกเลี้ยงในกระชังในบ่อ

ซีเมนต์ กระชังละ 1 ตัว โดยกุ้งแต่ละตัวมีหมายเลขประจำตัวเพื่อบันทึกประวัติ เลี้ยงกุ้งในบ่อซีเมนต์จนกระทั่งกุ้งลอกคราบ หลังจากนั้น 1 วัน เคลื่อนย้ายกุ้งไปเลี้ยงในตู้กระจกจนระยะเวลาลอกคราบ อยู่ที่ช่วง C-D_0 พิจารณาตามวิธีของ Smith และ Dall (1985) จึงให้ยา

4.4.2 วิธีการศึกษา

4.4.2.1 การให้ยาโดยฉีดเข้าแอ่งเลือดขนาด 10 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักตัวกุ้ง

เตรียมสารละลายออกซีเตตราซัยคลินที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายยาในสารละลายฟอสเฟตเซลีนบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ที่ถูกปรับให้มี พีเอช 12 ด้วยโซเดียม-โฮดรอกไซด์ (NaOH) (0.1 โมลาร์) จนกระทั่งยาละลายสมบูรณ์ แล้วปรับพีเอชให้เท่ากับ 8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl)) (1 โมลาร์) ปรับปริมาตรของสารละลายจนเท่ากับ 10 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายฟอสเฟตเซลีนบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ฉีดยาเข้าแอ่งเลือดบริเวณขาเดินคู่ที่ 3 ด้วย ไมโครไซริงก์ขนาด 50 ไมโครลิตร ที่ต่ออยู่กับเข็มฉีดยาขนาด 27G ซึ่งปริมาตรที่ฉีดเท่ากับ 1 ไมโครลิตรต่อ 1 กรัมน้ำหนักตัวกุ้ง กุ้งที่ใช้คือกุ้งที่มี ระยะลอกคราบอยู่ที่ช่วง C-D_0 และก่อนทำการฉีดยาทำการอดอาหารกุ้ง 48 ชั่วโมง และเริ่มให้อาหารกุ้งอีกครั้งหลังจากให้ยา 24 ชั่วโมง ตลอดการทดลองจะให้อาหารกุ้งทุกวันๆละ 1 ครั้ง ในเวลาประมาณ 17.00 น ที่ปริมาณ 2-3 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักตัวกุ้ง

4.4.2.2 การให้ยาโดยป้อนยาผสมอาหารให้กุ้งกินขนาด 50 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักตัวกุ้ง

กุ้งในการทดลองครั้งนี้จะให้ยาผสมอาหารในขนาด 50 ไมโครกรัมต่อกรัมของน้ำหนักตัวกุ้งผ่านทางหลอดฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตรที่ต่ออยู่กับปลายเข็มขนาด 16G และที่ปลายเข็มนั้นต่อท่อซิลิโคนยาว 1 เ ซนติเมตร เพื่อป้องกันปากกุ้งเป็นแผล โดยกำหนดให้ปริมาณอาหารที่ป้อนให้เท่ากับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวกุ้ง เบื้องต้นได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาตรของอาหารที่อัดผ่านหลอดฉีดยากับน้ำหนักเปียกและน้ำหนักแห้ง เพื่อนำมาคำนวณหาปริมาตรของอาหารผสมยาที่จะป้อน และความเข้มข้นของยาผสมอาหารที่จะเตรียม

เตรียมอาหารโดยนำอาหารที่ผ่านการบดละเอียดที่มีอนุภาคเล็กกว่า 0.50 มิลลิเมตร ผสมกับน้ำ ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยมวลต่อปริมาตร บรรจุอาหารเปียกดังกล่าวลงในหลอดฉีดยา แล้วอัดอาหารผ่านหลอดฉีดในปริมาตรที่ต่างกัน 5 ปริมาตร (0.025, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 มิลลิลิตร) ระดับละ 3 ซ้ำ มาชั่งน้ำหนัก แล้วนำอาหารชุดเดียวกันนี้ไปอบในตู้ลมร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศา

เซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก สร้างสมการอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างปริมาตรและน้ำหนัก พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาตร(Y)กับน้ำหนักเปียก(X_1)และน้ำหนักแห้ง(X_2)เป็นเส้นตรง มีสมการเป็น (1) $Y=1.5326X_1+0.0074$ ($r=1.00$) และ (2) $Y=0.8171X_2+0.0039$ ($r=1.00$) ตามลำดับ โดยที่ Y X_1 และ X_2 คือปริมาตรอาหาร (มิลลิลิตร) น้ำหนักเปียก (กรัม) และน้ำหนักแห้ง (กรัม) ตามลำดับ จากสมการที่ 2 ทำให้ทราบว่าต้องเตรียมผสมอาหารเบื้องต้นเท่ากับ 20 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กรัม จึงจะทำให้กุ้งได้รับยาในขนาดที่ต้องการ

เตรียมยาผสมอาหารที่ประกอบด้วยออกซีเตตราซัยคลิน 20 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กรัม หลังจากผสมอาหารและยาจนทั่วถึงกันแล้วจึงเติมน้ำในปริมาตร 1 ต่อ 1 โดยน้ำหนักอาหาร ผสมจนน้ำซึมเข้าอาหารจนทั่วถึงกัน บรรจุอาหารผสมยาที่เปียกลงในหลอดฉีดยาเพื่อเตรียมป้อนให้กุ้งกิน

ทดสอบปริมาณยาในอาหารหลังจากผสม อัดยาผสมอาหารจากหลอดฉีดยามา 0.025, 0.50 และ 0.10 มิลลิลิตร ระดับละ 3 ซ้ำ ซึ่งเป็นปริมาตรที่ป้อนให้กุ้งขนาด 5, 10 และ 20 กรัมตามลำดับ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณยาที่แท้จริง พบว่าให้ค่าเท่ากับ 253.50±12.68 514.30±2.49 และ 1038.25±18.28 ไมโครกรัม ตามลำดับ ขนาดยาเฉลี่ยต่อน้ำหนักกุ้งเท่ากับ 50.24±1.06 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักตัวกุ้ง ซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณยาที่ต้องการให้กุ้งในขนาด 5, 10, และ 20 กรัม ที่ความเข้มข้นของยาเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักกุ้ง การเตรียมยาโดยวิธีนี้เป็นวิธีที่มีความถูกต้องของขนาดยาที่ให้สูง และปริมาณยาที่ให้มีความสม่ำเสมอ

นำยาที่เตรียมตามวิธีการข้างต้นมาป้อนให้กุ้ง ในขนาด 50 ไมโครกรัมต่อกรัม ในระดับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักตัวกุ้ง โดยคำนวณปริมาตรยาผสมอาหารที่จะป้อนในกุ้งแต่ละตัวตามสมการข้างต้น

4.4.2.3 การเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ปริมาณออกซีเตตราซัยคลิน

หลังจากกุ้งได้รับยาโดยการฉีดผ่านแอ่งเลือด และป้อนอาหารผสมยา แล้วเป็นระยะเวลา 0.25, 0.50, 2.00, 4.00, 6.00, 9.00, 12.00, 24.00, 48.00, 72.00, 170.00, 336.00 และ 504.00 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างเลือด ของแต่ละช่วงเวลา โดยแต่ละช่วงเวลาใช้กุ้ง 3 ตัว เมื่อครบเวลาที่กำหนดทำให้กุ้งตายทันทีโดยวางกุ้งในน้ำแข็ง แล้วทำการดูดเลือด ซึ่งก่อนการดูดเลือดได้เติมสารยับยั้งการแข็งตัวของเลือดลงในหลอดฉีดยาประมาณ 0.005 มิลลิกรัมต่อหลอด แล้วทำการดูดเลือดจากขาเดินคู่ที่ 3 ประมาณ 1.5-2.0 มิลลิลิตร บันทึกหมายเลขตัวอย่างเลือด (หมายเลขประจำ

ตัวกุ้ง) ส่วนตัวกุ้งนั้นบรรจุใส่ถุงพลาสติกบันทึกหมายเลขเช่นกัน ตัวอย่างทั้งหมดนำไปเก็บในตู้ที่มีอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์หาปริมาณออกซีเตตราซัยคลิน

นำตัวอย่าง hemolymph มาเติมสารมาตรฐานภายใน ส่วนกล้ามเนื้อและ digestive glad นั้นตัดแยกจากกุ้งที่แช่แข็งไว้ ชั่งน้ำหนักเปียกทันทีหลังจากตัดแยกแล้วเติมสารมาตรฐานภายในที่ปริมาณเท่ากันทุกตัวอย่าง เก็บในตู้ที่มีอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง แล้วนำไปทำแห้ง (freeze dry) และชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่ถูกบดละเอียดทันทีหลังจากการทำแห้ง นำเนื้อเยื่อที่แห้งสนิททั้งหมดของแต่ละตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณออกซีเตตราซัยคลิน ผ่านกระบวนการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณออกซีเตตราซัยคลินด้วยเทคนิค HPLC ตามวิธีที่ได้ผลในบทที่ 3

4.4.2.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

พิจารณาเภสัชจลนศาสตร์ของการบริหารยาผ่านแอ่งเลือดและและป้อนยาผสมอาหาร แบบ non-compartment pharmacokinetics model และคำนวณพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ที่สำคัญ

สร้างแบบจำลองทางเภสัชจลนศาสตร์ นำข้อมูลความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลิน ในอวัยวะต่างๆเข้าสมการ poly-exponential โดย nonlinear regression และวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ย (SigmaPlot® 2000, SPSS Inc., USA) พบว่าแบบจำลองทางเภสัชจลนศาสตร์เป็น two-compartment pharmacokinetics model และ three-compartment pharmacokinetics model คำนวณค่าพารามิเตอร์ต่างๆที่สำคัญทางจลนศาสตร์ของการบริหารยาผ่านแอ่งเลือดและป้อนยาผสมอาหาร ตามวิธีของ Wagner (1993), Rescigno (2004) และ Gorski (2005)

4.4.2.5 ชีวประโยชน์ของยาออกซีเตตราซัยคลินแบบรับประทาน

คำนวณชีวประโยน์ของออกซีเตตราซัยคลินโดยการหาอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของระดับยาใน hemolymph ของการให้ยาผ่านแอ่งเลือดและให้ยาโดยการป้อนยาผสมอาหารตามสมการดังนี้

$$F = \frac{AUC^{\infty}_{0,oral}.Dose_{is}}{AUC^{\infty}_{0,is}.Dose_{oral}}$$

โดยที่ F คือ ค่าชีวประโยชน์; $AUC^{\infty}_{0,oral}, AUC^{\infty}_{0,IS}$ คือพื้นที่ใต้กราฟของระดับยาใน Hemolymph หลังป้อนยาผสมอาหาร และฉีดยาเข้าแอ่งเลือดตามลำดับ; $Dose_{oral}, Dose_{IS}$ คือ ขนาดยาที่ให้โดยการป้อนยาผสมอาหาร และฉีดเข้าแอ่งเลือดตามลำดับ

การคำนวณค่าพื้นที่ใต้กราฟนั้นสามารถทำได้หลายวิธีแต่วิธีที่นิยมใช้โดยทั่วไป คือคำนวณจากสมการ regression และคำนวณตามวิธี Trapezoidal Rule การทดลองนี้ใช้ทั้งสองวิธี แต่ค่าชีวประโยชน์ที่น่าเชื่อถือนั้น ใช้ค่าที่พื้นที่ใต้กราฟคำนวณตามวิธี Trapezoidal Rule เพราะได้จากข้อมูลจริงไม่ใช่จากแบบจำลอง (Toutain and Bousquet-Mélou, 2004)

4.4.2.6 การจับตัวของยากับโปรตีนในเลือด

4.4.2.6.1 หาปริมาณของยาที่ถูกจับเอาไว้โดยแผ่นกรอง

เตรียมสารละลายมาตรฐานออกซีเตตราซัยคลินใน 0.1 M ใน phosphate saline buffer พีเอช 7.4 ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อลิตร ดูดสารละลายมา 150 ไมโครลิตร (3 ซ้ำ) เติมลงใน Ultrafree-Mc (cut-off 100,000 ดาลตัน) แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 rpm นาน 40 นาที ที่อุณหภูมิห้อง วัดปริมาตรของส่วนใสทั้งหมด แล้วนำไปสกัดหาปริมาณออกซีเตตราซัยคลิน เติมสารมาตรฐานภายใน 5 ไมโครกรัม เติมน้ำ จนได้ปริมาตรทั้งหมด 200 ไมโครลิตร จากนั้นเติม TFA 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,900x g นาน 40 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใส 20 ไมโครลิตรฉีดเข้าเครื่อง HPLC ล้างส่วนที่ติดแผ่นกรองออกด้วยน้ำ Milli-Q 200 ไมโครลิตร นำไปวิเคราะห์หาปริมาณออกซีเตตราซัยคลินด้วยวิธีเดียวกับ hemolymph เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Reed และคณะ (2004)

4.4.2.6.2 การจับตัวของยาออกซีเตตราซัยคลินกับโปรตีนที่ศึกษาในหลอดทดลอง

ศึกษาการจับตัวของโปรตีนใน hemolymph ในหลอดทดลอง โดยเตรียม hemolymph ที่มีออกซีเตตราซัยคลิน 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 4 ชั่วโมง ทำตัวอย่าง hemolymph เป็น 5 ชุดการทดลอง ชุดละ 2 ซ้ำ ดูด hemolymph มา 150 ไมโครลิตร (2 ซ้ำ) เติมลงใน Ultrafree- Mc นำไปหมุนเหวี่ยง 7,000 rpm นาน 10, 20 , 40, 60 และ 80 นาที วัดปริมาตรของส่วนใสทั้งหมดของแต่ละชุด นำไปสกัดหาปริมาณออกซีเตตราซัยคลิน โดยเติมตัวควบคุมภายใน 5 ไมโครกรัม และเติมน้ำ จนได้ปริมาตรทั้งหมด 200 ไมโครลิตร เติม

TFA 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,900xg นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใส 20 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ล้างส่วนที่ติดแผ่นกรองด้วยน้ำ 200 ไมโครลิตร แล้ววิเคราะห์หาปริมาณออกซีเตตราซัยคลินด้วยวิธีเดียวกับ hemolymph

4.4.2.6.3 การจับตัวของยาออกซีเตตราซัยคลินกับโปรตีนที่ศึกษาในตัวกุ้ง

ศึกษาการจับตัวของยากับโปรตีนในเลือดกุ้งภายในตัวกุ้งจริง โดยดูด hemolymph กุ้งจากการป้อนยาผสมอาหารที่เวลา 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง มา 150 ไมโครลิตร (3 ซ้ำ) เติมลงใน Ultrafree- Mc แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 rpm นาน 40 นาที ที่อุณหภูมิห้อง วัดปริมาตรของส่วนใส ทั้งหมด แล้วนำไปสกัดหาปริมาณออกซีเตตราซัยคลิน โดยเติมตัวควบคุมภายใน 5 ไมโครกรัม เติมน้ำ จนได้ปริมาตรทั้งหมด 200 ไมโครลิตรเติม TFA 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,900x g นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4ºC นำส่วนใส 20 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ล้างส่วนที่ติดแผ่นกรองด้วยน้ำ 200 ไมโครลิตร แล้ววิเคราะห์หาปริมาณออกซีเตตราซัยคลินด้วยวิธีเดียวกับ hemolymph

4.5 ผลการทดลอง

4.5.1 การกระจายของยาออกซีเตตราซัยคลินใน hemolymph, digestive gland และกล้ามเนื้อหลังจากให้ยาผ่านแอ่งเลือด

หลังจากกุ้งได้รับยาผ่านแอ่งเลือดในขนาด 10 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักกุ้ง พบว่าระดับยาใน hemolymph เพิ่มสูงสุดทันทีหลังจากได้รับยาโดยที่ 0.25 ชั่วโมงมีความเข้มข้น 21.031 ± 1.813 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับยาจะลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 4 หลังจากนั้น ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ถึง 48 ค่อยๆลดลง และลดลงเหลือน้อยกว่า 0.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 72 (ดังแสดงในตารางที่ 5) แล้วระดับยาลดลงอย่างช้าๆ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 72 ถึง 170 (ดังแสดงในรูปที่ 13) จนไม่สามารถตรวจวัดปริมาณยาได้ หลังจากได้รับยาแล้ว 336 และ 504 ชั่วโมง

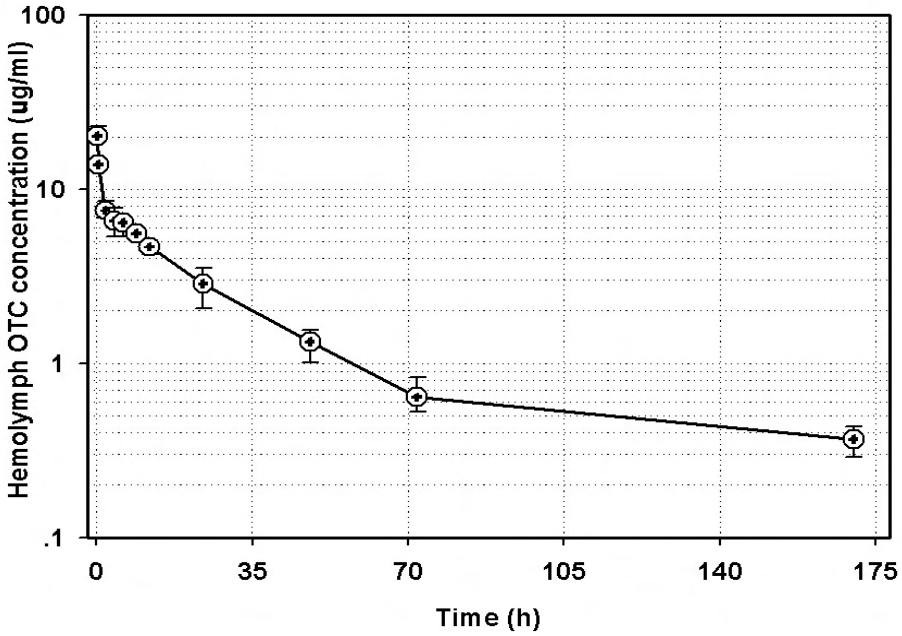
ระดับของยาในเนื้อกุ้ง (Abdominal muscle) ค่อยๆเพิ่มสูงขึ้นและมีระดับยาสูงสุดในชั่วโมงที่ 6 ที่ความเข้มข้น 7.944±1.524 ไมโครกรัมต่อกรัม ต่อจากนั้นระดับยาลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 12 และระดับยาค่อยๆลดลงจนไม่สามารถตรวจวัดปริมาณยาได้ ในชั่วโมงที่ 336 (ดังแสดงในตารางที่ 5 และรูปที่ 14)

ระดับของยาใน digestive gland เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและมีระดับยาสูงสุดในชั่วโมงที่ 9 ที่ความเข้มข้น 41.000±4.374 ไมโครกรัมต่อกรัม หลังจากนั้นระดับยาลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 24 แล้วลดลงอย่างช้าๆ จนไม่สามารถตรวจวัดปริมาณยาได้ในชั่วโมงที่ 336 หลังจากได้รับยาผสมอาหาร (ดังแสดงในตารางที่ 5 และ รูปที่ 15)

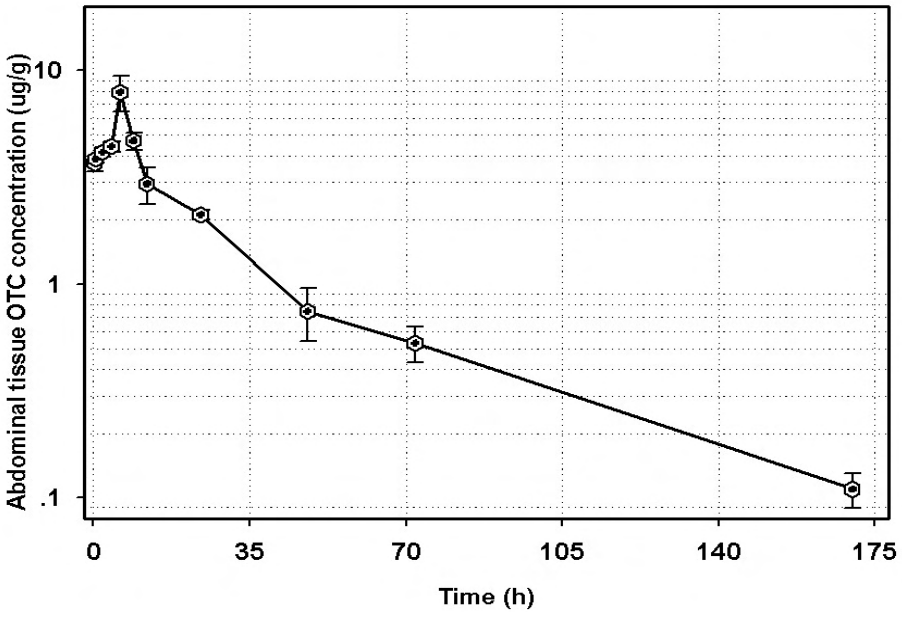
ตารางที่ 5 ระดับของออกซีเตตราซัยคลินใน hemolymph, กล้ามเนื้อ และ digestive gland หลังให้ยาผ่านแอ่งเลือด (ค่าเฉลี่ย ± S.D.)

เวลา (ชั่วโมง)	*ความเข้มข้นของ OTC ใน hemolymph (µg/ml)*	*ความเข้มข้นของ OTC ในกล้ามเนื้อ (µg/g)*	**ความเข้มข้นของ OTC ใน digestive gland (µg/g)**
0.25	21.031±1.813	3.687±0.316	0.346±0.089
0.50	13.751±0.794	3.855±0.159	0.957±0.351
2.00	7.714±0.836	4.159±0.208	5.068±1.772
4.00	6.567±1.210	4.423±0.248	16.709±5.183
6.00	6.171±0.793	7.944±1.524	22.382±4.683
9.00	5.481±0.253	4.687±0.450	41.000±4.374
12.00	4.583±0.359	2.957±0.576	23.664±1.985
24.00	2.795±0.731	2.122±0.114	6.283±2.010
48.00	1.285±0.272	0.749±0.206	3.421±1.464
72.00	0.679±0.154	0.530±0.099	1.023±0.190
170.00	0.362±0.070	0.109±0.019	0.234±0.111
336.00	nd	nd	nd
504.00	nd	nd	nd

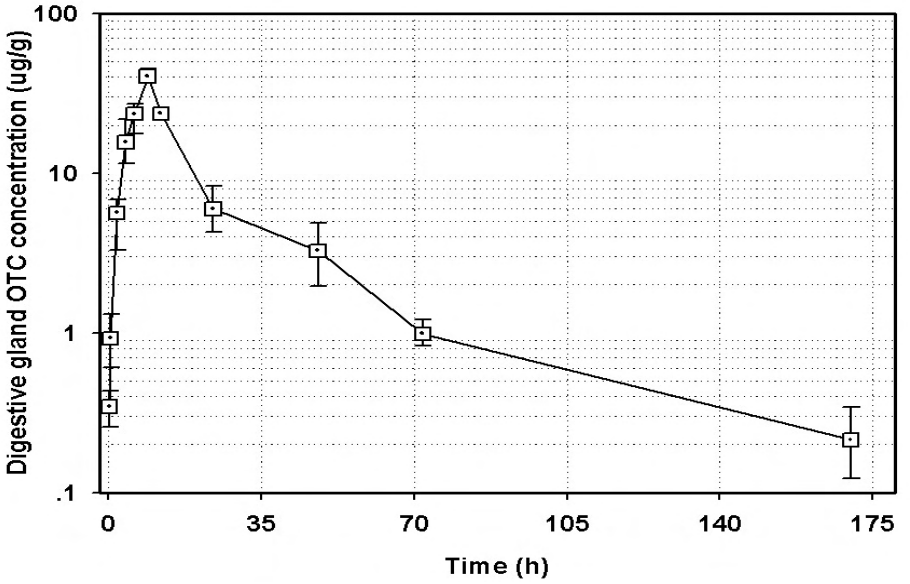
nd = ไม่สามารถตรวจวัดได้



รูปที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินใน hemolymph กับเวลาหลังจากให้ยาผ่านแอ่งเลือด



รูปที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินในกล้ามเนื้อกับเวลาหลังจากให้ยาผ่านแอ่งเลือด



รูปที่ 15 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินใน digestive gland กับเวลาหลังจากให้ยาผ่านแอ่งเลือด

4.5.2 เภสัชจลนศาสตร์ของออกซีเตตราซัยคลินของการให้ยาผ่านแอ่งเลือด

4.5.2.1 เภสัชจลนศาสตร์แบบ non-compartment ของออกซีเตตราซัยคลินใน hemolymph , กล้ามเนื้อ และ digestive gland

เภสัชจลนศาสตร์ของออกซีเตตราซัยคลินแบบ non-compartment โดยให้ยาผ่านแอ่งเลือด ยามีความเข้มข้นสูงสุดที่ digestive gland ในชั่วโมงที่ 9 หลังจากรับยา ค่าครึ่งชีวิตการขับยาออกจากแต่ละอวัยวะพบว่าไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) ปริมาณยาส่วนใหญ่อยู่ที่ digestive gland (พิจารณาจากค่า AUC_0^∞) ต่างจากในกล้ามเนื้อและ hemolymph อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ยากระจายผ่าน digestive gland เร็วกว่ากล้ามเนื้อและ hemolymph อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 เภสัชจลนศาสตร์พารามิเตอร์ของ Non-compartment pharmacokinetics ที่ให้ยาผ่านแอ่งเลือด (ค่าเฉลี่ย ± S.D., n=3)

พารามิเตอร์	*Hemolymph*	*กล้ามเนื้อ*	**Digestive gland**
[1] C_{max} (µg/ml or µg/g)	32.22 ±4.19	[*]7.94 ± 1.52	41.00 ±4.37
[2] T_{max} (h)	0.00	6.00	9.00
[3] λ (h^{-1})	[*]0.0092 ±0.0032	0.0157 ±0.0009	0.0203 ± 0.0065
[4] $t_{0.5}^{\lambda}$ (h)	80.70± 23.30	50.28± 9.50	42.07 ± 15.90
[5] AUC_0^{170} (µg.h/ml)	245.56±20.64	170.45±11.62	668.80± 87.93
[6] AUC_0^{∞} (µg.h/ml)	[*]284.91± 22.75	[*]177.40 ±12.41	682.06± 88.92
Mean $\frac{AUC_0^{170}}{AUC_0^{\infty}}$	0.8619	0.9608	0.9805
[7] $T_{transit}$ (h)	77.00 ±17.01	[*]41.25± 6.41	[*]30.09 ±4.72

[*]ค่าเฉลี่ยที่มีเครื่องหมายต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

[1] ความเข้มข้นยาสูงสุด (Maximun level); [2] เวลาที่ความเข้มข้นยาสูงสุด (Time at maximum level)

[3] ค่าความชันของ terminal phase (3 จุดข้อมูล)

[4] ค่าครึ่งชีวิตการขับยาออกจากตัวกุ้ง (The half-life of disposal from shrimp's body)

[5] พื้นที่ใต้กราฟระหว่างความเข้นของยากับเวลาตั้งแต่ 0 ถึง 170 ชั่วโมง

[6] พื้นที่ใต้กราฟระหว่างความเข้มข้นของยากับเวลา 0 ถึง ∞ ชั่วโมง

[7] Mean transit time: $T_{transit} = \frac{AUMC_0^{\infty}}{AUC_0^{\infty}}$ โดย $AUMC$ คือ Area under the moment curve

4.5.2.2 เภสัชจลนศาสตร์แบบ two-compartment model ของออกซีเตตราซัยคลินใน hemolymph และกล้ามเนื้อ

ได้นำแบบจำลองทางเภสัชจลนศาสตร์ two-compartment model ซึ่งยาถูกให้เข้ากระแสเลือดโดยตรง (Single-bolus administration) มาใช้กับระดับยาใน hemolymph และ กล้ามเนื้อ แบบจำลองดังกล่าวกำหนดให้ hemolymph เป็น compartment 1 (central compartment) เพื่อความสะดวกขอเรียกเลือดแทน hemolymph และ กล้ามเนื้อเป็น compartment 2 (Peripheral compartment) โดยมีสมมุติฐานว่ายาใน compartment 1 เคลื่อนไปสู่ digestive gland โดยไม่มีการย้อนกลับ จึงพิจารณา digestive gland แยกออกจาก model ต่างหากเรียกว่า compartment 0 (พิจารณารูปที่ 16 ประกอบ) ทำ non- linear regression หาสมการอธิบายความสัมพันธ์ของยาใน

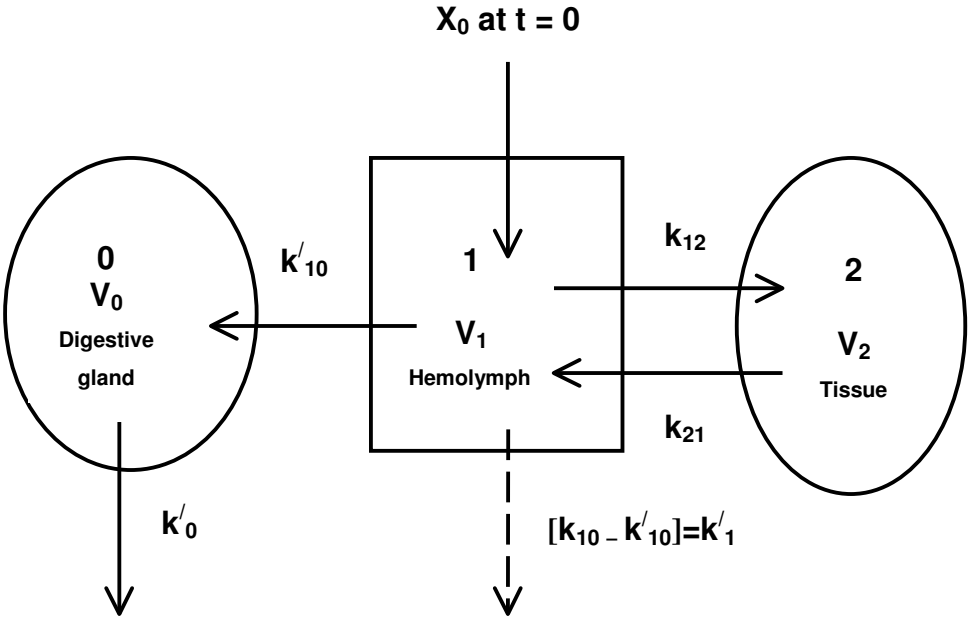
เลือดและกล้ามเนื้อกับเวลา ตามสมการที่ 1 และ 2 ตามลำดับ (ดังแสดงในรูปที่ 17 และ 18) (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก)

$$(1) \qquad C_1(t) = \frac{x_0}{V_1(\beta - \alpha)}\left[(k_2 - \alpha)e^{-\alpha.t} + (\beta - k_2)e^{-\beta.t}\right]$$

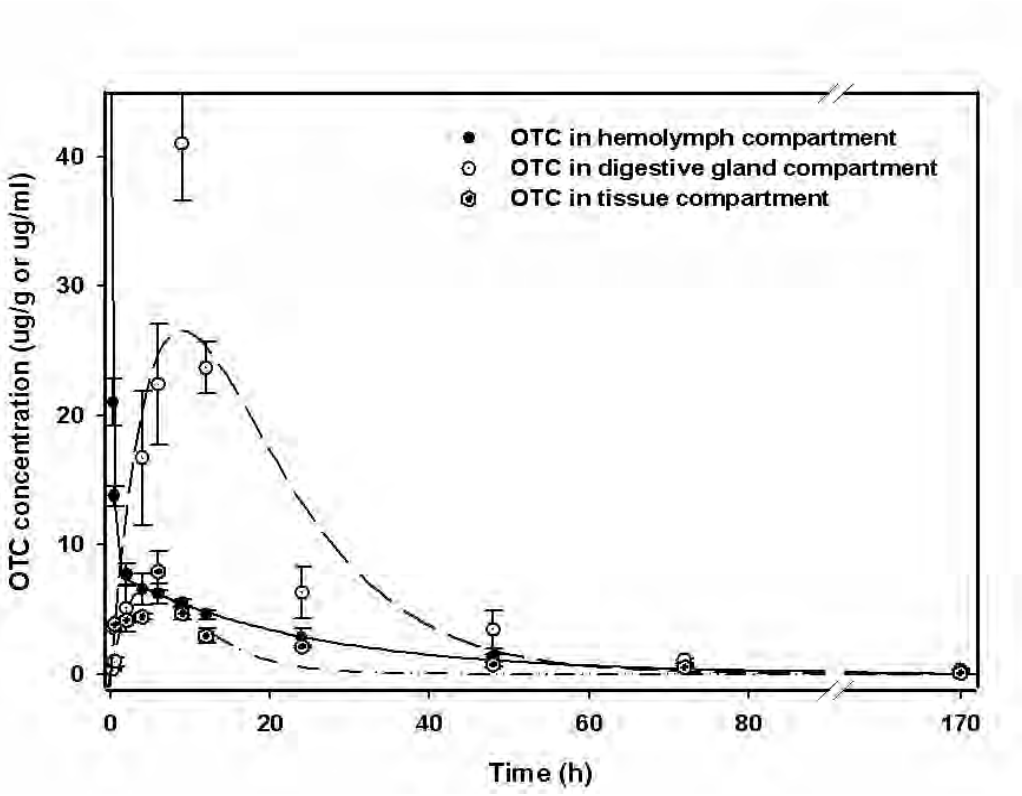
$$(2) \qquad C_2(t) = \frac{x_0 k_{12}}{V_2(\beta - \alpha)}\left[e^{-\alpha.t} - e^{-\beta.t}\right]$$

โดยที่ C_1 คือความเข้มข้นของยาใน compartment 1 ที่เวลา (t) ใดๆ ; C_2 คือความเข้มข้นของยาใน compartment 2 ที่เวลา (t) ใดๆ; x_0 คือความเข้มข้นของยาในตัวกุ้งที่เวลาเริ่มต้นซึ่งเท่ากับ Dose (10 µg/g) ; α, β คือ ค่าคงที่อัตราการกระจายยาและกำจัดยาออกจาก compartment 1ตามลำดับ; k_1 และ k_2 คือค่าคงที่อัตรากระจายยาออกจาก compartment 1 ทั้งหมด และcompartment 2 ทั้งหมด ตามลำดับ; k_{12} คือค่าคงที่อัตรากระจายยาจาก compartment 1 เข้าสู่ compartment 2; V_1 และ V_2 คือ ปริมาตรการกระจายยา compartment 1 และ compartment 2 ตามลำดับ

หลังจากทำ non-linear regressions ความเข้มข้นของยาในเลือดตามสมการที่ 1 (แสดงในรูปที่ 18) พบว่าให้ค่า correlation coefficient เท่ากับ 0.9991 และ ความเข้มข้นของยาในกล้ามเนื้อตามสมการที่ 2 (รูปที่ 17) ได้ค่า correlation coefficient เท่ากับ 0.8988 และคำนวณพารามิเตอร์ที่สำคัญ หลังจากการทำ regression ดังแสดงในตารางที่ 7



รูปที่ 16 แบบจำลองทางเภสัชจลนศาสตร์ two-compartment open model ของการไหลเวียนออกซีเตตราซัยคลินของการให้ยาผ่านแอ่งเลือด โดยที่ k_{12} และ k_{21} คือค่าคงที่อัตรากระจายยาจาก compartment 1 เข้าสู่ compartment 2 และใน compartment 2 เข้าสู่ compartment 1 ตามลำดับ; k_{10} คือค่าคงที่อัตราการกำจัดออกจาก compartment 1; V_0, V_1 และ V_2 คือ ปริมาตรการกระจายยา compartment 0, compartment 1 และ compartment 2 ตามลำดับ; k'_{10} ค่าคงที่อัตราการกระจายยาจาก compartment 1 เข้า compartment 0; k'_0 คือค่าคงที่อัตราการกำจัดยาออกจาก compartment 0



รูปที่ 17 Non-linear regressions ของออกซีเตตราซัยคลินใน hemolymph, digestive gland และกล้ามเนื้อหลังให้ยาผ่านแอ่งเลือด โดยใช้แบบจำลองตามสมการที่ 1-3

ตารางที่ 7 เภสัชจลนศาสตร์พารามิเตอร์ของออกซีเตตราซัยคลิน จากการทำ non-linear regression ใน hemolymph (central compartment) และ กล้ามเนื้อ (peripheral compartment) หลังให้ยาผ่านแอ่งเลือด (ค่าเฉลี่ย± S.E., n=3)

พารามิเตอร์	*Hemolymph compartment (ตามสมการที่1)*	**Abdominal tissue compartment (ตามสมการที่2)**
A (μg/ml)	28.9108± 1.7104	-
B (μg/ml)	7.9817± 0.2224	-
α (h^{-1})	3.1583± 0.2089	2.8994± 0.8853
β (h^{-1})	0.0422 ± 0.0031	0.0365± 0.0097
k_{10} (h^{-1})	0.1861 ± 0.0137	-
k_{12} (h^{-1})	2.2980± 0.1785	1.4869± 0.4592
k_{21} (h^{-1})	0.7164 ± 0.0354	-
†Vi (ml/g)	0.2711± 0.0128	0.8696 ± 0.5777
Distribution half-life (h)	0.2300± 0.0100	0.2300± 0.0700
Disposition half-life (h)	16.4200± 1.1900	19.1600± 5.1000
AUC_0^∞ (μg.h/ml)	198.1900 ± 10.4900	162.3800± 34.4300
Vss (ml/g)	1.1400±0.0300	-

A, B คือ จุดตัดแกน Y ของการกระจายยาและการกำจัดยาตามลำดับ; α, β คือ ค่าคงที่อัตราการกระจายยาและกำจัดยาออกจากเลือดตามลำดับ; k_{10} คือค่าคงที่อัตราการกำจัดยาออกจาก compartment 1; k_{12} และ k_{21} คือค่าคงที่อัตรากระจายยาจาก compartment 1 เข้าสู่ compartment 2 และจาก compartment 2 เข้าสู่ compartment 1 ตามลำดับ; † = ปริมาณการกระจายยาในแต่ละ compartment โดยที่ *i* แทน 1, 2; V_1 คือปริมาตรการกระจายยาในเลือด; V_2 คือ ปริมาตรการกระจายยาใน peripheral compartment; AUC_0^∞ คือพื้นที่ใต้กราฟที่คำนวณจากสมการ regression; Vss คือ ปริมาตรการกระจายยาที่ steady state

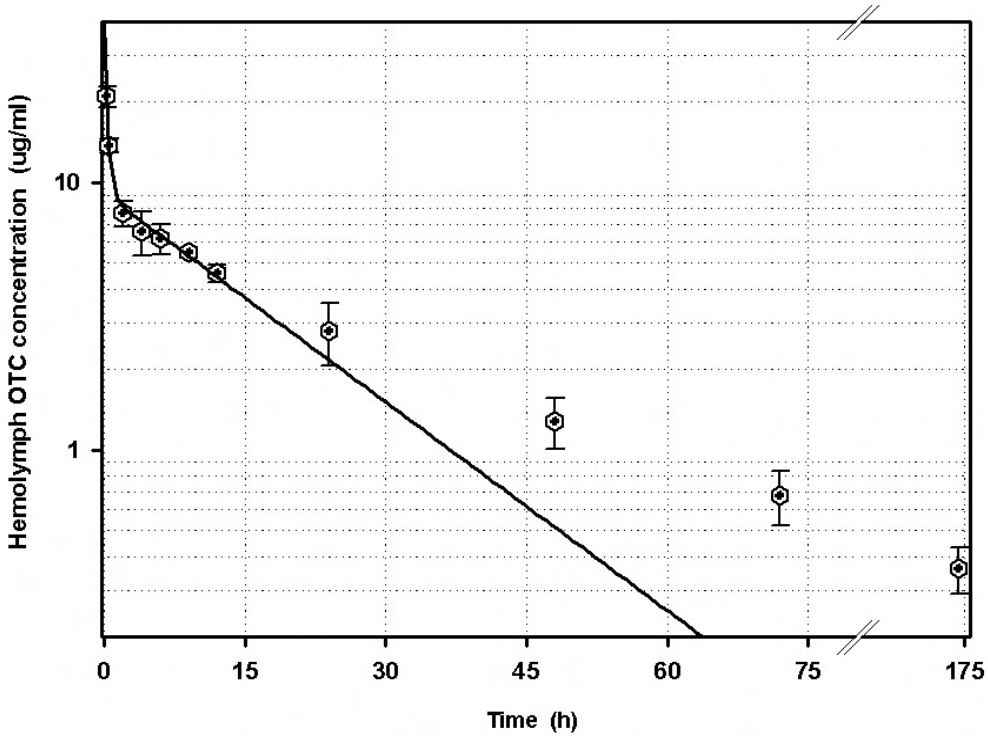
4.5.2.3 เภสัชจลนศาสตร์ของออกซีเตตราซัยคลินใน digestive gland

Digestive gland (compartment 0) (รูปที่ 16) มีค่าคงที่การกำจัดยาออกจาก digestive gland ทั้งหมดแทนด้วย k ($k = k'_0 + k'_{01}$) เมื่อยาถูกกระจายจากเลือดเข้า digestive gland และกระจายย้อนกลับเข้าสู่เลือด (compartment 1) น้อยมาก $\left(k'_{01} \approx 0\right)$ ทำให้ $k'_0 = k$ มีสมการแสดงความสัมพันธ์ของยาใน digestive gland เป็นดังสมการที่ 3

(3) $$C'_0(t) = \frac{x_0}{V'_0}.k'_{10}t.e^{-k.t}$$

ซึ่ง k คือค่าคงที่อัตราการกำจัดยาออกจาก digestive gland และ k'_{10} คือค่าคงที่อัตราการกระจายยาจากเลือดเข้าสู่ digestive gland โดยพิจารณาที่สภาวะซึ่งมีอัตราการกำจัดยาสูงสุด ($k'_{10} = k$) และ V'_0 คือ ปริมาตรการกระจายยาใน digestive gland ตามลำดับ (Rescigno, 2004)

หลังจากทำ non-linear regressions ระหว่างความเข้มข้นของยาใน digestive gland และเวลา ตามสมการที่ 3 (รูปที่ 17) correlation coefficient เท่ากับ 0.8866 Estimates ± standard error ของค่า k'_{10} หรือ k, V'_0 และ AUC_0^{∞} มีค่าเท่ากับ 0.1116±0.0132 ต่อชั่วโมง 0.1387±0.0097 มิลลิลิตรต่อกรัมน้ำหนักตัว และ 646.67±89.95 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนค่า coefficients of variation (%CV) ของค่า k, V'_0 และ AUC_0^{∞} มีค่าเท่ากับ 11.84, 6.96 และ 13.91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

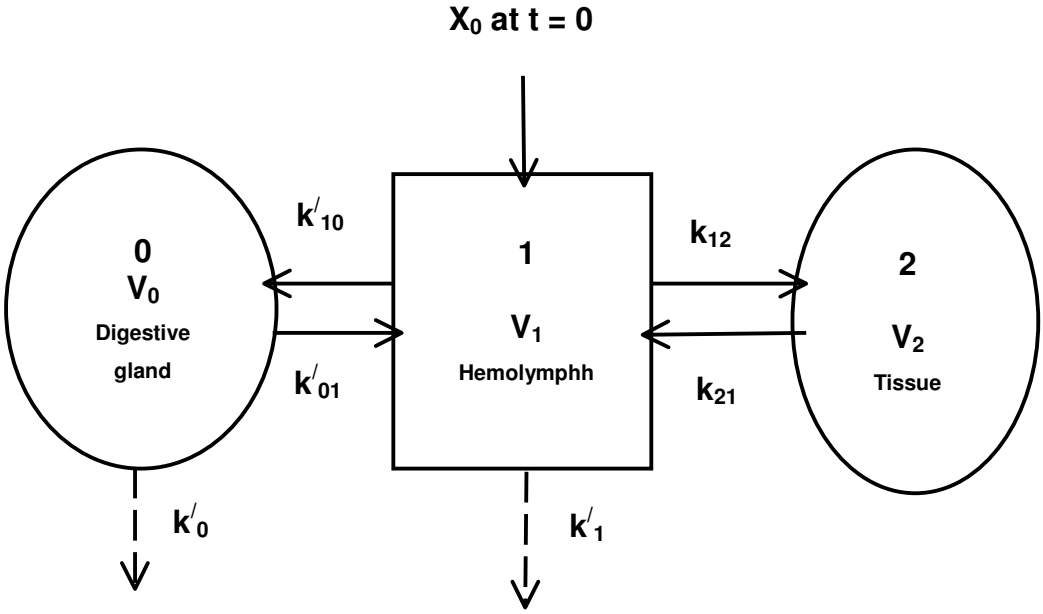


รูปที่ 18 Non-linear regressions ของออกซีเตตราซัยคลินใน hemolymph แบบ two-compartment open model หลังให้ยาผ่านแอ่งเลือด

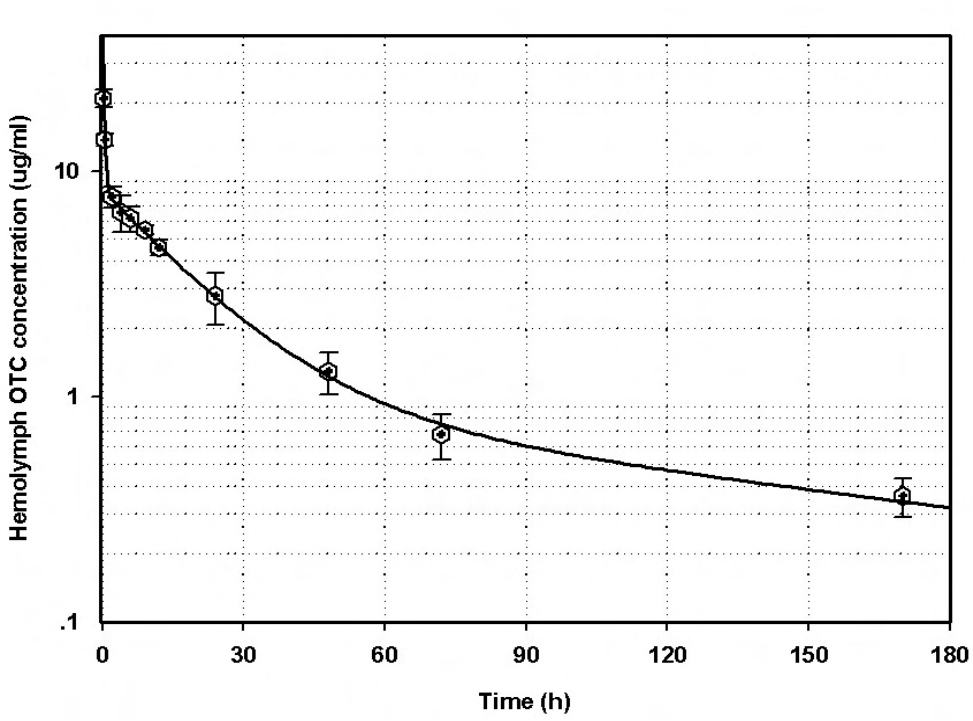
4.5.2.4 เภสัชจลนศาสตร์แบบ three-compartment open model ของออกซีเตตราซัยคลินใน hemolymph หลังให้ยาผ่านแอ่งเลือด

ใช้แบบจำลองทางเภสัชจลนศาสตร์เป็น three-compartment open model ซึ่งให้ยาเข้ากระแสเลือดโดยตรง (Single-bolus administration) แบบจำลองดังกล่าวกำหนดให้เลือดเป็น compartment 1 (central compartment) กล้ามเนื้อเป็น compartment 2 (Peripheral compartment) และ digestive gland เป็น compartment 0 ตามลำดับ (พิจารณารูปที่ 19 ประกอบ) ทำ non-linear regression หาสมการอธิบายความสัมพันธ์ของยาในเลือดกับเวลา สมการที่ 4 (พิจารณารูปที่ 20 ประกอบ) และคำนวณเภสัชจลนศาสตร์พารามิเตอร์ดังแสดงในตารางที่ 8

(4) $$C_1(t) = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t} + Ge^{-\gamma t}$$



รูปที่ 19 แบบจำลองทางเภสัชจลนศาสตร์ three-compartment open model ของการไหลเวียนออกซีเตตราซัยคลินหลังให้ยาผ่านแอ่งเลือด โดย k_{12} และ k_{21} คือค่าคงที่อัตรากระจายยาจาก compartment 1 เข้าสู่ compartment 2 และจาก compartment 2 เข้าสู่ compartment 1 ตามลำดับ; k'_{10} คือค่าคงที่การกระจายยาจาก compartment 1 เข้าสู่ compartment 0; k'_{01} คือค่าคงที่การกระจายยาจาก compartment 0 เข้าสู่ compartment 1; V_0, V_1 และ V_2 คือปริมาตรการกระจายยา compartment 0, compartment 1และ compartment 2 ตามลำดับ; k'_0 คือค่าคงที่อัตราการกำจัดยาออกจาก compartment 0; k'_1 คือค่าคงที่อัตราการกำจัดยาออกจาก compartment 1.



รูปที่ 20 Non-linear regressions ของออกซีเตตราซัยคลินใน hemolymph แบบ three-compartment open model หลังได้รับยาทางแอ่งเลือด

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบเภสัชจลนศาสตร์พารามิเตอร์ของ two-compartment open model และ three-compartment open model หลังจากให้ยาออกซีเตตราซัยคลิน ขนาด 10 µg/g-body weight เข้าแอ่งเลือดกุ้งขาวแวนนาไม

พารามิเตอร์	□*two-compartment* *ค่าเฉลี่ย±S.E.*	#*three-compartmentค่า* *เฉลี่ย±S.E.*	†**P-value** **(t-comparison)**
α (h^{-1})	3.1583± 0.2089	3.2647± 0.1347	0.674
β (h^{-1})	0.0422 ± 0.0031	0.0555± 0.0064	0.078
γ (h^{-1})	-	*0.0061± 0.0055	-
$\ddot{A}$ (µg/L)	28.9108 ± 1.7104	29.0584± 1.0519	0.942
B (µg/L)	7.9817 ± 0.2224	7.3234± 0.5155	0.256
G (µg/L)	-	*0.9599± 0.5682	-
k_{12} (h^{-1})	2.2980 ± 0.1785	2.3417± 0.1835	0.782
k_{21} (h^{-1})	0.7164 ± 0.0354	0.7860± 0.0403	0.087

α, β คือ ค่าคงที่อัตราการกระจายยาออกจากเลือด และ γ คือ ค่าคงที่อัตราการกำจัดยาออกจากเลือด; A, B และ G คือ จุดตัดแกน Y ของ α, β และ γ ตามลำดับ; k_{12} และ k_{21} คือค่าคงที่อัตรากระจายยาจาก compartment 1 เข้าสู่ compartment 2 และจาก compartment 2 เข้าสู่ compartment 1 ตามลำดับ

‡ Non-linear regression ตามสมการ $C_1(t) = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$ มีค่า correlation coefficient = 0.9991

Non-linear regression ตามสมการ $C_1(t) = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t} + Ge^{-\gamma t}$

มีค่า correlation coefficient = 0.9994

† P-value ของ statistical t-test ระหว่าง α , β , $\ddot{A}$, B ของ two-compartment และ three-compartment

* ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับ 0 (t-test)

4.5.3 การไหลเวียนของยาออกซีเตตราซัยคลินใน hemolymph, digestive gland และกล้ามเนื้อ หลังจากป้อนยาผสมอาหารให้กุ้งกิน

หลังจากกุ้งได้รับยาโดยป้อนยาผสมอาหารในขนาด 50 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักกุ้ง พบว่าระดับยาใน hemolymph เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและเพิ่มขึ้นสูงสุด ที่เวลา 6 ชั่วโมงหลังจากได้รับยา ที่ความเข้มข้นเฉลี่ย 41.489±8.149 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และหลังจากนั้นระดับยาลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 24 แล้วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ถึง 72 นั้นระดับยาค่อยๆลดลงจนกระทั่งในชั่วโมงที่ 72 ถึง 336 ระดับยาลดลงช้ามาก และไม่สามารถตรวจวัดปริมาณยาได้หลังจากได้รับยาแล้ว 504 ชั่วโมง (ดังแสดงในตารางที่ 9 และรูปที่ 21)

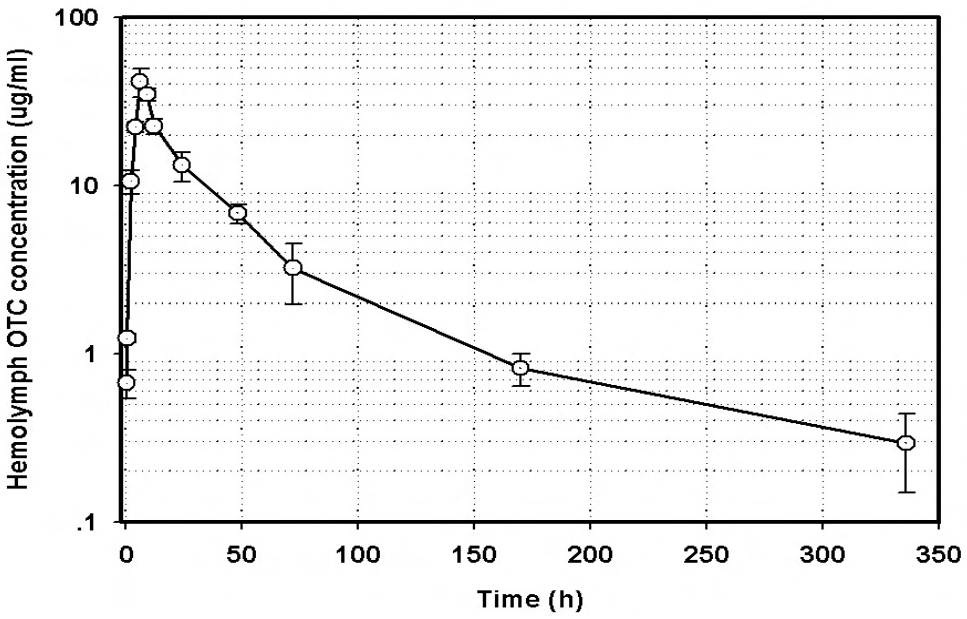
ระดับของยาในกล้ามเนื้อกุ้ง หลังจากได้รับยาพบว่าค่อยๆเพิ่มสูงขึ้นในอัตราที่ช้ากว่าใน hemolymph และ digestive gland ระดับยาสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 (20.627±1.721ไมโครกรัมต่อกรัม) หลังจากได้รับยา จากนั้นระดับยาค่อยๆลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 72 และจนถึงชั่วโมงที่ 336 ระดับยาค่อยๆลดลงอย่างช้ามาก จนไม่สามารถตรวจวัดปริมาณยาได้ ในชั่วโมงที่ 504 (ดังแสดงในตารางที่ 9 และรูปที่ 22)

ระดับของยาใน digestive gland เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วมาก ระดับยาเพิ่มสูงสุดในชั่วโมงที่ 2 (1149.318±145.308 ไมโครกรัมต่อกรัม) หลังจากได้รับยา แล้วระดับยาลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 12 และระดับยาใน digestive gland ลดลงอย่างช้าๆ จนถึงชั่วโมงที่ 72 จนถึงชั่วโมงที่ 336 ระดับยาลดลงช้ามาก จนไม่สามารถตรวจวัดปริมาณยาได้ในชั่วโมงที่ 504 หลังจากได้รับยา (ดังแสดงในตารางที่ 9 และรูปที่ 23)

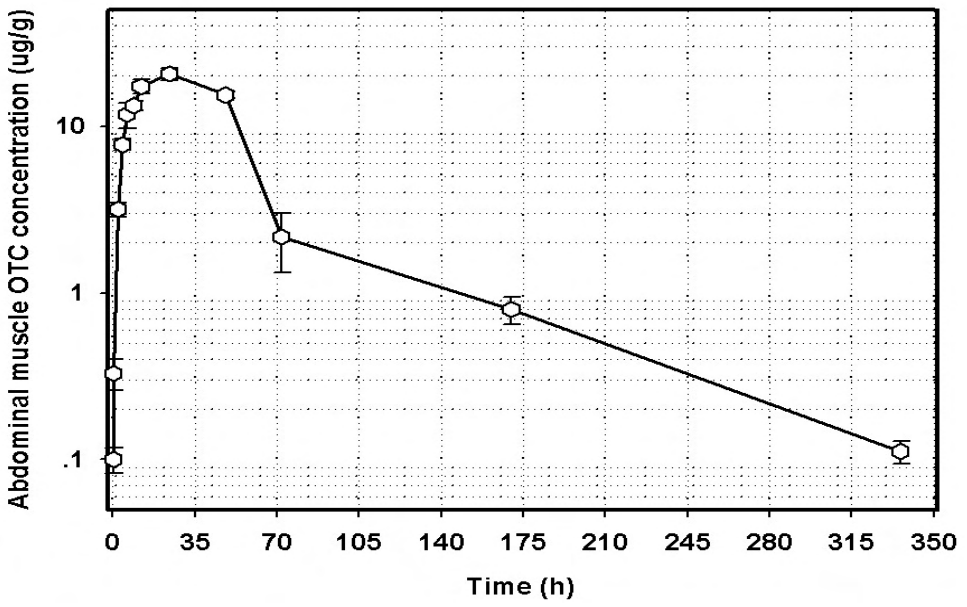
ตารางที่ 9 ระดับของออกซีเตตราซัยคลินใน hemolymph, กล้ามเนื้อ และdigestive gland หลังป้อนยาผสมอาหาร (ค่าเฉลี่ย±S.D.)

เวลา (ชั่วโมง)	*ความเข้มข้นของ OTC ใน hemolymph (µg/ml)*	*ความเข้มข้นของ OTC ในกล้ามเนื้อ (µg/g)*	**ความเข้มข้นของ OTC ใน digestive gland (µg/g)**
0.25	0.670±0.130	0.100±0.017	293.307±55.118
0.50	1.233±0.067	0.329±0.068	550.153±44.288
2.00	10.588±1.756	3.173±0.305	1149.318±145.308
4.00	22.273±1.492	7.745±0.610	865.126±175.785
6.00	41.489±8.149	11.767±2.019	634.813±61.777
9.00	34.754±2.949	13.262±0.929	463.585±90.695
12.00	22.510±2.377	17.349±1.657	281.993±27.795
24.00	13.202±2.636	20.627±1.721	110.566±17.890
48.00	6.835±0.909	15.372±0.760	39.228±15.389
72.00	3.231±1.263	2.169±0.819	4.327±0.667
170.00	0.819±0.181	0.797±0.147	2.814±0.865
336.00	0.293±0.144	0.112±0.017	0.819±0.148
504.00	nd	nd	nd

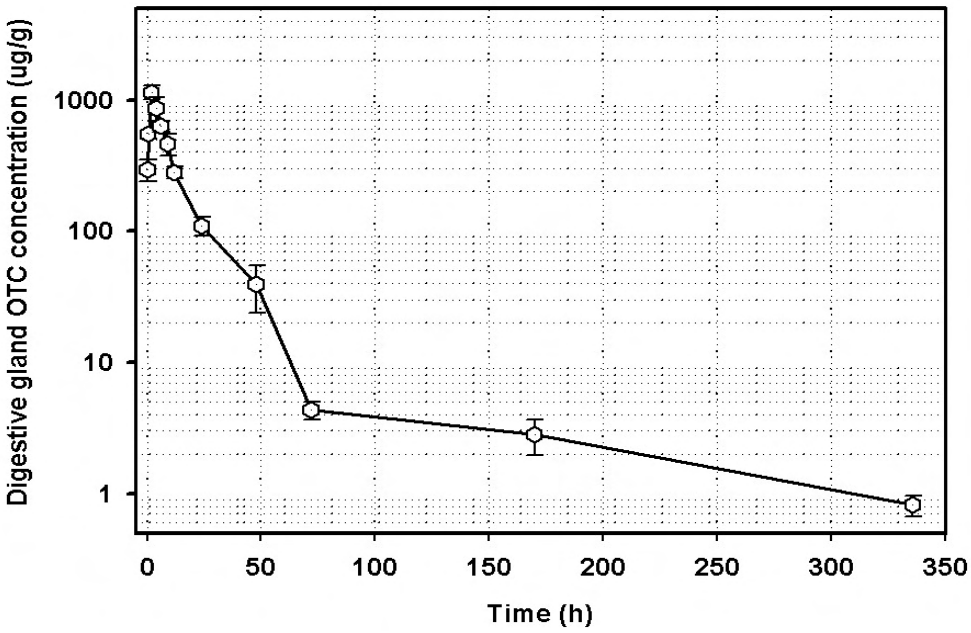
nd = ไม่สามารถตรวจวัดได้



รูปที่ 21 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินใน hemolymph กับเวลาหลังจากการป้อนยาผสมอาหาร



รูปที่ 22 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินในกล้ามเนื้อกับเวลาหลังจากป้อนยาผสมอาหารให้กิน



รูปที่ 23 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินใน digestive gland กับเวลาหลังจากป้อนยาผสมอาหารให้กิน

4.5.4 เภสัชจลนศาสตร์และชีวประโยชน์ของออกซีเตตราซัยคลินหลังป้อนยาผสมอาหาร

4.5.4.1 เภสัชจลนศาสตร์แบบ non-compartment model ของออกซีเตตราซัยคลิน ใน hemolymph, กล้ามเนื้อ และ digestive gland โดยป้อนยาผสมอาหารให้กิน

เภสัชจลนศาสตร์ของออกซีเตตราซัยคลินแบบ non-compartment ยามีความเข้มข้นสูงสุดที่ digestive gland และความเข้มข้นของยาเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ digestive gland ตามด้วย hemolymph และกล้ามเนื้อ ที่เวลา 2, 6 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ ค่าเฉลี่ยครึ่งชีวิตการดูดซึมยาเข้า hemolymph เท่ากับ 0.575 ชั่วโมง ค่าครึ่งชีวิตการขับยาออกจากแต่ละอวัยวะพบว่าต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ปริมาณยาส่วนใหญ่อยู่ใน digestive gland (พิจารณาจากค่า AUC_0^∞) มากกว่าในกล้ามเนื้อและ hemolymph อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ยากระจายผ่าน digestive gland เร็วกว่ากล้ามเนื้อและ hemolymph อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 10

4.5.4.2 เภสัชจลนศาสตร์แบบ two-compartment open model ของออกซีเตตราซัยคลิน ใน hemolymph หลังป้อนยาผสมอาหารให้กิน

เภสัชจลนศาสตร์หลังป้อนยาผสมอาหารให้กุ้งกิน มีแบบจำลองเภสัชจลนศาสตร์เป็น two-compartment open model (พิจารณารูปที่ 24 ประกอบ) โดยเข้าสมการ exponential โดยวิธี non-linear regression ตามสมการที่ 5 (พิจารณาภาคผนวก ข ประกอบ)

(5) $$C_1(t) = C'e^{-k_a t} + Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$$

แต่ผลการทดลองให้ค่า correlation coefficient ที่ต่ำ และค่า standard error สูงมาก จึงกำหนดค่าคงที่อัตราการกระจายยา (α)และกำจัดยา (β) ตามผลการทดลองเภสัชจลนศาสตร์การให้ยาเข้าแอ่งเลือด แล้วเข้าสมการ exponential ตามสมการที่ 10 (แสดงในรูปที่ 25) พบว่าให้ค่า correlation coefficient เท่ากับ 0.7068 และคำนวณพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ ตามวิธีของ Gorski (2005) ดังแสดงในตารางที่ 11 โดยค่าคงที่ต่างๆของ oral two-compartment open model มีความสัมพันธ์กันดังสมการที่ 6-7 (พิจารณาภาคผนวก ข ประกอบ)

(6) $$\alpha + \beta = k_{21} + k_{12} + k_{10}$$

(7) $$\alpha * \beta = k_{21} + k_{10}$$

ตารางที่ 10 เภสัชจลนศาสตร์พารามิเตอร์ของ non-compartment pharmacokinetics model ที่บริหารยาโดยป้อนยาผสมอาหารให้กุ้งกิน (ค่าเฉลี่ย ± S.D., n=3)

พารามิเตอร์	*Hemolymph*	*กล้ามเนื้อ*	**Digestive gland**
[1] C_{max} (µg/ml or µg/g)	[@]41.49± 8.15	[‡]20.63 ±1.72)	[*]1149.31± 145.30
[2] T_{max} (h)	6.00	24.00	2.00
[3] λ (h^{-1})	0.0090 ± 0.0038	0.0110± 0.0027	0.0064 ± 0.0003
[4] $t_{0.5}^{\lambda}$ (h)	[@]91.90 ± 51.50	[‡]66.29 ± 19.55	[*] 107.88± 5.20
[5] AUC_0^{336} (µg.h/ml)	1122.25 ± 29.28	1207.83 ± 35.42	13024.18 ± 770.31
[6] AUC_0^{∞} (µg.h/ml)	1154.80 ± 29.80	1218. 01± 35.34	[*]13151. 94 ± 794.32
Mean $\frac{AUC_0^{336}}{AUC_0^{\infty}}$	0.9718	0.9916	0.9902
[7] $T_{transit}$ (h)	71.50 ± 27.97	52.25 ± 3.83	[*]24.30 ± 3.26

[*,@,‡] ค่าเฉลี่ยที่มีเครื่องหมายต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

[1] ความเข้มข้นยาสูงสุด (Maximun level)

[2] เวลาที่ความเข้มข้นยาสูงสุด (Time at maximum level)

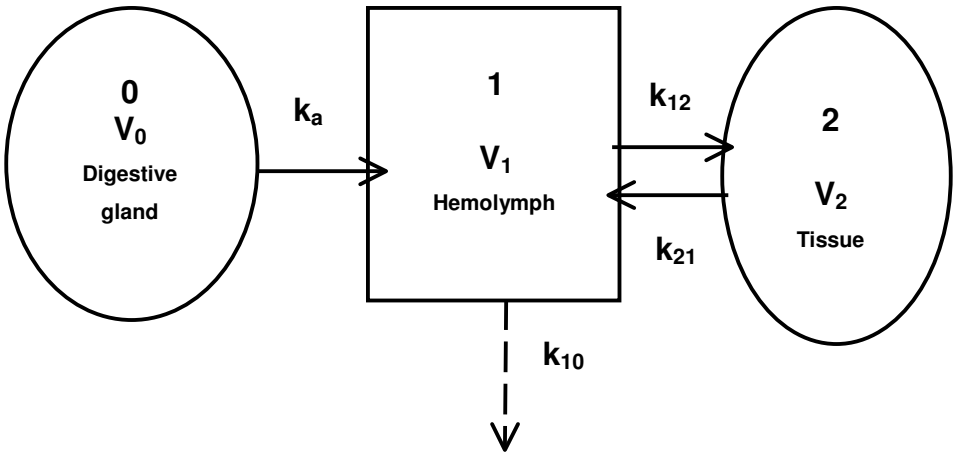
[3] ค่าความชันของ terminal phase (n=3)

[4] ค่าครึ่งชีวิตการขับยาออกจากแต่ละอวัยวะ (The half-life of disposal from shrimp's body)

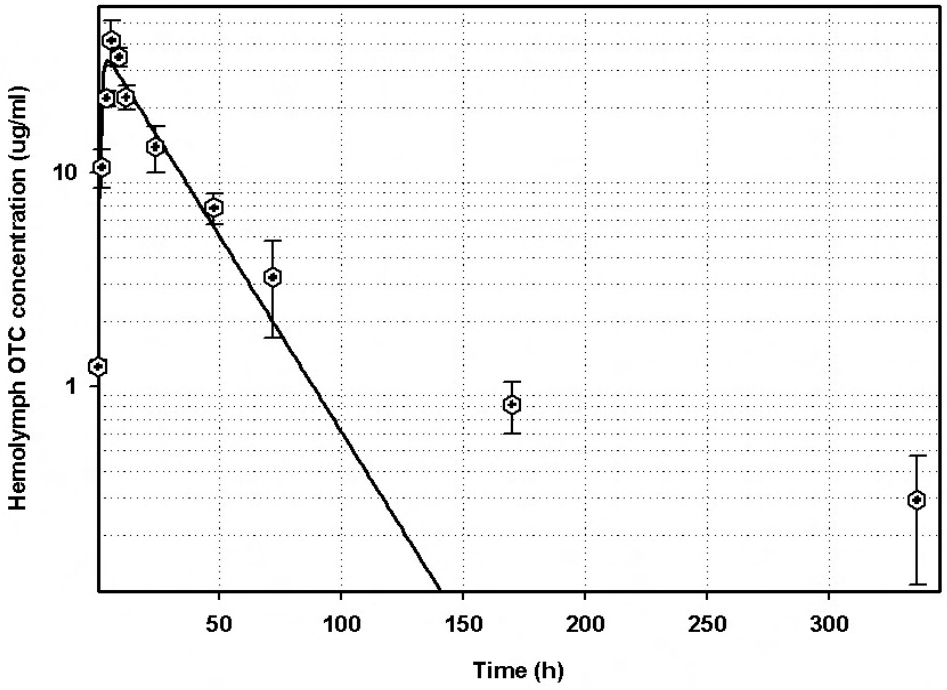
[5] พื้นที่ใต้กราฟระหว่างความเข้นของยากับเวลาตั้งแต่ 0 ถึง 336 ชั่วโมง

[6] พื้นที่ใต้กราฟระหว่างความเข้นของยากับเวลา 0 ถึง ∞ ชั่วโมง

[7] Mean transit time: $T_{transit} = \frac{AUMC_0^{\infty}}{AUC_0^{\infty}}$ โดย $AUMC$ คือ Area under the moment curve



รูปที่ 24 แบบจำลองทางเภสัชจลนศาสตร์ oral two-compartment open model ของการกระจายออกซีเตตราซัยคลิน หลังบริหารยาโดยป้อนยาผสมอาหารให้กุ้งกิน จากรูป k_a คือค่าคงที่อัตราการดูดซึม; k_{12} และ k_{21} คือค่าคงที่อัตรากระจายยาจาก compartment 1 เข้าสู่ compartment 2 และจาก compartment 2 เข้าสู่ compartment 1 ตามลำดับ; k_{10} คือค่าคงที่อัตราการกำจัดยาออกจาก compartment 1; V_1 และ V_2 คือปริมาตรการกระจายยาใน compartment 1 และ compartment 2 ตามลำดับ



รูปที่ 25 Non-linear regressions ของ oral two-compartment open model ของออกซีเตตราซัยคลิน ใน hemolymph หลังป้อนยาผสมอาหารให้กิน

ตารางที่ 11 เภสัชจลนศาสตร์พารามิเตอร์และชีวประโยชน์ของยาออกซีเตตราซัยคลิน แบบ oral two-compartment open model หลังกินยาผสมอาหารขนาด 50 μg/g body weight กุ้งขาวแวนนาไม

พารามิเตอร์	**ค่าเฉลี่ย ±S.E. (n=3)**
A (μg/ml)	112.5288± 34.2466
B (μg/ml)	38.6266 ±2.5765
$C^{/}$ (μg/ml)	-112.0806± 19.1010
Ka (h^{-1})	1.0629 ±0.3302
□ (h^{-1})	3.1583 ±0.2089
□ (h^{-1})	0.0422 ± 0.0031
k_{12} (h^{-1})	2.2527
k_{21} (h^{-1})	0.7757
k_{10} (h^{-1})	0.1718
Absorption half-life (h)	0.6519
Disposition half-life (h)	16.4218
Elimination half-life (h)	4.0337
Distribution half-life (h)	0.2194
Bioavailability (F; %)	$^{\#}$80.6200± 2.5400 *85.3225
V_1 (ml/g)	0.1390
AUC_0^{∞}	$^{\#}$1154.8000±29.8000 *845.5038

A ,B และ$C^{/}$, คือ จุดตัดแกน Y ของการกระจายยา การกำจัดยาและการดูดซึมยาตามลำดับ; *Ka* คือ ค่าคงที่อัตราการดูดซึมยา ; α, β คือ ค่าคงที่อัตราการกระจายยาและกำจัดยาออกจากเลือดตามลำดับ; k_{12} และ k_{21} คือค่าคงที่อัตรากระจายยาจาก compartment 1 เข้าสู่ compartment 2 และจาก compartment 2 เข้าสู่ compartment 1 ตามลำดับ; k_{10} คือค่าคงที่อัตราการกำจัดยาออกจาก compartment 1; F คือค่าชีวประโยชน์; V_1 คือปริมาตรการกระจายยาใน compartment 1; AUC_0^{∞} คือพื้นที่ใต้กราฟ; *,$^{\#}$ ค่าที่คำนวณจากสมการ regression และพื้นที่ใต้กราฟจริง (trapezoidal rule) ตามลำดับ

4.5.4.3 เภสัชจลนศาสตร์แบบ three-compartment open model ของออกซีเตตราซัยคลิน ใน hemolymph หลังป้อนยาผสมอาหารให้กิน

เภสัชจลนศาสตร์ของการป้อนยาผสมอาหารให้กุ้งกิน มีแบบจำลองเภสัชจลนศาสตร์แบบ oral three-compartment open model (พิจารณารูปที่ 26 ประกอบ) โดยเข้าสมการ exponential ตามสมการที่ 5 โดยวิธี non-linear regression ผลการทดลองให้ค่า correlation coefficient ที่ต่ำ และค่า standards error สูงมาก จึงได้กำหนดค่า α , β และ γ ตามผลการทดลองเภสัชจลนศาสตร์การให้ยาเข้าแอ่งเลือดแบบ three-compartment open model แล้วเข้าสมการ exponential ตามสมการที่ 8 (แสดงในรูปที่ 27) พบว่าให้ค่า correlation coefficient เท่ากับ 0.9538 และคำนวณพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ ตามวิธีของ Wagner (1993) ดังแสดงในตารางที่ 12

(8) $$C_1(t) = \frac{FDk_{02}k_{21}}{V_1}\left[\frac{(k_{31}-\alpha)e^{-\alpha t}}{(\beta-\alpha)(\gamma-\alpha)(k_{02}-\alpha)} + \frac{(k_{31}-\beta)e^{-\beta t}}{(\alpha-\beta)(\gamma-\beta)(k_{02}-\beta)}\right.$$

$$\left. + \frac{(k_{31}-\gamma)e^{-\gamma t}}{(\alpha-\gamma)(\beta-\gamma)(k_{02}-\gamma)} + \frac{(k_{31}-k_{02})e^{-k_{02}t}}{(\alpha-k_{02})(\beta-k_{02})(\gamma-k_{02})}\right]$$

โดยค่าคงที่ต่างๆของ oral three-compartment open model มีความสัมพันธ์กันดังสมการที่ 9-16

(9) $$K_2 + K_3 = \frac{A}{A+B+G}(\gamma-\alpha) + \frac{B}{A+B+G}(\gamma-\beta) + \alpha + \beta$$

(10) $$K_2K_3 = \beta\left[\frac{A}{A+B+G}(\gamma-\alpha) + \frac{B}{A+B+C}(\gamma-\beta) + \alpha\right] + \frac{B}{A+B+G}(\alpha-\beta)(\gamma-\beta)$$

(11) $$K_2 + K_2 + K_3 = \alpha + \beta + \gamma$$

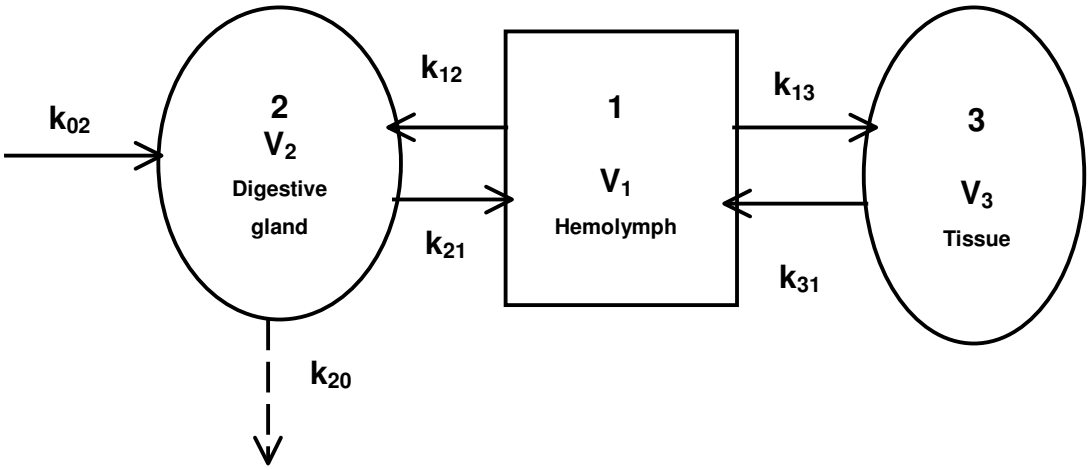
(12) $$K_1K_2 + K_2K_3 + K_1K_3 - k_{12}k_{21} - k_{13}k_{31} = \alpha\beta + \beta\gamma + \alpha\gamma$$

(13) $$K_1K_2K_3 - k_{12}k_{21}K_3 - k_{13}k_{31}K_2 = \alpha + \beta + \gamma$$

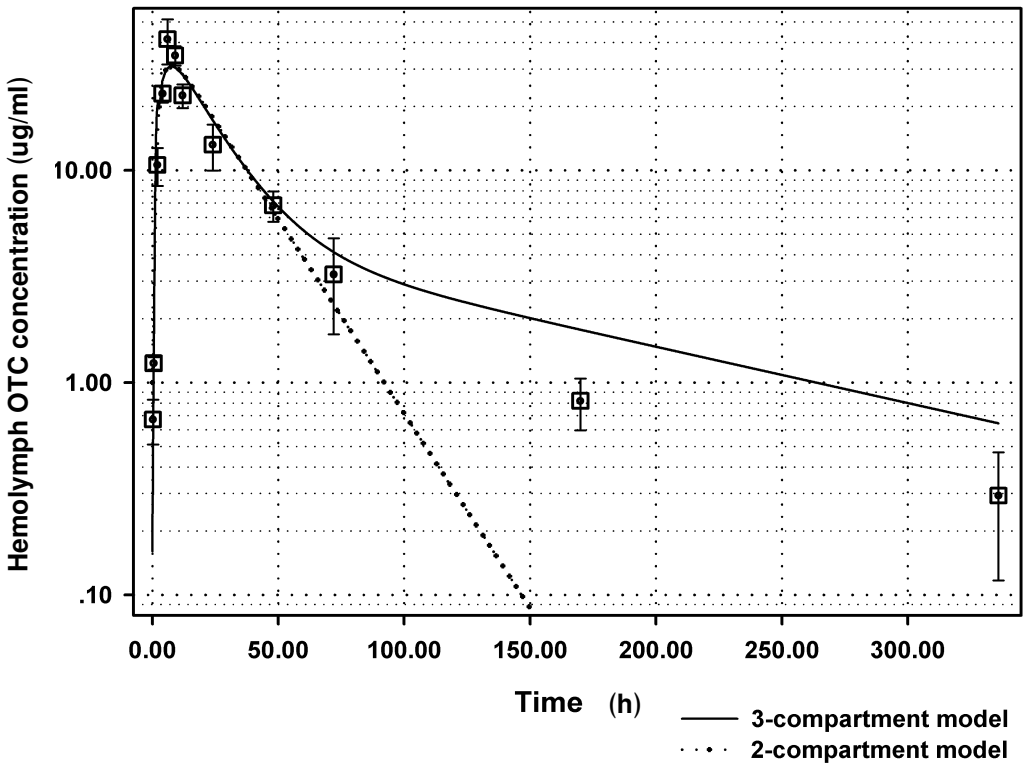
(14) $$K_1 = k_{12} + k_{13}$$

(15) $$K_2 = k_{20} + k_{21}$$

(16) $$K_3 = k_{31}$$



รูปที่ 26 แบบจำลองทางเภสัชจลนศาสตร์ oral three-compartment open model ของการไหลเวียนออกซีเตตราซัยคลินหลังจากกุ้งกินยาผสมอาหาร โดยที่ k_{12} และ k_{21} คือค่าคงที่อัตราการกระจายยาจาก compartment 1 เข้าสู่ compartment 2 และจาก compartment 2 เข้าสู่ compartment 1 ตามลำดับ; k_{13} คือค่าคงที่การกระจายยาจาก compartment 1 เข้าสู่ compartment 3; k_{31} คือค่าคงที่การกระจายยาจาก compartment 3 เข้าสู่ compartment 1; k_{20} คือค่าคงที่อัตราการกำจัดยาออกจาก compartment 2; k_{02} คือค่าคงที่อัตราการดูดซึมยา; V_1, V_2 และ V_3 คือปริมาตรการกระจายยา compartment 1, compartment 2 และ compartment 3 ตามลำดับ



รูปที่ 27 Non-linear regressions ของ oral two-compartment open model และ oral three-compartment open model ของออกซีเตตราซัยคลินใน hemolymph หลังป้อนยาผสมอาหารให้กิน

ตารางที่12 เภสัชจลนศาสตร์พารามิเตอร์ของยาออกซีเตตราซัยคลิน แบบ oral three-compartment open model หลังกินยาผสมอาหารขนาด 50 μg/g body weight กุ้งขาวแวนนาไม

พารามิเตอร์	**ค่าเฉลี่ย ± S.E. (n=3)**
α (h^{-1})	3.2647 ± 0.1347
β (h^{-1})	0.0555 ± 0.0064
γ (h^{-1})	0.0061 ± 0.0055
K_1 (h^{-1})	2.5515 ± 0.1354
K_2 (h^{-1})	0.7860 ± 0.0109
K_3 (h^{-1})	0.0116 ± 0.0006
k_{12} (h^{-1})	2.4617 ± 0.1330
k_{21} (h^{-1})	0.0899 ± 0.0254
k_{13} (h^{-1})	0.0388 ± 0.0025
k_{31} (h^{-1})	0.7244 ± 0.0106
k_{20} (h^{-1})	0.0116 ± 0.0006
k_{02} (h^{-1})	0.2986 ± 0.0452
V_1 (ml/g)	0.2678 ± 0.0020

α, β คือค่างที่อัตราการกระจายยาในเฟสที่ 1 และ 2 ตามลำดับ; γ ค่าคงที่อัตราการกำจัดยา; K_1, K_2, K_3 คือค่าคงที่อัตราการกระจายยาทั้งหมดที่ออกจาก compartment ที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ; k_{12} และ k_{21} คือค่าคงที่อัตรากระจายยาจาก compartment 1 เข้าสู่ compartment 2 และจาก compartment 2 เข้าสู่ compartment 1; k_{13} คือค่าคงที่การกระจายยาจาก compartment 1 เข้าสู่ compartment 3; k_{31} คือค่าคงที่การกระจายยาจาก compartment 3 เข้าสู่ compartment 1; k_{20} คือค่าคงที่อัตราการกำจัดยาออกจาก compartment 2; k_{02} คือค่าคงที่อัตราการดูดซึมยา, V_1 คือปริมาตรการกระจายยาที่ compartment 1

4.5.5 การจับตัวของออกซีเตตราซัยคลินกับโปรตีนใน hemolymph

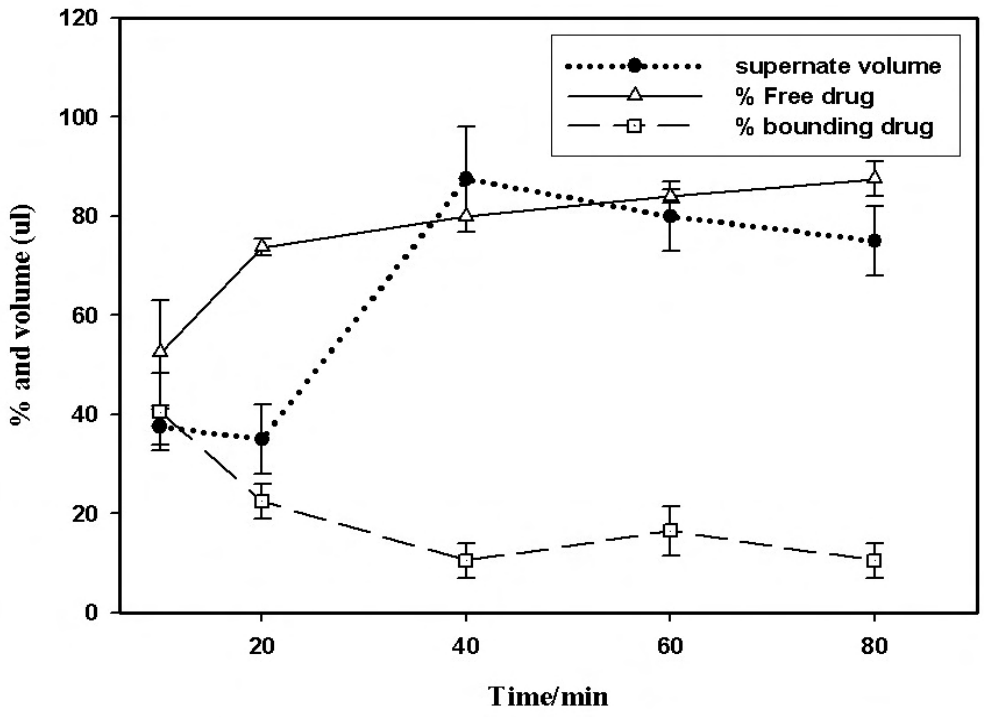
การจับตัวของออกซีเตตราซัยคลินกับโปรตีนใน hemolymph ที่ทำการศึกษาในหลอดทดลองนั้นพบว่ายาส่วนใหญ่มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในรูปอิสระซึ่งมีเพียง 11 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่ถูกจับเอาไว้ด้วยโปรตีนที่มีขนาดใหญ่กว่า 10,000 ดาลตัน แต่จากการทดลองเบื้องต้นนั้นพบว่ายาประมาณ 6 เปอร์เซ็นต์ ถูกจับเอาไว้โดยกระดาษกรอง

การทดลองจากตัวอย่าง hemolymph ในหลอดทดลองพบว่าปริมาณยาอิสระที่วัดได้ขึ้นอยู่กับเวลาในการหมุนเหวี่ยง ยาจะอยู่ในรูปที่ไม่เป็นอิสระ (bounding drug) มากที่สุดที่เวลา 10 นาที (41.37± 7.89 เปอร์เซ็นต์) น้อยที่สุดที่เวลา 80 นาที (11.08 ± 3.40 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 13 และรูปที่ 28)

การทดลองจากตัวอย่าง hemolymph ที่เก็บหลังจากกุ้งถูกป้อนยา 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าที่เวลา 6 ชั่วโมง hemolymph มีปริมาณยาในรูปอิสระมากที่สุด (82.86 ± 11.41 เปอร์เซ็นต์) ปริมาณยาที่ถูกจับไว้โดยโปรตีน 18.54 ± 10.16 เปอร์เซ็นต์ แต่ในชั่วโมงที่ 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ยา 19.28-25.06 เปอร์เซ็นต์ ถูกจับไว้ด้วยโปรตีน และ 75.03-78.84 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในรูปอิสระ ดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 13 การจับตัวของออกซีเตตราซัยคลินกับโปรตีนใน hemolymph กุ้งขาวแวนนาไม ในหลอดทดลอง (ค่าเฉลี่ย ± S.D., n=2)

เวลาหมุนเหวี่ยง (นาที)	*ปริมาตรส่วนใส (ไมโครลิตร)*	*ปริมาณยาอิสระ (%)*	**ปริมาณยาที่ถูกจับไว้ (%)**
10	37.50 ± 3.53	53.37 ± 10.45	41.37± 7.89
20	35.00 ± 7.07	73.80 ± 1.75	23.42 ± 3.45
40	87.50 ± 10.60	85.60 ± 6.56	11.10 ± 3.46
60	80.00 ± 7.07	84.91 ± 1.50	17.21 ± 3.81
80	75.00 ± 7.07	88.15 ± 3.24	11.08 ± 3.40



รูปที่ 28 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่หมุนเหวี่ยงกับ supernatant volume, % Free drug และ % bounding drug และปริมาตรส่วนใส

ตารางที่ 14 การจับตัวของออกซีเตตราซัยคลินกับโปรตีนใน hemolymph กุ้งขาวแวนนาไม ในตัวกุ้ง (ค่าเฉลี่ย ± S.D., n=3)

เวลา (ชั่วโมง)	*ปริมาตรส่วนใส (ไมโครลิตร)*	*ปริมาณยาอิสระ (%)*	**ปริมาณยาที่ถูกจับไว้ (%)**
6	81.33 ± 10.18	82.86 ± 11.41	18.54 ± 10.16
12	85.33 ± 15.57	75.03 ± 10.17	23.28 ± 9.68
24	81.33 ± 15.51	75.14 ± 12.52	25.06 ± 8.95
48	86.33 ± 14.51	78.84 ± 10.49	19.28 ± 9.14

4.6 วิจารณ์ผลการทดลอง

เภสัชจลนศาสตร์ของยาออกซีเตตราซัยคลินโดยการฉีดยาผ่านแอ่งเลือด (intra-sinus) เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในการศึกษาในกุ้งทะเล (Reed et al., 2004; Uno, 2004; Uno et al., 2005) แต่ใน American lobster (*Homarus americanus)* ให้ยาโดยฉีดยาเข้าแอ่งเลือดรอบหัวใจ (pericardium) (Li and James, 2000) วัตถุประสงค์หลักของการศึกษาของการให้ยาเข้ากระแสเลือดคือต้องการทราบจลนศาสตร์ของยาโดยไม่ผ่านการดูดซึม แต่เนื่องจากกุ้งกับสัตว์มีกระดูกสันหลังนั้นมีระบบการไหลเวียนเลือดที่ต่างกัน การไหลเวียนเลือดในกุ้งนั้นเร็วกว่าสัตว์มีกระดูกสันหลังมาก (Dall et al., 1990) และเป็นระบบเปิดทำให้เลือดที่เข้าแอ่งเลือดถูกกระจายเข้าสู่หัวใจและอวัยวะอื่นๆอย่างรวดเร็ว เพื่อให้ยาทั้งหมดอยู่ในเลือดก่อนกระจายไปยังอวัยวะต่างๆ ในกุ้ง Lobster จึงฉีดยาเข้าแอ่งเลือดรอบหัวใจโดยตรง แต่ในกุ้งทะเลนั้นทำได้ยากมากเพราะกุ้งทะเลมีขนาดเล็กกว่ามาก

ผลการทดลองการฉีดยาเข้าแอ่งเลือดพบว่าระดับยาในเลือดนั้นสามารแบ่งออกเป็น 3 เฟส เฟสแรกนั้นยาลดลงอย่างรวดเร็ว หมายความว่ายาเริ่มถูกขับออกจากเลือดไปยังอวัยวะอื่น หากพิจารณาระดับยาในกล้ามเนื้อพบว่าในช่วงแรกๆนั้นระดับยาเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆจนถึงจุดสูงสุดที่เวลา 6 ชั่วโมงหลังจากให้ยา ซึ่งเวลาดังกล่าวเป็นเวลาหลังจากจุดสิ้นสุดของเฟสแรก (distribution phase) ของยาในเลือด เมื่อพิจารณาใน digestive gland ระดับยาค่อยๆเพิ่มขึ้นและเพิ่มขึ้นสูงที่สุด (ชั่วโมงที่ 9 หลังจากให้ยา) หลังจากที่ยาถูกขับออกจากกล้ามเนื้อ (elimination phase) เมื่อพิจารณา oral three-compartment model พบว่า $\frac{k_{13}}{k_{31}}$ (7.75) มากกว่า $\frac{k_{12}}{k_{21}}$ (3.23) แสดงให้เห็นว่ายากระจายจาก hemolymph เข้าสู่กล้ามเนื้อเร็วกว่ากระจายเข้าสู่ digestive gland และเมื่อพิจารณาปริมาณยารวมในแต่ละอวัยวะ (พิจารณาจากค่า AUC_0^∞ ตารางที่ 6) พบว่าปริมาณยาส่วนใหญ่อยู่ที่ digestive gland จึงมีความเป็นไปได้ที่ยาถูกส่งเข้ามาทำการเปลี่ยนรูป (biotransformation) ที่ digestive gland

การวิเคราะห์ข้อมูลเภสัชจลนศาสตร์แบบ non-compartment เป็นการลดข้อจำกัดของสมมุติฐานที่จำเป็นในการสร้างแบบจำลองแบบแบ่งส่วน วิธีนี้ทฤษฎีสถิติโมเมนต์ถูกนำมาประยุกต์ใช้ เพื่อบ่งบอกเวลาที่ยาคงอยู่ในร่างกาย (Boroujerdi, 2001) จากผลการทดลองพบว่าเมื่อยาอยู่ในกระแสเลือด ยาจะถูกกระจายเข้ากล้ามเนื้อ และ digestive gland ซึ่งเป็นอวัยวะที่ยามีความเข้มข้นสูงที่สุด และลำดับการวิ่งผ่านโดยพิจารณาเวลา ณ ความเข้มข้นสูงสุดพบว่ายาไหลจากเลือดเข้ากล้ามเนื้อและ digestive gland ตามลำดับ ยาถูกขับยาออกจากแต่ละ compartment ด้วยเวลาใกล้เคียง

กัน โดยที่ยาส่วนใหญ่อยู่ที่ digestive gland (พิจารณาจากค่า AUC_0^∞) ยากระจายผ่าน digestive gland เร็วกว่ากล้ามเนื้อและ hemolymph ทั้งที่มีปริมาณยามากกว่ามาก อาจเนื่องจากความเร็วกระแสเลือดเข้าอวัยวะดังกล่าวเร็วกว่าในกล้ามเนื้อ และ digestive gland อาจมีเอนไซม์ที่ทำลายยาอยู่

เภสัชจลนศาสตร์ของออกซีเตตราซัยคลินที่ให้ผ่านแอ่งเลือดในกุ้ง เภสัชจลนศาสตร์ใน hemolymph เป็น two-compartment model หรือ three-compartment model โดยมีจลนศาสตร์แบบfirst order kinetics (*Litopenaeus setiferus*- Reed et al., 2004: *P. japonicus*-Uno, 2004: *P. monodon*-Sangrungruang et al,. 2004; Uno et al., 2005) (พิจารณาตารางที่ 15) จากผลการทดลองครั้งนี้พิจารณาแบบจำลองเภสัชจลนศาสตร์เป็น two-compartment open model และ three-compartment open model first order kinetics ซึ่งมีการกระจายยาที่เร็ว (distribution phase) และการกำจัดยาที่ค่อยลดลงอย่างช้า (elimination phase) เมื่อพิจารณาจากกราฟความสัมพันธ์ของยาใน hemolymph กับเวลาพบว่าน่าจะเป็นแบบ three-compartment open model มากกว่าและเมื่อพิจารณาเวลาที่ความเข้มข้นของยาใน digestive gland และกล้ามเนื้อสูงสุดนั้นต่างกันถึง 3 ชั่วโมง ซึ่งน่าจะเป็น compartment ที่แยกกัน ก็ยิ่งสนับสนุนสมมุติฐานดังกล่าว เมื่อเข้าสมการ tri-exponential ของ three-compartment open model โดยทำ non linear regression มีค่า correlation coefficient เท่ากับ 0.9994 และมี α (S.E.), β (S.E.) และ γ (S.E.) เท่ากับ 3.2647 (0.1347), 0.0555 (0.0064) และ 0.0061 (0.0055) ต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งค่า α และ β นั้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \geq 0.05$) กับค่าที่ได้จาก two-compartment open model ส่วนค่า γ นั้นพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) กับ 0 จึงทำให้แบบจำลอง three-compartment open model ไม่มีนัยสำคัญ ซึ่งอาจเป็นเพราะจำนวนข้อมูลที่ได้ใน terminal phase นั้นยังมีน้อยเกินไป (มีเพียง 2 coordinates) แต่เพื่อความสมบูรณ์ของผลการทดลอง จะพิจารณาใช้ทั้ง two-compartment open model และ three-compartment open model อธิบายเภสัชจลนศาสตร์ของยาออกซีเตตราซัยคลิน โดยข้อจำกัดของ two-compartment open model นั้น คิดแต่เพียง 2 compartment ได้แก่เลือด และ tissue อื่นๆ ซึ่งไม่สอดคล้องกับข้อมูลที่ได้ของ digestive gland และกล้ามเนื้อ เพราะมี time to peak ต่างกัน จึงต้องตั้งสมมุติฐานว่าอัตราการไหลของยาจาก hemolymph เข้า digestive gland นั้นมากกว่าอัตราการไหลย้อนกลับมากทำให้ digestive gland กลายเป็น isolated compartment เพิ่มเติมจาก two-compartment model ที่เสนอ

พารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาที่ให้ผ่านแอ่งเลือดในกุ้งขาวแวนนาไมเปรียบเทียบกับกุ้งชนิดอื่นพบว่าปริมาตรการกระจายยาในเลือดมีค่าใกล้เคียงกับผลการศึกษาในกุ้งกุลาดำ (Sangrungruang et al,. 2004) แต่มากกว่าในกุ้งคุรุมา (Uno et al., 2004) ค่าครึ่งชีวิตการ

กำจัดยา ($t_{1/2}\beta$) น้อยกว่ากุ้งกุลาดำ กุ้ง *L. setiferus* (Reed et al., 2004) และกุ้งคุรุมา แต่มีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาในกุ้งกุลาดำ (Uno et al., 2005) แสดงให้เห็นว่ากุ้งขาวแวนนาไมนั้นสามารถขับยาออกจากตัวได้เร็วกว่ากุ้งชนิดอื่น ปริมาตรการกระจายยาในเลือดที่จุดสมดุล (Volume of distribution at steady-state) มากกว่าในกุ้งกุลาดำและกุ้งคุรุมา แต่น้อยกว่าในกุ้ง *L. setiferus* clearance (*CL*) ในกุ้งแวนนาไมมากกว่ากุ้งกุลาดำและกุ้งคุรุมา แสดงให้เห็นความสามารถในการกำจัดยาออกจากร่างกายของกุ้งแวนนาไมนั้นทำได้ดีกว่าในกุ้งชนิดอื่น

สัตว์น้ำในกลุ่ม crustacean ดังเช่น lobster และกุ้ง มี Digestive gland ทำหน้าที่ดูดซึม สะสมและย่อยอาหาร (Cobb and Philips, 1980 อ้างโดย Li and James, 1997) มีความเป็นไปได้ที่อวัยวะดังกล่าวยังทำหน้าที่ลดพิษ (detoxification) (Barron et al., 1988 อ้างโดย Park et al., 1995) แต่ยังไม่มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นกระบวนการดังกล่าวในยาออกซีเตตราซัยคลินเกิดในกุ้งทะเล เมื่อพิจารณาแบบจำลอง (พิจารณารูปที่ 16 ประกอบ) พบว่ากุ้งขาวแวนนาไม กำจัดยาออกจากร่างกายได้สองทางคือผ่านเลือดและผ่าน digestive gland ซึ่งยา 59.91% $\left(\frac{k'_{10}}{k_{10}} x100\right)$ ของยาที่ขับออกจากเลือด (k_{10}) กระจายจากเลือดเข้าสู่ digestive gland และเมื่อพิจารณาสัดส่วนของปริมาณยาทั้งหมดใน digestive gland ต่อปริมาณยาทั้งหมดในร่างกาย (f_e) โดยคำนวณจากสัดส่วนพื้นที่ใต้กราฟดังนี้ :

$$f_e = \frac{AUC_0}{\sum AUC} = \frac{AUC_0}{AUC_0 + AUC_1 + AUC_2}$$

พบว่าสัดส่วนของยาทั้งหมดใน digestive gland ที่คำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟของ non-compartment model และ two-compartment model มีค่าเท่ากับ 0.5865 และ 0.6420 ตามลำดับนั้น มีค่าใกล้เคียงกันมาก หากพิจารณาตามสมมุติฐานของ two-compartment model แสดงให้เห็นว่ายาประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ อาจถูกขับออกที่ digestive gland และแสดงให้เห็นว่า digestive gland นั้นเป็นอวัยวะกำจัดยาออกซีเตตราซัยคลินที่สำคัญ

ตารางที่ 15 เปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของออกซีเตตราซัยคลินหลังจากให้ยาผ่านแอ่งเลือด ในกุ้งทะเล

พารามิเตอร์	L.vannamei[a*]	L.setiferus[b‡]	P.monodon[c‡]	P.monodo[d‡]	***P.japonicus***[e‡]
อุณหภูมิน้ำ (°C)	28-30	20	30	28-29	25
น้ำหนักกุ้ง(g)	16	18.1	23.6	23.4	21.9±2.5
ขนาดยา (μg/g)	10	11.1	10	10	25
A (μg/ml)	28.929			35.36	130.2
B (μg/ml)	7.986			10.64	28.5
α (h^{-1})	3.162		0.74	3.530	1.535
β (h^{-1})	0.042		0.03	0.0428	0.0281
$t_{1/2}\alpha$ (h)	0.219	2.10	0.89	0.20	0.45
$t_{1/2}\beta$ (h)	16.421	22.3	23.1	16.20	24.7
AUC_0^∞ (μg.h/ml)	198.394		760	258	1102
CL (ml/g/h)	0.050		0.013	0.038	0.022
V_1 (ml/g)	0.270		0.20	0.217	0.157
Vss(ml/g)	1.140	2.30	0.41	0.869	0.749

ผู้ทำการศึกษา; [a]การศึกษาครั้งนี้; [b]Reed และคณะ (2004); [c]Sangrungruang และคณะ (2004);[d]Uno และคณะ (2005); [e]Uno (2004); *, ‡ แสดงการทดลองที่ใช้ OTC dihydrate และ hydrochloride ตามลำดับ; A, B คือ จุดตัดแกน Y ของการการกระจายยาและการกำจัดยาตามลำดับ; α, β คือ ค่าคงที่อัตราการกระจายยาและกำจัดยาออกจากเลือดตามลำดับ; $t_{1/2}\alpha$, $t_{1/2}\beta$ คือค่าครึ่งชีวิตอัตราการกระจายยาและการกำจัดยาตามลำดับ; AUC_0^∞ คือพื้นที่ใต้กราฟที่คำนวณจากสมการ regression ; CL คืออัตราการกำจัดยา; V_1 คือปริมาตรการกระจายยาในเลือด; Vss คือปริมาตรการกระจายยาที่สภาวะสมดุล

การให้ยากุ้งนั้นทำได้โดยการผสมอาหารให้กุ้งกิน ยาจะเข้าสู่กระแสเลือดได้นั้นยาต้องผ่านกระบวนการดูดซึมที่ digestive gland และอาจถูกย่อยไปบางส่วนที่กระเพาะอาหาร และ digestive gland (first past metabolism) จึงได้มีการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของยารับประทาน ใน

ช่วงแรกๆ การศึกษาในกุ้งนั้นทำโดยให้กุ้งกินอาหารเอง (Park et al., 1995) แต่ปัญหาที่เกิดขึ้นคือไม่สามารถควบคุมปริมาณยาที่แน่นอนที่กุ้งได้รับ จึงได้มีการพัฒนาวิธีการป้อนยาเข้าปากกุ้งโดยตรงขึ้นมา (Oral force feed) (Sangrungruang et al,. 2004; Uno, 2004; Uno et al., 2005) แต่วิธีดังกล่าวไม่สามารถควบคุมปริมาณยาได้ดีในกรณีที่กุ้งมีขนาดแตกต่างกันปริมาณยาและปริมาณอาหารที่ให้ต้องเปลี่ยนไปขึ้นกับน้ำหนักตัวกุ้งด้วย ดังนั้นการทดลองครั้งนี้จึงได้ใช้สมการของความสัมพันธ์ระหว่างปริมาตรอาหารที่ให้กุ้งผ่านหลอดฉีดยาและน้ำหนักเปียกมาคำนวณปริมาตรอาหารผสมยาที่อัดผ่านหลอดฉีดยา ให้ได้ขนาดที่ต้องการและพบว่าวิธีการนี้สามารถนำมาใช้ได้เป็นอย่างดี นอกจากนั้น ปริมาตรอาหารที่ให้กุ้งต้องสอดคล้องกับพฤติกรรมการกินของกุ้งด้วย โดยปริมาณการกินอาหารของกุ้งนั้นขึ้นอยู่กับระยะลอกคราบของกุ้ง (Hill and Wassenberg, 1992) การทดลองครั้งนี้จึงให้อาหารในปริมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักตัวกุ้ง ซึ่ง Hill และ Wassenberg (1992) กล่าวว่าที่ระยะ C-D_0 ของการลอกคราบ กุ้ง *P. esculentus* ตัวเต็มวัยจะกินอาหารมากที่สุด ที่ปริมาณประมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักตัวกุ้ง และสอดคล้องกับผลการทดลองในกุ้ง *L. vannamei* แต่ไม่ทราบระยะการลอกคราบที่แน่ชัด (Park et al., 1995; Reed et al., 2006) แต่ข้อกำจัดของวิธีอาจมีผลต่อความเครียดของกุ้งซึ่งจะต้องป้อนยาให้เสร็จสิ้นภายในเวลา 1 นาที เพื่อไม่ให้กุ้งเครียดเกินไป

การวิเคราะห์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของออกซีเตตราซัยคลินในกุ้งทะเลหลังจากป้อนยาผสมอาหาร ส่วนใหญ่เป็นแบบ non-compartment (*Penaeus japonicus*- Uno, 2004; *P. monodon*-Uno et al., 2005) และ one-compartment pharmacokinetics model (*P. monodon*-Sangrungruang et al,. 2004) แต่ผลการทดลองครั้งนี้เป็นแบบ two-compartment model และ three-compartment model ทำให้สามารถอธิบายเภสัชจลนศาสตร์ของยาออกซีเตตราซัยคลินหลังจากกุ้งกินยาผสมอาหารได้ชัดเจนยิ่งขึ้น ผลการทดลองครั้งนี้พบว่าค่าคงที่อัตราการดูดซึมยา (*Ka*) ที่คำนวณจาก two-compartment model มีค่าเท่ากับ 1.06 ต่อชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าค่าคงที่การดูดซึมยาเข้ากระแสเลือดของกุ้งกุลาดำซึ่งมีแบบจำลองเภสัชจลนศาสตร์ one-compartment pharmacokinetics model ประมาณ 10 เท่า (Sangrungruang et al,. 2004) (พิจารณาตารางที่ 16) และสูงกว่ากุ้ง *L. setiferus* (Reed et al., 2006) แสดงว่ากุ้งขาวนั้นดูดซึมยาได้เร็วกว่ากุ้งกุลาดำ และกุ้ง *L. setiferus* แต่อาจเกิดจากกุ้งมีสรีระที่ต่างกันเพราะกุ้งกุลาดำ กุ้งคุรุมา และกุ้ง *L. setiferus* นั้นไม่ได้ควบคุมระยะการลอกคราบให้อยู่ที่ระยะเดียวกัน และรูปของยาที่ใช้โนการทดลองนี้เป็น dihydrate form แต่ในกุ้งกุลาดำและกุ้งคุรุมาใช้ hydrochloride form อย่างไรก็ตามรายงานล่าสุดในกุ้ง *L. setiferus* นั้นใช้ยาออกซีเตตราซัยคลินในรูป dihydrate เช่นเดียวกับการทดลองครั้งนี้กลับมีค่าคงที่การดูดซึมยาน้อยกว่ามาก (0.05 ต่อชั่วโมง) (Reed et al., 2006) ดังนั้นความแตกต่างของสรีระของการดูดซึมในช่วงการลอกคราบ น่าจะมีผลต่ออัตราในการดูดซึมยาเข้ากระแสเลือดกุ้ง

สรีรวิทยาของการดูดซึมยาในกุ้งขาวแวนนาไม หลังจากกุ้งได้รับอาหารผสมยาเข้ากระเพาะส่วนหน้า (foregut) และเกิดการผสมกันระหว่างเอ็นไซม์และสารเมือกอื่นๆ ที่หลั่งออกมาจาก digestive gland เพื่อช่วยย่อยและดูดซึมอาหาร (Dall et al., 1990) ระดับยาเพิ่มขึ้นสูงสุดใน digestive gland เป็นอันดับแรก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Cobb และ Phillip (1980) อ้างโดย Li และ James (2000) ที่กล่าวว่าเมื่อยาถูกย่อยในกระเพาะแล้วจะกระจายเข้าสู่ digestive gland โดยตรงผ่านทาง hepatic duct สอดคล้องกับการทดลองครั้งนี้มากเพราะหลังจากให้ยาพบว่ายาเพิ่มขึ้นสูงสุดใน digestive gland เป็นอันดับแรก (t_{max} = 2 ชั่วโมง) สัดส่วนปริมาณยาใน digestive gland ต่อปริมาณยาในร่างกายทั้งหมด ที่คำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟของ non-compartment หลังป้อนยาผสมอาหารให้กุ้งกิน พบว่ามีค่าเท่ากับ 84.45 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าใกล้เคียงกับค่าชีวประโยชน์ (80.62 เปอร์เซ็นต์) แสดงให้เห็นว่ายาถูกดูดซึมเข้ากระแสเลือดโดย digestive gland เมื่อพิจารณาสรีรวิทยาของการดูดซึมและย่อยอาหารพบว่า ยาและอาหารจะถูกย่อยแล้วไหลผ่าน hepatic duct เข้าสู่ digestive gland โดยตรง ทำให้พบยาในอวัยวะดังกล่าวสูงมาก

ค่าคงที่อัตราการดูดซึม (*Ka*) ที่ได้จากแบบจำลอง two-compartment model ของการป้อนยาผสมอาหารนั้น เป็นการดูดซึมยาเข้ากระแสเลือด แต่ไม่ใช่การดูดซึมยาเข้า digestive gland ซึ่งตามสรีรวิทยาของกุ้งการดูดซึมยานั้น ยาจะถูกดูดซึมผ่าน digestive gland เข้ากระแสเลือด ดังนั้น ค่าคงที่อัตราการดูดซึมที่แท้จริงคืออัตราการดูดซึมเข้า digestive gland แต่ด้วยข้อจำกัดของ two-compartment model ทำให้ไม่สามารถคำนวณค่าดังกล่าวได้ ซึ่งเมื่อใช้ oral three-compartment model (ดังแสดงในรูปที่ 26) จะทำให้ทราบค่าดังกล่าว และอธิบายเภสัชจลนศาสตร์ของการกินยาออกซีเตตราซัยคลิน ผสมอาหารในกุ้งขาวแวนนาไมได้อย่างสมบูรณ์

ตารางที่ 16 เปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของออกซีเตตราซัยคลินหลังจากให้โดยการป้อนให้กิน ในกุ้งทะเล (ค่าเฉลี่ย ±S.D.)

พารามิเตอร์	L.vannamei[a@]	P.monodon[b‡]	P.monodon[c‡]	***P.japonicus*** [d‡]
อุณหภูมิน้ำ (ºC)	28 -30	30	28 -29	25
น้ำหนักกุ้ง (g)	16.00±4.12	23.60	22.4 0±4.90	21.10 ±2.30
ขนาดยา (μg /g)	50.00	10.00	50.00	50.00
C_{max} (μg /ml)	41.49 ±8.15		21.10	24.30
t_{max} (h)	6		4	10
Ka (h^{-1})	0.3689	0.1380		
K_{el} (h^{-1})	0.0422	0.20		
AUC_0^{∞} (μ g.h/ml)	[#]1154.80±29.80 845.50[*]	455.00	459.00	953.00
$t_{1/2Kel}$ (h)	13.40	6.93	16.40	33.60
F (%)	[#]80.62±2.54 85.32[*]	59.90	35.00	43.20

ผู้ทำการศึกษา; [a]การศึกษาครั้งนี้; [b]Sangrungruang และคณะ (2004);[c]Uno และคณะ (2005); [d]Uno (2004), [@] , ‡ แสดงรูปของ OTC ที่ใช้ dihydrate และ hydrochloride ตามลำดับ; C_{max} คือความเข้มข้นยาสูงสุด; t_{max} คือเวลาที่ปริมาณยามีความเข้มข้นสูงสุด; Ka, K_{el} คือค่าคงที่อัตราการดูดซึมและการกำจัดยาออกจากเลือดตามลำดับ; AUC_0^{∞} คือพื้นที่ใต้กราฟ; [*],[#] ค่าที่คำนวณจากสมการ regression และพื้นที่ใต้กราฟจริง (trapezoidal rule) ตามลำดับ; $t_{1/2Kel}$ คือค่าครึ่งชีวิตของการกำจัดยาออกจาก hemolymph; F คือชีวประโยชน์

เมื่อพิจารณา oral three-compartment model พบว่ายาถูกดูดซึมเข้า digestive gland ด้วยอัตรา 0.2986 ต่อชั่วโมง และจากผลการทดลองของการให้ยาเข้าแอ่งเลือดทราบว่า digestive gland นั้นยังทำหน้าที่ทำลายยาหรือขับยาด้วย และยาส่วนหนึ่งถูกทำลายโดย digestive gland ก่อนถูกดูดซึมเข้ากระแสเลือด (first pass metabolism) ซึ่งคำนวณได้จากสัดส่วนระหว่างอัตราการขับยาออกจาก digestive gland ต่ออัตราการไหลออกจาก digestive gland ทั้งหมด $\left(\frac{k_{20}}{K_2}\right)$ ของ oral three-compartment model มีค่าเท่ากับ 0.0508 แสดงว่ายาถูกขับออกหรืออาจถูกทำลายโดย digestive gland ที่ First pass ประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์

ชีวประโยชน์เป็นค่าแสดงให้เห็นถึงสัดส่วนของปริมาณยาที่ถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้มีค่าสูงมาก (80.62%) ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Reed และคณะ (2006) ในกุ้ง *L. setiferus* ซึ่งใช้ออกซีเตตราซัยคลินในรูป dihydrate เช่นเดียวกัน พบว่าให้ค่าชีวประโยชน์สูงถึง 92.2% แสดงว่าออกซีเตตราซัยคลินในรูป dihydrate นั้นสามารถดูดซึมเข้าสู่เลือดกุ้งได้ดีกว่าในรูป hydrochloride แต่ความแตกต่างดังกล่าวอาจเกิดจากพฤติกรรมการกินอาหารของกุ้ง ซึ่งที่ระยะการลอกคราบต่างกันปริมาณอาหารที่กินจะต่างกัน โดยการทดลองครั้งนี้ใช้กุ้งที่อยู่ในระยะ C-D_0 ซึ่งเป็นระยะที่กุ้งกินอาหารมากที่สุด (Hill and Wassenberg, 1992) สำหรับการนำยาไปใช้ในฟาร์มเลี้ยงกุ้งจริงนั้น การมีค่าชีวประโยชน์ที่สูงเป็นสิ่งที่ดี เพราะไม่ต้องให้ยาในขนาดเริ่มต้นสูงมากระดับยาในเลือดก็เพียงพอที่จะทำลายเชื้อโรค ส่งผลต่อการลดต้นทุนการผลิตและลดการตกค้างของยาในตัวกุ้งและสิ่งแวดล้อม

เมื่อเปรียบเทียบเภสัชจลนศาสตร์พารามิเตอร์ของ non-compartment และ two-compartment ของการให้ยาเข้าแอ่งเลือด และป้อนยาผสมอาหารพบว่าให้ค่าครึ่งชีวิตการกำจัดยาในเลือดต่างกัน (พิจารณาตารางที่ 6, 7, 8, 10 และ11 ประกอบ) ทั้งนี้เกิดจากการทำความชัน non-linear regression ของ two-compartment ในเฟสสุดท้ายนั้น (elimination phase) (0.0422 ต่อชั่วโมง IS two-compartment; 0.0555 ต่อชั่วโมง oral two-compartment) ไม่ใช่เฟสสุดท้ายจริงๆ (พิจารณารูปที่ 23 ประกอบ) ทำให้ค่าที่ได้มากกว่าค่าความชันของ terminal phase ของ non-compartment (0.0092 ต่อชั่วโมง IS non-compartment; 0.0090 ต่อชั่วโมง oral non-compartment) และเมื่อเปรียบเทียบ IS non-compartment กับความชันของ terminal phase ของ IS three-compartment (0.0061 ต่อชั่วโมง) มีค่าใกล้เคียงกัน ดังนั้นการวางแผนหยุดยากุ้งก่อนจับขาย ควรใช้ข้อมูลของค่าครึ่งชีวิตการกำจัดยาจาก non-compartment model (dispositional half-life) หรือ three-compartment จะสอดคล้องกับความเป็นจริงมากกว่า two-compartment

เลือดเป็นตัวกลางการนำส่งยาไปยังอวัยวะเป้าหมายเพื่อการรักษา การทำหน้าที่ดังกล่าวนั้นโปรตีนในเลือดมีบทบาทสำคัญ การทำความเข้าใจถึงรูปแบบการทำงานของโปรตีนดังกล่าวจึงเป็นสิ่งที่สำคัญอย่างยิ่ง การวางแผนการใช้ยาในกุ้ง โดยส่วนใหญ่แล้วจะให้ความสนใจศึกษาการจับตัวของยากับโปรตีนในเลือด รายงานในกุ้งขาว (*L. setiferus*) เท่ากับ 4.05 ± 1.11 เปอร์เซ็นต์ (Reed et al., 2004) *Penaeus japonicus* 36.7± 8.5 เปอร์เซ็นต์ (Uno, 2004) ส่วนการทดลองครั้งนี้มีค่าเท่ากับ 18-25 เปอร์เซ็นต์ แต่ค่าดังกล่าวนั้นรวมเอาปริมาณยาที่ติดอยู่กับกระดาษกรองประมาณ 6 เปอร์เซ็นต์ เข้าไปด้วย ดังนั้นค่าปริมาณของการจับตัวของยากับโปรตีนมีค่าเท่ากับ 12-19 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น แต่ในกุ้งกุลาดำที่ศึกษาโดย Uno และคณะ (2005) เท่ากับ 49.0 ± 7.9

เปอร์เซ็นต์ มากกว่าทุกรายงานที่ผ่านมาซึ่งอาจเป็นเพราะ สรีระของกุ้งต่างกัน (ระยะของการลอกคราบต่างกัน) ชนิดของกุ้งที่ใช้ต่างกัน และค่าอาจคลาดเคลื่อนจากวิธีการศึกษาที่ต่างกัน

ปริมาณการจับตัวของยากับโปรตีนในเลือดนั้นเป็นค่าที่แสดงให้เห็นว่ายาในเลือดที่อยู่ในรูปอิสระซึ่งเป็นรูปที่มีฤทธิ์ในการรักษานั้นมีปริมาณเท่าไร ซึ่งในการทดลองครั้งนี้พบว่ามีค่าน้อย ทำให้ยาส่วนใหญ่ในเลือดนั้นมีฤทธิ์ในการรักษา นอกจากนั้นค่าดังกล่าวยังบอกได้ว่ายาถูกกระจายเข้าสู่อวัยวะเป้าหมายมากน้อยแค่ไหนถ้ามีค่าดังกล่าวน้อยแสดงว่ายาส่วนใหญ่ในเลือดถูกกระจายไปยังอวัยวะเป้าหมายและยังมีผลต่อความคลาดเคลื่อนในการวางแผนระยะเวลาหยุดยาก่อนจับขาย (Shargel and Yu., 1999)

วิธีการศึกษาปริมาณการจับตัวของยากับโปรตีนในเลือดกุ้งนั้นโดยส่วนใหญ่แล้วใช้วิธี Ultrafiltration เช่นเดียวกับการทดลองในครั้งนี้ แต่ผู้วิจัยพบว่าวิธีนี้ยังมีความคลาดเคลื่อนที่สูงมากเพราะหลังจากที่นำตัวอย่างเลือดไปหมุนเหวี่ยงผ่านกระดาษกรอง พบว่าปริมาตรส่วนใสทั้งหมดที่ผ่านกระดาษกรองลงมานั้นมีปริมาณที่ต่างกันมาก ส่งผลต่อปริมาณยาอิสระที่วัดจะมีปริมาณที่ต่างกันมากด้วย อีกทั้งยังมีน้ำเลือด (plasma) ส่วนหนึ่งติดอยู่บนกระดาษกรอง ซึ่งทำให้ไม่สามารถสรุปได้ว่าส่วนดังกล่าวนั้นเป็นยาอิสระหรือยาที่ถูกโปรตีนจับเอาไว้หรือเป็นส่วนที่เกิดจากกระดาษกรองตันแล้วไม่สามารถไหลลงมาด้านล่างได้ ปัญหาดังกล่าวข้างต้นนั้นผู้วิจัยได้คาดว่าจะเกิดขึ้นจากการทำการทดลอง แต่ต้องการทราบผลการทดลองตามวิธีที่ผู้ศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ในกุ้งทุกคณะที่ผ่านมาใช้ในการศึกษาการจับตัวของยากับโปรตีนในเลือดมาโดยตลอด (Park et al., 1995; Reed et al., 2004; Uno, 2004) ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่เป็นที่ยอมรับกันในงานวิจัยเชิงลึกเพราะในงานวิจัยทาง biomedical science ที่เกี่ยวกับมนุษย์และสัตว์มีกระดูกสันหลัง นิยมใช้วิธี dialysis (Barré et al., 1985; Eriksson et al., 2005) เพื่อให้ได้ข้อสรุปที่แน่ชัด ควรเปลี่ยนวิธีการศึกษาจากวิธีดังกล่าวมาเป็นวิธี Dialysis แทน แต่ข้อจำกัดทางด้านเวลาผู้วิจัยจึงไม่ได้ทำการทดลองในส่วนนี้ให้สมบูรณ์

จาก oral three-compartment model พบว่ามีค่าคงที่อัตราดูดซึมยาเข้าสู่ digestive gland (k_{02}) เท่ากับ 0.2986 ต่อชั่วโมง และค่าครึ่งชีวิตการดูดซึมยาเข้าสู่ digestive gland เท่ากับ 2.36 ชั่วโมง ดังนั้นยามากกว่า 96 เปอร์เซ็นต์ จะถูกดูดซึมเข้าสู่ digestive gland ภายในเวลา 11.60 ชั่วโมง และยาจะถูกดูดซึมจาก digestive gland เข้าสู่ hemolymph (k_{21}) ด้วยอัตรา 0.7244 ต่อชั่วโมง ค่าครึ่งชีวิตการดูดซึมยาจาก digestive gland เข้าสู่ hemolymph เท่ากับ 0.96 ชั่วโมง ดังนั้นยามากกว่า 96 เปอร์เซ็นต์ จาก digestive gland จะถูกดูดซึมเข้าสู่ hemolymph ภายในเวลา 4.78 ชั่วโมง ดังนั้นหลังจากกุ้งกินยาผสมอาหารแล้วประมาณ 16.38 ชั่วโมง (11.60+4.78 ชั่วโมง) ยามาก

กว่า 96 เปอร์เซ็นต์จะถูกดูดซึมเข้าสู่ hemolymph เกษตรกรจึงควรให้ยากุ้งระหว่างมื้อห่างกัน 17 ชั่วโมงโดยประมาณ

ระยะเวลาหยุดยา กำหนดตามมาตรฐานของปริมาณออกซีเตตราซัยคลินที่ตกค้างในเนื้อกุ้งของสภาพยุโรป ซึ่งต้องมีความเข้มข้นน้อยกว่า 0.1 ไมโครกรัมต่อกรัม ส่วนสหรัฐอเมริกากำหนด 2 ไมโครกรัมต่อกรัม (Oka et al., 2000; Chen et al., 2004; Charoenraks et al., 2005) เมื่อพิจารณาการขับยาออกจากกล้ามเนื้อกุ้งจะพิจารณาตามสมการด้านล่าง :

$$C = C_{lag}\, e^{-\lambda t}$$

โดยที่ C คือความเข้มข้นของยาในกล้ามเนื้อ เท่ากับ 0.1 ไมโครกรัมต่อกรัม (ตามมาตรฐานสหภาพยุโรป), C_{lag} คือความเข้มข้นของยาในกล้ามเนื้อต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ หลังป้อนยาผสมอาหารให้กุ้งกิน (0.112 µg/g หรือ ppm) และ λ คือ คำนวณจากความชันของ terminal phase ของระดับยาในกล้ามเนื้อ แบบ non-compartment pharmacokinetics หลังป้อนยาผสมอาหารให้กุ้งกิน (0.011 h^{-1}) แทนค่าต่างๆ ลงในสมการด้านบน ได้เป็นสมการด้านล่าง

$$\ln \frac{0.100}{0.112} = -0.011\ t$$

$$t = 10.30 \text{ ชั่วโมง}$$

แต่เวลาที่คำนวณได้นั้นคือเวลาที่ความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลิน จากเวลาสุดท้ายที่สามารถตรวจวัดปริมาณยาได้ (336 ชั่วโมง) ไปจนความเข้มข้นของยาเท่ากับ 0.1 µg/g ดังนั้นเวลาหยุดยาก่อนจับขายหลังให้กุ้งกินยาผสมอาหารจึงเท่ากับ เวลาสุดท้ายที่สามารถตรวจวัดปริมาณยาได้รวมกับ 10.30 ชั่วโมง เท่ากับ 346.30 ชั่วโมง เกษตรกรควรหยุดให้ยากุ้งอย่างน้อยประมาณ 14 วันติดต่อกันก่อนจับขาย