

ปริมาณยาออกซีเตตราไซคลินที่มีการดูดซึมเข้าสู่กล้ามเนื้อตับและตับอ่อน ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) โดยการผสมยาลงในอาหาร

มธุ บำรุงคุณากร¹ พจนานพร กริทธิทายาวุธ¹ พัลลภา ว่องเศรษฐชัย¹
ศิรินทร หยิบโชคอนันต์² เจนนุช ว่องธวัชชัย^{3*}

Abstract

Mathu Bumrungkunakorn¹ Pojjanaporn Krichtitayawuth¹ Pallapa Wongsetthachai¹
Sirintorn Yibchok-anun² Janenuj Wongtavatchai^{3*}

THE QUANTITATIVE ANALYSIS OF OXYTETRACYCLINE IN BLACK TIGER SHRIMPS (*PENAEUS MONODON*) MUSCLE TISSUE AND HEPATOPANCREAS, AFTER ORAL MEDICATION

270, 3-month old, Black Tiger Shrimps (*Penaeus monodon*) (average 24.55 grams b.w.) were fed for 5 days with oxytetracycline (OTC) medicated feed (coated with squid oil) at 2000 milligrams of OTC per kilogram of feed (2000 ppm). OTC in the hepatopancreas and muscle was measured using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (96 percentage recovery). Samples were taken 0.5, 1, 4, 12 and 24 hours after first administration and 1, 5, 7, 10, 14, 21 days after the 5-day treatment. The OTC concentration in samples from fifty negative control shrimps was undetectable by this method. The maximum concentration of OTC (C_{max}) detected in the hepatopancreas at 0.5 hours after the initial medication (t_{max}) was 19.05 ppm, which was greater than the minimal inhibitory concentration 60% ($MIC_{60} = 4$ ppm). However, the concentration decreased rapidly to 10.46 ppm and 8.16 ppm, 1 and 4 hours after the initial medication. By the fifth and seventh day, following the cessation of feeding the medicated feed, the drug residue in the shrimps hepatopancreas and muscle, was less than the detectable limits for the method used.

Keywords : oxytetracycline, Black Tiger Shrimps, High Performance Liquid Chromatography, medicated feed

¹6th year student of Faculty of Veterinary Science, ²Department of Veterinary Pharmacology, ³Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Pathumwan Bangkok 10330

*Corresponding author

¹นิสิตชั้นปีที่ 6, ²ภาควิชาเภสัชวิทยา, ³ภาควิชาอายุรศาสตร์, คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

*ผู้รับผิดชอบบทความ

บทคัดย่อ

มธุ บำรุง कुमार¹ พจนานพร กริชติทายาวุธ¹ พัลลภา ว่องเสริมฐชัย¹ ศิริินทร หยิบโซคอนันต์² เจนนุช ว่องรัชชัย^{3*}

ปริมาณยาออกซิจีเตตราไซคลินที่ถูกดูดซึมเข้าสู่กล้ามเนื้อ ตับและตับอ่อนของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) โดยการผสมยาลงในอาหาร

กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) อายุ 3 เดือน น้ำหนักตัวเฉลี่ย 24.55 กรัม ได้รับยาออกซิจีเตตราไซคลิน (Oxytetracycline) ติดต่อกัน 5 วัน โดยการละลายยาปริมาณ 2000 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ผสมลงในอาหาร 1 กิโลกรัม (2000 ppm) เคลือบด้วยสารเคลือบอาหารชนิดน้ำมันปลาหมึก จากนั้นตรวจวิเคราะห์ปริมาณยาออกซิจีเตตราไซคลินที่มีการดูดซึมเข้าสู่กล้ามเนื้อ และ hepatopancreas ที่เวลา 0.5, 1, 4, 12, 24 ชั่วโมงหลังจากการให้ยาครั้งแรก และภายหลังการหยุดยา 1, 5, 7, 10, 14 และ 21 วันด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ recovery 96 เปอร์เซ็นต์ โดยมีกุ้งกุลาดำ กลุ่มควบคุม 50 ตัวซึ่งไม่สามารถตรวจพบระดับยาออกซิจีเตตราไซคลินในทั้ง hepatopancreas และกล้ามเนื้อ ส่วนกึ่งกลุ่มทดลอง 270 ตัว (แบ่งทำการทดลองซ้ำสองครั้ง) พบว่าความเข้มข้นของยาออกซิจีเตตราไซคลินสูงสุด (C_{max}) เฉลี่ยเท่ากับ 19.05 พีพีเอ็ม ที่เวลา 0.5 ชั่วโมง (t_{max}) ซึ่งสูงกว่าค่า minimal inhibitory concentration 60% ($MIC_{60} = 4$ พีพีเอ็ม) อย่างไรก็ตาม ระดับยาใน hepatopancreas จะลดลงอย่างรวดเร็วอยู่ที่ระดับ 10.46 พีพีเอ็ม, 8.16 พีพีเอ็ม, ที่เวลา 1 และ 4 ชั่วโมงตามลำดับ โดยไม่สามารถตรวจพบระดับยาออกซิจีเตตราไซคลินใน hepatopancreas ได้ภายหลังการหยุดยา 5, 7, 10, 14 และ 21 วัน ส่วนในกล้ามเนื้อพบว่ามียาออกซิจีเตตราไซคลินคงค้างอยู่เฉลี่ย 0.09 พีพีเอ็ม และ 0.02 พีพีเอ็ม ในวันที่ 5 และ 7 ภายหลังการหยุดยา ตามลำดับ จนไม่สามารถตรวจพบยาออกซิจีเตตราไซคลินคงค้างในกล้ามเนื้อในวันที่ 10, 14 และ 21 วันภายหลังการหยุดยา

คำสำคัญ: ออกซิจีเตตราไซคลิน กุ้งกุลาดำ High Performance Liquid Chromatography อาหารผสมยา

บทนำ

กุ้งกุลาดำเป็นสินค้าส่งออกทางการเกษตรชนิดหนึ่งที่สามารถนำรายได้หลักเข้าสู่ประเทศไทย แต่หลังจากปี พ.ศ. 2545 มาแล้ว สินค้าทางการเกษตรและอาหารของไทยได้ถูกประเทศผู้นำเข้านำมาตราการกีดกันทางการค้าที่ไม่ใช่ภาษี (Non-Tariff Barrier) มาใช้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเรื่องคุณภาพมาตรฐานสินค้าที่อาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพอนามัยของผู้บริโภค รวมทั้งการตกค้างของยาปฏิชีวนะในผลิตภัณฑ์กุ้ง ดังนั้นในการเพาะเลี้ยง และในกระบวนการผลิตกุ้งกุลาดำ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องพิจารณาถึงการใช้อยาปฏิชีวนะในกุ้งกุลาดำอย่างระมัดระวัง โดยเลือกใช้อยาปฏิชีวนะที่เป็นที่ยอมรับของกองควบคุมยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทยให้ใช้กับสัตว์ที่เป็นอาหาร ได้อย่างปลอดภัยในขนาดที่เหมาะสม เช่น ออกซิจีเตตราไซคลิน (oxytetracycline) ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่มเตตราไซคลิน (tetracyclines) ที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง และได้รับการพิสูจน์ว่าสามารถใช้ในการรักษาโรคเนื่องจากการติดเชื้อ *Vibrio spp.*

ในกุ้งได้ (Mohny et al., 1997; อ้างถึงโดย Bormüdoz-Almada et al., 1999) โดยยาออกซิจีเตตราไซคลินออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (bacteriostatic) ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ และสามารถออกฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ (bactericidal) หากใช้ในปริมาณสูง กลไกการออกฤทธิ์ของยาในกลุ่มนี้คือ ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น เชื้อแบคทีเรีย ริกเก็ตเซีย และโปรโตซัว (Plumb, 2002) ถึงแม้ว่ายาออกซิจีเตตราไซคลินเป็นยาที่ได้รับอนุญาตให้ใช้ในสัตว์ที่นำมาเป็นอาหารได้ และมีการกำหนดปริมาณสารตกค้างในสัตว์ชนิดต่างๆ ไว้แล้ว อย่างไรก็ตาม ในสัตว์น้ำโดยเฉพาะในสัตว์น้ำที่เพาะเลี้ยงในประเทศไทยยังมีการศึกษาเกี่ยวกับขนาดของยา วิธีการใช้ และระยะหยุดยาที่เหมาะสมอยู่น้อย จากรายงานการศึกษาถึงระยะหยุดยาที่เหมาะสมในต่างประเทศซึ่งสภาพแวดล้อม และอุณหภูมิการเลี้ยงต่างกับในประเทศไทยค่อนข้างมาก โดยพบว่าระยะหยุดยาที่ได้จากการศึกษาทดลองนั้น ประมาณ 30-40 วัน (อุณหภูมิ 9 องศาเซลเซียส) (อ้างถึงโดย อาสรา, 2535) แต่ในการเลี้ยงกุ้งใน

ประเทศไทยมีอุณหภูมิสูงกว่าต่างประเทศ จึงควรมีการทดลอง เพื่อศึกษาถึงการใช้อยากออกซ์เตตราไซคลินในการเลี้ยงกุ้งอย่าง ถูกต้องและศึกษาถึงระยะเวลาหยุดยาที่เหมาะสม โดยวิธีการ ให้อาหารที่เหมาะสมในทางปฏิบัติ คือ การผสมยาลงในอาหาร พร้อมทั้งทำการเคลือบผิว (coated) ด้วยสารจำพวกเจลลาติน เพื่อให้อาหารที่ผสมยาลงไปแล้วนั้นมีความคงตัวและเพิ่ม ความน่ากิน (palatability) (อ้างถึงโดย นิพนธ์, 2521; ชลอ, 2543) กุ้งจึงสามารถกินอาหารพร้อมกับได้รับยาในปริมาณ ความเข้มข้นที่ถูกดูดซึมเข้าสู่อวัยวะเป้าหมายจนถึงระดับความ เข้มข้นที่สามารถหยุดยั้งการเจริญเติบโต หรือทำลายแบคทีเรีย ที่ก่อโรคได้ (therapeutic level) โดยตรวจวัดปริมาณของยาด้วยวิธี High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) ซึ่งเป็น วิธีที่สามารถตรวจชนิดและวัดระดับของสารเคมีได้อย่าง ละเอียดและมีความแม่นยำสูง นอกจากนั้นการศึกษาครั้งนี้ได้ ทำการวิเคราะห์ปริมาณยาออกซ์เตตราไซคลินที่ตกค้างใน เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อและ hepatopancreas ในช่วงระยะเวลาต่างๆ เพื่อ หาระยะการหยุดยาที่เหมาะสม และปลอดภัยต่อการบริโภค

วัสดุและวิธีการ

1. แบ่งกุ้งกุลาดำ อายุประมาณ 3 เดือน น้ำหนักเฉลี่ย 25 กรัม/ตัว ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม 50 ตัว และ กลุ่มทดลอง 270 ตัว ควบคุมสภาพในบ่อทั้ง 2 กลุ่ม ให้มี อุณหภูมิ pH และความเค็มของน้ำเท่ากันตลอดการทดลอง เลี้ยงกุ้งเพื่อปรับสภาพ 2 วันก่อนเริ่มทำการทดลอง

2. ให้อาหารกุ้งทั้ง 2 กลุ่มประมาณ 2.5% ของ น้ำหนักตัวเฉลี่ยของกุ้ง (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2545) แบ่งให้วันละ 2 เวลา คือ 8.00 น. และ 15.00 น. กลุ่มควบคุมได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปผสมสารเคลือบอาหาร ชนิดน้ำมันปลาหมักตลอดการศึกษา และกลุ่มทดลองได้รับ อาหารเม็ดสำเร็จรูปที่ผสมยาออกซ์เตตราไซคลิน (OTC) ใน ขนาด 2000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร (พีพีเอ็ม) (สำนักงาน คณะกรรมการอาหารและยา, 2545) คิดเป็นขนาดของ OTC 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัมกุ้ง และเคลือบด้วยสารเคลือบอาหาร เป็นระยะเวลา 5 วัน และหลังจากนั้นได้รับอาหารเม็ดสำเร็จ รูปผสมสารเคลือบอาหารจนจบการทดลอง ทำการทดลอง 2 ชั่วโมง

3. ตรวจสอบ leaching effect ของยาที่ผสมในอาหาร โดยนำอาหารผสมยาที่เตรียมไว้ใช้ในการทดลองมา 10 กรัม แช่ ในกระบอกตวงที่มีน้ำกลั่นบรรจุอยู่ 1 ลิตร แล้วทำ การเก็บ ตัวอย่างน้ำที่เวลา 30 และ 60 นาที จากนั้นนำตัวอย่างน้ำที่ ได้มาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ OTC โดยวิธี HPLC แล้ว

นำค่าความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้มาคำนวณหาค่า leaching effect โดยใช้สูตร

$$\text{leaching effect} = \frac{\text{ความเข้มข้นของ OTC ในน้ำที่วัดได้} \times 100}{\text{ความเข้มข้นของ OTC ในอาหารผสมยา}}$$

4. เก็บตัวอย่างกุ้งในกลุ่มควบคุมก่อนทำการทดลอง 5 ตัว และกลุ่มทดลองครั้งละ 5 ตัว ที่เวลา 0.5, 1, 4, 12 และ 24 ชั่วโมง หลังจากให้อาหารมื้อแรก และทุก 24 ชั่วโมง ไป จนถึงวันที่ 6 ของการทดลอง จากนั้นเก็บตัวอย่างที่ 5, 7, 10, 14 และ 21 วัน หลังจากหยุดให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปผสมยา OTC แยกเก็บส่วนของ hepatopancreas และกล้ามเนื้อกุ้ง โดย เก็บ hepatopancreas ไว้ในหลอดไมโครเซนทริฟิวส์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเก็บส่วนของกล้ามเนื้อที่ปั่นละเอียด แล้ว ประมาณ 5.00 ± 0.05 กรัม ใส่ในหลอดเซนทริฟิวส์ ขนาด 50 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการวิเคราะห์

5. วัดปริมาณยา OTC ที่สกัดได้จากกล้ามเนื้อและ hepatopancreas ของกุ้งโดยวิธี HPLC คอลัมน์ และ mobile phase ที่ใช้ คือ Nova-Pak C18 ขนาด 3.9x150 มิลลิเมตร และ 0.01 M oxalic acid:acetonitrile:methanol ในอัตราส่วน 60:30:10 ปริมาตรของสารที่ฉีดเข้าเครื่องแต่ละครั้ง คือ 20 ไมโครลิตร ตั้งค่าอัตราเร็วของการไหลผ่านสารของเครื่องที่ 1 มิลลิตร/นาที ความยาวคลื่นแสง 350 นาโนเมตร และค่า การดูดกลืนแสงที่ 0.005 AUFS (Absorbance unit full scale)

6. คำนวณหาความเข้มข้นของยาในกล้ามเนื้อ หรือ hepatopancreas โดยใช้สูตร

$$\text{ความเข้มข้นสุดท้าย} = \frac{\text{ความเข้มข้นที่ได้} \times \text{volume} \times \text{dilution factor}}{\text{น้ำหนักของกล้ามเนื้อ/hepatopancreas}}$$

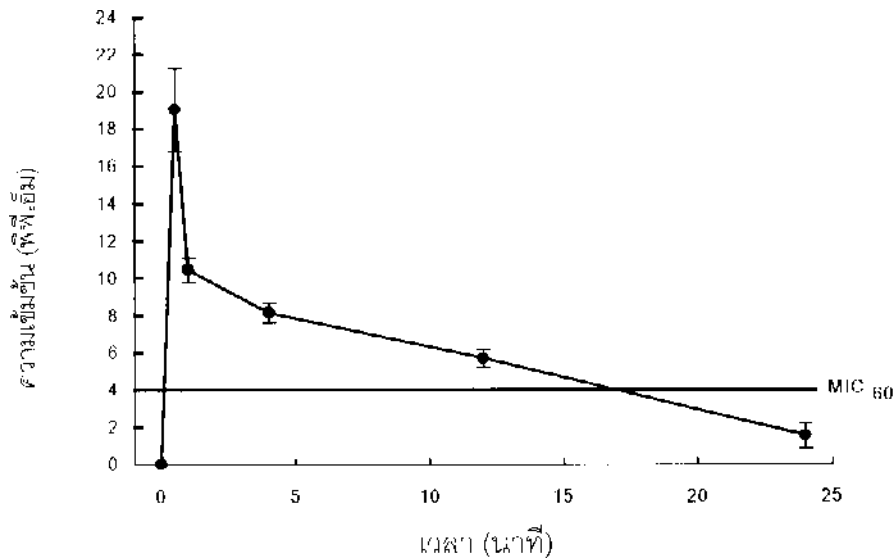
ผล

ตลอดการทดลองอุณหภูมิของน้ำอยู่ระหว่าง 28-29 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างของน้ำเท่ากับ 8 และความ เค็มของน้ำอยู่ที่ระดับ 10 พีพีที

รูปที่ 1 แสดงระดับความเข้มข้นเฉลี่ยของยา OTC (จากการทดลอง 2 ชั่วโมง) ใน hepatopancreas กุ้งที่เวลา 0.5, 1, 4, 12 และ 24 ชั่วโมงหลังจากได้รับยาครั้งแรก จากผลการ ทดลองพบว่า ความเข้มข้นเฉลี่ยสูงสุดที่สุดของ OTC (C_{max}) เท่ากับ

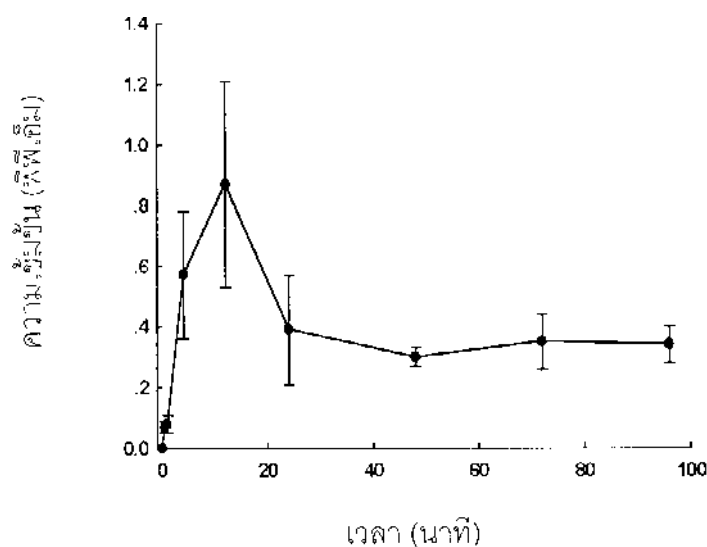
19.05 พีพีเอ็ม ที่เวลา 0.5 ชั่วโมง (t_{max}) ซึ่งสูงกว่าค่า Minimal Inhibitory Concentration 60% ($MIC_{60} = 4$ พีพีเอ็ม) และระดับยาใน hepatopancreas จะลดลงอย่างรวดเร็วมาอยู่ที่

ระดับ 10.46 พีพีเอ็มและ 8.16 พีพีเอ็ม, ที่เวลา 1 และ 4 ชั่วโมงตามลำดับ (รูปที่ 1)



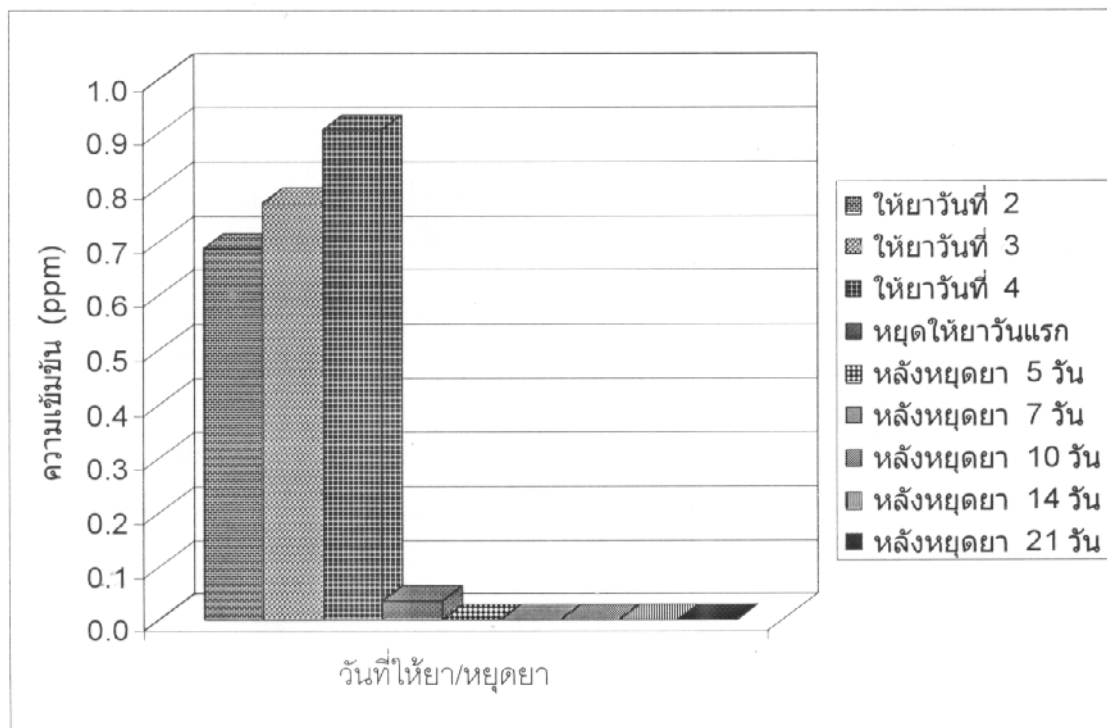
รูปที่ 1 ความเข้มข้นของ OTC ใน hepatopancreas กุ้ง หลังการให้อาหารผสมยาที่เวลาต่างๆ ภายใน 24 ชั่วโมง

ระดับความเข้มข้นเฉลี่ยของ OTC ในกล้ามเนื้อกุ้งที่เวลา 0.5, 1, 4, 12, 24 และ 96 ชั่วโมงหลังจากได้รับยาครั้งแรก ได้ผลดังรูปที่ 2 พบว่าความเข้มข้นเฉลี่ยของ OTC สูงที่สุด (C_{max}) เท่ากับ 0.87 พีพีเอ็ม ที่เวลา 12 ชั่วโมง (t_{max}) ซึ่งต่ำกว่าค่า Minimal Inhibitory Concentration 60% ($MIC_{60} = 4$ พีพีเอ็ม) (รูปที่ 2)



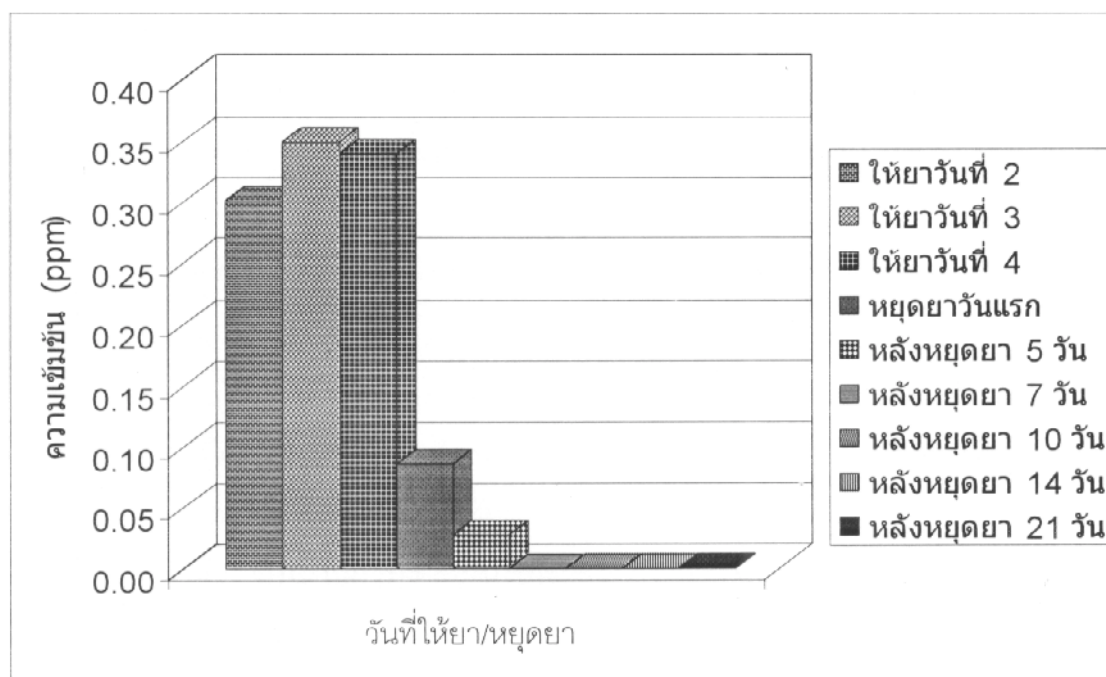
รูปที่ 2 ความเข้มข้นของ OTC ในกล้ามเนื้อกุ้งหลังการให้อาหารผสมยาที่เวลาต่างๆ ภายในเวลา 96 ชั่วโมง

ระดับความเข้มข้นของ OTC ที่ตกค้างใน hepatopancreas กุ้ง ภายหลังการหยุดยาวันที่ 1, 5, 7, 10, 14 และ 21 วัน ได้ผลดังรูปที่ 3 ในวันแรกของการหยุดยา พบความเข้มข้นของ OTC อยู่ใน hepatopancreas เพียง 1 จาก 8 ตัวอย่าง (0.18 พีพีเอ็ม) และในวันที่ 5, 7, 10, 14 และ 21 วันภายหลังการหยุดยา ไม่สามารถตรวจพบระดับของ OTC ใน hepatopancreas ด้วยวิธี HPLC ได้ (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 ความเข้มข้นโดยเฉลี่ยของ OTC ใน hepatopancreas กุ้ง ตั้งแต่วันที่ 2 ของการให้อาหารผสมยาจนถึงหลังหยุดยา 21 วัน

ระดับความเข้มข้นของ OTC ที่ตกค้างในกล้ามเนื้อกุ้ง ภายหลังการหยุดยาวันที่ 1, 5, 7, 10, 14 และ 21 วัน จากการวิเคราะห์โดยใช้ HPLC ได้ผลดังรูปที่ 4 ในวันแรกของการหยุดยา พบความเข้มข้นของ OTC อยู่ในกล้ามเนื้อ 5 จาก 8 ตัวอย่าง (เฉลี่ย 0.09 พีพีเอ็ม) และในวันที่ 5 ภายหลังการหยุดยา พบความเข้มข้นของ OTC อยู่ในกล้ามเนื้อ 2 จาก 8 ตัวอย่าง (เฉลี่ย 0.02 พีพีเอ็ม) ส่วนในวันที่ 7, 10, 14 และ 21 วันภายหลังการหยุดยา ไม่สามารถตรวจพบระดับของ OTC ในกล้ามเนื้อด้วยวิธี HPLC ได้ (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 ความเข้มข้นโดยเฉลี่ยของ OTC ในกล้ามเนื้อกุ้ง ตั้งแต่วันที่ 2 ของการให้อาหารผสมยาจนถึงหลังหยุดยา 21 วัน

วิจารณ์

ยาที่เลือกใช้ในการทดลองนี้คือออกซีเตตราไซคลิน ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่ได้รับการพิสูจน์ว่าสามารถใช้ในการรักษาโรคเนื่องจากการติดเชื้อ *Vibrio spp.* (Limpoka et al., 1994; Mohny et al., 1997; Bormüdoz-Almada et al, 1999) และได้รับการยอมรับให้สามารถใช้ในการเลี้ยงสัตว์น้ำได้ตามขนาดที่กำหนดไว้ในฉลากยาสัตว์มาตรฐาน (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2545) ออกซีเตตราไซคลินมีกลไกการออกฤทธิ์โดยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (bacteriostatic) ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของเชื้อแบคทีเรีย (Plumb, 2002) จากการศึกษาของ Namdari และคณะ (1996) พบว่าเมื่อให้ยาโดยผสมในอาหาร ระดับความเข้มข้นของยาออกซีเตตราไซคลินใน hepatopancreas จะสูงกว่าในกล้ามเนื้อ

โดยปกติอัตราการกินอาหารของกุ้งในช่วงอายุประมาณ 3 เดือน จะเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว (จันทนา, 2532) และปริมาณยา OTC ที่แนะนำให้ใช้ผสมอาหารตามฉลากยาสัตว์มาตรฐาน (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2545) เท่ากับ 2.0-4.0 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (ในการทดลองนี้ใช้ยา 2000 พีพีเอ็ม) แต่เนื่องจากในสภาวะจริงของการเลี้ยงกุ้ง

กุลาค่าเมื่อกุ้งป่วยจะพบว่าอัตราการกินอาหารลดลงอย่างน้อยครึ่งหนึ่ง ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงทำการปรับอัตราการให้อาหารลงเหลือเพียง 2.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวเพื่อให้สอดคล้องกับสภาพจริงของกุ้งป่วย นอกจากนี้ในสภาวะปกติ การเลี้ยงกุ้งที่น้ำหนัก 10.0-25.5 กรัมจะมีการให้อาหารวันละ 5 ครั้งเพื่อให้ได้ผลผลิตที่สูง (จันทนา, 2532) แต่ในการทดลองนี้มีการให้อาหารเพียง 2 ช่วงเวลา คือ 8.00 น. และ 15.00 น. เพื่อป้องกันปัญหากุ้งไม่กินอาหารภายหลังการถูกรบกวนจากการเก็บตัวอย่างในช่วงเวลาต่างๆ (ในช่วงแรกมีการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0.5, 1, 4, 12 และ 24 ชั่วโมงหลังให้อาหารครั้งแรก)

วิธีการสกัดสารเตตราไซคลินด้วย SPE cartridge สามารถสกัดสารออกจากเนื้อเยื่อตัวอย่างที่มีสารกลุ่มเตตราไซคลิน 15 นาโนกรัมให้ได้อย่างน้อย 80 เปอร์เซ็นต์ ($\geq 80\%$ recovery) ซึ่งในการทดลองนี้ได้มีการทดสอบประสิทธิภาพของระบบการสกัดก่อนการตรวจวัดปริมาณจากเนื้อเยื่อตัวอย่างที่ได้จากการทดลองจริง พบว่าระบบการสกัดที่ใช้มีเปอร์เซ็นต์การ recovery สูงถึง 96 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้ทราบว่าระบบที่ใช้มีประสิทธิภาพสูงให้ผลที่เชื่อถือได้

ในการให้ยา OTC ในการทดลองนี้ใช้วิธีผสมยาในอาหารเมื่อก่อนนั้นจึงเคลือบผิวด้วยสารเคลือบอาหารชนิดน้ำมันปลาหมึกเพื่อเพิ่มความนำกินของอาหารและป้องกันการละลายน้ำของยาที่ผสมในอาหาร (ชโล, 2543) ซึ่งทั้งนี้ต้องมีการตรวจสอบ leaching effect เพื่อนำมาประกอบการพิจารณาปริมาณยาที่กึ่งได้รับจริงจากการกินอาหาร ซึ่งได้มีการทดลองตรวจสอบพบว่าอาหารผสมยาที่ใช้มีค่า leaching effect ในน้ำที่มีระดับความเค็ม 10 พีพีที เท่ากับ 13.5% ในระยะเวลา 30 นาที และ มีค่าเท่ากับ 60% ในระยะเวลา 60 นาที

จากผลการทดลอง (รูปที่ 1) แสดงให้เห็นว่า เมื่อให้อาหารผสมยา OTC ในขนาด 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัมกึ่ง ยาจะไปถึงยัง hepatopancreas ซึ่งเป็นอวัยวะที่มักพบมีการติดเชื้อที่ก่อโรคสำคัญในกุ้งกุลาดำ (เช่น *Vibrio spp.*) ได้อย่างรวดเร็ว โดยระดับยาที่ตรวจพบใน hepatopancreas สูงสุดใน 30 นาที ภายหลังได้รับยา คือ 19.05 พีพีเอ็ม ซึ่งเป็นระดับที่สูงเกินกว่า *in vitro* MIC₆₀ (ค่าความเข้มข้นของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ทดสอบได้ 60%) ของยา OTC ต่อเชื้อ *Vibrio* มาก (MIC₆₀ = 4.0 พีพีเอ็ม) (ฉิธาวัน และคณะ, 2546) จากนั้นระดับยาจะลดลงอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้อาจเนื่องจากการกระจายตัวของยา OTC ในกุ้งสูง (high volume of distribution) หรือ ยาถูกขับออกจากร่างกายอย่างรวดเร็ว เนื่องจากกุ้งกุลาดำเป็นสัตว์ที่มีระบบเมตาบอลิซึมสูง ดังนั้นในกรณีที่ต้องการให้ระดับยา OTC ใน hepatopancreas ของกุ้งสูงเกินกว่าค่า MIC₆₀ จึงควรให้อาหารผสมยาบ่อยครั้งขึ้น

การใช้ยา OTC ในกุ้งกุลาดำมีวัตถุประสงค์เพื่อป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อ *Vibriosis* และโรคติดเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ (เมตตาและคณะ, 2530; ชโล, 2543) ซึ่งเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้มักพบมากใน hepatopancreas โดยกุ้งที่มีอาการป่วยและติดเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* จะสามารถตรวจพบเชื้อจาก hepatopancreas หรือจากน้ำเลือดเป็นจำนวนมากและพบว่า hepatopancreas จะถูกทำลายอย่างรุนแรง (ชโล, 2543) การกระจายตัวของยา OTC สู่กล้ามเนื้อจึงไม่มีความสำคัญในการป้องกันและรักษาโรคนี้ แต่จะมีความสำคัญในด้านการศึกษาถึงการตกค้างของยาในกล้ามเนื้อซึ่งยา OTC ที่ตกค้างอยู่ในกล้ามเนื้อกึ่งที่เกินกว่าปริมาณสูงสุดที่อนุญาตโดยหน่วยงานขององค์การอนามัยโลกและองค์การอาหารโลก (JECFA) ให้มีจะก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค เช่น เกิดอาการแพ้ต่างๆ และ/หรือ อาจก่อให้เกิดการดื้อยาของแบคทีเรียบางชนิดต่อสารปฏิชีวนะกลุ่มนี้ (ชโล, 2543) จึงต้องทำการ

ศึกษาถึงระยะหยุดยาที่เหมาะสม ระยะหยุดยา OTC ที่เหมาะสมในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำควรเป็นระยะที่ทั้ง hepatopancreas และกล้ามเนื้อมีระดับ OTC คงค้างอยู่ไม่เกิน 0.1 ไมโครกรัม/กิโลกรัม (อ้างถึงโดย Bormüdoz-Almada et al, 1999) ซึ่งจากผลการทดลองนี้ พบว่าระดับของ OTC ที่คงค้างอยู่ในกล้ามเนื้อจะลดต่ำลงจนไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธี HPLC ภายหลังการหยุดยาดังแต่วันที่ 7 เป็นต้นไป ส่วนใน hepatopancreas พบว่าระดับของ OTC จะลดต่ำลงจนไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธี HPLC ภายหลังการหยุดยาดังแต่วันที่ 5 เป็นต้นไป ดังนั้น ผลจากการทดลองนี้ สรุปได้ว่าระยะหยุดยา OTC ที่เหมาะสมในกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสม OTC ในขนาด 2000 พีพีเอ็ม คือ อย่างน้อย 7 วันหลังจากได้รับยาครั้งสุดท้าย

การตรวจวัดปริมาณ OTC นอกจากจะใช้วิธี HPLC แล้ว (Jacobsen, 1989; Rogstad, et al., 1991; Haug and Hals, 2000) ยังสามารถทำได้โดยวิธีอื่นๆ อีก เช่น Radioimmunoassay (Charm II) (Moats, et al., 1995) และ Microbial assay (Kusser and Newman, 1990; Chanratchakool, et al., 1995) แต่อย่างไรก็ตาม การตรวจวัดระดับยาโดยวิธี HPLC เป็นวิธีที่สามารถตรวจชนิดและวัดระดับยาได้ละเอียด และถูกต้องกว่าเมื่อเทียบกับสองวิธีดังกล่าวข้างต้น

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยโรคและการใช้ยาในกุ้ง สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2546 และเป็นส่วนหนึ่งของ โครงการเสริมทักษะการวิจัย คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2546

ทางคณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สพ.ญ. ฉิธาวัน เจริญพร ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านการเก็บตัวอย่าง การทดลอง และการวิเคราะห์ข้อมูล

เอกสารอ้างอิง

- จันทนา ธนาสว่างกุล, 2532. ต้นทุนและผลตอบแทนจากการลงทุนเลี้ยงฟาร์มกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์ บัณฑิตมหาบัณฑิตภาควิชาการบัญชี บัณฑิตวิทยาลัย. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 104 หน้า.
- ชโล ลิ้มสุวรรณ, 2543. การใช้ยาด้านจุลชีพในสัตว์น้ำ. กุ้งไทย 2000. โรงพิมพ์เจริญรัฐการพิมพ์ 232-236.

- ชลอ ลิมสุวรรณ, 2543. โรคติดเชื้อแบคทีเรีย. กุ้งไทย 2000. โรงพิมพ์เจริญรัฐการพิมพ์. 170-196 หน้า.
- ฉัตรวัน เจริญพร ชลธิดา บรรเทากุล นุชนารถ ทิพย์มงคลศิลป์ มณฑล เลิศวรปรีชา ธงชัย เฉลิมชัยกิจ และเจนนุช ว่องรัชชัย, 2546. การสำรวจความไวรับต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อไวรัสที่ก่อโรคในกุ้งกุลาดำ. โครงการเสริมทักษะการวิจัย คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Senior project) ประจำปีการศึกษา 2545.
- นิพนธ์ เหมะประสิทธิ์, 2521. ผลของอาหารผสมที่มีโปรตีนระดับต่างๆที่มีต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon Fabricius*). วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต แผนกชีววิทยาสาส์ตรทางทะเล บัณฑิตวิทยาลัย. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 87 หน้า.
- เมตตา เมฆานนท์ อนุสรณ์ เนตรประไพ และกำพล คมคาย, 2530. ผลของยาแอนตี้แบคทีเรีย 6 ชนิด (เตตราไซคลินไฮโปคลอไรด์, คลอแรมเฟนิคอล, ฟูราโซลิโดน, กรดนาลิดีซิก, โซลูพริมและไนเฟอรัสเตอรินด โซเดียม) ในการรักษาโรคไวรัสที่ซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัสโอแองกิลลาอัม และ ไวรัสโพรอาอีโมไลติคัส. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ปีการศึกษา 2530. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2545. ฉลากยาสัตว์มาตรฐาน.
- อาสรา ใจเย็น, 2535. การศึกษาการแพร่กระจายของออกซิทเตตราไซคลินในกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์บัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 160 หน้า.
- Bormüdoz-Almada, M.C., Pòroz-Tello, M.G., Valonzuolu-Quintanar, A.L. and Vázquez-Morono, L. 1999. Oxytetracycline residues in cultured white shrimp tissue by HPLC and a microbial receptor assay. J. Food Sci. 64(4) : 638-640.
- Chanratchakool, P., Pearson, M., Limsuwan, C. and Roberts, R. J. 1995. Oxytetracycline sensitivity of *Vibrio* species isolated from black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius. J. Fish Dis. 18: 79-82.
- Haug, T. and Hal, P. A. 2000. Pharmacokinetics of oxytetracycline in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) in fresh water at low temperature. Aquaculture. 186: 175-191.
- Jacobsen, M. D., 1989. Withdrawal times of freshwater rainbow trout, *Salmo Gairdneri* Richardson, after treatment with oxolinic acid, oxytetracycline and trimethoprim. J. Fish Dis. 12: 29 - 36.
- Kusser, W. C. and Newman, S. G. 1990. Detection of oxytetracycline residues in fish tissues using a sensitive bioassay. J. Fish Dis. 13: 545-548.
- Limpoka, M., Pongsakorn, S., Phongvivat, S., Thampipatanakul, G., Wongsommart, D., Rongrodejarnarak, C., Pung, T., Sittiphuprasert, U., Chotipundu, P., Vichkovitten, T., Chuchit, L., Lawhavinit, O., Chainanan, P., Kanchanomai, R. and Wongkalaung, T. 1994. Antimicrobial drugs in *Penaeus monodon* Fabricius. The 32nd Kasetsart University annual conference. 428-438.
- Moats, W. A., Anderson, K. L., Rushing, J. E. and Wesen, D. P. 1995. Composition of a radioimmunoassay (Charm II) test with high-performance liquid chromatography for detection of oxytetracycline residues in milk samples from lactating cattle. Am. J. Vet. Res. 56: 795-800.
- Mohney, L.L., Williams, R.R., Bell, T. A. and Lighter, D. V. 1997. Residues of oxytetracycline in cultured juvenile blue shrimp, *Penaeus stylirostris* (Crustacea: Decapod), fed medicated feed for 14 days. Aquaculture. 149: 193-202.
- Namdari, R., Abedini, S. and Law, F. C. P. 1996. Tissue distribution and elimination of oxytetracycline in seawater Chinook and coho salmon following medicated-feed treatment. Aquaculture. 144: 27-38.
- Plumb, D. C., 2002, Oxytetracycline. In: Veterinary Drug Hand Book. 4th edition. Blackwell. Iowa. 616-621.
- Rogstad, A., Hormazabal, V., Ellingsen, O. F. and Rasmussen, K. E. 1991. Pharmacokinetic study of oxytetracycline in fish. Aquaculture. 96: 219-226.