

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีการวิเคราะห์

การวิเคราะห์ความชื้น (ตามวิธีการของ AOAC, 1990)

อุปกรณ์

- 1 กระเบื้องครุซีเบ็ด (porcelain crucible)
- 2 ตู้อบ (hot air oven)
- 3 โถอบแห้ง (desiccator)
- 4 ขวดชั่ง
- 5 คีมคีบขวดชั่ง
- 6 ถาดใส่ขวดชั่ง

วิธีการ

- 1 นำขวดชั่งเข้าตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 40 นาที
- 2 นำขวดชั่งที่อบแล้ว เข้าโถอบแห้งทิ้งไว้ให้เย็น
- 3 นำขวดชั่งมาชั่งบันทึกน้ำหนักที่แน่นอนไว้
- 4 ชั่งตัวอย่างอาหารใส่ขวดชั่งให้ได้น้ำหนัก 5 กรัม
- 5 นำตัวอย่างอาหารเข้าตู้อบ
 - ก. อบโดยใช้อุณหภูมิ 135 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (อย่าปิดฝาขวดชั่ง)
 - ข. หรืออบโดยใช้อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง
- 6 นำตัวอย่างอาหารที่อบแล้วเข้าโถอบแห้งเพื่อลดความชื้น (อย่าปิดฝาขวดชั่ง) ทิ้งไว้ให้เย็นจึงเอาออกมาชั่ง (ก่อนหยิบออกจากโถอบแห้ง ให้ปิดฝาขวดชั่งให้สนิท) บันทึกน้ำหนักไว้จากนั้นนำเข้าตู้อบอีกครั้ง จนได้เวลาตามต้องการนำเข้าโถอบแห้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงนำออกมาชั่งทำซ้ำหลายๆ ครั้ง จนกระทั่งได้น้ำหนักเต็มที่ ซึ่งน้ำหนักที่หายไปจะเป็นน้ำหนักของความชื้น

การคำนวณ

$$\% \text{ ความชื้น} = \frac{(a-b) \times 100}{w}$$

a = น้ำหนักของอาหารก่อนอบแห้ง
 b = น้ำหนักของอาหารหลังอบแห้ง
 w = น้ำหนักของอาหารก่อนอบ
 หรือ % ของวัตถุแห้ง (DM) = 100 - % ความชื้น

การวิเคราะห์ห่ออกซิเตดร้าซัยคลินในน้ำด้วย HPLC

อุปกรณ์และสารเคมี

- 1 กระดาษกรองผ่าน Nylon -6, 6 Membrane filter ขนาด 0.45 μm
- 2 Methylalcohol HPLC grade
- 3 Acetonitrile HPLC grade
- 4 Oxaliic acid
- 5 HPLC system ของ Waters ประกอบด้วย
 - Pump Model 616
 - UV detector Model 486
 - Controller Model 600
 - Autosampler Model 717

HPLC Condition

- 1 Column: Nova-Pack C 18 column ขนาด 3.9 x 1.50 mm.
- 2 Mobile Phase : Methylalcohol : Acetonitrile : 0.1 M Oxalic acid pH 3.3
 ในอัตราส่วน 1.5 : 1 : 7.5
- 3 Flow rate: 1.0 ml/min
- 4 Detector: 360 nm.

การเตรียมตัวอย่าง

- 1 เก็บตัวอย่างน้ำในปริมาตร 4 มล.
- 2 กรองผ่านกระดาษกรอง Nylon -6, 6 Membrane 0.45 μm
- 3 ปริมาตรน้ำที่กรองแล้วฉีดเข้าไปในเครื่อง HPLC 20 ไมโครลิตร

การวิเคราะห์ออกซิทेटราไซคลินในอาหารกุ้งด้วย HPLC

อุปกรณ์และสารเคมี

- 1 Disodium hydrogen phosphate, Na_2HPO_4
- 2 Citric acid, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 3 Ethylenediamine tetraacetate, disodium
- 4 Oxalic acid, $(\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 5 Triethylamine
- 6 Sodium Hydroxide, NaOH
- 7 Oxytetracycline hydrochloride, Sigma
- 8 Acetonitrile, HPLC grade
- 9 Methanol, HPLC grade
- 10 Milli-Q water
- 11 Syringe
- 12 กระดาษกรองผ่าน Nylon -6,6 Membrane filter ขนาด 0.45 μm
- 13 Centrifuge
- 14 HPLC system ของ Waters ประกอบด้วย
 - Pump Model 616
 - UV detector Model 486
 - Controller Model 600
 - Autosampler Model 717

HPLC Condition

- 1 Column : Nova-Pak C 18, 3.9 x 150 mm
- 2 Mobile Phase : 20% acetonitrile + 80% (0.01M oxalic acid pH 2.8)
- 3 Flow rate : 1 ml/min
- 4 Detector : 360 nm

การเตรียมตัวอย่าง

- 1 โดยชั่งอาหาร 3.75 กรัม ผสมกับ McIlvaine Buffer 50 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันเป็นระยะเวลา 10 นาที
- 2 นำไปปั่นให้ตกตะกอน ที่ความเร็ว 2000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที
- 3 ดูดสารละลายใส 5 มิลลิลิตร นำไปผ่าน sep-pak C₁₈ ซึ่ง activate ด้วย methanol 10 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร
- 4 ชะ (eluted) ยากจาก sep-pak C₁₈ ด้วย 0.02 M methanolic oxalic acid 5 มิลลิลิตร และกรองตัวอย่างที่ได้ผ่าน 0.45 ไมครอน Membrane filter (PTFE) เขย่าสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำตัวอย่างน้ำที่กรองแล้ว (ปริมาตร 5 มิลลิลิตร)
- 5 นำสารละลายที่ผ่านการกรองไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ต่อไป

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณ OTC ในอาหาร (ส่วนในล้านส่วน)} = \frac{C \times E \times B}{S \times W}$$

โดยที่ C = ค่าความเข้มข้นที่ได้จาก Calibration Curve (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

E = ปริมาตรของสารละลายที่ได้จากการชะ (elute) OTC ออกจาก sep-pak ซึ่งเท่ากับ 5 มิลลิลิตร

B = ปริมาตรของสารสกัด McIlvaine Buffer ซึ่งเท่ากับ 50 มิลลิลิตร

S = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่นำไปผ่าน sep-pak ซึ่งเท่ากับ 5 มิลลิลิตร

W = น้ำหนักอาหาร (กรัม)

การวิเคราะห์ออกซิเตตราไซคลินในดินและเนื้อเยื่อด้วย HPLC

อุปกรณ์และสารเคมี

- 1 Disodium hydrogen phosphate, Na_2HPO_4
- 2 Citric acid, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 3 Ethylenediamine tetraacetate, disodium
- 4 Oxalic acid, $(\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 5 Triethylamine
- 6 Sodium Hydroxide, NaOH
- 7 Oxytetracycline hydrochloride, Sigma
- 8 Acetonitrile, HPLC grade
- 9 Methanol, HPLC grade
- 10 Milli-Q water
- 11 กระดาษกรองผ่าน Nylon -6,6 Membrane filter 0.45 μm
- 12 Syringe
- 13 Centrifuge
- 14 HPLC system ของ Waters ประกอบด้วย
 - Pump Model 616
 - UV detector Model 486
 - Controller Model 600
 - Autosampler Model 717

HPLC Condition

- 1 Column: Nova-Pack C18. 3.9x150 nm.
- 2 Mobile Phase: 20% Acetonitrile + 80% (0.01 M Oxalic acid/TEA, pH 3.0)
- 3 Flow rate 1.0 ml/min
- 4 Detector UV 360 nm

การเตรียมตัวอย่าง

- 1 นำตัวอย่าง 5 กรัม ปั่นละเอียด 3 ครั้ง ด้วยสารละลาย 0.1 M Na₂EDTA (pH4) 20, 20 และ 10 มล. โดยใช้ความเร็ว 3000 rpm นาน 2 นาที และ centrifuge ที่ 3500 rpm นาน 2 นาที
- 2 นำสารละลายส่วนใส ไสลงใน syringe ขนาด 50 มล. ที่ต่ออยู่กับ sep-pak C₁₈ ที่ผ่านการ activated (ทำโดยการ elute ด้วย methanol 20 มล. ผ่านด้วยน้ำ Milli-Q 25 มล.) จากนั้น elute สารผ่าน sep-pak ล้างด้วยน้ำ Milli-Q 25 มล. ใช้ syringe ดูดอากาศ 2 มล. แล้วอัดผ่าน sep-pak
- 3 elute ออกซิเตตราไซคลิก ออกจาก sep-pak โดยชะด้วย 50:50 oxalic-TEA 5 มล. และเก็บสารละลายให้ครบ 5 มล. โดยการอัดอากาศผ่าน sep-pak เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
- 4 ฉีด 20 ไมโครลิตร

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณ OTC (ส่วนในล้านส่วน)} = \frac{C \times E}{W}$$

โดยที่ C = ค่าความเข้มข้นที่ได้จาก Calibration Curve (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

E = ปริมาตรของสารละลายที่ได้จากการชะ (elute) OTC ออกจาก sep-pak ซึ่งเท่ากับ 5 มิลลิลิตร

W = น้ำหนักตัวอย่างกึ่ง (กรัม)

ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์สถิติของผลการทดลอง

ตารางภาคผนวกที่ 1 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ OTC ที่
ละลายจากอาหารกึ่ง เบอร์ 4 และ 5 ของการทดลองที่ 1 โดย factorial design
(GLM)

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	43286.377 ^b	31	1396.335	297.550	.000
Intercept	143403.87	1	143403.87	30558.498	.000
Feed	37066.188	1	37066.188	7898.581	.000
Salinity	1222.413	3	407.471	86.830	.000
Times	3602.433	3	1200.811	255.886	.000
Feed * salinity	406.839	3	135.613	28.898	.000
Feed *times	897.561	3	299.187	63.755	.000
Salinity *times	62.879	9	6.987	1.489	.171
Feed * salinity *times	28.064	9	3.118	.664	.738
Error	300.337	64	4.693		
Total	186990.58	96			
Corrected total	43586.714	95			

ตารางภาคผนวกที่ 2 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การละลายของ OTC จากอาหารกุ้ง เบอร์ 4 และ 5 ของการทดลองที่ 1 โดย factorial design (GLM)

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	37866.481 ^b	31	1221.499	132.472	.000
Intercept	278970.23	1	278970.23	30254.327	.000
Feed	27427.011	1	27427.011	2974.460	.000
Salinity	2355.541	3	785.180	85.153	.000
Time *feed	6890.234	3	2296.745	249.745	.000
Feed no *salinity	347.726	3	115.909	12.570	.000
Feed no *times	700.864	3	233.621	25.336	.000
Salinity *times	94.745	9	10.527	1.142	.348
Feed no * salinity *times	50.360	9	5.596	.607	.787
Error	590.134	64	9.221		
Total	317426.85	96			
Corrected total	38456.615	95			

ตารางภาคผนวกที่ 3 การวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยความเข้มข้นเริ่มต้นของ OTC ในอาหารกุ้ง เบอร์ 4 และ 5 ของการทดลองที่ 1 โดยใช้ t-test

	t	Df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Mean	
						Lower	Upper
Equal variances assumed	7.625	4	.002	1155.8333	151.5865	734.9617	1576.7050

ตารางภาคผนวกที่ 4 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของปริมาณ OTC เฉลี่ยที่คงเหลือ
ในอาหารกุ้งเบอร์ 4 และ เบอร์ 5 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ของการทดลองที่ 1
โดย factorial design (GLM)

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1703543.7 ^b	7	243363.38	296.348	.000
Intercept	11304651	1	11304651	13765.898	.000
Feed no	1023265.3	1	1023265.3	1246.050	.000
Salinity	530151.41	3	176717.14	215.192	.000
Feed no *salinity	150126.94	3	50042.312	60.938	.000
Error	13139.311	16	821.207		
Total	13021334	24			
Corrected total	1716683.0	23			

ตารางภาคผนวกที่ 5 การวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของน้ำหนักเริ่มต้นของกุ้ง ของการทดลอง
ที่ 2 โดยใช้ t-test

	t	Df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Mean	
						Lower	Upper
Equal variances assumed	1.495	4	.209	9.000E-02	6.018E-02	-7.71E-02	.2571

ตารางภาคผนวกที่ 6 การวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสุดท้ายของกุ้ง ของการทดลอง
ที่ 2 โดยใช้ t-test

	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Mean	
						Lower	Upper
Equal variances assumed	1.060	4	.349	9.333E-02	8.807E-02	-.1512	.3378

ตารางภาคผนวกที่ 7 การวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของกุ้ง ของการทดลองที่ 2
โดยใช้ t-test

	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Mean	
						Lower	Upper
Equal variances assumed	.105	4	.922	3.333E-03	3.180E-02	-8.50E-02	9.162E-02

ตารางภาคผนวกที่ 8 การวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของกุ้ง ของการทดลอง
ที่ 2 โดยใช้ t-test

	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Mean	
						Lower	Upper
Equal variances assumed	1.485	4	.212	.8167	.5498	-.7098	2.3431

ตารางภาคผนวกที่ 9 การวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของอัตราการเจริญเติบโตต่อวันของกุ้ง ของการทดลองที่ 2 โดยใช้ t-test

	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Mean	
						Lower	Upper
Equal variances assumed	1.506	4	.207	1.300E-02	8.634E-03	-1.10E-02	3.697E-02

ตารางภาคผนวกที่ 10 การวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของอัตราการรอดตายของกุ้ง ของการทดลองที่ 2 โดยใช้ t-test

	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Mean	
						Lower	Upper
Equal variances assumed	.991	4	.378	2.2100	2.2307	-3.9835	8.4035

ตารางภาคผนวกที่ 11 การวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของกุ้ง ของการทดลองที่ 2 โดยใช้ t-test

	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Mean	
						Lower	Upper
Equal variances assumed	-1.063	4	.348	-.5233	.4924	-1.8904	.8438

ตารางภาคผนวกที่ 12 การวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของปริมาณการกินอาหารของกิ้ง
ของการทดลองที่ 2 โดยใช้ t-test

	T	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Mean	
						Lower	Upper
Equal variances not assumed	5.707	2.139	.025	23.3933	4.0987	6.8152	39.9714

ตารางภาคผนวกที่ 13 การวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การกินอาหารของกิ้ง ของการ
ทดลองที่ 2 โดยใช้ t-test

	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Mean	
						Lower	Upper
Equal variances not assumed	-23.632	2.000	.002	-1.4967	6.333E-02	-1.7692	-1.2242

ตารางภาคผนวกที่ 14 การวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของอัตราการกินอาหารของกิ้ง ของการ
ทดลองที่ 2 โดยใช้ t-test

	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Mean	
						Lower	Upper
Equal variances not assumed	5.701	2.140	.025	3.3400	.5859	.9709	5.7091

ตารางภาคผนวกที่ 15 การวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของอัตราการกินอาหารต่อวัน (% ของน้ำหนักตัว) ของกึ่งของการทดลองที่ 2 โดยใช้ t-test

	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Mean	
						Lower	Upper
Equal variances not assumed	6.653	2.164	.018	.1933	2.906E-02	7.696E-02	.3097

ตารางภาคผนวกที่ 16 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของค่าครึ่งชีวิตการสลายตัวของ OTC ตกค้างในเนื้อเยื่อต่างๆ ของกึ่งที่เลี้ยงในบ่อดิน ของการทดลองที่ 3

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.085	3	.362	5.653	.064
Within Groups	.256	4	6.397E-02		
Total	1.341	7			

ตารางภาคผนวกที่ 17 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของค่าครึ่งชีวิตการสลายตัวของ OTC ตกค้างในเนื้อเยื่อต่างๆ ของกึ่งที่เลี้ยงในซีเมนต์ ของการทดลองที่ 3

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.937	3	1.312	3.709	.061
Within Groups	2.831	8	.354		
Total	6.768	11			

ตารางภาคผนวกที่ 18 การวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของค่าครึ่งชีวิตการสลายตัวของ OTC ที่ตกค้างในเนื้อเยื่อต่างๆ ของกึ่งที่เลี้ยงในบ่อคินและบ่อซีเมนต์ ของการทดลองที่ 3 โดยใช้ t-test

		t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Mean	
							Lower	Upper
M	Equal variances assumed	-1.908	3	.152	-1.3783	.7224	-3.6775	.9208
H	Equal variances assumed	-9.050	3	.003	-1.7817	.1696	-2.969	-1.1552
I	Equal variances assumed	-6.806	3	.006	-2.3067	.3389	-3.3852	-1.2281
TBM	Equal variances assumed	-5.000	3	.015	-1.8067	.3614	-2.9566	-.6567

หมายเหตุ M = muscle H = hepatopancreas I = integument TBM = total body mass

ตารางภาคผนวกที่ 19 การวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยค่าครึ่งชีวิตของการสลายตัวของ OTC ในน้ำและดินตะกอน ของการทดลองที่ 4 โดยใช้ t-test

	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Mean	
						Lower	Upper
Equal variances not assumed	-8.354	1.195	.05	-11.63965	1.393332	-23.79024	.51094

ภาคผนวก ค

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์

ORIGINAL ARTICLE

Residues of oxytetracycline in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) reared in cement tank and earthen pond

Sopon Onkong¹, Amonrat Sermwatanakul² and Chutima Tantikitti³

Abstract

Onkong, S., Sermwatanakul, A. and Tantikitti, C.

Residues of oxytetracycline in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) reared in cement tank and earthen pond

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2000, 22(Suppl.) : 717-724

The objective of this experiment was to investigate residual concentration of oxytetracycline (OTC) in different tissues of black tiger shrimp subsequent to treatment with the antibiotic. Three-month-old shrimps weighing 17.54 ± 0.5 g were cultured in $1.2 \times 2.8 \times 0.6$ m³ cement tanks or in 0.25 hectare earthen ponds. Three cement tanks each containing 30 shrimps per square meter and two earthen ponds each containing 35 shrimps per square meter were used. Shrimps were fed commercial diet sprayed with OTC (86.4% active ingredient) 5g/kg of diet at the daily feeding rate of 3% of body weight for seven days. The shrimps were then sampled every day for a period of 28 days for the determination of residues of OTC in integument, hepatopancreas, and muscles. These determinations were made using high performance liquid chromatography. For both rearing conditions, the OTC concentration in the hepatopancreas during the medication period was 2 to 3 fold higher compared with the other tissues. The OTC concentration in hepatopancreas decreased from approximately 19 to 2 ppm within 7 days after withdrawal and the tissue was free of any detectable residue at 17 and 14 days after withdrawal in the cement tanks and earthen ponds, respectively. Since the dietary concen-

¹Scientist, Satun Coastal Aquaculture Development Center, Coastal Aquaculture Division, Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Co-operative Langu, Satun 91110 Thailand, ²Ph. D. (Fish Nutrition), Ornamental Fish Division, Department of Fisheries, Kaset Klang, Jatujak, Bangkok 10900 Thailand, ³Ph. D. (Fish Nutrition), Department of Aquatic Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112 Thailand.

Corresponding e-mail : tachutim@ratree.psu.ac.th

Received, 5 April 2000 Accepted, 8 June 2000

tration of OTC used in this experiment is the same as that used in commercial farming, a withdrawal period of 21 days appears to be adequate in terms of public health concerns related to residual levels of this antibiotic in the shrimp tissues meant for human consumption.

Key words : black tiger shrimp, oxytetracycline, drug residues

บทคัดย่อ

โสภณ อ่อนคง¹ อมรรัตน์ เสริมวัฒนกุล¹ และ ชุตติมา ดันตินิกิตติ³
การตกค้างของยาปฏิชีวนะออกซิเตทตราไซคลินในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ที่เลี้ยงในบ่อซีเมนต์และบ่อดิน

ว. สงขลานครินทร์ ฉบับวทท. 2543 22(ฉบับพิเศษ) : 717-724

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการตกค้างของยาปฏิชีวนะออกซิเตทตราไซคลิน (oxytetracycline, OTC) ในเปลือก ตับ และเนื้อ ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่อซีเมนต์และบ่อดิน โดยเลี้ยงกุ้งในบ่อซีเมนต์ขนาด 1.2 x 2.8 x 0.6 ลบ.ม. ความหนาแน่น 30 ตัว/ตร.ม. และในบ่อดินขนาด 0.25 เฮกตาร์ ความหนาแน่น 35 ตัว/ตร.ม. และให้อาหารกุ้งผสม OTC (86.4% active ingredient) ปริมาณ 5 ก./อาหาร 1 กก. ในอัตรา 3% ของน้ำหนักตัว ติดต่อกันเป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างกุ้งทุกวันตั้งแต่เริ่มให้อาหารติดต่อกันเป็นเวลา 28 วัน เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณการตกค้างของ OTC ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ โดยใช้ High Performance Liquid Chromatography พบว่าในระหว่างการให้อาหารปฏิชีวนะ OTC เนื้อเยื่อที่มีปริมาณของยามากที่สุด ได้แก่ ตับ ซึ่งมีมากกว่าเนื้อเยื่ออื่น ๆ ประมาณ 2-3 เท่า ทั้งในกุ้งที่เลี้ยงในบ่อซีเมนต์และบ่อดินโดยปริมาณของยาลดลงอย่างรวดเร็วจาก 19 พีพีเอ็ม เป็น 2 พีพีเอ็ม เป็นเวลา 7 วัน หลังจากหยุดยา และไม่สามารถตรวจพบได้ในวันที่ 17 และ 14 หลังจากการหยุดยาในกุ้งที่เลี้ยงในบ่อซีเมนต์และบ่อดิน ตามลำดับ ผลจากการศึกษาค้นคว้านี้แสดงให้เห็นว่าในสภาพการเลี้ยงที่ปฏิบัติกันอยู่โดยมีการใช้ยาปฏิชีวนะออกซิเตทตราไซคลินที่ระดับ 5 ก./อาหาร 1 กก. นั้น เพื่อความปลอดภัยต่อผู้บริโภค เกษตรกรควรหยุดย้านับตั้งแต่การเริ่มให้อาหารจนถึงการจับกุ้งไม่น้อยกว่า 21 วัน

¹ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสตูล กรมประมง หมู่ 4 ตำบลปากน้ำ อำเภอละงู จังหวัดสตูล 91110 ²สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ กรมประมง จตุจักร กรุงเทพฯ 10900 ³ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Large scale production of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) carried out via intensive farming poses a risk of rapid disease spread in shrimp populations (Kongkeo, 1997). Several chemicals and drugs have been used on shrimp farms to improve water and soil quality and to prevent and control diseases. Oxytetracycline (OTC) is the predominant antibiotic used both in hatchery and grow-out ponds by black tiger shrimp farmers (Saitanu et al., 1994). To control the incidence of disease outbreaks under commercial conditions, farmers usually mix OTC 5 g/kg of diet feeding to the shrimp for a period of seven days. As in other animals, any residual levels of OTC in

shrimp tissue is considered as a serious concern for human consumers. The gravity of such concerns is inversely related to the period of withdrawal of the antibiotic prior to marketing (Reilly and Käferstein, 1997). Therefore, there is an urgent need to investigate the extent of OTC residues in shrimp tissues subsequent to its withdrawal, under practical conditions of shrimp farming.

Objective

To determine OTC residual concentrations in various shrimp tissues during medication and post-medication withdrawal periods under cement

tank and earthen pond systems of shrimp culture.

Materials and Methods

1. Shrimp Culture

Intensive culture techniques, as usually practised by shrimp farmers, were employed in this study. Three months prior to start of the experiment, PL₁₅ shrimp larvae were stocked in each of two earthen ponds each of the size 0.25 hectare. Seven days prior to start of the experiment, four hundred shrimps were randomly taken from earthen ponds. One hundred of these shrimps were then randomly taken, desensitized by chilled water (about 15 °C), lightly blotted with paper, weighed collectively and placed in each of the three cement tank (1.2 x 2.8 x 0.6 m³) for the purpose of acclimatization. Shrimp body weight at start was 17.54 ± 0.5 g for earthen ponds and 17.54 ± 0.2 g for cement tanks. The initial stocking density in cement tanks was 30 shrimps whereas in earthen ponds it was 35 shrimps per square meter.

2. Medication

A commercial grade oxytetracycline (oxytetracycline hydrochloride with 86.4% active ingredient) widely applied for bacterial treatment by farmers was used in this study. The 5 g quantity of OTC was dissolved in 45 mL of distilled water, after which the solution was sprayed on 1 kg of commercial pelleted shrimp feed No. 5 to obtain a final OTC concentration of 5 g/kg of diet. The experimental diet was freshly prepared on a daily basis. To protect the drug from leaching, the feed pellets were then sprayed with 30 mL of fish oil per kg of feed. The shrimp were fed the medicated feed 4 times a day at 6.00, 12.00, 18.00 and 24.00 h at the rate of 3% of body weight per day for seven consecutive days, both in cement tanks and in earthen ponds.

3. Sampling Procedure

Thirty shrimps from each earthen pond and three shrimps from each cement tank were randomly sampled every day throughout the experimental period, at start of the medication (day 0),

during the medication period (day 1 to 7), and during the post-medication withdrawal period (day 8 to 21). These shrimps were collected immediately before the second feeding at 12.00 hours, were sealed in a plastic bag and kept at -20 °C until analysis.

4. Sample Analysis

The OTC concentrations in hepatopancreas, muscle, integument and in the total body mass were determined according to the method described by Oka *et al.* (1985) using high performance liquid chromatography (Waters with Model 616 Pump, Model 486 UV Detector, Model 600 Controller and Model 717 Autosampler) The OTC concentrations in each tissue sample were then calculated using the following equation:

$$\text{OTC concentration (ppm)} = \frac{\text{Calibration conc. } (\mu\text{g/ml}) \times 5}{\text{sample weight (g)}}$$

5. Data Analysis

Data obtained for OTC concentrations over the sampling period were subjected to logarithmic transformation and least square regression analysis. The elimination rate constant (β) was obtained from the slope of the elimination curve. The half-life ($t_{1/2}$) of residue in each tissue was tabulated from the equation $t_{1/2} = \ln 2/\beta$ (Xu and Rogers, 1994; Uno *et al.* 1992). Means of each tissue between rearing conditions were subjected to ANOVA. Comparison of means was determined using Duncan's New Multiple Range Test (Zar, 1984).

Results

1. OTC concentration in shrimp tissues in earthen ponds

The mean OTC concentrations in different tissues of shrimp after feeding medicated feed for seven days are shown in Figure 1. The highest concentration (34.24 ± 4.37 µg/mL) was found in the hepatopancreas on day 5 of medication. The peak concentrations of OTC in integument and muscle

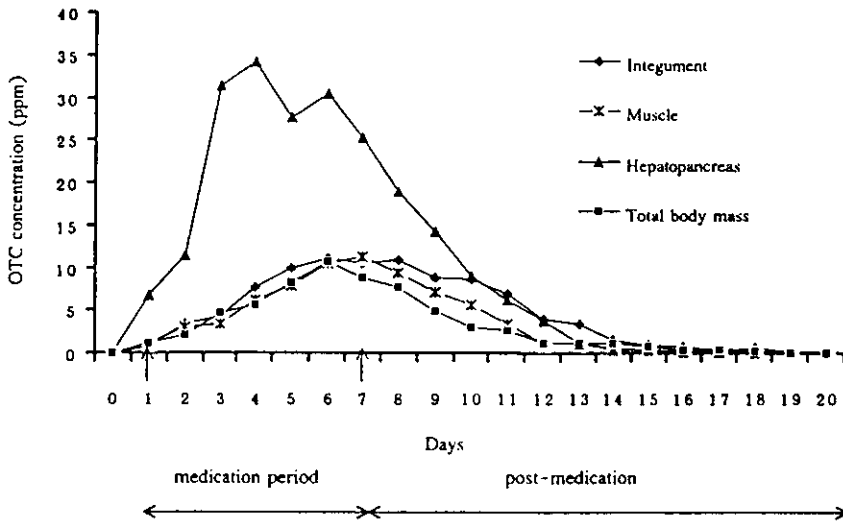


Figure 1. Concentration of OTC before, during and after a 7-day medication to shrimp in earthen ponds

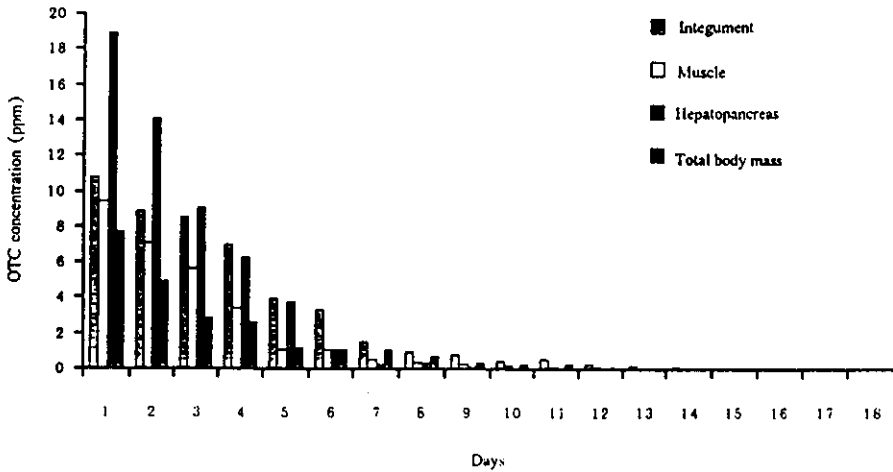


Figure 2. Elimination of OTC from tissues after medication (earthen ponds)

tissue occurred on day 6 and 7 of medication, respectively. The OTC concentration in all the tissues rapidly decreased after drug withdrawal reaching below detection limits on 10, 12, 13 and 14 day after the drug withdrawal in hepatopancreas, muscle tissue, integument and total body mass, respectively (Figure 2).

2. OTC concentration in shrimp tissues in cement tanks

The mean OTC concentrations in different

tissues of shrimp fed medicated feed for seven days are shown in Figure 3. As with the shrimp reared in earthen ponds, the highest concentration ($37.75 \pm 3.01 \mu\text{g/ml}$) was found in hepatopancreas, however this occurred at 3rd day of medication. The peak concentrations of OTC in integument and muscle tissue occurred on the same day as those found in shrimp in earthen ponds. Although elimination of OTC from different tissues of shrimps raised under cement tank conditions followed the same pattern as found for shrimps raised under

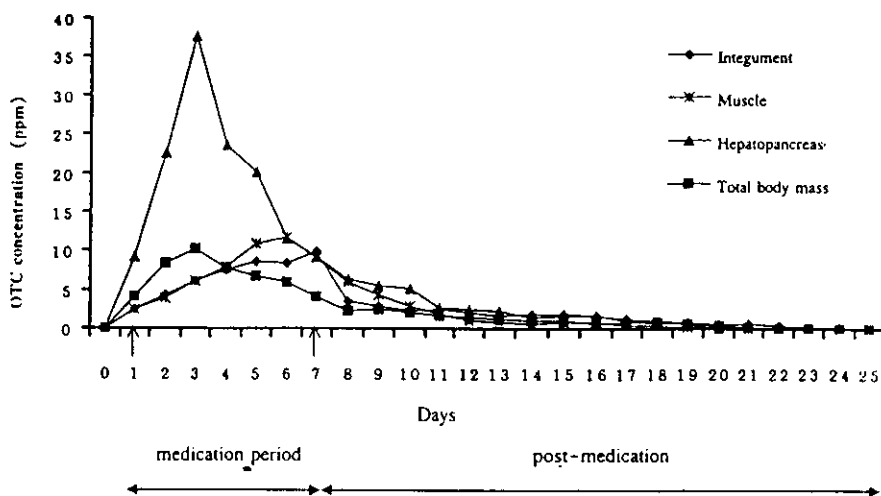


Figure 3. Concentration of OTC before, during and after a 7-day medication to shrimp in cement tanks

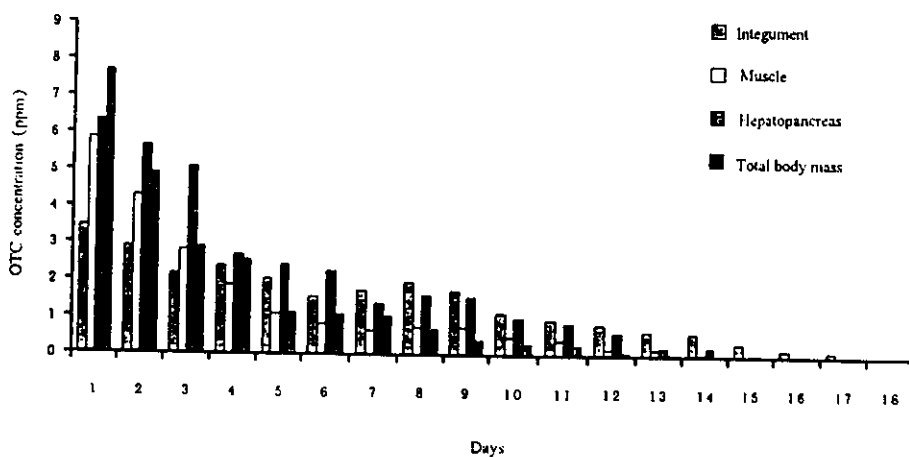


Figure 4. Elimination of OTC from tissues after medication (cement tanks)

earthen pond conditions, the elimination period was longer in the former. Figure 4 shows that the OTC concentrations reached non-detectable levels at 14, 15, 16 and 17 day after drug withdrawal in hepatopancreas, muscle tissue, total body mass and integument, respectively.

A comparison of OTC concentrations in different shrimp tissues in earthen ponds and cement tanks is further elaborated in Figure 5 whereas the apparent drug elimination rate con-

stant (β), half-life ($t_{1/2}$) and elimination time for different shrimp tissues are provided in Table 1. Statistical analysis of half-life of OTC in different shrimp tissues reared in two different conditions is further elaborated in Table 2 and shows that OTC in hepatopancreas, integument and total body mass of shrimp in cement tanks had significantly longer half-life than those in earthen ponds ($P \leq 0.05$) whereas the elimination from muscle tissue was similar under both rearing conditions.

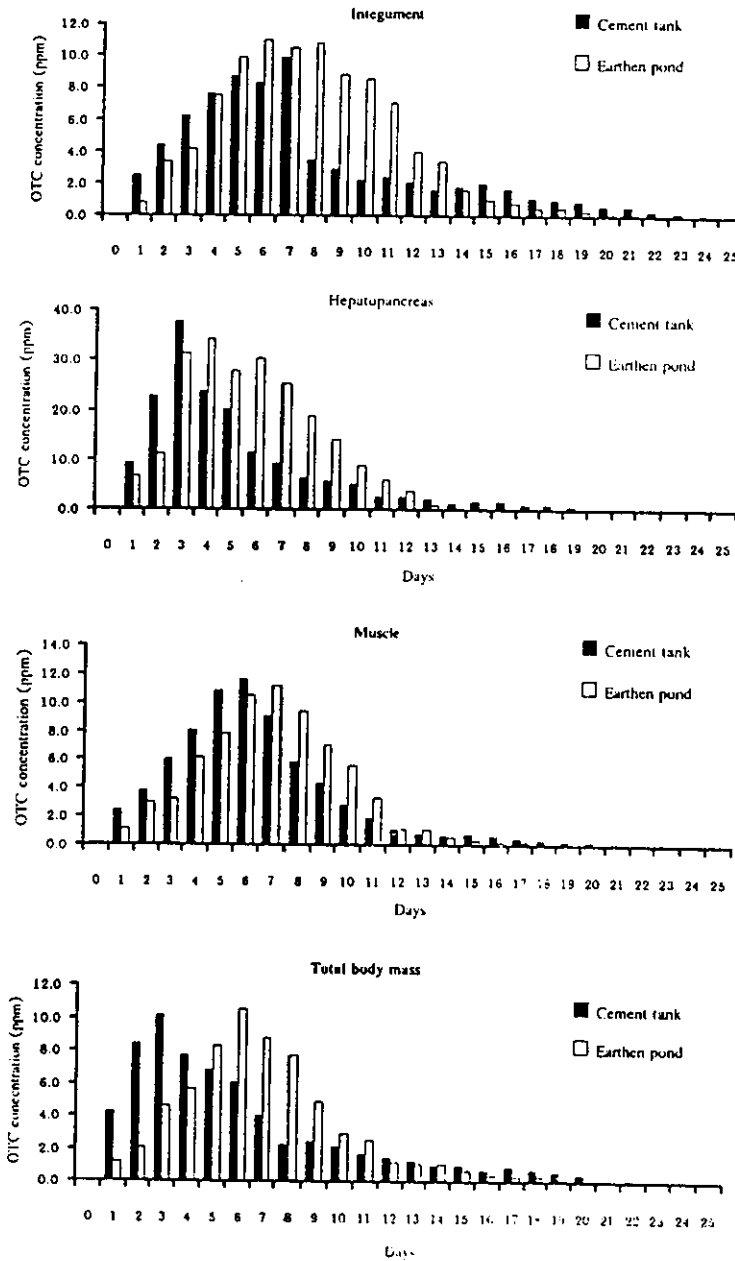


Figure 5. Comparison of OTC concentration in different tissues of black tiger shrimp in earthen ponds and cement tanks

Discussion

1. OTC concentrations in different shrimp tissues

Among the tissues examined, hepatopancreas was found to contain the highest concen-

tration of OTC during the seven day medication period irrespective of rearing conditions. This organ also achieved peak OTC concentration 2-3 days earlier than other tissues. The reason for this effect appears to be that hepatopancreas is the first organ that encounters the drug subsequent

Table 1. Apparent OTC elimination rate constants (β), half-life ($t_{1/2}$) and withdrawal times in tissues after administration of black tiger shrimp cultured either in earthen ponds or in cement tanks after 7 days period of feeding OTC- medicated pellet (5 g/kg of feed).

Culture condition and tissues	$\beta \pm \text{SD/day}$	$t_{1/2} \pm \text{SD}$ (days)	Elimination times (days)
Earthen ponds			
Muscle	-0.452 \pm 0.023	1.54 \pm 0.077	12
Hepatopancreas	-0.769 \pm 0.175	0.93 \pm 0.215	10
Integument	-0.388 \pm 0.045	1.80 \pm 0.210	14
Total body mass	-0.380 \pm 0.080	1.87 \pm 0.393	13
Cement tanks			
Muscle	-0.257 \pm 0.086	2.91 \pm 0.965	15
Hepatopancreas	-0.256 \pm 0.020	2.72 \pm 0.214	14
Integument	-0.170 \pm 0.017	4.11 \pm 0.430	17
Total body mass	-0.188 \pm 0.023	3.73 \pm 0.497	16

Table 2. Statistical comparison of the half life ($t_{1/2}$) of OTC elimination in black tiger shrimp tissues cultured either in earthen pond or in cement tank conditions after medication.

Tissue	Half life in days (mean \pm SD)	
	Earthen Pond	Cement Tank
Muscle	1.54 \pm 0.077 ^a	2.91 \pm 0.965 ^{b*}
Hepatopancreas	<u>0.93 \pm 0.215^{a**}</u>	<u>2.72 \pm 0.214^{b**}</u>
Integument	<u>1.80 \pm 0.210^a</u>	<u>4.11 \pm 0.430^b</u>
Total body mass	<u>1.87 \pm 0.393^a</u>	<u>3.73 \pm 0.497^b</u>

* Means with the same superscripts in each column are not significant different ($P > 0.05$).

** Means underlined in the same row are significantly different ($P \leq 0.05$) from each other.

to its absorption from the intestine providing an essential passage through which the drug is distributed to other tissues via the blood circulation (Lockwood, 1967). A rapid decrease in drug concentration in all tissues under examination is attributable to an efficient xenobiotic elimination mechanism that may exist in shrimps, although little information pertaining to this phenomenon is available to date. Regardless of rearing condition, OTC disappearance from hepatopancreas was fas-

ter than from other tissues. This information is in agreement with that of Lockwood (1967) and indicates an important role played by shrimp hepatopancreas in xenobiotic removal from the body.

2. OTC concentrations in shrimps raised in earthen ponds versus cement tanks

Despite the similarity in the absorption and accumulation pattern of OTC between shrimp reared in either culture conditions, OTC concentrations in tissues of shrimp reared in cement tanks were higher. This effect may have occurred because of the relatively much smaller capacity of the cement tanks causing a more even distribution of feed and a more uniform feed intake. This point gets its support from the observation that loss of drug and feed wastage in cement tanks was less than in earthen ponds leading to higher feed and drug availability.

The higher OTC concentrations in tissues from shrimp in cement tanks were nevertheless associated with longer elimination time when compared with those from earthen ponds. The difference in elimination was prominent for hepatopancreas, integument and total body mass tissue. Other factors that might have an effect on metabolism of shrimp that prolonged the elimination

process were stress associated with lower water temperature in cement tanks than in earthen ponds (27.5-30.0 versus 29.0-31.0 °C). Work of Bayer and Daniel (1987) suggested that OTC elimination in Lobster is inversely related to the ambient temperature of the culture media. Similar relationship pertaining to rainbow trout has been elucidated by Herman *et al.* (1969). Although such information for shrimp is not available, it appeared likely that a high water temperature stimulates drug metabolism and its subsequently elimination from the body (Corliss, 1979; Goebbles, 1991). The results of the present experiment indicate that under practical conditions where farmers use OTC at the rate of 5 g/kg of shrimp feed, the longest elimination time of the drug from any tissue will be 18 days. Adding a margin of few more days to this period for consumer safety, we suggest that the withdrawal period between the use of OTC and harvesting should be no less than 21 days. These considerations should be taken in to account for making recommendations about withdrawal period of drug in aquaculture.

References

- Bayer, R.C. and Daniel, P.C. 1987. Safety and efficacy of oxytetracycline for control of gaffkemia in the American lobster (*Homarus americanus*). *Fish Res.* 5:71-81.
- Corliss, J.P. 1979. Accumulation and depletion of oxytetracycline in juvenile white shrimp (*Penaeus setiferus*). *Aquaculture* 16:1-6
- Goebbles, J.H.G. 1991. Residue problem with regard to cultivated fish and shellfish. In : Problems of Chemotherapy in Aquaculture from Theory to Reality, eds. C. Michel and D.J. Aldermann Office International DES EPI ZOO TIES, Paris. pp. 333-335.
- Hermann, R.L., Collis, D. and Bullock, G.L. 1969. Oxytetracycline residue in different tissue of trout. U.S. Bureau of Sport Fisheries and Wildlife Technical Paper No. 37, pp. 1-6.
- Kongkeo, H. 1997. Comparison of intensive shrimp farming systems in Indonesia, Philippines, Taiwan and Thailand. *Aquaculture Research* 28 : 789-796.
- Lockwood, A.P.M. 1967. Aspect of the Physiology of Crustacean. W.H. Freeman and Company, San-Francisco. 570 p.
- Oka, H., Matsumoto, H. and Suzuki, K. 1985. Improvement of chemical analysis of antibiotics. VII Application of sep-pak C18 cartridge for the analysis of tetracycline residue in animal liver. *J. Chromatography* 325 : 265-274.
- Reilly, A. and Käferstein, F. 1997. Food safety hazards and the application of the principles of the hazard analysis and critical control point (HACCP) system for their control in aquaculture production. *Aquaculture Research* 28 : 735-752
- Saitanu, K., Amornsinsin, A., Kondo, F. and Tsai, C.E. 1994. Antibiotic residues in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Asian Fisheries Science*, 7 : 47-52.
- Uno, K., Aoki, T. and Uena, R. 1992. Pharmacokinetic study of oxytetracycline in cultured rainbow trout, amago salmon and yellowtail. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58(6) : 1151 - 1156.
- Xu, D. and Roger, W.A. 1994. Oxytetracycline residues in stripped bass muscle. *J. Aquatic Animal Health* 6 : 349 - 354
- Zar, J.H. 1984. *Biostatistical Analysis* (2nd ed.). Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J., 718 pp.