

## รายงานการวิจัย

ปริมาณฮอร์โมนเมสทาโนโลนตกค้างในปลานิลหลังจากการกินฮอร์โมนในระยะเวลานั้น  
Mestanolone residues in farmed tilapia *Oreochromis niloticus* following  
a short term oral administration

โดย

รศ.สพ.ญ. ดร.เจนนุช ว่องวัชชัย  
รศ.ภก. ดร. พรชัย โรจน์สิทธิศักดิ์  
สพ.ญ. นีอร วินารักษ์วงศ์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## รายงานการวิจัย

ปริมาณฮอร์โมนเมสทาโนโลนตกค้างในปลานิลหลังจากการกินฮอร์โมนในระยะเวลานั้น  
Mestanolone residues in farmed tilapia *Oreochromis niloticus* following  
a short term oral administration

โดย

รศ.สพ.ญ. ดร.เจนนุช ว่องวัชชัย  
รศ.ภก. ดร. พรชัย โรจน์สิทธิศักดิ์  
สพ.ญ. นีอร วินารักษ์วงศ์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยเรื่อง ปริมาณฮอร์โมนเมสทาโนโลนตกค้างในปลานิลหลังจากการกินฮอร์โมนในระยะเวลาสั้น (Mestanolone residues in farmed tilapia *Oreochromis niloticus* following a short term oral administration) ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2556

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ และ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ป.เจริญฟาร์ม สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องมือและสถานที่ในการทำการศึกษา

## ปริมาณฮอร์โมนเมสทาโนโลนตกค้างในปลานิลหลังจากการกินฮอร์โมนในระยะเวลาสั้น

### บทคัดย่อ

ปลานิลเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีการเลี้ยงแบบหนาแน่น ลักษณะการเลี้ยงเป็นปลาเนื้อเพศผู้ (monosex male tilapia) โดยการเหนี่ยวนำลูกปลาให้เจริญเป็นเพศผู้ด้วยการให้ฮอร์โมนเพศผู้แก่ลูกปลาวัยอ่อน เนื่องจากปลานิลเพศผู้มีการเจริญเติบโต ดีกว่าเพศเมียและการเลี้ยงปลานิลแบบเพศผู้เพศเดียวเหมาะสมต่อการจัดการเมสทาโนโลนเป็นฮอร์โมนเพศผู้สังเคราะห์ชนิดหนึ่งที่มีการใช้ผสมอาหารให้ลูกปลากินในช่วงอนุบาล เพื่อวัตถุประสงค์ในการเหนี่ยวนำลูกปลาให้เจริญเป็นเพศผู้การวิจัยนี้ ทำการศึกษา ประสิทธิภาพ ของเมสทาโนโลนในการ เหนี่ยวนำเพศหลังจาก การให้ลูกปลานิลกินฮอร์โมนขนาด 80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ติดต่อกันเป็นเวลา 15 วัน ประเมินผลการ เหนี่ยวนำเพศปลานิล จากลักษณะของ เนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์ระดับมหภาคและ ระดับมิถุวิทยาทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ ฮอร์โมนตกค้างในลูกปลานิลที่ 1, 2, 3, 5, 7, 14 และ 21 วันหลังจากการหยุดให้กินฮอร์โมนผสมอาหาร ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) ผลการศึกษา พบว่าการให้ ลูกปลานิลกินฮอร์โมนขนาด 80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ติดต่อกัน 15 วัน สามารถ เหนี่ยวนำเป็นลูกปลาเพศผู้ได้ 100% และเมื่อหยุดให้อาหารผสมฮอร์โมนเป็นเวลา 1 วัน 2 วัน 3 วัน พบ ปริมาณเมสทาโนโลนในตัวอย่างลูกปลา 0.856-3.198 นาโนกรัมต่อปลา 1 กรัม และเมื่อหยุดให้อาหาร ผสมฮอร์โมนเป็นเวลา 5 วัน ไม่พบปริมาณเมสทาโนโลนในตัวอย่าง หรือปริมาณต่ำกว่าระดับต่ำสุดที่วิธี วิเคราะห์สามารถตรวจสอบได้อย่างถูกต้อง (0.5 นาโนกรัมต่อเนื้อปลา 1 กรัม) การศึกษานี้แสดงว่าการ ให้ฮอร์โมนเมสทาโนโลนขนาด 80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารเป็นระยะเวลา 15 วันแก่ลูกปลานิลวัยอ่อน สามารถเหนี่ยวนำให้ลูกปลานิลเจริญเป็นปลาเพศผู้และปลานิลขนาดบริโภคซึ่งเลี้ยงต่อจากระยะเวลา หยุดการให้ฮอร์โมนแล้ว 6-8 เดือน จึงไม่มีปริมาณฮอร์โมนตกค้างในระดับที่อาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค

**คำสำคัญ**    เมสทาโนโลน    ปลานิล    ฮอร์โมนตกค้าง

## Mestanolone residues in farmed tilapia *Oreochromis niloticus* following a short term oral administration

### Abstract

Tilapia (*Oreochromis niloticus*) is an important freshwater fish in Thailand. Along with intensive farming, androgenic hormones are applied during the farming process to produce monosex-male tilapia because of its better yield. A monosex population also allows for more effective management of a single crop. Mestanolone, a synthetic androgenic steroid, is used in newly hatched tilapia fry for sex reversal, but its residual level in these fry has not been examined. This study investigated the androgenic efficacy of mestanolone and mestanolone residues in tilapia after a course of oral administration of mestanolone to early-stage tilapia fry at a dose of 80 mg/kg feed for 15 consecutive days. At completion of the hormonal treatment, histological examination of gonadal tissue was performed for sexing of tilapia fry and residual mestanolone in fry were investigated. Analysis of residual mestanolone was performed in the treated fry at 1, 2, 3, 5, 7, 14 and 21 days after the last dose using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The results showed that oral administration of mestanolone at 80 mg/kg to early-stage tilapia fry for 15 consecutive days induced a 100% male population. The amounts of mestanolone detected in 15 days hormonal treated fry on days 1, 2 and 3 after hormone withdrawal ranged from 0.856-3.198ng/g. Mestanolone was not detectable in fry deprived of the hormonal diet for 5 days (limit of quantitation, LOQ, 0.5 ng/g). This suggests that, after an adequate withdrawal period following treatment of early-stage fry negligible levels of mestanolone will be present in tilapia during the growth stage of 6-8 months.

**Keywords** Mestanolone Nile Tilapia Residues

## สารบัญเรื่อง

### ปริมาณฮอร์โมนเมสทาโนโลนตกค้างในปลานิลหลังจากการกินฮอร์โมนในระยะเวลาสั้น

	หน้า
บทคัดย่อ.....	i
Abstract.....	ii
บทที่ 1 บทนำ .....	1
บทที่ 2 การเหนี่ยวนำเพศในลูกปลานิลโดยการให้ฮอร์โมนเมสทาโนโลนผสมอาหาร.....	6
• การให้ฮอร์โมนเมสทาโนโลนแก่ลูกปลานิล.....	6
• การตรวจเพศปลานิลที่ได้รับฮอร์โมนเมสทาโนโลน.....	6
• ผลการศึกษา.....	8
บทที่ 3 ปริมาณฮอร์โมนเมสทาโนโลนตกค้างในปลานิล.....	12
• การเก็บตัวอย่าง.....	12
• การเตรียมตัวอย่างเนื้อปลานิลสำหรับการวิเคราะห์.....	12
• การวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนเมสทาโนโลนตกค้างในปลานิล.....	12
• ผลการศึกษา.....	14
อภิปรายและวิจารณ์ผล .....	26
สรุปและเสนอแนะ.....	28
บรรณานุกรม .....	30
ภาคผนวก .....	33

## สารบัญตาราง

### ปริมาณฮอร์โมนเมสทาโนโลนตกค้างในปลานิลหลังจากการกินฮอร์โมนในระยะเวลาสั้น

	หน้า
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	
ตารางที่ 1.1 การศึกษาขนาด ระยะเวลา การให้ฮอร์โมนเพศผู้ผสมอาหารในปลาชนิดต่างๆ และปริมาณฮอร์โมนตกค้างในเนื้อปลา.....	4
<b>บทที่ 2 การเหนี่ยวนำเพศในลูกปลานิลโดยการให้ฮอร์โมนเมสทาโนโลนผสมอาหาร</b>	
ตารางที่ 2.1 เปอร์เซ็นต์เพศของปลานิลที่ได้รับฮอร์โมนเมสทาโนโลนโดยการแช่และเลี้ยงต่อด้วยอาหารผสมฮอร์โมนเมสทาโนโลน.....	9
<b>บทที่ 3 ปริมาณฮอร์โมนเมสทาโนโลนตกค้างในปลานิล</b>	
ตารางที่ 3.1 system suitability test ของวิธีวิเคราะห์เมสทาโนโลนตกค้างในเนื้อเยื่อปลานิล.....	14
ตารางที่ 3.2 การตรวจสอบความถูกต้องและความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์เมสทาโนโลนตกค้างในเนื้อเยื่อปลานิล.....	16
ตารางที่ 3.3 ความเป็นเส้นตรงและช่วงความเข้มข้นของเมสทาโนโลนจากวิธีวิเคราะห์ปริมาณเมสทาโนโลนในเนื้อเยื่อปลานิล.....	17
ตารางที่ 3.4 Limit of quantitation ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณเมสทาโนโลนในเนื้อเยื่อปลานิล.....	22
ตารางที่ 3.5 ผลการตรวจสอบการกลับคืนของการสกัดเมสทาโนโลนจากเนื้อเยื่อปลานิล (recovery of extraction).....	23
ตารางที่ 3.6 ผลการวิเคราะห์เมสทาโนโลนตกค้างในปลานิลที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมนเมสทาโนโลนเป็นเวลา 15 วัน.....	25
<b>บทที่ 4 อภิปรายผลและวิจารณ์</b>	
ตารางที่ 4.1 เปอร์เซ็นต์เพศผู้และปริมาณเมสทาโนโลนฮอร์โมนที่ตรวจวิเคราะห์ในลูกปลานิลที่ได้รับฮอร์โมนผสมอาหารในขนาด 80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารเป็นระยะเวลา 15 และ 23 วัน.....	27

## สารบัญภาพ

### ปริมาณฮอร์โมนเมสทาโนโลนตกค้างในปลานิลหลังจากการกินฮอร์โมนในระยะเวลาสั้น

หน้า

#### บทที่ 1 บทนำ

ภาพที่ 1.1	โครงสร้างทางเคมีของฮอร์โมนเพศผู้ที่นำมาใช้ในการเหนี่ยวนำเพศผู้ในปลานิล.....	3
------------	---	---

#### บทที่ 2 การเหนี่ยวนำเพศในลูกปลานิลโดยการให้ฮอร์โมนเมสทาโนโลนผสมอาหาร

ภาพที่ 2.1	การทดลองให้ฮอร์โมนเมสทาโนโลนผสมอาหารแก่ลูกปลานิล.....	7
ภาพที่ 2.2	เนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์เพศเมียในปลานิล.....	10
ภาพที่ 2.2	เนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์เพศผู้ในปลานิล.....	11

#### บทที่ 3 ปริมาณฮอร์โมนเมสทาโนโลนตกค้างในปลานิล

ภาพที่ 3.1	LC-MS/MS chromatogram ของการวิเคราะห์สารละลายผสมของสารมาตรฐานเมสทาโนโลน และ ไฟแนสเทอไรด์.....	15
ภาพที่ 3.2	LC-MS/MS chromatogram ของสารละลายมาตรฐานเมสทาโนโลน.....	18
ภาพที่ 3.3	ความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ (method linearity) ของวิธีวิเคราะห์เมสทาโนโลนในลูกปลานิลด้วย LC-MS/MS.....	20
ภาพที่ 3.4	LC-MS/MS chromatogram ของเมสทาโนโลน ที่มีสารละลายมาตรฐานภายในไฟแนสเทอไรด์ ความเข้มข้น 50 ng/g จากตัวอย่างลูกปลานิล.....	21

#### ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1	LC-MS chromatogram ของเมสทาโนโลนและไฟแนสเทอไรด์จากตัวอย่างลูกปลานิลที่เลี้ยงด้วยฮอร์โมนเมสทาโนโลนผสมอาหารเป็นเวลา 15 วัน.....	34
ภาคผนวกที่ 2	LC-MS chromatogram ของเมสทาโนโลนและไฟแนสเทอไรด์จากตัวอย่างลูกปลานิลที่เลี้ยงด้วยฮอร์โมนเมสทาโนโลนผสมอาหารเป็นเวลา 23 วัน.....	42
ภาคผนวกที่ 3	Studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in food producing animals: Validation of analytical methods used in residue depletion studies. VICH GL 49 (MRK)-metabolism and residue kinetics. February 2011 adopted at step 7 of the VICH Process by the VICH Steering Committee.....	50



## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

### ปริมาณฮอร์โมนเมสทาโนโลนตกค้างในปลานิลหลังจากการกินฮอร์โมนในระยะเวลาสั้น

คำอธิบาย	สัญลักษณ์/คำย่อ
กรัม (gram)	g
มิลลิกรัม (milligram)	mg
นาโนกรัม (nanogram)	ng
กิโลกรัม (kilogram)	kg
ลิตร (litre)	L
มิลลิลิตร (milliliter)	ml
ไมโครลิตร (microliter)	μl
มิลลิเมตร (millimeter)	mm
ไมโครเมตร (microliter)	μm
มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (milligram per milliliter)	mg/ml
ไมโครกรัม /มิลลิลิตร (microgram per milliliter)	μg/ml
นาที (minute)	min
ชั่วโมง (hour)	h
องศาเซลเซียส (degree Celsius)	°C
ความเป็นกรดเบส	pH
อุณหภูมิ	Temp
แอมโมเนีย	NH <sub>3</sub>
สัมประสิทธิ์ของความแปรผัน (Coefficient of variation)	CV
part per million	ppm
part per billion	ppb
liquid chromatography tandem mass spectrometry	LC-MS/MS
limit of detection	LOD
limit of quantitation	LOQ
maximum residue limit	MRL

## บทที่ 1

### บทนำ

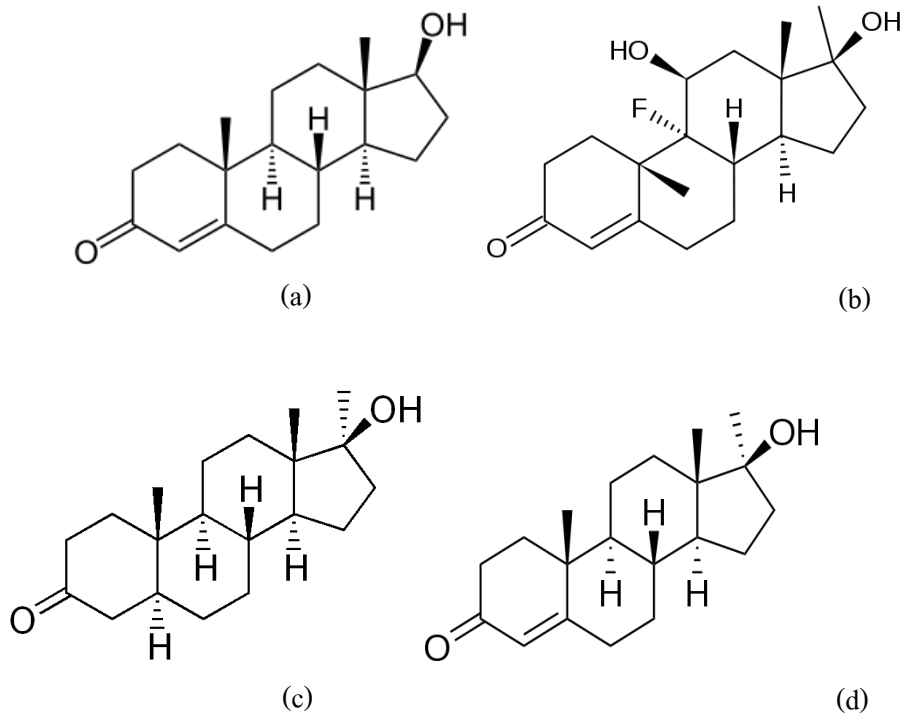
ปลานิล *Oreochromis nilotica* เป็นปลาน้ำจืด ที่ปัจจุบันกำลังได้รับความนิยมอย่างสูงในตลาดโลกเนื่องจาก สามารถทำการ เพาะเลี้ยงทั่วไปทั้งในทวีปเอเชียและอเมริกา การเลี้ยงการจัดการ สามารถทำได้ง่าย มีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆ ที่เปลี่ยนแปลง มีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว และมีปัญหาเรื่องโรคน้อย ปลานิลเพาะเลี้ยงที่ผลิตได้ถูกนำมาเป็นวัตถุดิบสำหรับประกอบอาหารนำมา ทำเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารเพื่อเพิ่มมูลค่านอกจากนั้นผลิตภัณฑ์แปรรูปต่างๆ จากหนัง ปลานิล เช่น เครื่องหนัง เช่น รองเท้าและกระเป๋า กำลังได้รับความนิยมจากตลาดโลกด้วยเช่นกัน (ธนาคารเพื่อการส่งออกและนำเข้าแห่งประเทศไทย, 2550) ผลผลิตปลานิลทั่วโลกมีมากเป็นอันดับ 9 ของผลผลิตสัตว์น้ำทั่วโลกที่ได้มาจากการเพาะเลี้ยงและในปี พ.ศ. 2553 มีผลผลิตปลานิลทั่วโลก ประมาณ 3.2 ล้านตัน (Fitzsimmons และคณะ, 2011) โดยประมาณสองในสามของผลผลิตมาจากทวีป เอเชีย สำหรับประเทศไทยปลาน้ำจืดเศรษฐกิจชนิดนี้ได้รับความนิยมในการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกัน เพราะสามารถเลี้ยงได้ทุกสภาพในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศ โดยเลี้ยงทั้งในรูปแบบอุตสาหกรรมการค้า และการเลี้ยงเพื่อการบริโภคภายในครัวเรือน ประเทศไทยสามารถผลิตปลานิลปริมาณ 200,000 ตัน คิดเป็นมูลค่ากว่า 7,900 ล้านบาท (สมาคมอาหารแช่เยือกแข็งไทย, 2551) ซึ่งเพียงพอต่อความต้องการ ภายในประเทศและสามารถเพิ่มศักยภาพในการผลิตเพื่อส่งออกไปยังตลาดต่างประเทศทั้ง สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น และทวีปยุโรปประเทศไทยจัดอยู่ในกลุ่มประเทศผู้ผลิตรายใหญ่ โดยในปี พ.ศ. 2552 ไทยมีกำลังการผลิตสูงเป็นลำดับที่ 4 ของโลกในการผลิตปลานิล รองจากประเทศจีน อียิปต์ และ อินโดนีเซีย (FAO, 2011) ส่งออกปลานิลทั้งในรูปแบบแช่แข็งและในรูปแช่เนื้อประมาณ 12,956 ตัน และคิด เป็นมูลค่าการส่งออกสูงถึง 689 ล้านบาท (กรมประมง, 2553) ปัจจุบันการเลี้ยงปลานิล ในประเทศไทย พัฒนาการเลี้ยงเข้าสู่ระบบการเลี้ยงแบบหนาแน่น เกษตรกรนิยมเพาะเลี้ยงปลานิลแบบเพศผู้เพศเดียว (monosex male tilapia) โดยการให้ฮอร์โมนเพศผู้สังเคราะห์ นำมาผสมอาหารให้ลูกปลากินในช่วง อนุบาล เพื่อเหนี่ยวนำให้ลูกปลาไม่เกิดความสมบูรณ์พันธุ์ของเพศเมีย วิธีการใช้ฮอร์โมนผสมอาหารนี้มี ประสิทธิภาพดี ทำให้ได้ผลผลิตเป็นลูกปลานิลเพศผู้ต่อหน่วยการผลิตสูง และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ ในทุกระบบการเพาะเลี้ยง

ฮอร์โมนเพศได้เข้ามามีบทบาทในการเลี้ยงปลาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน มีรายงานการศึกษาที่ นำฮอร์โมนมาใช้กับปลาแซลมอน เป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2480 หลังจากนั้นฮอร์โมนเพศอีกหลายชนิดได้ ถูกนำมาใช้ทดลองในปลาชนิดต่างๆ (Pandian and Sheela, 1995) รายงานดังกล่าว อาทิเช่น การใช้ ฮอร์โมนเอทินิลเทสโทสเตอโรน (ethynyltestosterone) และ 1-ดีไฮโดรเทสโทสเตอโรน

(1-dehydrotestosterone) ใน blue tilapia (Guerrero, 1975) การใช้ฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) ใน blue tilapia (Jensen, et al., 1979) การใช้ฮอร์โมนเมสทาโนโลน (mestanolone) ใน Nile tilapia (Soto, 1992) การใช้ฮอร์โมนฟลูออกซีเมสเทอโรน (fluoxymesterone) ใน Nile tilapia (Phelps and Popma, 2000) การใช้เมทิลเทสโทสเตอโรนในปลาไหล eelpout (Korsgaard, 2006) การใช้ฮอร์โมนเมทิลเทสโทสเตอโรน (methyltestosterone) ใน medaka (Kang et al., 2008) เป็นต้น โดยกลไกของฮอร์โมนในการเหนี่ยวนำเพศนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดแต่จากหลายการศึกษาพบว่าฮอร์โมนเพศผู้สังเคราะห์ที่ให้เข้าไปนั้น จะไปมีผลยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ที่สำคัญ รวมทั้งไซโตโครมพี 450 อะโรมาเทส (cytochrome P450 aromatase) ซึ่งมีบทบาทในการพัฒนาของ อัณฑะ (testicular differentiation) ในปลาที่มีพันธุกรรมเป็นเพศเมีย (Kwon et al., 2000; Bhandari et al., 2006) และการให้ฮอร์โมนเพื่อวัตถุประสงค์ในการเหนี่ยวนำเพศให้ได้มีประสิทธิภavnั้นมีความจำเป็นต้องให้ฮอร์โมนในช่วงระยะเวลาจำกัดที่เรียกว่าระยะวิกฤต (critical period, labial period) เป็นระยะที่ลูกปลายังมีพัฒนาการของระบบสืบพันธุ์ที่ไม่สมบูรณ์ซึ่งจะมีระยะเวลาที่แตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของปลา ปลานิลซึ่งจัดอยู่ใน ตระกูล Cichlidae จะมีระยะวิกฤตคือ วันที่ 10-30 หลังจากการฟักออกจากไข่ (hatching) (Pandian and Sheela, 1995)

สำหรับปลานิลที่ปัจจุบันได้มีการพัฒนาระบบการเลี้ยงเข้าสู่ระบบอุตสาหกรรมนิยมการเลี้ยงปลานิลแบบเพศผู้เพศเดียว (monosex male tilapia) เพราะปลานิลเพศผู้มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าเพศเมียสามารถลดปัญหาการผสมกันเองและการแตกไซส์ภายในบ่อทำให้สะดวกต่อการจัดการ จึงมีการนำฮอร์โมนเพศผู้เข้ามาใช้เพื่อการเหนี่ยวนำเพศในลูกปลานิลอย่างแพร่หลาย ถึงแม้จะมีวิธีการอื่นๆ ในการเหนี่ยวนำให้ไม่เกิดความสมบูรณ์พันธุ์ของเพศเมีย อาทิเช่น การคัดแยกเพศด้วยมือ การผสมข้ามพันธุ์ (El-Sayed, 2006)แต่ไม่ได้รับความนิยมมาก เท่ากับวิธีการใช้ฮอร์โมนเพราะวิธีการให้ฮอร์มนั้นเป็นวิธีที่ต้นทุนไม่สูงนักหากเทียบกับวิธีอื่นและเกษตรกรสามารถปฏิบัติได้เองภายในฟาร์ม ฮอร์โมนเพศผู้ที่นิยมใช้ในปลานิล อาทิเช่น เทสโทสเตอโรน (testosterone) เมทิลเทสโทสเตอโรน (methyltestosterone) เมสทาโนโลน (mestanolone) และ ฟลูออกซีเมสเทอโรน (fluoxymesterone) ดังแสดงในภาพ ที่ 1 ฮอร์โมนเมสทาโนโลน (mestanolone) หรือ แอลฟาเมทิลไดไฮโดรเทสโทสเตอโรน (17 $\alpha$ -methylated dihydrotestosterone; DHT) เป็นฮอร์โมนเพศผู้สังเคราะห์ มีคุณสมบัติเป็นฮอร์โมนเพศผู้ (androgenic effect) ที่สูงและสูงกว่าฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน ในสมัยแรกถูกนำมาใช้เพื่อวัตถุประสงค์ในทางการแพทย์ ในการรักษาผู้ป่วยเพศชายที่มีความบกพร่องของระดับฮอร์โมนเพศ แต่เนื่องจากคุณสมบัติที่สามารถสร้างกล้ามเนื้อได้สูง จึงทำให้ในปัจจุบันเมสทาโนโลนถูกนำมาใช้กับนักกีฬา และม้าแข่งเพื่อหวังผลในการเสริมสร้างกล้ามเนื้อ และถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลานิลเพื่อเหนี่ยวนำให้ลูกปลานิลไม่มีความสมบูรณ์พันธุ์ของเพศเมียในปัจจุบัน โดยการให้ฮอร์โมนเมสทาโนโลนจะผสม

อาหารในขนาด 80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ให้แก่ลูกปลานิลกินเป็นระยะเวลา 23 วัน (เจนนุชและคณะ, 2554)



**ภาพที่ 1.1** โครงสร้างทางเคมีของฮอร์โมนเพศผู้ที่นำมาใช้ในการเหนี่ยวนำเพศผู้ในปลานิล (a) testosterone (b) fluoxymesterone (c) mestanolone และ (d) methyltestosterone

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณ ฮอร์โมนเพศผู้ มีรายงานการนำหลายเทคนิคมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ โดยวิธีการที่นิยมในปัจจุบันคือ เทคนิคทาง Chromatography ซึ่งมีความแม่นยำ (sensitivity) และจำเพาะสูง (specificity) จึงได้รับการพัฒนาขึ้นและนิยมใช้อย่างแพร่หลาย มีรายงานการตรวจหาและวัดระดับฮอร์โมนชนิดนี้ด้วยวิธี Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) ในการศึกษาหาฮอร์โมนจากเนื้อเยื่อต่อมลูกหมากในคน (Higashi et al., 2005) นอกจากนี้ยังมีการนำเทคนิค Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) มาใช้ในการตรวจปัสสาวะของคน (Bi and Massé, 1992) ในปัสสาวะของม้าแข่ง (Yamada et al., 2007; Yamada et al., 2008) ในปัสสาวะของเกรย์ฮาวนด์ (Biddle et al., 2009) เป็นต้น มีรายงานการศึกษาที่ทำการตรวจหาปริมาณฮอร์โมน 17 อัลฟาเมทิลเทสโทสเตอโรน (17alpha-methyltestosterone) และ 17 อัลฟาเอทินิลเทสโทสเตอโรน (17 alpha-ethynyltestosterone) ตกค้างในเนื้อปลาชนิดต่างๆ ดังแสดงสรุปในตารางที่ 1 แต่สำหรับการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนเมสทาโนโลนในเนื้อของปลานิลนั้น พบเพียงการศึกษาของเจนนุช และคณะ(2554) เท่านั้น

ตารางที่ 1.1 ขนาด ระยะเวลา การให้ฮอร์โมนเพศผู้ผสมอาหารในปลาชนิดต่างๆ และปริมาณฮอร์โมนตกค้างในเนื้อปลา

Fish	Hormonal dosage (kg <sup>-1</sup> feed)	Temperature	Hormonal level	Time of detection	Reference
<i>O. niloticus</i>	300mg MT/kg (21 days)	-	Undetectable	5 day after withdrawal	Guerrero (2008)
<i>O. niloticus</i> x <i>O. aureus</i>	60mg ET/kg (77 days)	26±1°C	Undetectable	2 day after withdrawal	Rothbard et al (1990)
<i>O. aureus</i>	60mg MT//kg (21 days)	26±2°C	Less than 1% ( 5ng/g tissue)	5 day after withdrawal	Goudie et al (1986)
<i>O. mossambicus</i>	40mg MT//kg (37 days)	28±1°C	Undetectable	100 hrs after withdrawal	Johnstone et al (1983)
<i>Salmo gairdneri</i>	30mg MT//kg (21 days)	10-11°C	Undetectable	100 hrs after withdrawal	Johnstone et al (1983)

MT= 17 $\alpha$ -methyltestosterone ET = 17 $\alpha$ -ethynyltestosterone

การให้ฮอร์โมนเมสทาโนโลนผสมอาหารในขนาด 80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นระยะเวลา 23 วัน ซึ่งเป็นวิธีที่ปฏิบัติอยู่ในปัจจุบันนั้นสามารถให้ผลผลิตเป็นลูกปลานิลเพศผู้สูงถึง 100% แม้วิธีการเหนี่ยวนำเพศผู้ในลูกปลานิลด้วยการให้ฮอร์โมนเมสทาโนโลนผสมอาหารแก่ลูกปลานิลกินนี้ จะมีประสิทธิภาพสูง แต่ยังคงต้องให้ติดต่อกันเป็นระยะเวลาถึง 23 วัน ซึ่งเป็นระยะเวลาที่นาน ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะลดระยะเวลาหรือปริมาณฮอร์โมนเมสทาโนโลนที่ให้แก่ลูกปลานิลเพื่อเหนี่ยวนำให้เป็นปลาเพศผู้ ซึ่งเป็นการลดปริมาณฮอร์โมนที่ลูกปลานิลได้รับ เป็นแนวทางปฏิบัติเพื่อลดการใช้สารเคมีในกระบวนการเลี้ยงปลานิลดังนั้นการศึกษานี้จึง เป็นการทดสอบเพื่อ ลดระยะเวลาและปริมาณการใช้ฮอร์โมนเมสทาโนโลนในการเหนี่ยวนำเพศในลูกปลานิล และตรวจปริมาณฮอร์โมนเมสทาโนโลนในปลานิลด้วยเทคนิค LC-MS/MS เพื่อนำข้อมูลไปเปรียบเทียบกับ ประสิทธิภาพการเหนี่ยวนำเพศผู้ในลูกปลานิลและปริมาณตกค้างของฮอร์โมนในปลานิลที่เลี้ยงด้วยวิธีการให้ฮอร์โมนแบบที่นิยมปฏิบัติอยู่ในปัจจุบัน

## บทที่ 2

### การเหนี่ยวนำเพศในลูกปลานิลโดยการให้ฮอร์โมนเมสทาโนโลนผสมอาหาร

#### การให้ฮอร์โมนเมสทาโนโลนแก่ลูกปลานิล

##### 1.1 การแช่ฮอร์โมน

ลูกปลานิลระยะไข่แดงยุบ (อายุประมาณ 7-10 วันหลังปฏิสนธิ) จากโรงเรือนเพาะฟักจำนวน 12,000 ตัว ถูกนำเข้าสู่การทดลอง แบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ A, B, C และ D แต่ละกลุ่มมีปลาจำนวนกลุ่มละ 3,000 ตัว นำมาแช่ฮอร์โมนเมสทาโนโลน (Sigma-Aldrich, USA) เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 0, 500, 1,000, 1,800 ไมโครกรัมต่อน้ำ 1 ลิตร ตามลำดับ

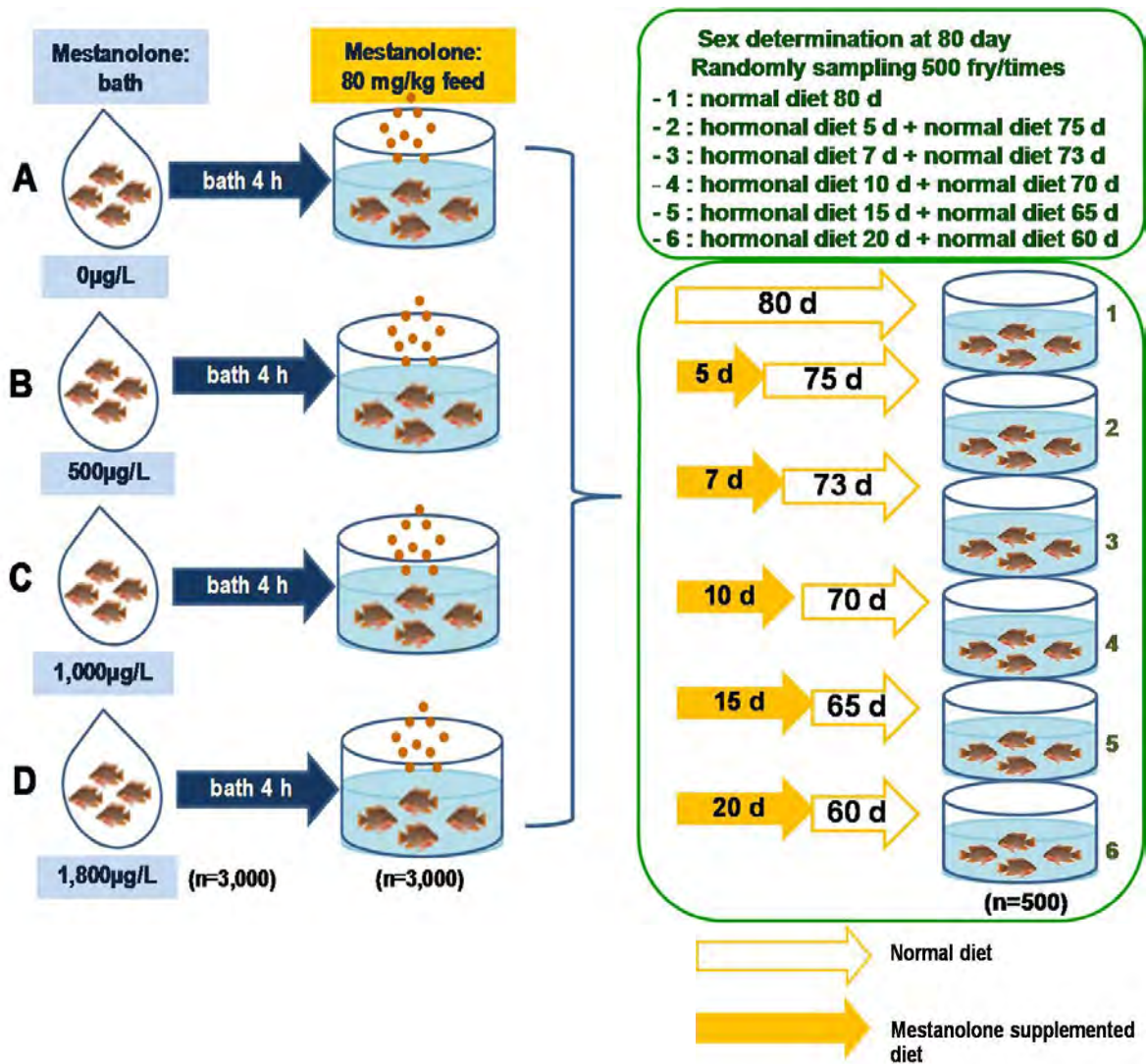
##### 1.2. การให้อาหารผสมฮอร์โมน

ฮอร์โมนผสมอาหารสามารถเตรียมได้โดยการละลายฮอร์โมนเมสทาโนโลนใน 95% เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) จะได้เป็น stock solution ซึ่งจะนำมาผสมกับอาหารปลานิลตามวิธีการของ National Freshwater Fisheries Technology Center (2000) ได้อาหารที่มีปริมาณฮอร์โมนเมสทาโนโลนเข้มข้นเท่ากับ 80 mg/kg อาหารแล้วนำไปเก็บไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 4°C รอการนำไปใช้

ลูกปลานิลทุกกลุ่ม (A-D) จากโรงเรือนเพาะฟักจะถูก ย้ายมาเลี้ยงต่อยังบ่ออนุบาล โดยกลุ่มควบคุม (กลุ่ม D) จะได้รับอาหารปกติตลอดการทดลอง (ระยะเวลาประมาณ 80 วัน) และกลุ่มทดลอง (กลุ่ม A-C) ได้รับอาหารผสมฮอร์โมนเมสทาโนโลนในขนาด 80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ทุกๆ 5 วัน จะทำการสุ่มลูกปลาออกมาจากแต่ละกลุ่ม จำนวนกลุ่มละ 500 ตัว คือสุ่ม ณ วันที่ 0, 5, 7 10, 15 และ 20 ของการให้อาหารผสมฮอร์โมน มาเลี้ยงต่อด้วยอาหารปกติ จนปลาถึงขนาดที่ทำการคัดแยกเพศได้ (ระยะเวลาการเลี้ยงประมาณ 80 วัน)

#### การตรวจเพศปลานิลที่ได้รับฮอร์โมนเมสทาโนโลน

นำปลานิลที่ได้รับฮอร์โมนเมสทาโนโลนมาทำการตรวจดูเนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์ด้วย gonadal squash technique ซึ่งใช้สีย้อมอะซีโตคาร์มีน (aceto-carmin stain) (นวลมนี, 2537) และวิธีการทางมิถุนวิทยา (histology)



ภาพที่ 2.1 การทดลองให้ฮอร์โมนเมสทาโนโลนผสมอาหารแก่ลูกปลานิล



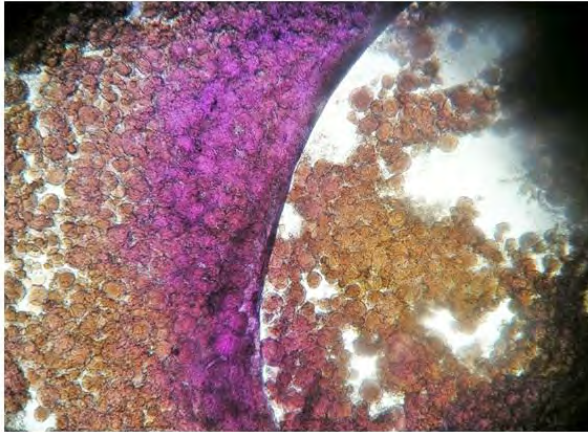
## ผลการศึกษา

การประเมินผลการเหนี่ยวนำเพศผู้ในลูกปลานิลด้วยการแช่และให้อาหารผสมฮอร์โมน เมสทาโนโลน การศึกษาเนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์ระดับมหภาค (gonadal squash technique) ของปลานิลอายุประมาณ 80 วัน โดยนำเนื้อเยื่อสด (fresh tissue imprint) ของอวัยวะระบบสืบพันธุ์ ผ่านการใช้สีย้อมอะซีโตคาร์มีน (aceto-carmin stain) ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ และการศึกษาเนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์ระดับมิถุนวิทยา (histology) ในปลานิลอายุ 100 วัน โดยวิธีทางมิถุนวิทยาพบว่าทุกกลุ่มการทดลองที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมนเมสทาโนโลนในขนาด 80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารเป็นระยะเวลา 15 วันนั้นเป็นปลานิลเพศผู้ถึง 100% (ภาพที่ 2.2 และ ภาพที่ 2.3) และการแช่ฮอร์โมนในน้ำเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมงให้แก่ลูกปลานิลในระยะเพาะฟัก สามารถเหนี่ยวนำการเป็นลูกปลานิลเพศผู้ได้สูงกว่าการเลี้ยงด้วยอาหารเพียงอย่างเดียว ดังแสดงในตารางที่ 2

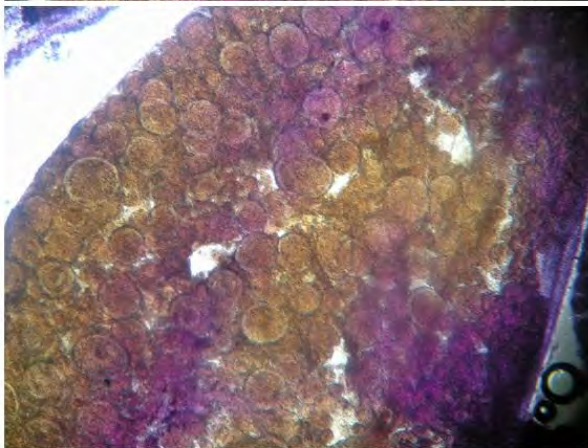
การแช่ฮอร์โมนเมสทาโนโลนที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อน้ำ 1 ลิตรเป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วเลี้ยงลูกปลาต่อด้วยอาหารผสมฮอร์โมน เมสทาโนโลน (80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร) เป็นระยะเวลา 0, 5, 7, 10, 15 และ 20 วัน ตรวจพบปลานิลเพศผู้เท่ากับ 53.73%, 93.19%, 95.26%, 99.23%, 100.00% และ 100.00% ตามลำดับ สำหรับการแช่ฮอร์โมน เมสทาโนโลน ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อน้ำ 1 ลิตร เป็นเวลา 4 ชั่วโมงแล้วเลี้ยงลูกปลาต่อด้วยอาหารผสมฮอร์โมน เมสทาโนโลน (80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร) เป็นระยะเวลา 0, 5, 7, 10, 15 และ 20 วัน ตรวจพบปลานิลเพศผู้เท่ากับ 72.91%, 94.97%, 98.94%, 99.27%, 100.00% และ 100.00% ตามลำดับ และการแช่ฮอร์โมนที่ความเข้มข้นสูงสุดในการทดลองนี้คือ 1,800 ไมโครกรัมต่อน้ำ 1 ลิตรเป็นเวลา 4 ชั่วโมงแล้วเลี้ยงต่อด้วยอาหารผสมฮอร์โมน เมสทาโนโลน (80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร) เป็นระยะเวลา 0, 5, 7, 10, 15 และ 20 วัน ตรวจพบปลานิลเพศผู้เท่ากับ 75.03%, 95.69%, 99.29%, 99.60%, 100.00% และ 100.00% ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มที่ไม่ได้รับการแช่ฮอร์โมนให้กินแต่อาหารผสมฮอร์โมนเป็นระยะเวลา 0, 5, 7, 10, 15 และ 20 วัน ตรวจพบปลานิลเพศผู้เท่ากับ 47.44%, 91.43%, 97.34%, 98.42%, 100.00% และ 100.00% ตามลำดับ (ตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 เปอร์เซ็นต์เพศของปลานิลที่ได้รับฮอร์โมนเมสทาโลนด้วยการแช่และเลี้ยงต่อด้วยอาหารผสมฮอร์โมนเมสทาโลน (80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร) ในระยะเวลาต่างๆ กัน

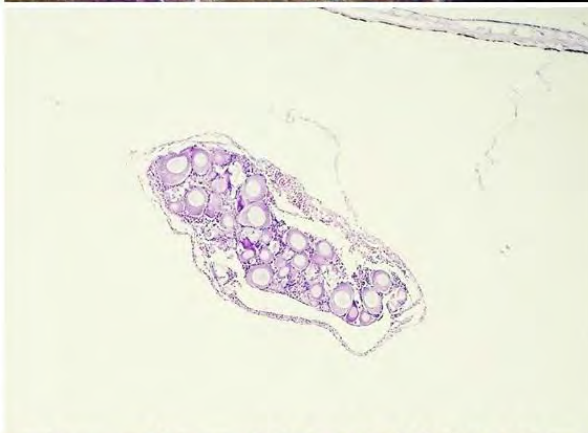
Treatment	Mestanolone Immersion		Mestanolone Feeding; day	Sex Percentage	
	Dose( $\mu\text{g/L}$ )	Duration(hour)		Male	Female
A1	0	0	0	47.44%	52.56%
A2			5	91.43%	8.57%
A3			7	97.34%	2.66%
A4			10	98.42%	1.58%
A5			15	100.00%	0.00%
A6			20	100.00%	0.00%
B1	500	4	0	53.73%	46.27%
B2			5	93.19%	6.81%
B3			7	95.26%	4.74%
B4			10	99.23%	0.77%
B5			15	100.00%	0.00%
B6			20	100.00%	0.00%
C1	1,000	4	0	72.91%	27.09%
C2			5	94.97%	5.03%
C3			7	98.94%	1.06%
C4			10	99.27%	0.73%
C5			15	100.00%	0.00%
C6			20	100.00%	0.00%
D1	1,800	4	0	75.03%	24.97%
D2			5	95.69%	4.31%
D3			7	99.29%	0.71%
D4			10	99.60%	0.40%
D5			15	100.00%	0.00%
D6			20	100.00%	0.00%



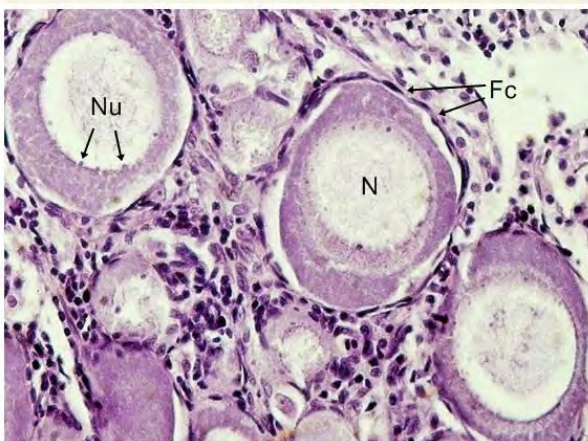
เนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์ในปลานิลเพศเมียอายุ 60 วัน ตรวจสอบด้วย gonadal squash technique; แสดงเนื้อเยื่อ รังไข่ (ovary) และเซลล์ไข่ (oocytes) (x40, aceto-carmine stain)



เนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์ในปลานิลเพศเมียอายุ 60 วัน ตรวจสอบด้วย gonadal squash technique; แสดงเซลล์ไข่ (x100, aceto-carmine stain)

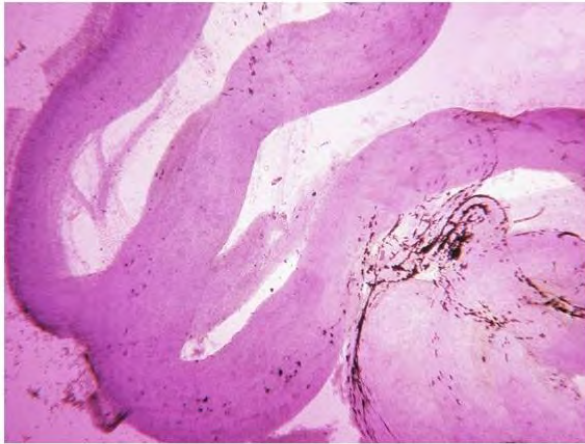


รูปมิกโครกราฟแสดงเนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์เพศเมียในปลานิล อายุ 100 วัน ; รังไข่ (ovary) ภายในบรรจุเซลล์ไข่ในระยะต่างๆ ของโอโอเจเนซิส (oogenesis) (x100, H&E stain)

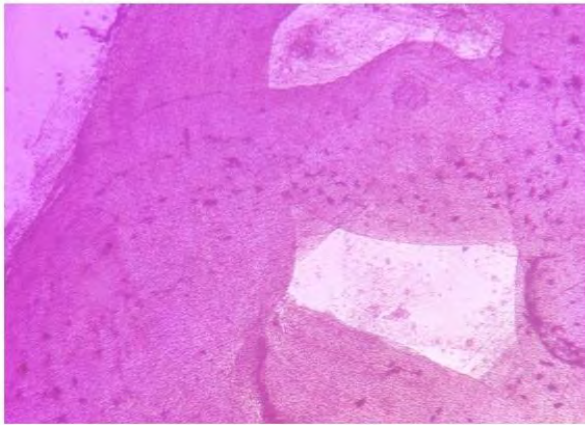


รูปมิกโครกราฟ แสดงเนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์เพศเมียในปลานิล อายุ 100 วัน ; เซลล์ไข่ ระยะแรก (early oocyte) มีนิวเคลียส (nucleus; N) ขนาดใหญ่อยู่ตรงกลาง มี (nucleoli; Nu) อยู่รอบๆ นิวเคลียส และมีชั้นของเซลล์ฟอลลิเคิล (follicle cell; FC) ซึ่งมีลักษณะเป็น simple squamous cell ล้อมรอบเซลล์ไข่ (x1000, H&E stain)

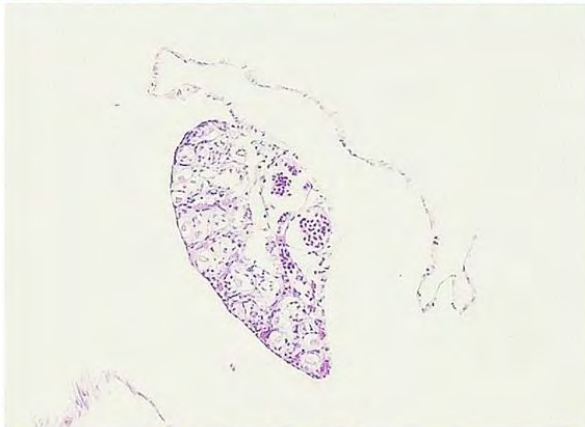
ภาพที่ 2.2 เนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์เพศเมียในปลานิล



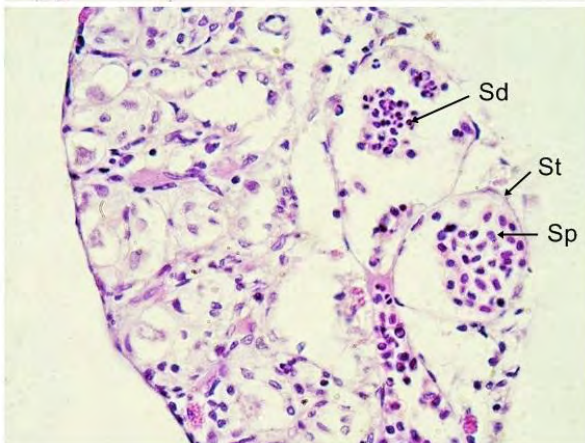
เนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์ในปลาชนิดเพศผู้อายุ  
60 วัน ตรวจสอบด้วย gonadal squash technique;  
แสดงเนื้อเยื่อ อัณฑะ (testis) (x40, aceto-  
carmine stain)



เนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์ในปลาชนิดเพศผู้อายุ  
60 วัน ตรวจสอบด้วย gonadal squash technique ;  
แสดงเนื้อเยื่ออัณฑะ (testis) ที่ภายในมีลักษณะ  
เนียนเป็นเนื้อเดียว (x100, aceto-carmine  
stain)



รูปมิถุนวิทยาแสดงเนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์เพศผู้  
ในปลาชนิด อายุ 100 วัน ; อัณฑะ (testis) เป็น  
อวัยวะที่อยู่เป็นคู่ทางด้านบนของผนังลำตัว  
แขวนอยู่ทางด้านล่างของถุงลม (swim bladder)  
ด้วยเยื่อมีเซนเทอรี (mesenteries) โดยรอบ  
(x100, H&E stain)



รูปมิถุนวิทยาแสดงเนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์เพศผู้  
ในปลาชนิด อายุ 100 วัน ; ท่อเซมินิเฟอรัส  
(seminiferous tubule) ตัดตามยาวแสดงบริเวณ  
ตรงกลางท่อที่บรรจุไปด้วยสเปออร์มาโทไซต์  
(spermatocytes; Sp) สเปออร์มาติดีส์  
(spermatids; Spd) และ ตัวอสุจิ  
(spermatozoas; Spz) (x100, H&E stain)

ภาพที่ 2.3 เนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์เพศผู้ในปลาชนิด

### บทที่ 3

#### ปริมาณฮอร์โมนเมสทาโนโลนตกค้างในปลานิล

##### การเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างของลูกปลานิลที่แช่ฮอร์โมนและให้อาหารผสมฮอร์โมนเมสทาโนโลนตามแผนการเก็บตัวอย่าง คือ ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างลูกปลาหลังจากหยุดการให้อาหารที่ผสมเมสทาโนโลนแล้วเป็นเวลา 1, 2, 3, 5, 7, 14, 21, 28 วัน โดยในแต่ละระยะจะทำการเก็บตัวอย่างปลาให้มีน้ำหนักรวมตั้งแต่ 20 กรัมขึ้นไปใส่ลงในถุงพลาสติกแห้งและสะอาด แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ  $-80^{\circ}\text{C}$  เพื่อรอการนำไปวิเคราะห์

##### การเตรียมตัวอย่างเนื้อปลานิลสำหรับการวิเคราะห์

การเตรียมตัวอย่างลูกปลาเพื่อให้เป็น placebo ในการวิเคราะห์ ในขั้นตอนการเตรียม standard curve และ Quality control sample (QC sample) โดยนำเนื้อปลานิลที่ทำกรอดเกล็ดและแกะก้างออกไป แล้วทำการหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำผสมกับน้ำแข็งแห้งปั่นและบดผสมด้วยเครื่องปั่นจนได้ผงละเอียดแห้ง ผงเนื้อปลานิลจะถูกรักษาไว้ที่อุณหภูมิ  $-80^{\circ}\text{C}$  จนกระทั่งนำมาใช้

สำหรับลูกปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารปลาที่มีส่วนผสมของสารเมสทาโนโลน การเตรียมตัวอย่างเนื้อลูกปลานิลเพื่อวิเคราะห์ โดยนำลูกปลานิลที่เลี้ยงด้วยฮอร์โมนเมสทาโนโลนมาผสมกับน้ำแข็งแห้งปั่นแล้วปั่นผสมด้วยเครื่องปั่นจนได้ผงละเอียดแห้ง ผงเนื้อลูกปลานิลจะถูกรักษาไว้ที่อุณหภูมิ  $-80^{\circ}\text{C}$  จนกระทั่งนำมาใช้เช่นเดียวกัน

##### การวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนเมสทาโนโลนตกค้างในปลานิล

ทำการตรวจการตกค้างของปริมาณฮอร์โมนเมสทาโนโลนในปลานิลเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) ตามวิธีการของเจนนูช และคณะ (2554) จากปลานิลตัวอย่างที่ได้รับฮอร์โมนโดยวิธีการแช่และเลี้ยงด้วยอาหารผสมฮอร์โมนในระยะเวลาต่างๆ

เตรียมสารละลายของสารมาตรฐานใช้งานเข้มข้นใน acetonitrile เพื่อเตรียม standard curve ที่ความเข้มข้น 10, 20, 40, 60, 100, 150, และ 200 ng/ml ตามลำดับ และเตรียมสารละลายมาตรฐานไฟแนนสเตอไรด์เข้มข้น สำหรับเป็นสารละลายมาตรฐานภายใน (internal standard) ให้มีความเข้มข้น 500 ng/ml นำสารละลายมาตรฐานใช้งานเมสทาโนโลนเข้มข้นที่ความเข้มข้นต่างๆ ข้างต้น จำนวน 50  $\mu$ l และสารมาตรฐานภายในเข้มข้น (internal standard) จำนวน 50  $\mu$ l เติมน้ำลงในเนื้อเยื่อปลานิลที่บดกับน้ำแข็งแห้ง (dried ice) จำนวน 1 กรัม สกัดด้วย tert-butyl methyl ether (TBME) 950  $\mu$ l และปั่นผสมตัวอย่าง 30 วินาที และนำตัวอย่างไปตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง (centrifuge) ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 10 °C จากนั้นนำสารละลายชั้นบนซึ่งจะมีเมสทาโนโลน ถูกถ่ายไปใส่ใน microcentrifuge tube และนำไประเหยจนแห้งโดยใช้ SpeedVac concentrator ที่อุณหภูมิ 50 °C ประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นละลายกลับด้วย acetonitrile 500  $\mu$ l นำไป sonicate เป็นเวลา 5 นาที และ ปั่นผสมเป็นเวลา 30 นาที และนำสารละลายไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง (ultracentrifuge) ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที สารละลายจะถูกถ่ายไปใส่ใน vial เพื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) ต่อไป

การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ฮอร์โมนตกค้างในเนื้อลูกปลานิล ทำโดยการชั่งลูกปลานิลที่ถูกละเอียดกับน้ำแข็งแห้ง ปริมาณ 1 กรัม ใส่หลอดเซนทริฟิวจ์ขนาด 5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายไฟแนนสเตอไรด์ 500 ng/ml จำนวน 50  $\mu$ l ซึ่งเป็นสารละลายมาตรฐานภายใน (internal standard) จากนั้น เติมน้ำ tert-butyl methyl ether (TBME) 950  $\mu$ l นำมาเขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที และตกตะกอนด้วย เครื่องปั่นความเร็วสูง ซึ่งจะตกตะกอนโปรตีนที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 10 °C จากนั้นนำสารละลายชั้นบนซึ่งจะมีเมสทาโนโลน ถูกถ่ายไปใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์และนำไประเหยจนแห้งโดยใช้ SpeedVac concentrator ที่อุณหภูมิ 50 °C ประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นละลายกลับด้วย acetonitrile 500  $\mu$ l นำไป sonicate เป็นเวลา 5 นาที และ ปั่นผสมเป็นเวลา 30 นาที และนำสารละลายไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที สารละลายจะถูกถ่ายไปใส่ใน vial และวิเคราะห์สารละลาย ด้วย Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) โดยใช้ chromatographic condition ดังนี้

Column	: AlltechAlltima C8 (4.6x100 mm, 5 $\mu$ m)
Mobile phase	: 5 mM Ammonium formate pH 3.5: Acetonitrile
Flow rate	: 0.8 ml/min
Detection	: mass spectrometer
Injection volume	: 10 $\mu$ l
Column temperature	: 30 °C
Auto sampler temperature	: 4 °C
Mass detection	: 305.3/269.3 สำหรับเมสทาโนโลน : 373.5/355.4 สำหรับไฟแนสเตรอไรด์

## ผลการศึกษา

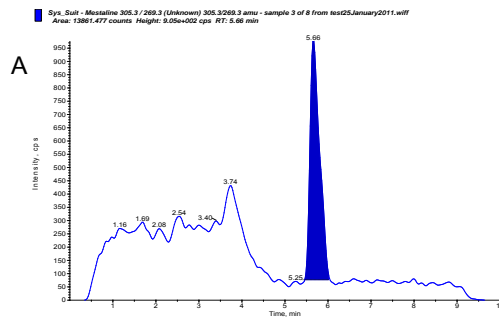
### 1. การตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability test)

LC-MS/MS chromatogram ของการวิเคราะห์เมสทาโนโลนตกค้างในลูกปลานิล ในรูปที่ 4 พบว่า ค่าเฉลี่ยของ retention time ของเมสทาโนโลนและไฟแนสเตรอไรด์ เท่ากับ 5.67 และ 5.05 นาที ตามลำดับโดยมีค่า % CV เท่ากับ 0.097 และ 0.177 ตามลำดับและพบว่าค่าเฉลี่ยของ resolution ระหว่างพีค (peak) ของเมสทาโนโลน กับ ไฟแนสเตรอไรด์เท่ากับ 2.32 โดยมีค่า % CV เท่ากับ 0.472 สำหรับค่า tailing factor ของยอดเมสทาโนโลน และ ไฟแนสเตรอไรด์เท่ากับ 1.13 และ 1.13 ตามลำดับ โดยมีค่า CV เท่ากับ 0.739 และ 0.885 ตามลำดับ ดังตารางที่ 3.1

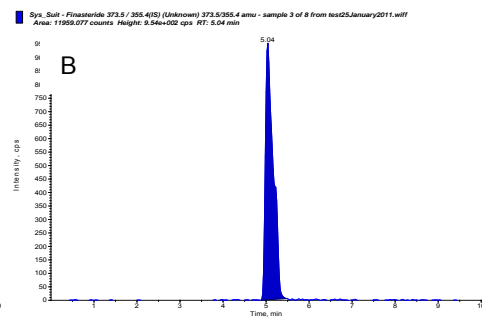
ตารางที่ 3.1 system suitability test ของวิธีวิเคราะห์เมสทาโนโลนที่ตกค้างในลูกปลานิล (n=5)

	Parameters (%CV)		
	Retention time (min)	Resolution	Tailing factor
Mestanolone	5.67 (0.097)	2.32 (0.472)	1.132 (0.739)
Finasteride	5.05 (0.177)	-	1.130 (0.885)

## เมสทาโนโลน



## ไฟแนสเตอไรด์



ภาพที่ 3.1 LC-MS/MS chromatogram ของการวิเคราะห์สารละลายผสมของสารมาตรฐานใช้งานเมสทาโนโลน และ ไฟแนสเตอไรด์ความเข้มข้น 5 ng/g (A) และ 50 ng/g (B) ตามลำดับเข้าสู่ LC-MS system จำนวน 5 ครั้ง (system suitability test)

## 2. การตรวจสอบความถูกต้อง (accuracy) และ ความเที่ยงตรง (precision) ของวิธีวิเคราะห์

การตรวจสอบความถูกต้อง และความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์เมสทาโนโลนที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน 3 ระดับ ในตัวอย่าง ลูกปลานิลพบว่าเมสทาโนโลนในเนื้อเยื่อปลานิล ที่ระดับความเข้มข้นประมาณ 1.0, 5.0 และ 7.5 ng/g มีค่าเฉลี่ยของ % recovery ของแต่ละความเข้มข้นเท่ากับ 103.02, 96.89 และ 101.24 ตามลำดับ โดยมีค่า % CV ที่แต่ละความเข้มข้นเท่ากับ 10.63, 3.83 และ 7.66 นอกจากนี้พบว่าในการวิเคราะห์ตัวอย่างระหว่างวัน ปริมาณเมสทาโนโลนในเนื้อเยื่อปลานิล มีค่า % recovery ของเมสทาโนโลนอยู่ในช่วงของ 82.30-112.44 และมีค่า %CV น้อยกว่า 30 (ตารางที่ 3.2)



**ตารางที่ 3.2** การตรวจสอบความถูกต้องและความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์เมสทาโนโกลนในลูปลานิล

Compound	Amount added (ng/g)	Amount found (ng/g)	%CV	%Recovery
Repeatability (intra-day) n = 5				
	1.007	1.04 ± 0.11	10.63	103.02
	5.035	4.88 ± 0.19	3.83	96.89
	7.522	7.65 ± 0.59	7.66	101.24
Intermediate precision (inter-day) (3 days, n = 3)				
first day	0.983	1.06 ± 0.04	4.11	107.80
	4.915	4.17 ± 0.18	4.26	84.75
	7.373	7.37 ± 0.88	11.88	100.03
second day	1.007	0.99 ± 0.13	12.95	98.79
	5.035	4.93 ± 0.22	4.52	97.96
	7.522	7.56 ± 0.52	6.85	100.05
third day	1.007	0.95 ± 0.11	11.73	93.92
	5.035	4.79 ± 0.10	2.15	95.05
	7.552	7.29 ± 0.35	4.84	96.55

**ผลการตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) และช่วงความเข้มข้น (range) ของวิธีวิเคราะห์**

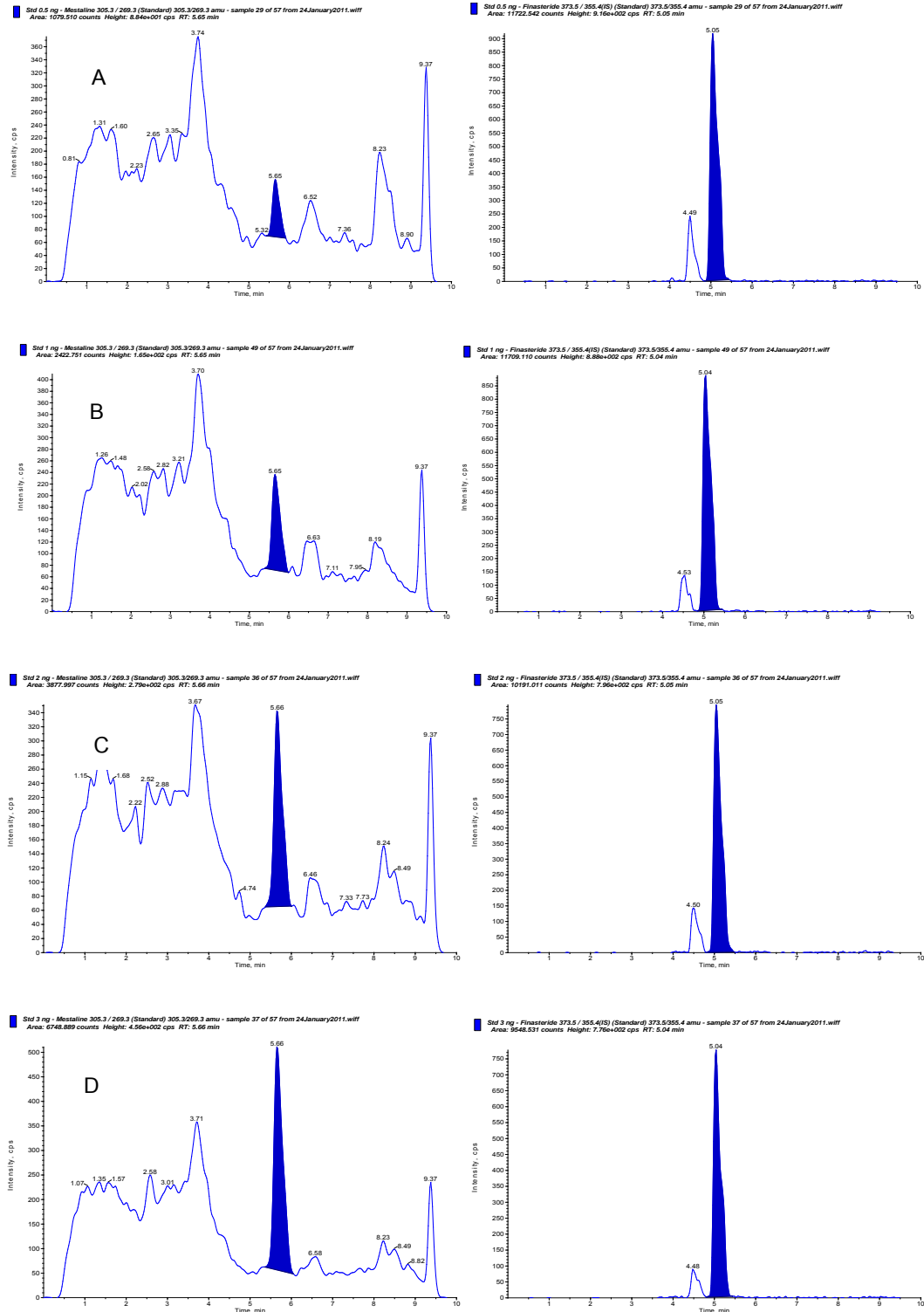
การตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ (method linearity) และช่วงความเข้มข้นที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณเมสทาโนโกลนในเนื้อเยื่อปลานิลที่ความเข้มข้นของสารละลายเมสทาโนโกลนที่สกัดจากเนื้อเยื่อปลานิล ต่างๆ กัน 7 ระดับ ได้แก่ 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 7.5, และ 10.0 ng/g โดยวิธีวิเคราะห์ความเข้มข้นละ 3 ครั้งได้ความสัมพันธ์ของ อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้พีคของเมสทาโนโกลน กับไฟแนนสเทอไรด์ (peak area ratio) กับอัตราส่วนของความเข้มข้นของเมสทาโนโกลนทั้ง 7 ความเข้มข้น (0.5-10.0 ng/g) กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานภายใน เป็นเส้นตรง โดยมีสมการ linear เป็น  $ax+b$  และ  $r^2 = 0.9989$  ดังตารางที่ 3.3 และภาพที่ 3.2-3.4

ตารางที่ 3.3 ความเป็นเส้นตรงและช่วงความเข้มข้นของวิธีวิเคราะห์เมสทาโนโดนใน เนื้อเยื่อ ปลานิล (n=7)

Concentration range (ng/g)	Parameters		
	a	b	r <sup>2</sup>
0.5-10.0	0.2288	0.1137	0.9989

## เมสทาโนลิน

## ไฟแนสเทอไรด์

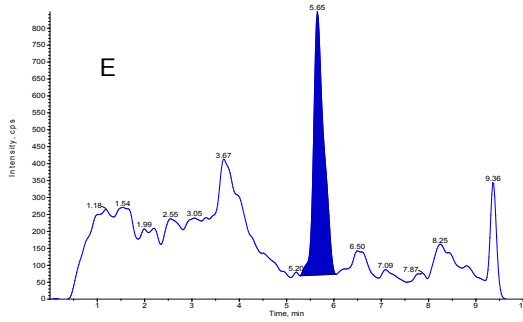


ภาพที่ 3.2 LC-MS/MS chromatogram ของสารละลายมาตรฐานใช้งานเมสทาโนลิน ความเข้มข้น 0.5 ng/g (A), 1 ng/g (B), 2 ng/g (C), 3 ng/g (D), 5 ng/g (E), 7.5 ng/g (F), และ 10 ng/g (G) (ซ้าย) กับสารมาตรฐานภายในไฟแนสเทอไรด์ ความเข้มข้น 50 ng/g (ขวา)

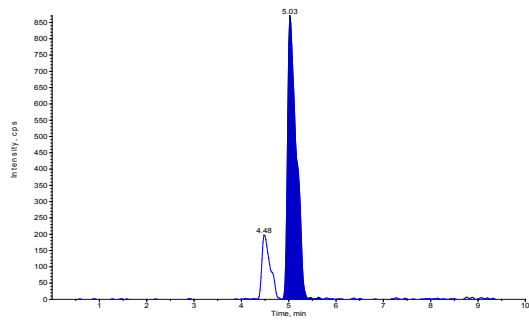
## เมสทาโนลอน

## ไฟแนสเทอไรด์

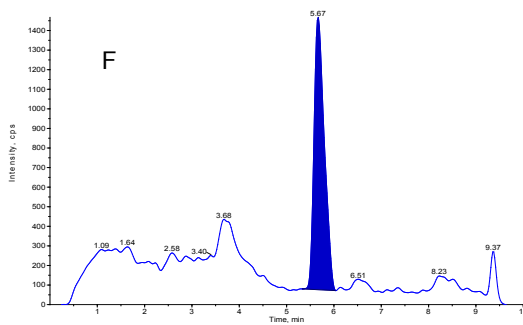
Std 5 ng - Mestaline 305.3 / 269.3 (Standard) 305.3/269.3 amu - sample 51 of 57 from 24.January2011.wiff  
Area: 11504.980 counts Height: 7.78e+002 cps RT: 5.65 min



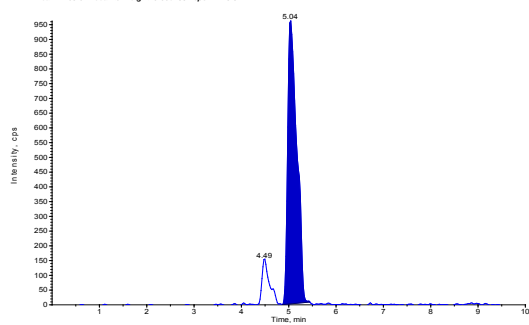
Std 5 ng - Finasteride 373.5 / 355.4(5) (Standard) 373.5/355.4 amu - sample 51 of 57 from 24.January2011.wiff  
Area: 11085.639 counts Height: 8.76e+002 cps RT: 5.03 min



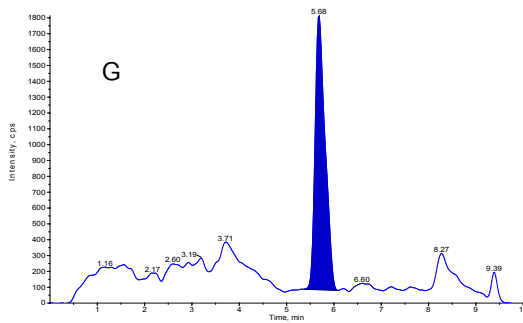
Std 7.5 ng - Mestaline 305.3 / 269.3 (Standard) 305.3/269.3 amu - sample 57 of 57 from 24.January2011.wiff  
Area: 22963.424 counts Height: 1.33e+003 cps RT: 5.67 min



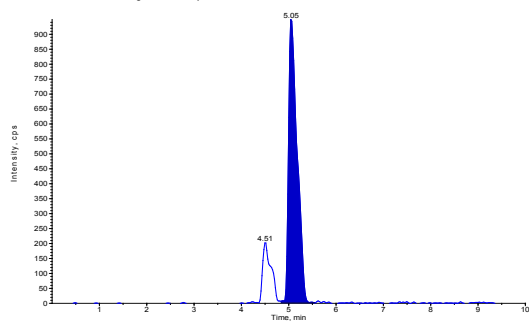
Std 7.5 ng - Finasteride 373.5 / 355.4(5) (Standard) 373.5/355.4 amu - sample 57 of 57 from 24.January2011.wiff  
Area: 12766.621 counts Height: 9.83e+002 cps RT: 5.04 min



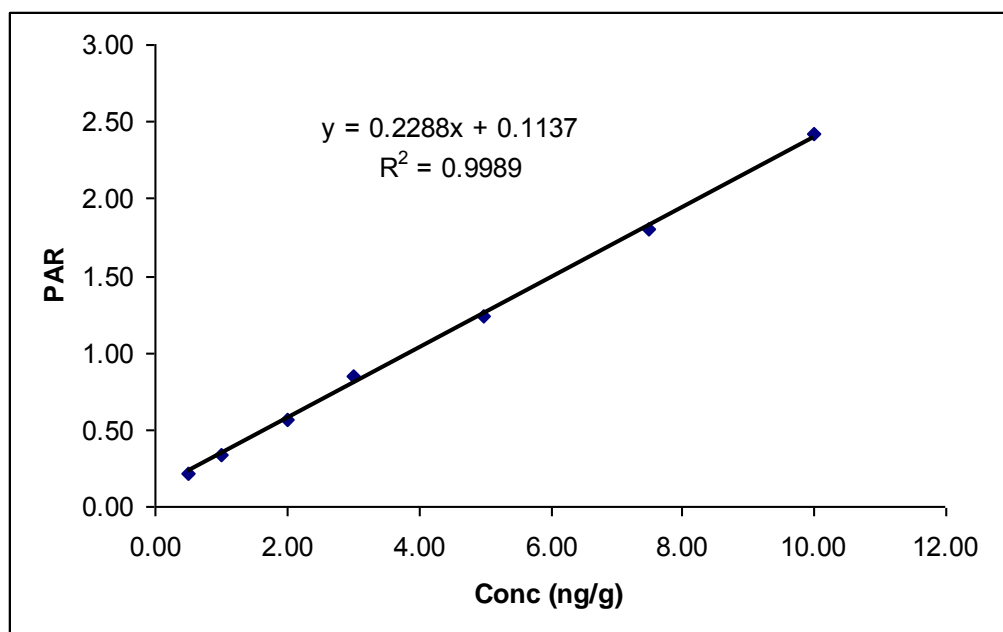
Std 10 ng - Mestaline 305.3 / 269.3 (Standard) 305.3/269.3 amu - sample 9 of 57 from 24.January2011.wiff  
Area: 25280.486 counts Height: 1.74e+003 cps RT: 5.68 min



Std 10 ng - Finasteride 373.5 / 355.4(5) (Standard) 373.5/355.4 amu - sample 9 of 57 from 24.January2011.wiff  
Area: 11907.786 counts Height: 9.59e+002 cps RT: 5.05 min



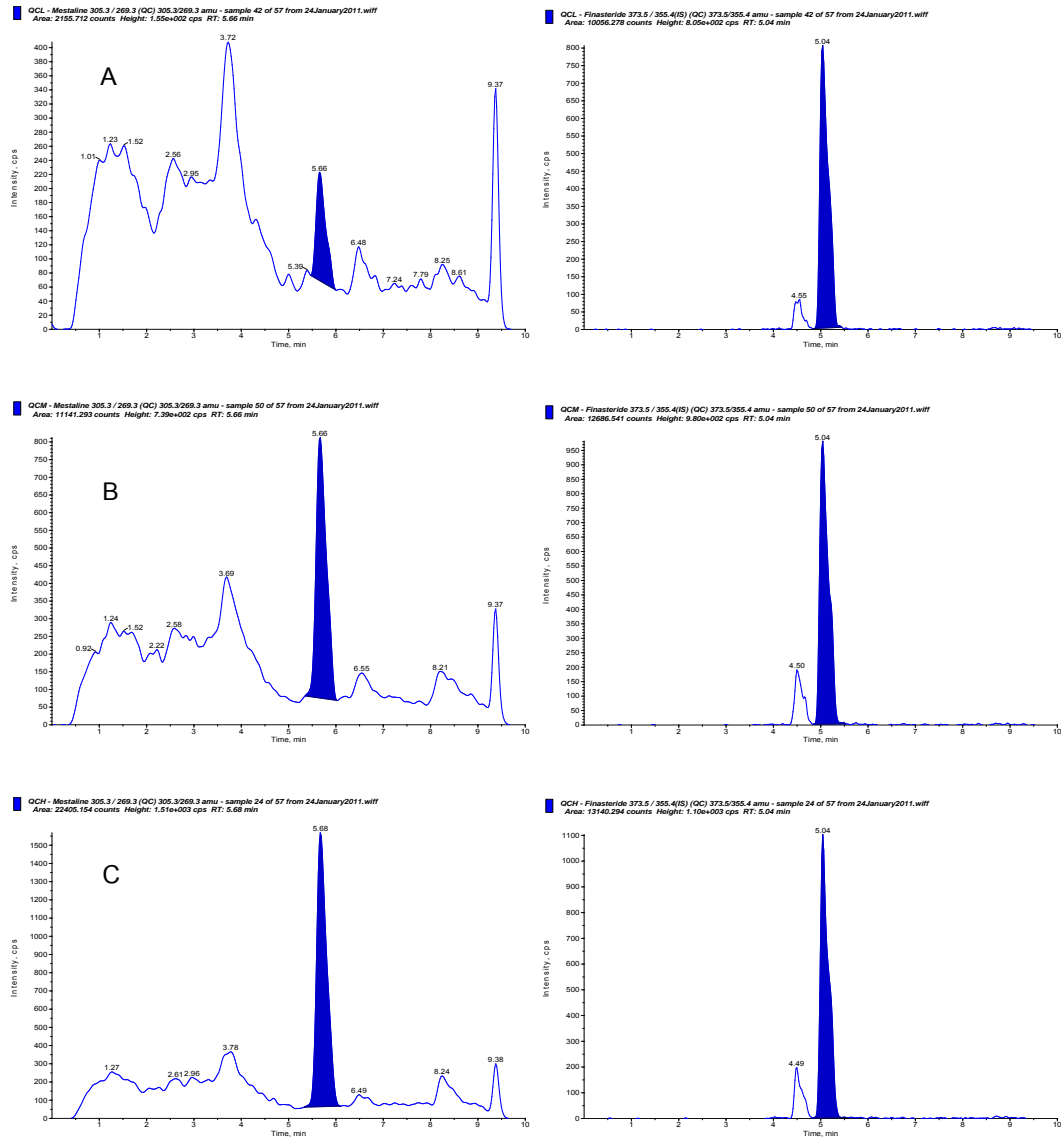
ภาพที่ 3.2 (ต่อ) LC-MS/MS chromatogram ของสารละลายมาตรฐานใช้งานเมสทาโนลอน ความเข้มข้น 0.5 ng/g(A), 1 ng/g (B), 2 ng/g (C), 3 ng/g (D), 5 ng/g (E), 7.5 ng/g (F), และ 10 ng/g (G) (ซ้าย) กับสารมาตรฐานภายในไฟแนสเทอไรด์ ความเข้มข้น 50 ng/g (ขวา)



ภาพที่ 3.3 ความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ (method linearity) ของวิธีวิเคราะห์เมสทานโคโนในตัวอย่างลูกปลานิลด้วย LC-MS/MS

## เมสทาโนลอน

## ไฟแนสเตอร์ไรด์



ภาพที่ 3.4 LC-MS/MS chromatogram ของเมสทาโนลอน ความเข้มข้น 1 ng/g (A), 5 ng/g (B) และ 7.5 ng/g (C) ที่มีสารละลายมาตรฐานภายในไฟแนสเตอร์ไรด์ ความเข้มข้น 50 ng/g จากตัวอย่างถูกปาดานิล

ส่วนช่วงความเข้มข้นของเมสทาโนโดนในลูปลานิลที่มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงที่จะให้ผลการวิเคราะห์ได้ถูกต้องและแม่นยำ เมื่อพิจารณาช่วงความเข้มข้นที่ใช้ในการตรวจสอบความเป็นเส้นตรง พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.5-10.0 ng/g

#### **ผลการตรวจสอบ limit of quantitation (LOQ) ของวิธีวิเคราะห์**

จากการตรวจสอบ limit of quantitation (LOQ) ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณเมสทาโนโดนที่ตกค้างในเนื้อเยื่อปลานิลพบว่ามีค่าเท่ากับ 0.5 ng/g ดังตารางที่ 3.4

**ตารางที่ 3.4** Limit of quantitation ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณเมสทาโนโดนในเนื้อเยื่อปลานิล

Concentration (ng/g)	Parameters		
	%Recovery	SD	%CV
0.5	92.81	10.48	11.29

#### **ผลการตรวจสอบการกลับคืน ของการสกัดเมสทาโนโดนจากเนื้อเยื่อปลานิล (recovery of extraction)**

จากการตรวจสอบการกลับคืนของการสกัด เมสทาโนโดนจากเนื้อเยื่อปลานิล (recovery of extraction) ที่ความเข้มข้น 3 ระดับคือ 1, 2 และ 5 ng/g พบว่า %recovery ของการสกัดเมสทาโนโดน ทั้ง 3 ความเข้มข้นจากเนื้อเยื่อปลานิลมีค่าเท่ากับ 56.02-71.31, 60.16-70.04 และ 56.56-71.55 % ตามลำดับ และมี %CV เท่ากับ 12.88, 8.42 และ 11.68 % ตามลำดับดังตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 ผลการตรวจสอบการกลับคืนของการสกัดเมสทาโนโดนจากลูกปลานิล (recovery of extraction)

Concentration (ng/g)	Extracted area	Unextracted area	%Recovery	Average $\pm$ SD	%CV
0.984	2571.529	4324.856	59.46		
0.984	3083.867	4324.856	71.31	62.26 $\pm$ 8.02	12.880
0.984	2422.751	4324.856	56.02		
1.968	4980.608	8108.678	61.42		
1.968	5679.428	8108.678	70.04	63.87 $\pm$ 5.38	8.420
1.968	4877.997	8108.678	60.16		
4.915	10034.627	17741.545	56.56		
4.915	12694.484	17741.545	71.55	64.32 $\pm$ 7.51	11.676
4.915	11504.980	17741.545	64.85		



### **ผลการตรวจสอบความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (specificity)**

การตรวจสอบความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ โดยนำ เนื้อเยื่อปลานิลมาสกัดและตรวจสอบความจำเพาะ พบว่าวิธีวิเคราะห์ปริมาณเมสทาโนโลนที่ตกค้างในลูกปลานิลโดยใช้ LC-MS/MS ไม่มีพีครบกวนการวิเคราะห์ทั้งเมสทาโนโลน และ ไฟแนสเทอไรด์ที่ retention time 5.67 และ 5.04 นาทีตามลำดับ

### **การวิเคราะห์หาปริมาณสารตกค้างของเมสทาโนโลนในลูกปลานิลที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารที่มีส่วนผสมของสารเมสทาโนโลน**

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารตกค้างของเมสทาโนโลนในปลานิลที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารผสมฮอร์โมนในขนาด 80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารเป็นระยะเวลา 15 วัน ดังแสดงในตารางที่ 3.6 การให้อาหารที่มีส่วนผสมของฮอร์โมนเมสทาโนโลนและหยุดให้อาหาร 1, 2 และ 3 วัน ตรวจพบปริมาณเมสทาโนโลนเท่ากับ 3.198, 2.065 และ 0.856 ppb ตามลำดับ

**ตารางที่ 3.6** ผลการวิเคราะห์สารตกค้างของเมสทาโนโลนในปลาไนที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารผสมฮอร์โมนเมสทาโนโลนเป็นเวลา 15 วัน

เวลาที่สุ่ม ตัวอย่าง (วัน)	ปริมาณสารตกค้าง (ppb)			ค่าเฉลี่ย (ppb)	%CV
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
1	3.231	3.139	3.224	3.198	1.601
2	2.104	2.016	2.074	2.065	2.167
3	0.827	0.857	0.885	0.856	3.387
5	*	*	*	*	-
7	*	*	*	*	-
14	*	*	*	*	-
21	*	*	*	*	-

\* The value was under limit of quantitation (LOQ was 0.5 ng/g).

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อหยุดให้อาหารผสมฮอร์โมนเป็นเวลา 5 วัน ไม่พบปริมาณฮอร์โมนเมสทาโนโลนในตัวอย่าง หรือปริมาณต่ำกว่าระดับต่ำสุดที่วิธีวิเคราะห์สามารถตรวจสอบได้อย่างถูกต้อง (0.5 ppb)

## อภิปรายและวิจารณ์ผล

ลูกปลานิลที่ได้รับฮอร์โมนเมสทาโนโลนโดย การแช่ฮอร์โมนเมสทาโนโลนที่ความเข้มข้น 500, 1,000 และ 1,800 ไมโครกรัมต่อน้ำ 1 ลิตรเป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วเลี้ยงต่อด้วยอาหารผสมฮอร์โมนเมสทาโนโลน (80 มิลลิกรัมฮอร์โมนต่อกิโลกรัมอาหาร) สามารถตรวจพบปลานิลเพศผู้คิดเป็น 100% ในปลานิลกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมฮอร์โมนเมสทาโนโลนเป็นระยะเวลา มากกว่าหรือเท่ากับ 15 วัน โดยระยะเวลาการเลี้ยงด้วยอาหารผสมฮอร์โมนที่สั้นกว่านี้ (เลี้ยงเป็นระยะเวลา 0, 5 และ 10 วัน) ได้ปลานิลเพศผู้ 72.91-99.60% แม้เปอร์เซ็นต์เพศที่ได้ดังกล่าวจะเป็นเปอร์เซ็นต์ที่ค่อนข้างสูงแต่ในทางการปฏิบัติจริงแล้วการมีลูกปลานิลเพศเมียปะปนในระบบการเลี้ยงปลานิลขุนแม้เป็นจำนวนเพียงเล็กน้อยจะส่งผลกระทบต่อในด้านการเลี้ยงการจัดการตามมา อาทิเช่น ปัญหาการผสมพันธุ์กันเองภายในบ่อ และ ปัญหาปลานิลแตกไซส์ เป็นต้น

สำหรับการเลี้ยงด้วยอาหารผสมฮอร์โมนเมสทาโนโลนเป็นระยะเวลา 15 วัน ตรวจพบปลานิลเพศผู้เท่ากับ 100.00% ในทุกกลุ่มการทดลองที่แช่ด้วยฮอร์โมนเมสทาโนโลนที่ขนาดความเข้มข้นที่แตกต่างกัน รวมทั้งกลุ่มที่ไม่ได้ทำการแช่ฮอร์โมนด้วย ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าการแช่ฮอร์โมนในระยะที่ลูกปลาอยู่ในโรงเรือนเพาะฟักไม่ได้ให้ผลที่แตกต่างจากการไม่ได้แช่ฮอร์โมน จึงไม่จำเป็นต้องเพิ่มขึ้นตอนการแช่ฮอร์โมนในการเหนี่ยวนำลูกปลานิลให้เป็นเพศผู้ จากผลการศึกษานี้สามารถเป็นแนวทางการเลี้ยงปลานิลเพศผู้ให้แก่เกษตรกรได้ว่า ระยะเวลาที่สั้นที่สุดที่สามารถให้ผลผลิตเป็นลูกปลานิลเพศผู้ได้ 100% คือวิธีการให้อาหารผสมฮอร์โมน เมสทาโนโลน ในขนาด 80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นระยะเวลา 15 วัน โดยเริ่มให้ฮอร์โมนผสมอาหารแก่ลูกปลาตั้งแต่ระยะการกินอาหารวันแรก

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณเมสทาโนโลนตกค้างในปลานิลด้วยวิธีวิเคราะห์ LC-MS/MS ที่ผ่านการตรวจสอบความถูกต้อง แสดงว่าปริมาณเมสทาโนโลนตกค้างในเนื้อเยื่อปลานิลมีความสัมพันธ์กับฮอร์โมนเมสทาโนโลนที่ปลานิลกินจากอาหาร เมื่อหยุดให้อาหารผสมฮอร์โมนเป็นเวลา 1 วัน 2 วัน และ 3 วัน พบปริมาณเมสทาโนโลนในตัวอย่างลูกปลา (ปลาทั้งตัว) 3.198, 2.065 และ 0.856 ppb ตามลำดับและเมื่อหยุดให้อาหารผสมฮอร์โมนเป็นเวลา 5 วัน ไม่พบปริมาณเมสทาโนโลนในตัวอย่างหรือปริมาณต่ำกว่าระดับต่ำสุดที่วิธีสามารถตรวจสอบได้อย่างถูกต้อง (0.5 ppb)

ตารางที่ 4.1 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของฮอร์โมนเมสทาโนโลนในการเหนี่ยวนำเพศผู้ในลูกปลานิล และปริมาณฮอร์โมนเมสทาโนโลน ตกค้างในลูกปลานิลที่ได้รับ เมสทาโนโลนผสมอาหารขนาด 80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นระยะเวลา 15 วัน (จากการศึกษานี้) และ 23 วัน ซึ่งเป็นวิธีการปฏิบัติในปัจจุบัน ดังนั้นผลจากการศึกษา เป็นการให้ข้อมูลว่าเมสทาโนโลนที่ลูกปลาได้รับ ผสมอาหาร

เป็นระยะเวลา 15 วัน สามารถเหนี่ยวนำเพศผู้ในลูกปลานิลได้อย่างสมบูรณ์ โดยไม่จำเป็นต้องให้ฮอร์โมนเป็นเวลา 23 วัน ดังที่ปฏิบัติอยู่ในปัจจุบัน นอกจากนี้ปริมาณฮอร์โมนเมสทาโนโลนที่ ตกค้างในตัวปลา <0.5 ppb สามารถขับออกจากร่างกายอย่างสมบูรณ์ก่อนถึงขนาดบริโภค (ประมาณ 8 เดือนหลังจากที่ปลาหยุดกินฮอร์โมน)

**ตารางที่ 4.1** เพอร์เซ็นต์เพศผู้และปริมาณเมสทาโนโลนฮอร์โมนที่ตรวจวิเคราะห์ในลูกปลานิลที่ได้รับฮอร์โมนผสมอาหารในขนาด 80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารเป็นระยะเวลา 15 และ 23 วัน

Duration of treatment	% Male	Mestanolone (ng/g) Day after the last dose							
		1	2	3	5	7	14	21	
15	100	3.1980	2.065	0.856	ND	ND	ND	ND	
23	100	3.224	2.029	1.046	ND	ND	ND	ND	

*ND*: Not Detected

Limit of quantitation (LOQ): 0.5 ng/g

## สรุปและเสนอแนะ

การเลี้ยงปลานิลในลักษณะระบบการเลี้ยงหนาแน่น (intensive farming) เป็นการเลี้ยงปลานิลเทศผู้ เนื่องจากปลานิลเทศผู้มีอัตราการเจริญเติบโตดีกว่าเทศเมีย และการเลี้ยงปลานิลเทศผู้เทศเดียวทำให้ไม่พบปัญหาการผสมพันธุ์กันเองภายในบ่อ ระหว่างการเลี้ยงในแต่ละรุ่น การเลี้ยงปลานิลของประเทศไทยมีการพัฒนาเป็นระบบการเลี้ยงอย่างหนาแน่นซึ่ง มีการใช้ฮอร์โมนเทศผู้เหนี่ยวนำให้ลูกปลานิลเป็นเทศผู้เพื่อการเลี้ยงขุน แม้ว่าการใช้ฮอร์โมนอาจมีประสิทธิภาพในการผลิตปลานิลเทศผู้ แต่การใช้ฮอร์โมนอาจเกิดการตกค้างในผลิตภัณฑ์ปลาที่นำไปสู่ผู้บริโภคได้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการศึกษาการตกค้างของฮอร์โมนในปลานิลที่ผลิตเพื่อการบริโภค นอกจากนี้การศึกษา เพื่อลดระยะเวลาการใช้ฮอร์โมนในระหว่างการเลี้ยงปลานิลเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถลดการใช้ฮอร์โมนใน กระบวนการผลิตปลานิลของประเทศไทย

การวิจัยนี้ศึกษาการใช้ฮอร์โมนเมสทาโนโลนซึ่งเป็นอนุพันธ์รูปหนึ่งของฮอร์โมนเทศผู้ให้ลูกปลานิลกินขนาด 80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นระยะเวลา 15 วัน ซึ่งเป็นระยะเวลาที่สั้นกว่าที่ปฏิบัติกันอยู่ในปัจจุบัน (23 วัน) ผลการศึกษาพบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้ลูกปลานิล เป็นลูกปลาเทศผู้ได้ถึง 100% ดังนั้นผลการศึกษานี้จึง เป็นข้อมูลสนับสนุนการลดปริมาณการใช้ฮอร์โมนเทศผู้ ในกระบวนการเพาะเลี้ยงปลานิลเพื่อการบริโภค

การ วิเคราะห์ปริมาณตกค้างของฮอร์โมนเมสทาโนโลน ในลูกปลานิลด้วย Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) ผลการศึกษาพบว่าปริมาณของฮอร์โมนเมสทาโนโลนในลูกปลานิลมีความสัมพันธ์กับปริมาณฮอร์โมนที่ปลา กิน โดยเมื่อหยุดการให้อาหารผสมฮอร์โมนประมาณ 5 วัน พบสารตกค้างของฮอร์โมนเมสทาโนโลนต่ำกว่าปริมาณของเมสทาโนโลนที่น้อยที่สุดที่วิธีจะสามารถตรวจสอบได้ (<0.5 ppb) จึงอาจอนุมานว่าลูกปลานิลจาก กระบวนการเพาะเลี้ยงที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมนเมสทาโนโลนในขนาด 80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร อาหารในช่วง 15 วันแรก และเลี้ยงในระยะขุนอีกจนถึงขนาดที่ขายอยู่ในท้องตลาด (6-8 เดือน) ไม่มีการตกค้างของฮอร์โมนในระดับที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค

ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า ขนาดการใช้ฮอร์โมนเทศผู้เพื่อการเหนี่ยวนำเทศผู้ในลูกปลานิลที่ปฏิบัติกันอยู่ในปัจจุบันนั้น สามารถลดขนาดการใช้ให้เหลือเพียง 15 วัน (จากการปฏิบัติ 23 วัน) ซึ่งเป็นการลดการใช้ฮอร์โมนในกระบวนการเลี้ยงปลานิลได้มากกว่า 30% โดยสามารถตรวจพบปริมาณฮอร์โมนตกค้างเพียงในระยะลูกปลาอนุบาลเท่านั้น (อายุน้อยกว่า 23 วัน) อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เป็นการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเมสทาโนโลนต้นแบบ (parent form) เท่านั้น ซึ่งไม่สามารถเชื่อมโยงไปถึง

เมตาบอไลต์ของเมสทาโนโลน นอกจากนี้ยังปรากฏการใช้ฮอร์โมนเพศผู้ชนิดอื่นๆ ในการเหนี่ยวนำเพศผู้  
ในลูกปลานิลเพื่อการเพาะเลี้ยงแบบหนาแน่น เช่น ฮอริโมนเทสโทสเทอโรน หรือ เมทิลเทสโทสเทอโรน  
ซึ่งมีขนาดของการใช้เช่นเดียวกับรายงานการศึกษานี้ จึงควรมีการศึกษาการตกค้างของฮอร์โมน  
ดังกล่าวในลูกปลานิลด้วยเช่นกัน

## บรรณานุกรม

- กองประมงต่างประเทศ . 2553. ข้อมูลการส่งออกสินค้าประมง . กรมประมง. แหล่งที่มา  
<http://www.fisheries.go.th/foreign/images/excel/freshfishwater45-53v19>.
- เจนนุช ว่องธวัชชัย พรชัย โรจน์สิทธิ์ศักดิ์ หทัยรัตน์ ไผ่สั ก นีอร วิনারักษ์วงศ์ แล ะ ศศิกา  
 จันทรขจร. 2554. รายงานการวิจัย : การพัฒนาปลานิลคุณภาพในระบบอุตสาหกรรม  
 (Improvement of Tilapia Quality Produced by Thai Aquaculture). สำนักงานคณะกรรมการ  
 วิจัยแห่งชาติ. 165 หน้า.
- ธนาคารเพื่อการส่งออกและนำเข้าแห่งประเทศไทย . 2550. ปลานิล...ดาวรุ่งดวงใหม่สินค้าประมง  
 ส่งออกของไทย .ธนาคารเพื่อการส่งออกและนำเข้าแห่งประเทศไทย . แหล่งที่มา  
<http://www.exim.go.th/NewsInfo/index.aspx>.
- สมาคมอาหารแช่เยือกแข็งไทย . 2551. ปลานิลไทย: ตลาดขยายตัวทั้งในประเทศและส่งออก . สมาคม  
 อาหารแช่เยือกแข็งไทย. แหล่งที่มา  
[http://www.thaifrozen.or.th/th/hotnews\\_detail.asp?menu=News&sid=479](http://www.thaifrozen.or.th/th/hotnews_detail.asp?menu=News&sid=479)
- Abdelhamid, A.M., Mehrim, A.I., Salem, M.F.I., and Yosuf, H. A.E. 2009. All-male monosex  
 Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), pros and cons. Egypt J Basic Appl Physiol. 8: 41-57.
- Aquaculture fish database. 2009. World Tilapia Imports. [Online] .Available.  
<http://aquafind.com>
- Bhandari, R.K., Nakamura, M., Kobayashi, T., Nagahama, Y., 2006. Suppression of  
 steroidogenic enzyme expression during androgen-induced sex reversal in Nile tilapia  
 (*Oreochromis niloticus*). Gen Comp Endocrinol. 145: 20-24.
- Biddle S.T., O'Donnell, A., Houghton, E. and Creaser, C. 2009. Metabolism of  
 methyltestosterone in the greyhound. Rapid Commun Mass Spectrom. 23(5): 713-721.
- El-sayed, A.M. 2006. Tilapia culture. London: CABI Publishing. 277 pp.
- Fitzsimmons, K., Martinez-Garcia, R., Gonzalez-Alanis, P. 2011. Why tilapia is becoming the  
 most important food fish on the planet. In: L. Liping and K. Fitzsimmons (eds.) Better  
 Science, Better Fish, Better Life: Proceedings of 9th International Symposium on Tilapia  
 in Aquaculture (ISTA 9). 8-16.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2011. [Online]. Available.  
<http://www.fao.org/fishery/en>
- Goudie, C..A., Shelton, W.L. and Parker, N.C. 1986. Tissue distribution and elimination of  
 radiolabelled methyltestosterone fed to adult blue tilapia. Aquaculture 58: 227-240.

- Guerrero III, R.D. 1975. Use of androgens for the production of all male *Tilapia aurea* (Steindachner). Transactions of the American Fisheries Society. 104: 342-348.
- Higashi, T., Yamauchi, A., Shimada, K., Koh, E., Mizokami, A., and Namiki, M. 2005. Determination of prostatic androgens in 10 mg of tissue using liquid chromatography-tandem mass spectrometry with charged derivatization. Anal Bioanal Chem. 382(4): 1035-1043.
- Jensen, G.L., Shelton, W.L., 1979. Effects of estrogens on *Tilapia aurea*: Implications for production of monosex genetic male tilapia. Aquaculture 16: 233-242.
- Johnstone, R., Macintosh, D.J. and Wright, R.S., 1983. Elimination of orally administered 17alpha Methyltestosterone by *Oreochromis mossambicus* (tilapia) and *Salmo gairdneri* (rainbow trout) juveniles. Aquaculture. 35: 249-257.
- Kang, I.J., Yokota, H., Oshima, Y., Tsuruda, Y., Shimasaki, Y., Honjo, T. 2008. The effects of methyltestosterone on the sexual development and reproduction of adult medaka (*Oryzias latipes*). Aquat Toxicol. 87(1): 37-46.
- Korsgaard, B. 2006. Effects of the model androgen methyltestosterone on vitellogenin in male and female eelpout, *Zoarces viviparous* (L). Mar Environ Res. 62: s205-s210.
- Kwon, J.Y., Haghpana, H. V., Kogson-Hurtado, L.M., McAndrew, B.J., Penman, D.J., 2000. Masculinization of genetic female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by dietary administration of an aromatase inhibitor during sexual differentiation. J Exp Zool 287(1), 46-53.
- Pandian, T.J., and Sheela, S.G. 1999. Hormonal induction of sex reversal in fish. Aquaculture. 138(1):1-22.
- Phelps, R. P. and Popma, T. J. 2000. Sex reversal of tilapia. pp. 34-59. In: B. A. Costa-Pierce and J. E. Rackocy (eds.). Tilapia Aquaculture in the Americas. Vol. 2. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States.
- Rothbard, S., Zohar, Y., Zmora, N., and Levavi-Sivan, B., Moav, B., Yaron, Z. 2008. Clearance of 17 alpha-Ethynyltestosterone from Muscle of Sex-inversed Tilapia Hybrids Treated for Growth Enhancement with Two Doses of the Androgen. Aquaculture. 89, 3-4 (15 September 1990): 365-376.
- Rolf, C., and Nieschlag, E. 1998. Potential adverse effects of long-term testosterone therapy. Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism. 12(3): 521-534.

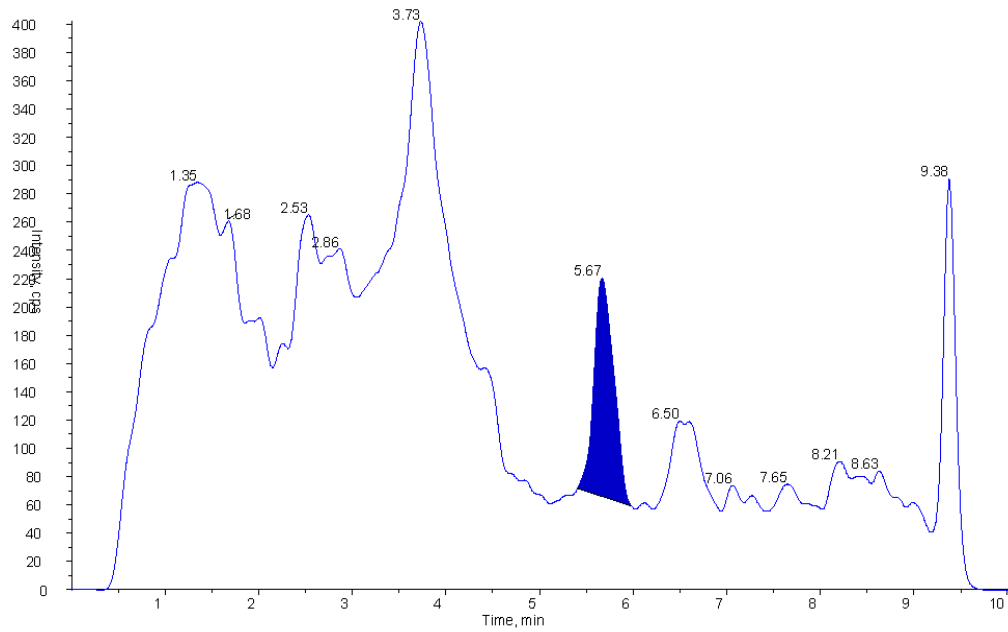


- Soto, P. 1992. Effect of mestanolone (17 $\alpha$ -methylandrostan-17 $\alpha$ -OL-3-one) on sex ratio on growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) Master Thesis, Auburn University, Auburn, AL, USA.
- Vinarukwong, N., Rojsitthisak, P., Wichidnithad, W., and Wongtavatchai, J. 2012. Sex Reversal Efficacy and Residual Levels of Mestanolone in Farmed Tilapia *Oreochromis niloticus* Following Oral Administration. Proceeding of Global Aquaculture securing our future AQUA 2012. Prague, Czech Republic. 27.
- Yamada M., Aramaki S., Kurosawa M., Kijima-Suda I., Saito K., and Nakazawa H. 2008. Simultaneous doping analysis of main urinary metabolites of anabolic steroids in horse by ion-trap gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Anal. Sci.* 24(9): 1199-1204.
- Yamada M., Aramaki S., Okayasu T., Hosoe T., Kurosawa M., Kijima-Suda I., Saito K., and Nakazawa H. 2007. Identification and quantification of metabolites common to 17 $\alpha$ -methyltestosterone and mestanolone in horse urine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45(1): 125-133.
- Waltner-Toews, D., and McEwen, S.A. 1994. Residues of hormonal substances in foods of animal origin: a risk assessment. *Preventive Veterinary Medicine.* 20: 235-247.
- World aquaculture. 2004. World production aquaculture. [Online]. Available. <http://www.was.org/main>

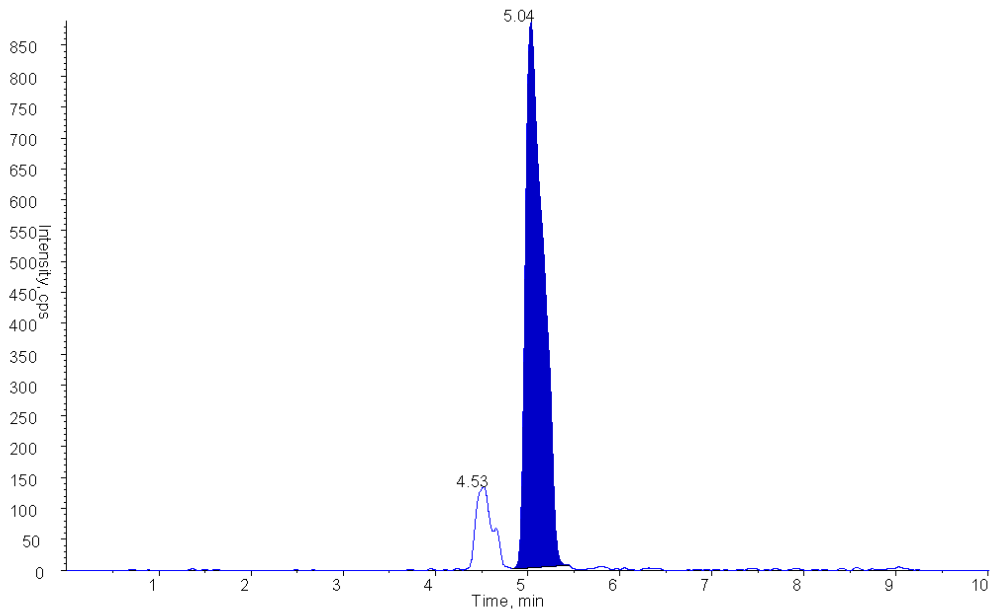
## ภาคผนวก

**ภาคผนวกที่ 1** LC-MS chromatogram ของเมสทาโนโดนและไฟแนสเตอไรด์จากตัวอย่างฉูก ปลานิลที่เลี้ยงด้วยฮอร์โมนเมสทาโนโดนผสมอาหารเป็นเวลา 15 วัน

Sample15\_1B - Mestaline 305.3 / 269.3 (Unknown) 305.3/269.3 amu - sample 48 of 57 from 5April2011.wif  
Area: 10372.994 counts Height: 1.55e+002 cps RT: 5.67 min

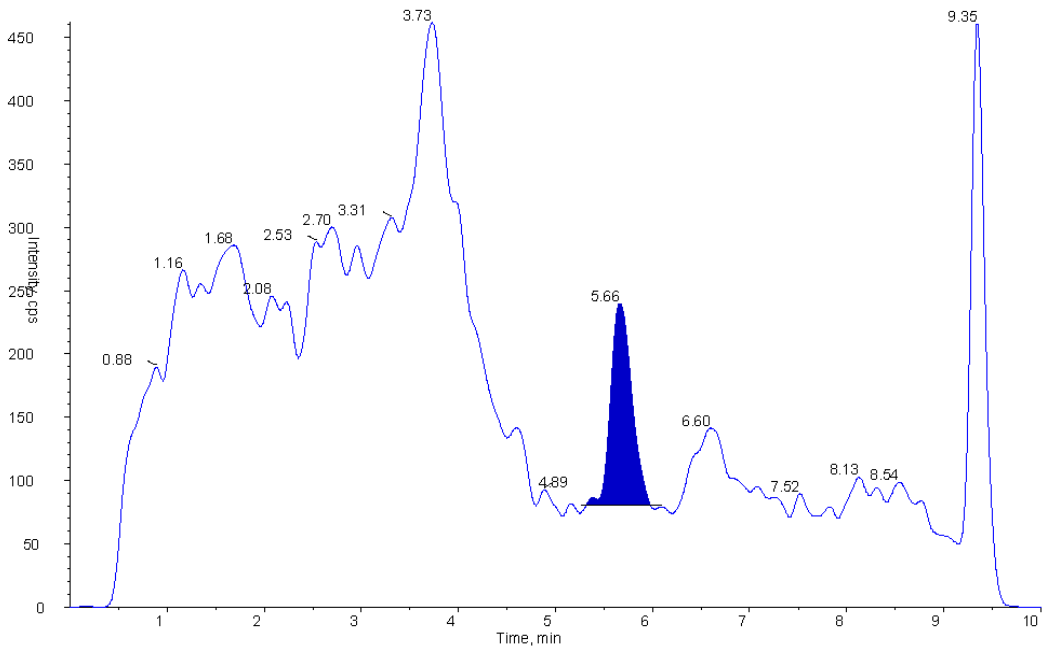


Sample 15\_1B - Finasteride 373.5 / 355.4 (IS) (Unknown) 373.5/355.4 amu - sample 48 of 57 from 5April2011.wif  
Area: 19121.669 counts Height: 8.88e+002 cps RT: 5.04 min

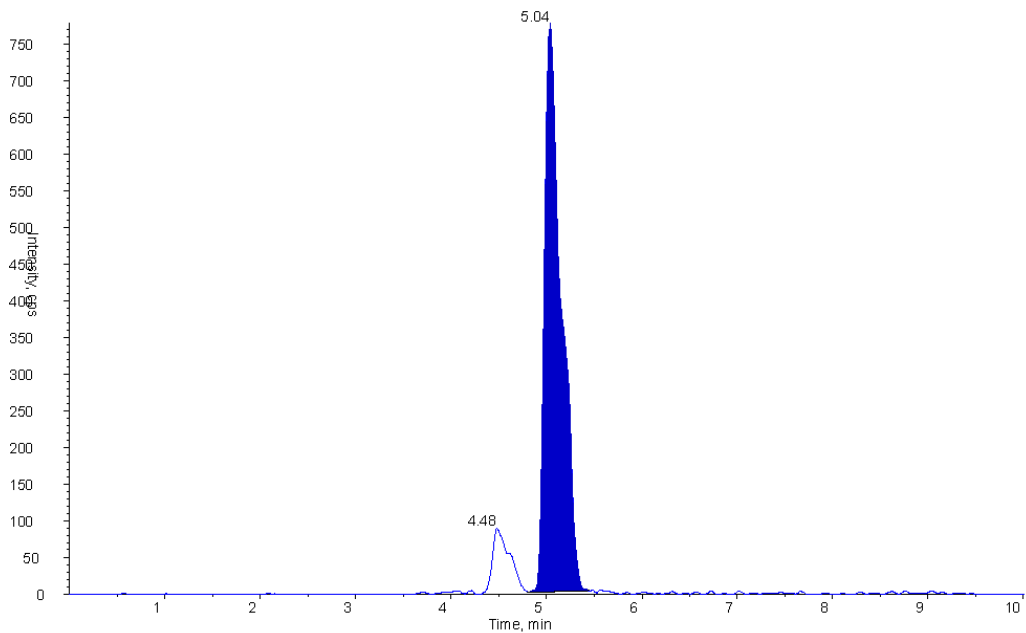


LC-MS chromatogram ของเมสตาลิน (ภาพบน) และไฟแนสเตอร์ไรด์ (ภาพล่าง) ในตัวอย่างลูกปลา  
นิลที่ตรวจหลังหยุดให้ออร์โมนผสมอาหาร 1 วัน

Sample15\_2B - Mestaline 305.3 / 269.3 (Unknown) 305.3/269.3 amu - sample 49 of 57 from 5April2011.wiff  
 Area: 7236.264 counts Height: 1.60e+002 cps RT: 5.66 min

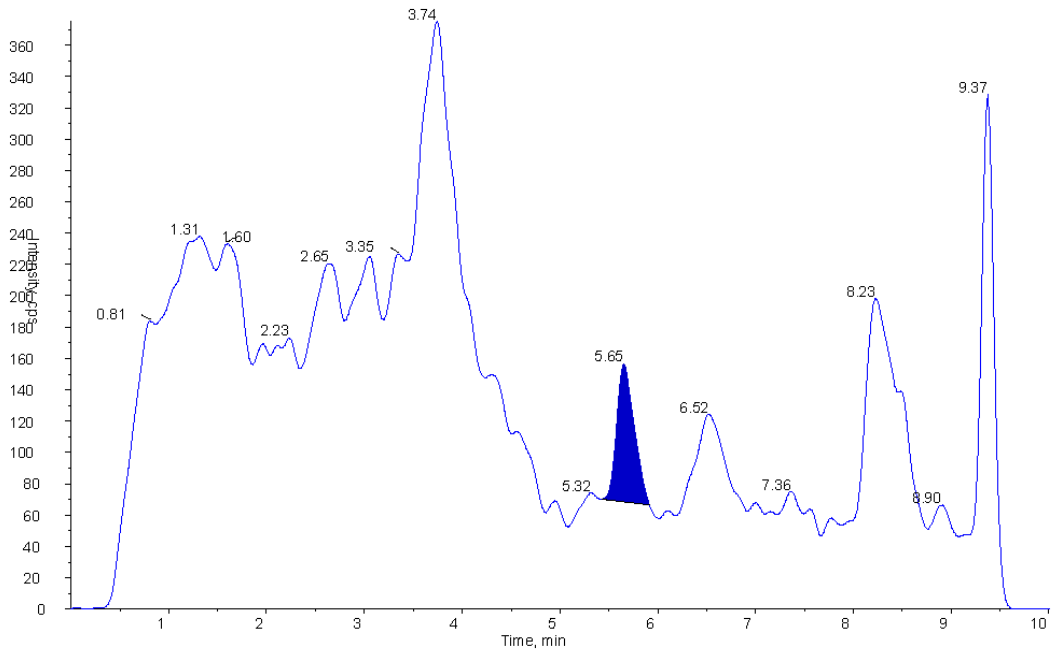


Sample15\_2B - Finasteride 373.5 / 355.4(1S) (Unknown) 373.5/355.4 amu - sample 49 of 57 from 5April2011.wiff  
 Area: 20726.404 counts Height: 7.76e+002 cps RT: 5.04 min

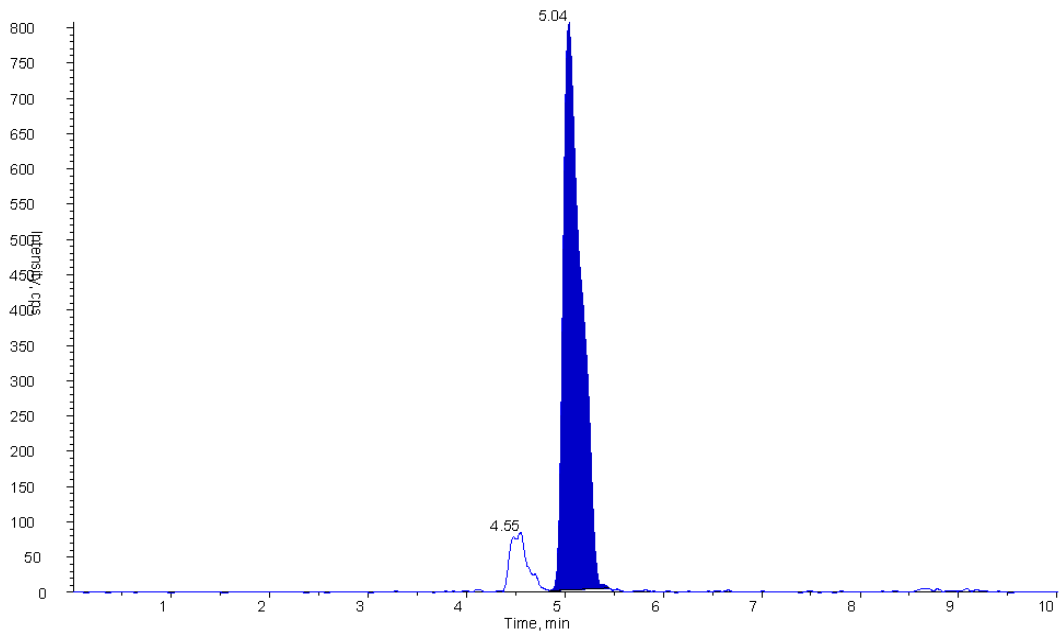


LC-MS chromatogram ของเมสทาโนลิน (ภาพบน) และไฟแนสเตอร์ไรด์ (ภาพล่าง) ในตัวอย่างลูกปลา  
 นิลที่ตรวจหลังหยุดให้ฮอร์โมนผสมอาหาร 2 วัน

**Sample15\_3B - Mestaline 305.3 / 269.3 (Unknown) 305.3/269.3 amu - sample 50 of 57 from 5April2011.wiff**  
 Area: 3152.520 counts Height: 8.84e+001 cps RT: 5.65 min

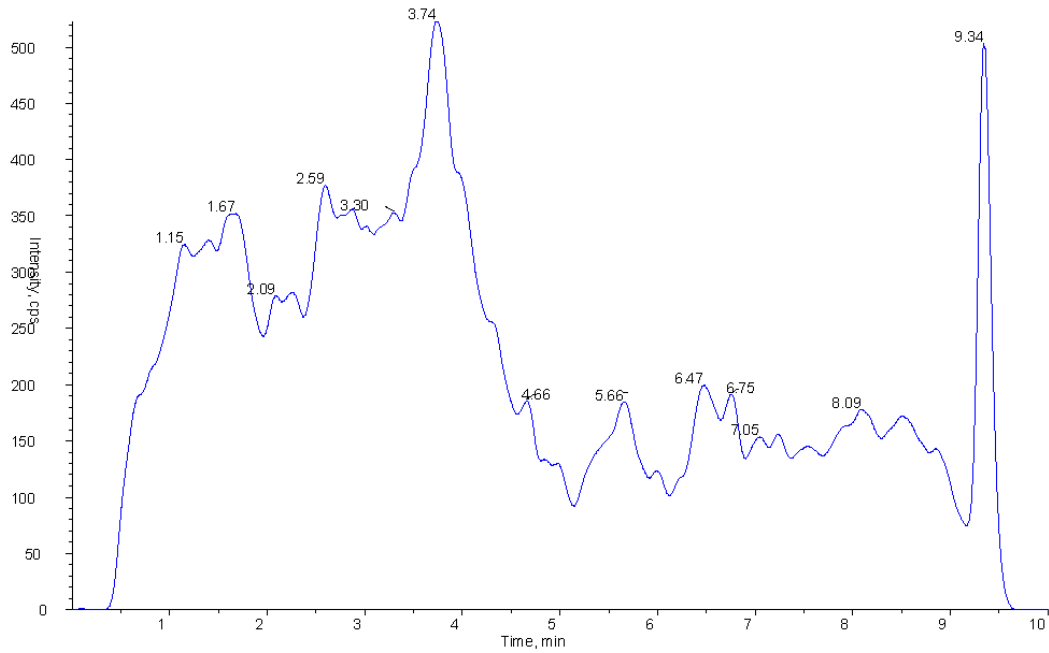


**Sample15\_3B - Finasteride 373.5 / 355.4(S) (Unknown) 373.5/355.4 amu - sample 50 of 57 from 5April2011.wiff**  
 Area: 21087.283 counts Height: 8.05e+002 cps RT: 5.04 min

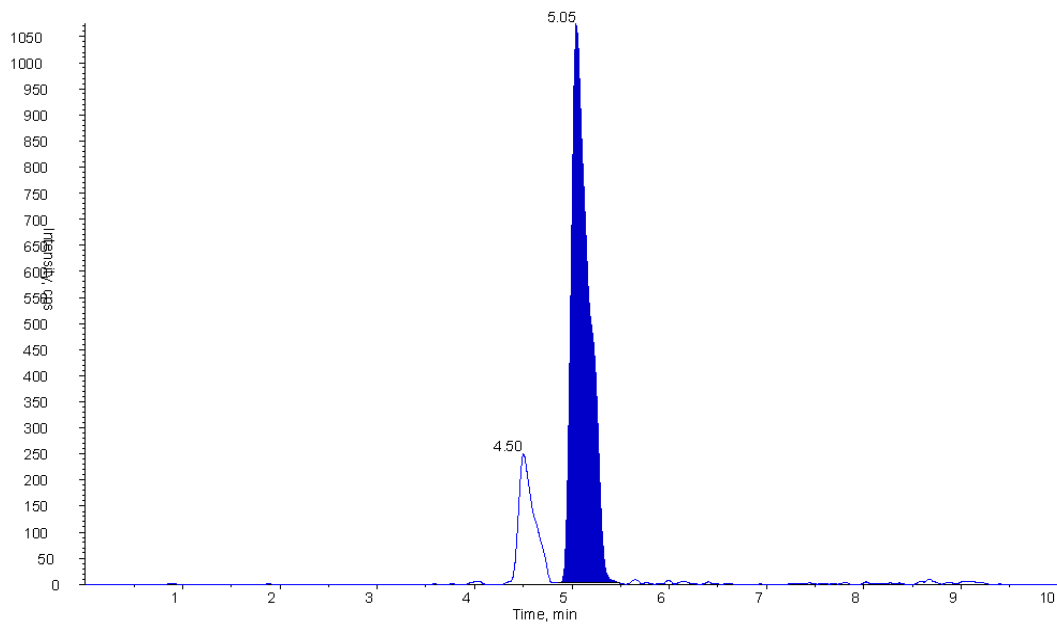


LC-MS chromatogram ของเมสทาโนโลน (ภาพบน) และไฟแนสเตอร์ไรด์ (ภาพล่าง) ในตัวอย่างลูกปลา  
 นิลที่ตรวจหลังหยุดให้ฮอร์โมนผสมอาหาร 3 วัน

Sample15\_5B - Mestaline 305.3 / 269.3 (Unknown) 305.3/269.3 amu - sample 51 of 57 from 5April2011.wiff (peak not found)

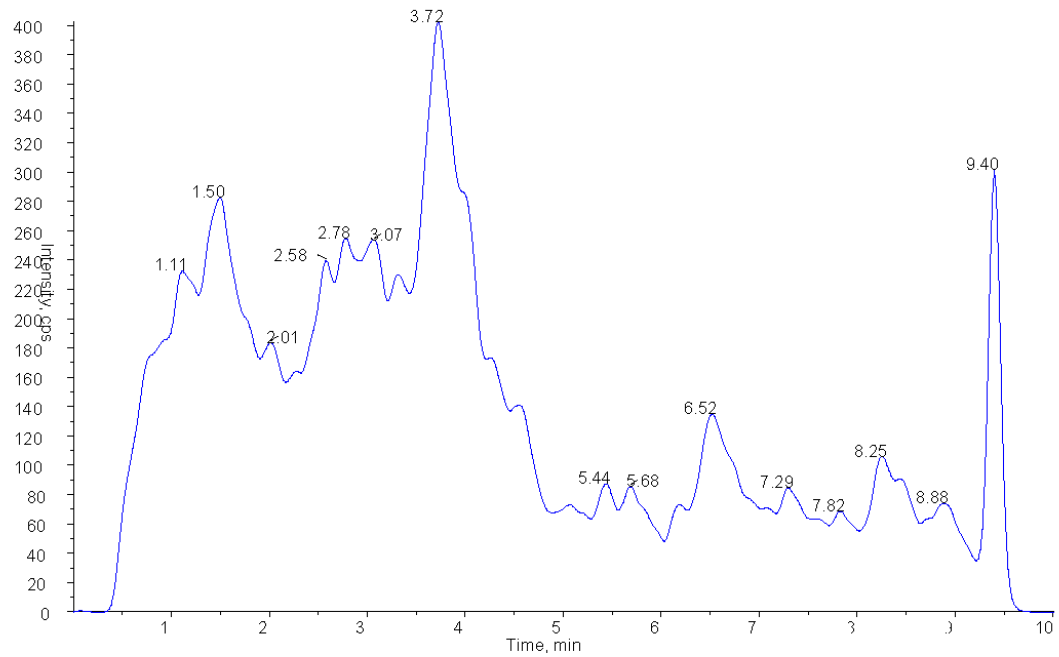


Sample15\_5B - Finasteride 373.5 / 355.4(S) (Unknown) 373.5/355.4 amu - sample 51 of 57 from 5April2011.wiff  
Area: 18690.735 counts Height: 1.08e+003 cps RT: 5.05 min

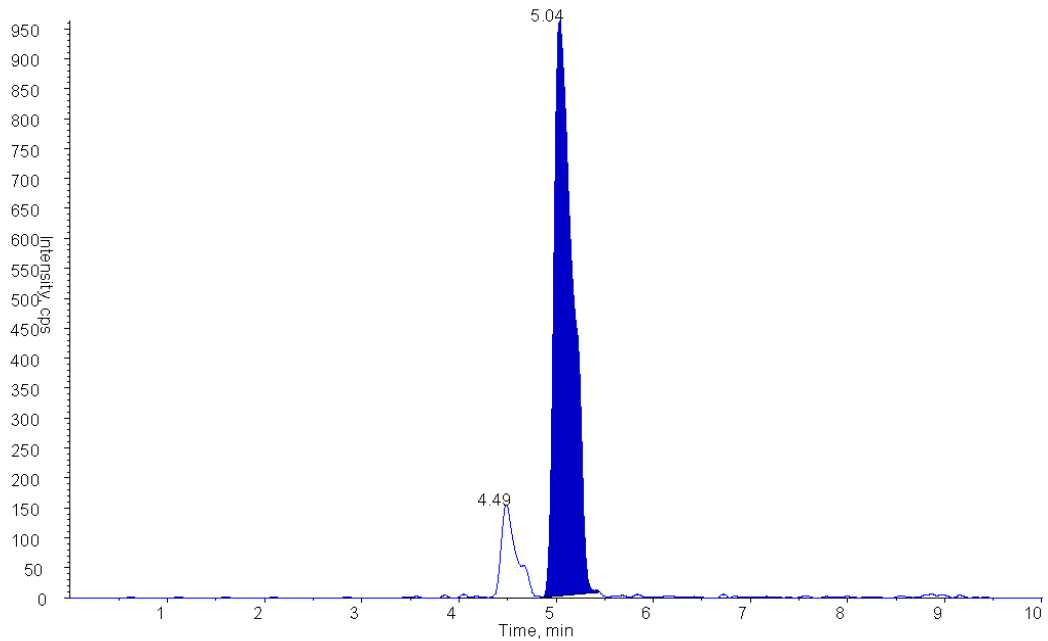


LC-MS chromatogram ของเมสทาโนโลน (ภาพบน) และไฟแนสเตอร์ไรด์ (ภาพล่าง) ในตัวอย่างลูกปลา  
นิลที่ตรวจหลังหยุดให้ฮอร์โมนผสมอาหาร 5 วัน

Sample15\_7B - Mestaline 305.3 / 269.3 (Unknown) 305.3/269.3 amu - sample 52 of 57 from 5April2011.wiff  
(peak not found)



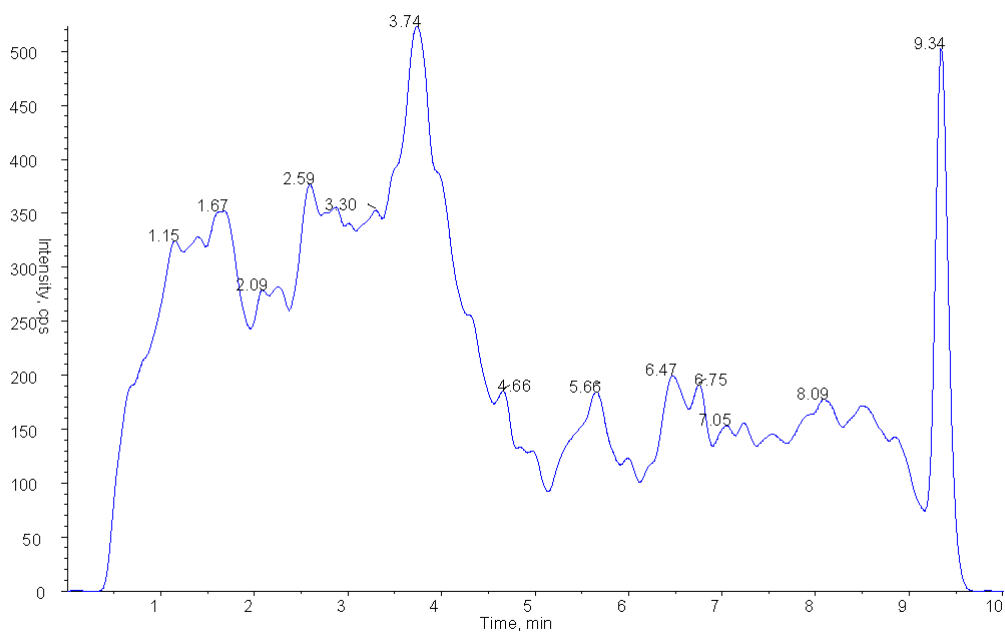
Sample15\_7B - Finasteride 373.5 / 355.4 (IS) (Unknown) 373.5/355.4 amu - sample 52 of 57 from 5April2011.wiff  
Area: 12765.621 counts Height: 9.63e+002 cps RT: 5.04 min



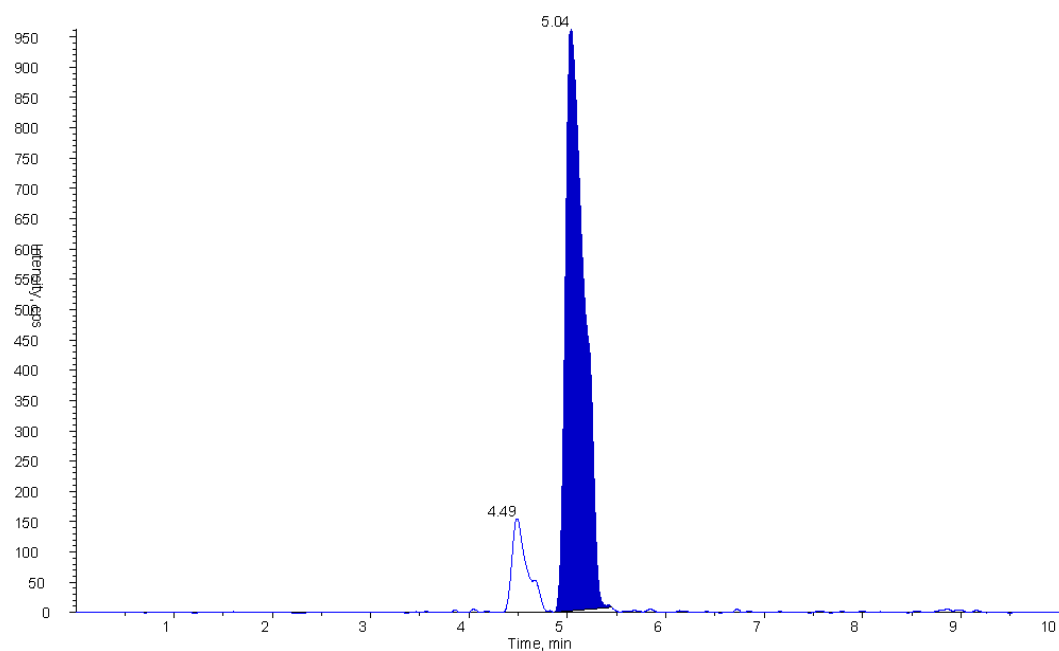
LC-MS chromatogram ของเมสทาโนโลน (ภาพบน) และไฟแนสเตอร์ไรด์ (ภาพล่าง) ในตัวอย่างลูกปลานิลที่ตรวจหลังหยุดให้ฮอร์โมนผสมอาหาร 7 วัน



Sample15\_14B - Mestaline 305.3 / 269.3 (Unknown) 305.3/269.3 amu - sample 53 of 57 from 5April2011.wiff  
(peak not found)

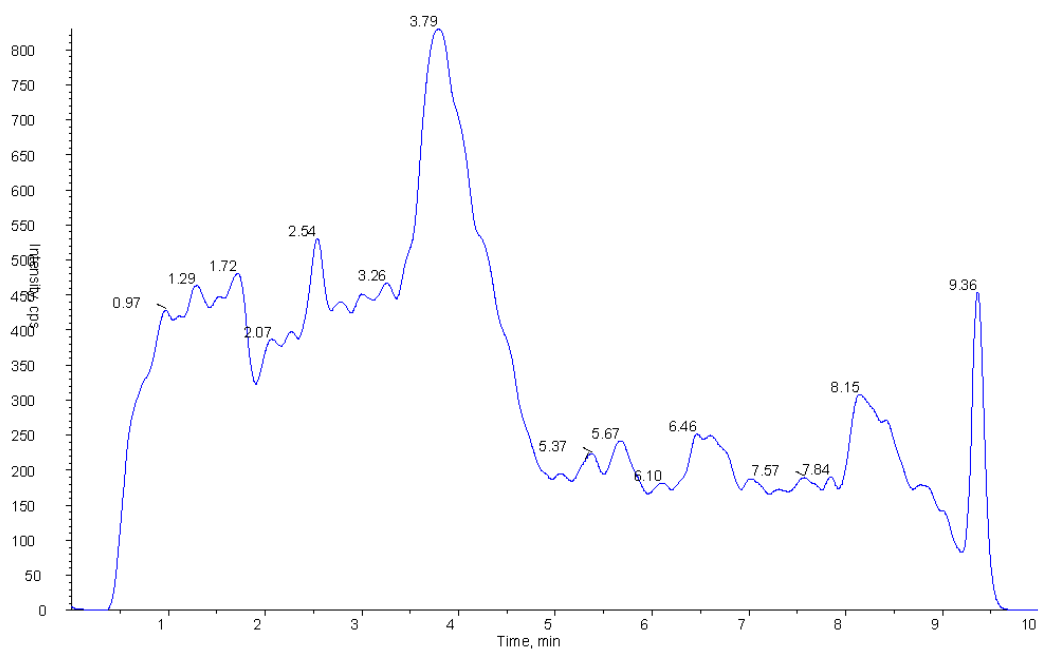


Sample15\_14B - Finasteride 373.5 / 355.4(S) (Unknown) 373.5/355.4 amu - sample 53 of 57 from 5April2011.wiff  
Area: 20219.620 counts Height: 9.63e+002 cps RT: 5.04 min

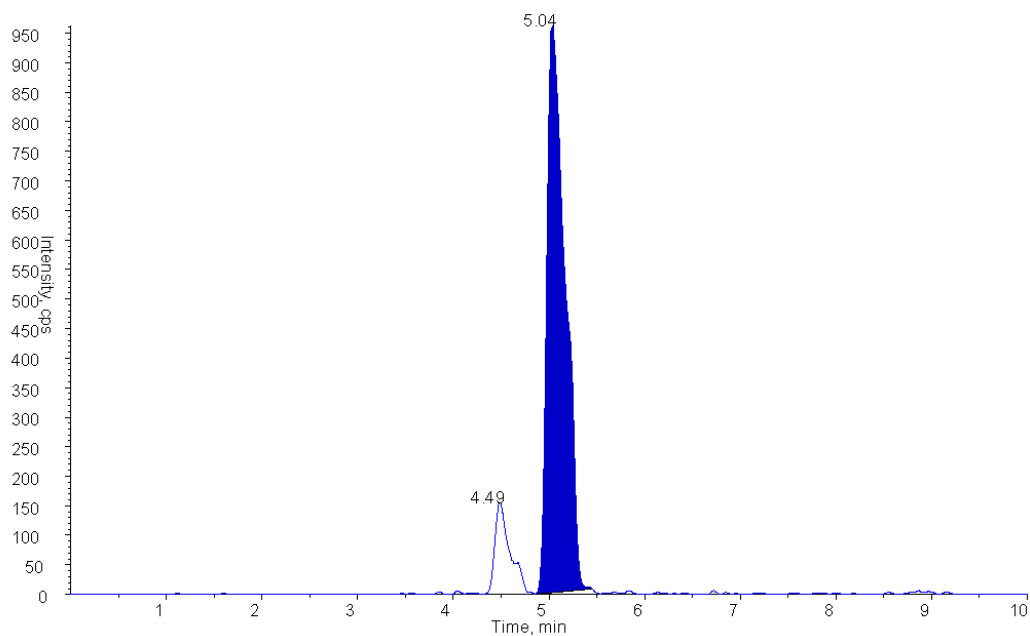


LC-MS chromatogram ของเมสทาโนลิน (ภาพบน) และไฟแนสเตอร์ไรด์ (ภาพล่าง) ในตัวอย่างลูกปลา  
นิลที่ตรวจหลังหยุดให้ออร์โมนผสมอาหาร 14 วัน

**Sample15\_21B - Mestaline 305.3 / 269.3 (Unknown) 305.3/269.3 amu - sample 54 of 57 from 5April2011.wiff (peak not found)**



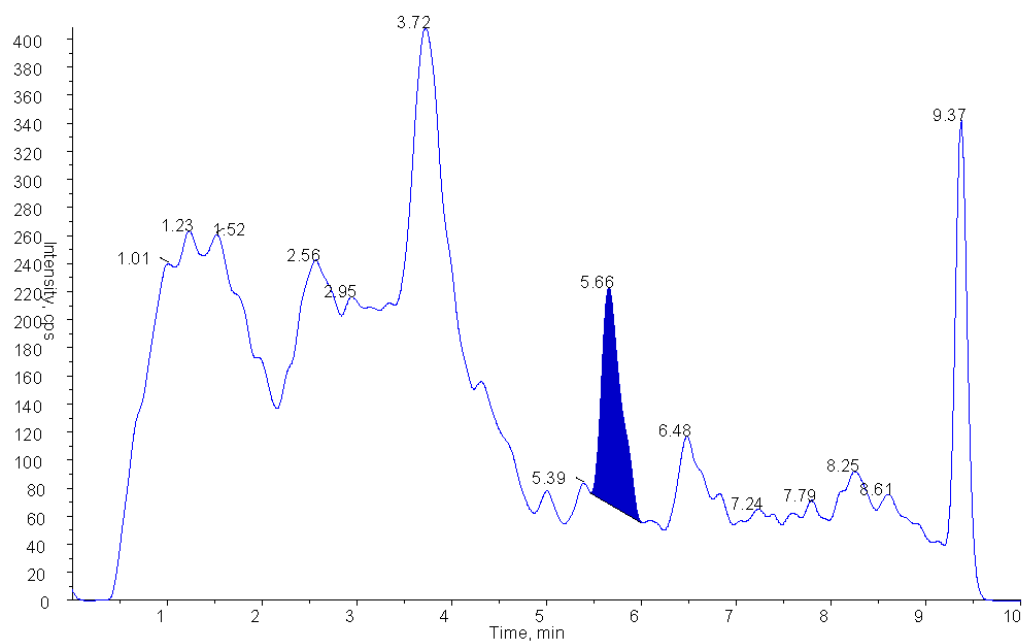
**Sample15\_21B - Finasteride 373.5 / 355.4 (IS) (Unknown) 373.5/355.4 amu - sample 54 of 57 from 5April2011.wiff  
Area: 20610.007 counts Height: 9.63e+002 cps RT: 5.04 min**



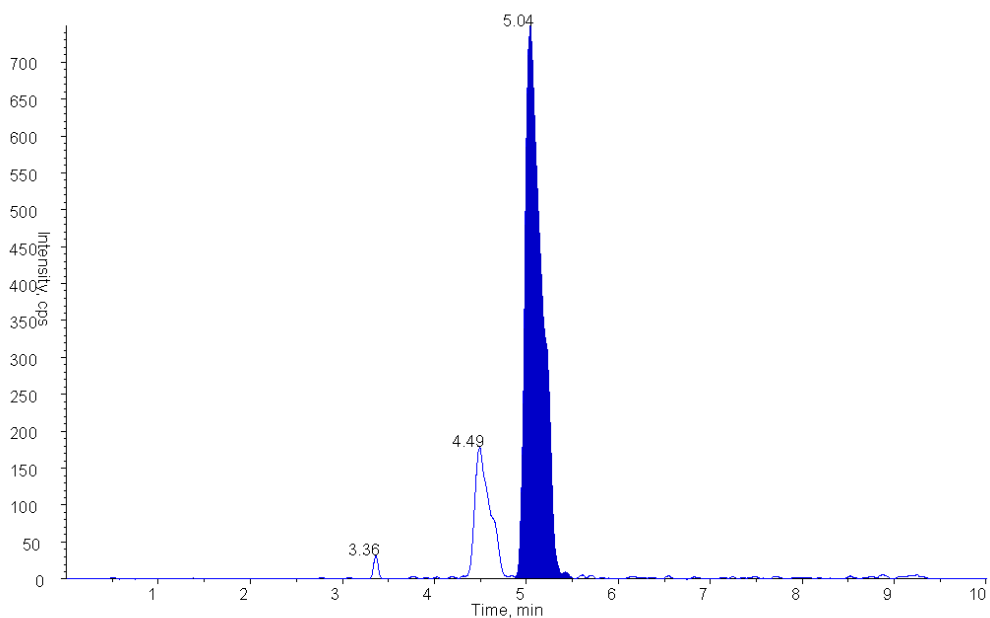
LC-MS chromatogram ของเมสทาโนลิน (ภาพบน) และไฟแนสเตอร์ (ภาพล่าง) ในตัวอย่างลูกปลา  
ชนิดที่ตรวจหลังหยุดให้ฮอร์โมนผสมอาหาร 21 วัน

**ภาคผนวกที่ 2** LC-MS chromatogram ของเมสทาโนโลินและไฟแนสเตอไรด์จากตัวอย่างลูกปลานิลที่เลี้ยงด้วยฮอร์โมนเมสทาโนโลินผสมอาหารเป็นเวลา 23 วัน

**Sample23\_1B - Mestaline 305.3 / 269.3 (Unknown) 305.3/269.3 amu - sample 42 of 70 from 5April2011.wiff**  
 Area: 9420.228 counts Height: 1.55e+002 cps RT: 5.66 min

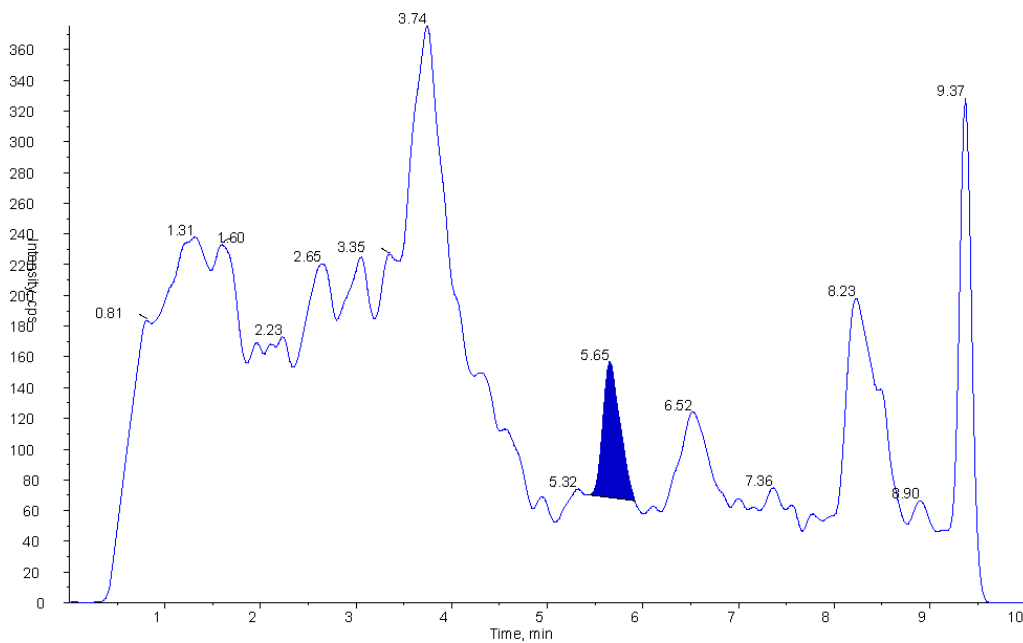


**Sample23\_1B - Finasteride 373.5 / 355.4(IS) (Unknown) 373.5/355.4 amu - sample 42 of 70 from 5April2011.wiff**  
 Area: 16876.078 counts Height: 7.49e+002 cps RT: 5.04 min

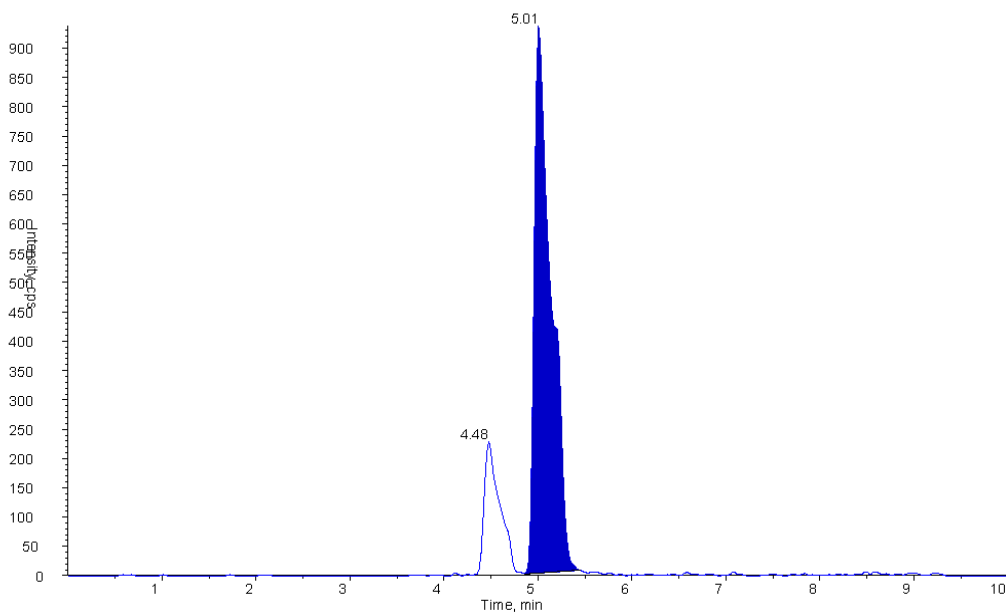


LC-MS chromatogram ของเมสทาโนโลน (ภาพบน) และไฟแนสเตอร์ไรด์ (ภาพล่าง) ในตัวอย่างลูกปลานิลที่ตรวจหลังหยุดให้ออร์โมนผสมอาหาร 1 วัน

Sample23\_2B - Mestaline 305.3 / 269.3 (Unknown) 305.3/269.3 amu - sample 43 of 70 from 5April2011.wiff  
Area: 7360.843 counts Height: 8.84e+001 cps RT: 5.65 min

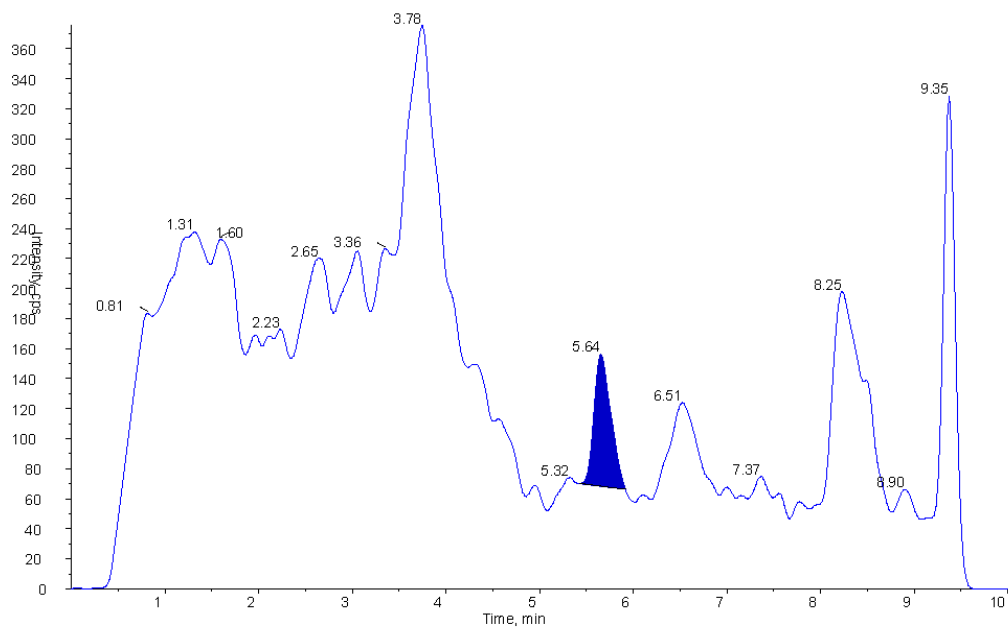


Sample23\_2B - Finasteride 373.5 / 355.4(IS) (Unknown) 373.5/355.4 amu - sample 43 of 70 from 5April2011.wiff  
Area: 20968.539 counts Height: 9.40e+002 cps RT: 5.01 min

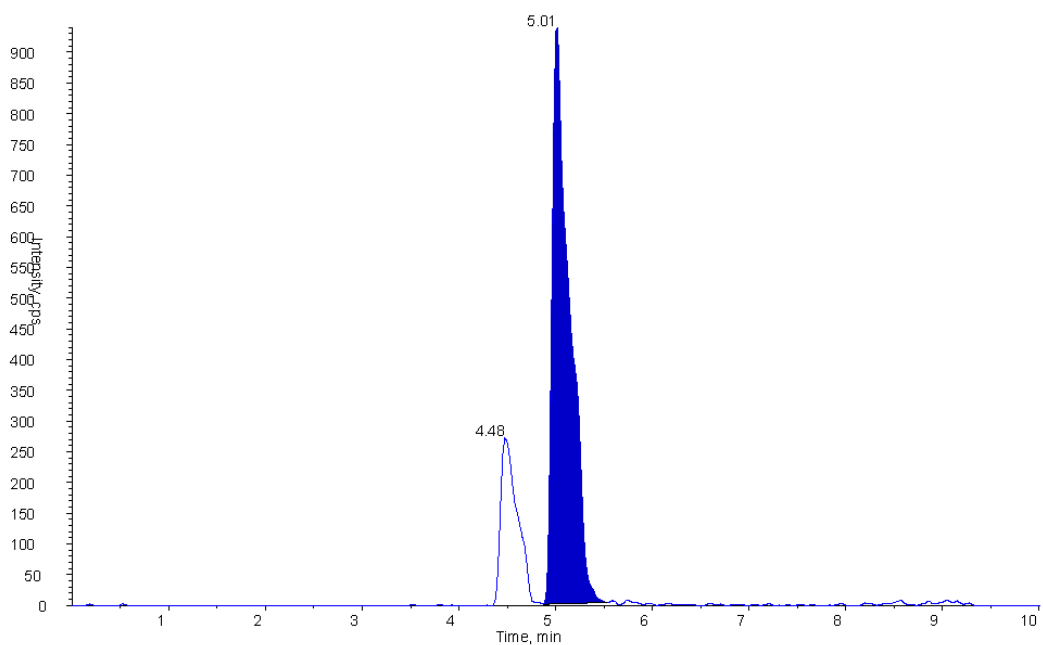


LC-MS chromatogram ของเมสทาโนลิน (ภาพบน) และไฟแนสเตอร์ไรด์ (ภาพล่าง) ในตัวอย่างลูกปลา  
นิลที่ตรวจหลังหยุดให้ฮอร์โมนผสมอาหาร 2 วัน

Sample23\_3B - Mestaline 305.3 / 269.3 (Unknown) 305.3/269.3 amu - sample 44 of 70 from 5April2011.wiff  
Area: 3298.552 counts Height: 5.84e+001 cps RT: 5.64 min

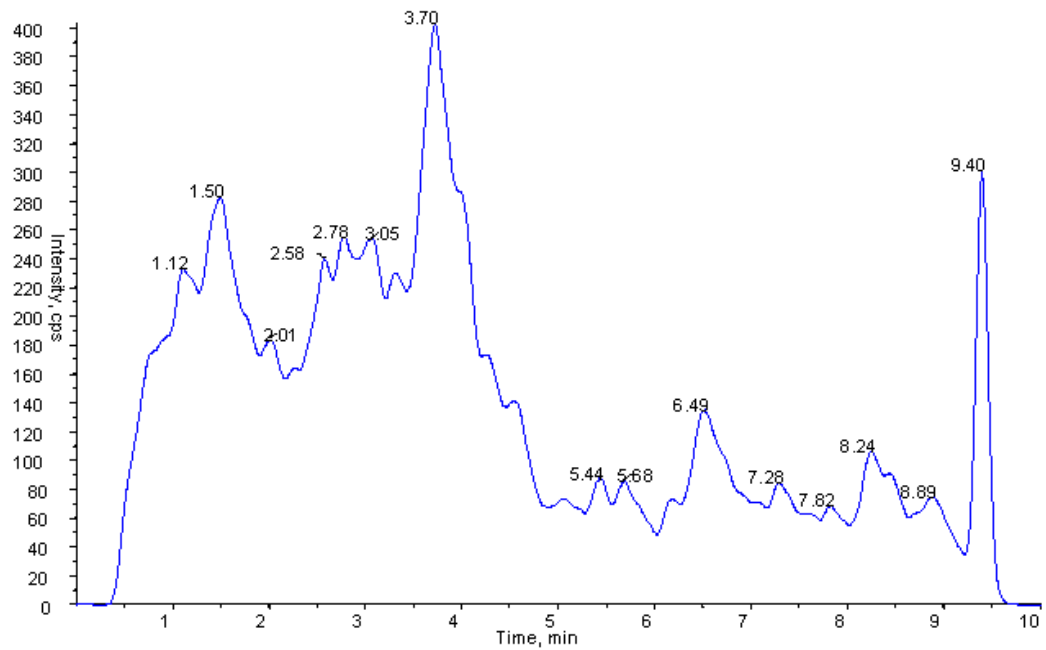


Sample23\_3B - Finasteride 373.5 / 355.4(S) (Unknown) 373.5/355.4 amu - sample 44 of 70 from 5April2011.wiff  
Area: 18359.175 counts Height: 9.49e+002 cps RT: 5.01 min

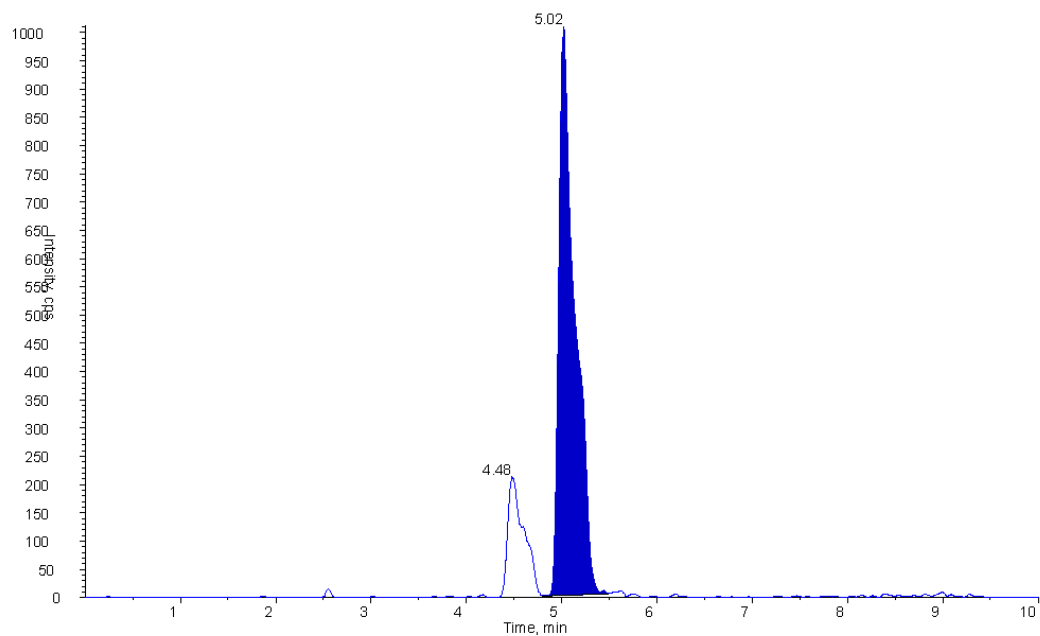


LC-MS chromatogram ของเมสทาโนโลน (ภาพบน) และไฟแนสเตอร์ไรด์ (ภาพล่าง) ในตัวอย่างลูกปลา  
นิลที่ตรวจหลังหยุดให้ฮอร์โมนผสมอาหาร 3 วัน

Sample23\_5B - Nbstaline 305.3 / 269.3 (Unknown) 305.3/269.3 amu - sample 45 of 70 from 5April2011.wiff  
(peak not found)

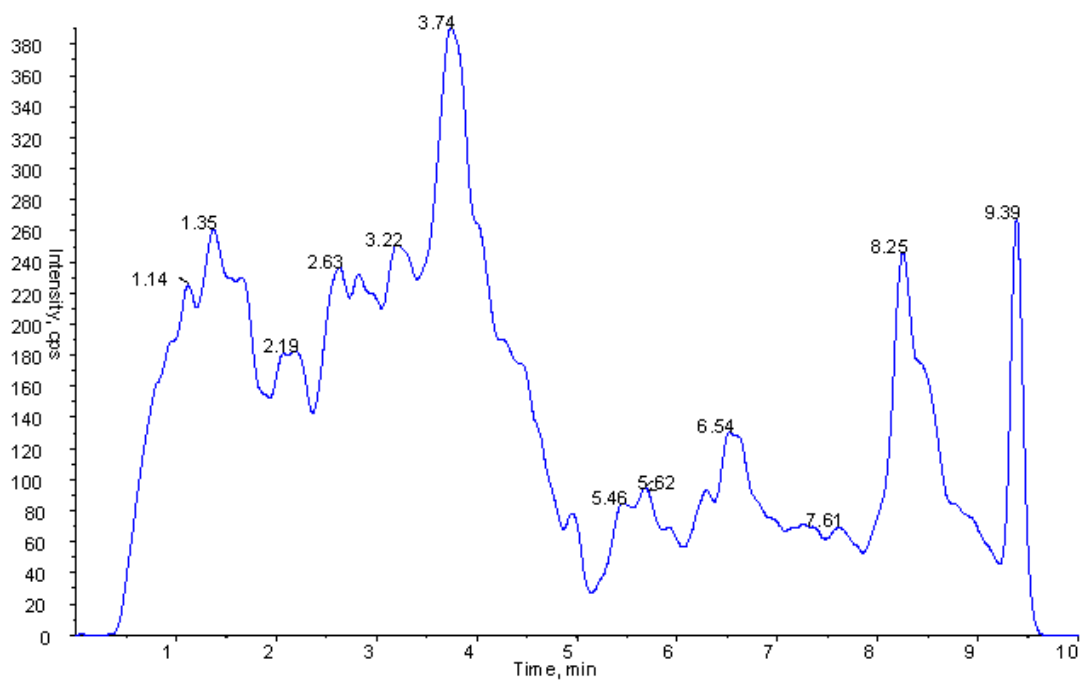


Sample23\_5B- Finasteride 373.5 / 355.4(S) (Unknown) 373.5/355.4 amu - sample 45 of 70 from 5April2011.wiff  
Area: 18190.770 counts Height: 1.01e+003 cps RT: 5.02 min

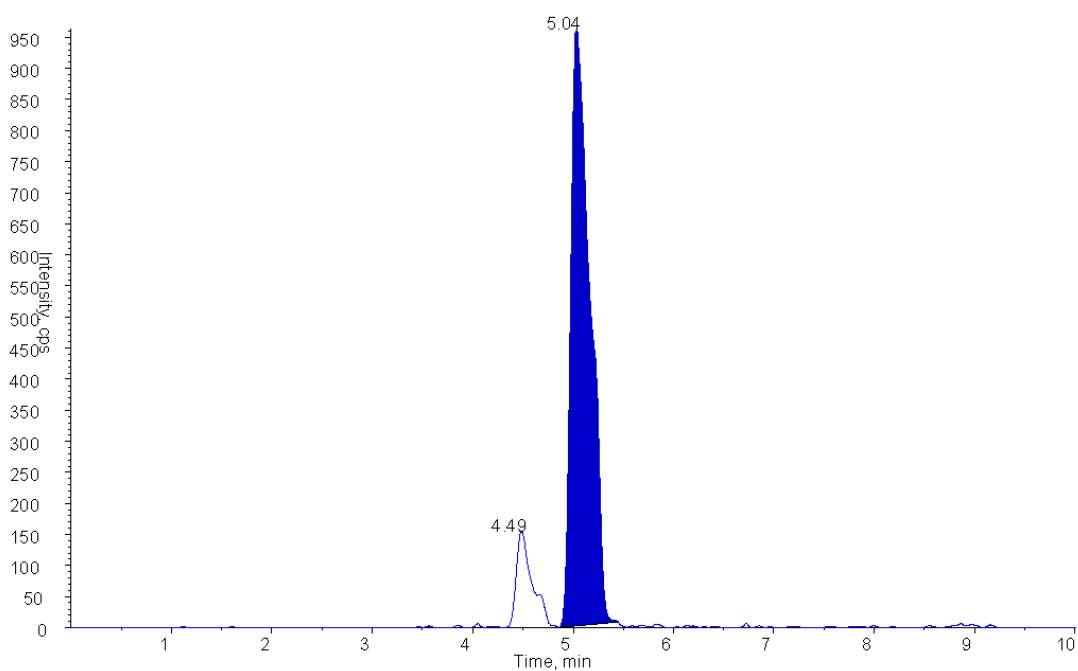


LC-MS chromatogram ของเมสทาโนลีน (ภาพบน) และไฟแนสเตอร์ไรด์ (ภาพล่าง) ในตัวอย่างลูกปลา  
นิลที่ตรวจหลังหยุดให้ฮอร์โมนผสมอาหาร 5 วัน

**Sample23\_7B - Mestaline 305.3 / 269.3 (Unknown) 305.3/269.3 amu - sample 46 of 70 from 5April2011.wiff (peak not found)**



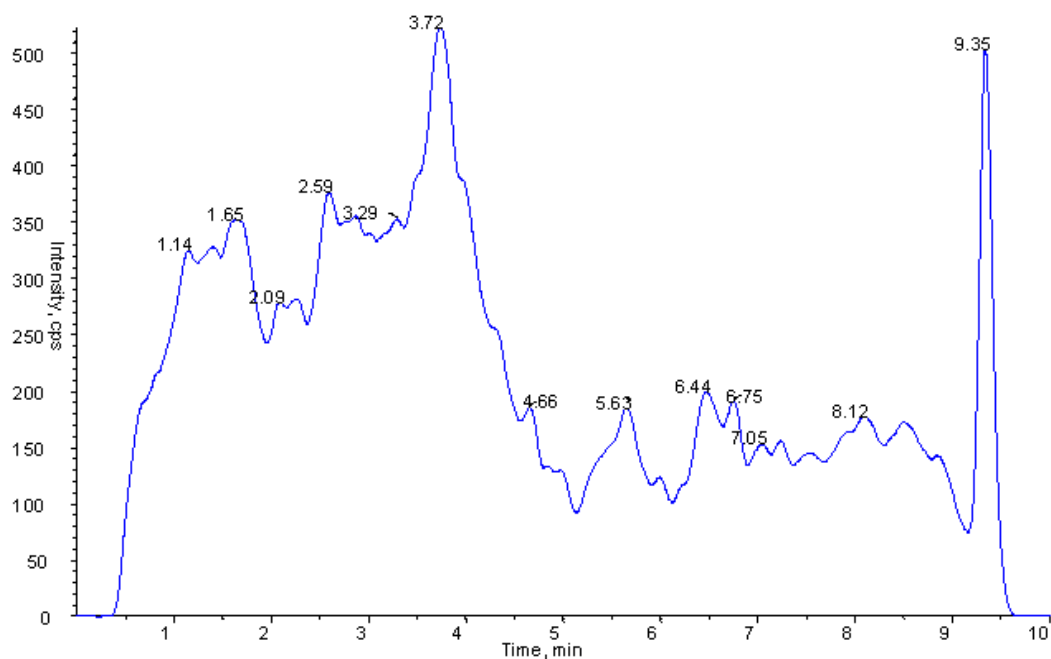
**Sample23\_7B - Finasteride 373.5 / 355.4 (IS) (Unknown) 373.5/355.4 amu - sample 46 of 70 from 5April2011.wiff**  
 Area: 18420.109 counts Height: 9.63e+002 cps RT: 5.04 min



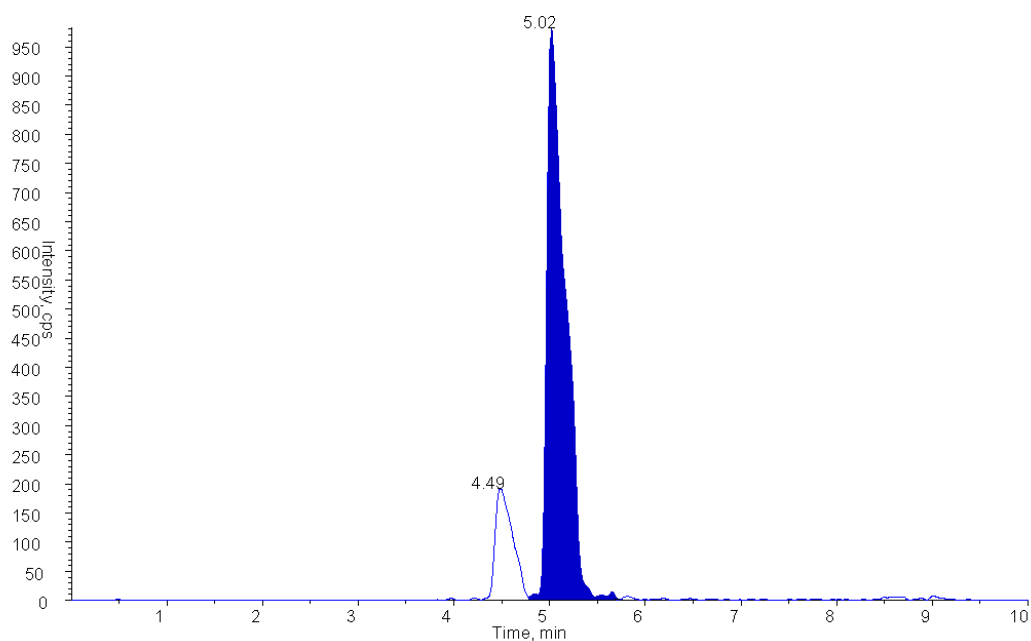
LC-MS chromatogram ของเมสทาโนลิน (ภาพบน) และไฟแนสเตอร์ไรด์ (ภาพล่าง) ในตัวอย่างลูกปลานิลที่ตรวจหลังหยุดให้ฮอร์โมนผสมอาหาร 7 วัน



**Sample23\_14B - Metastable 305.3 / 269.3 (Unknown) 305.3/269.3 amu - sample 47 of 70 from 5April2011.wiff (peak not found)**

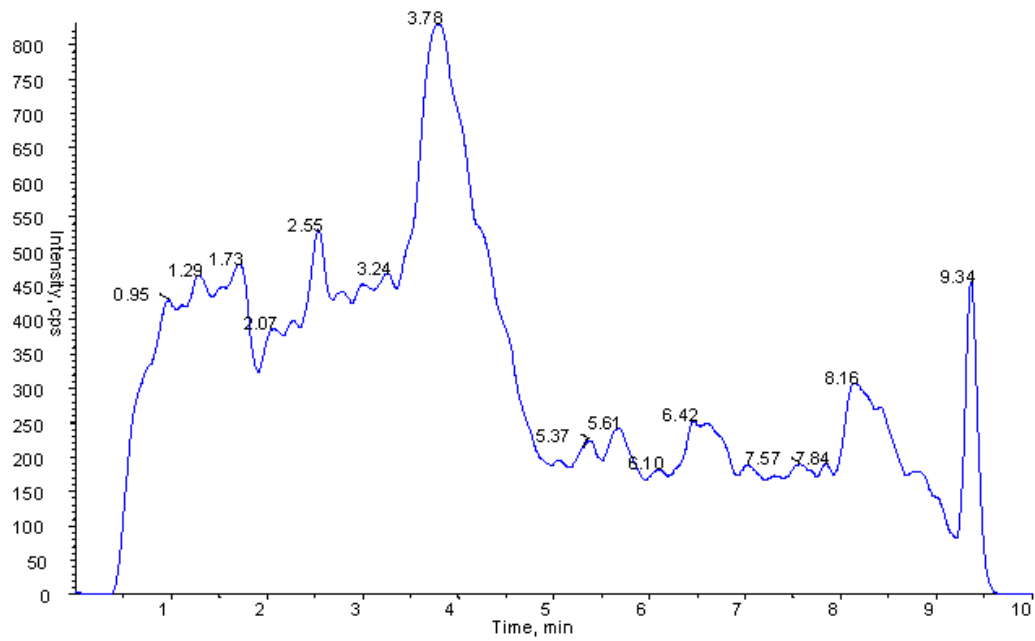


**Sample23\_14B - Finasteride 373.5 / 355.4 (IS) (Unknown) 373.5/355.4 amu - sample 47 of 70 from 5April2011.wiff**  
 Area: 19432.782 counts Height: 9.81e+002 cps RT: 5.02 min

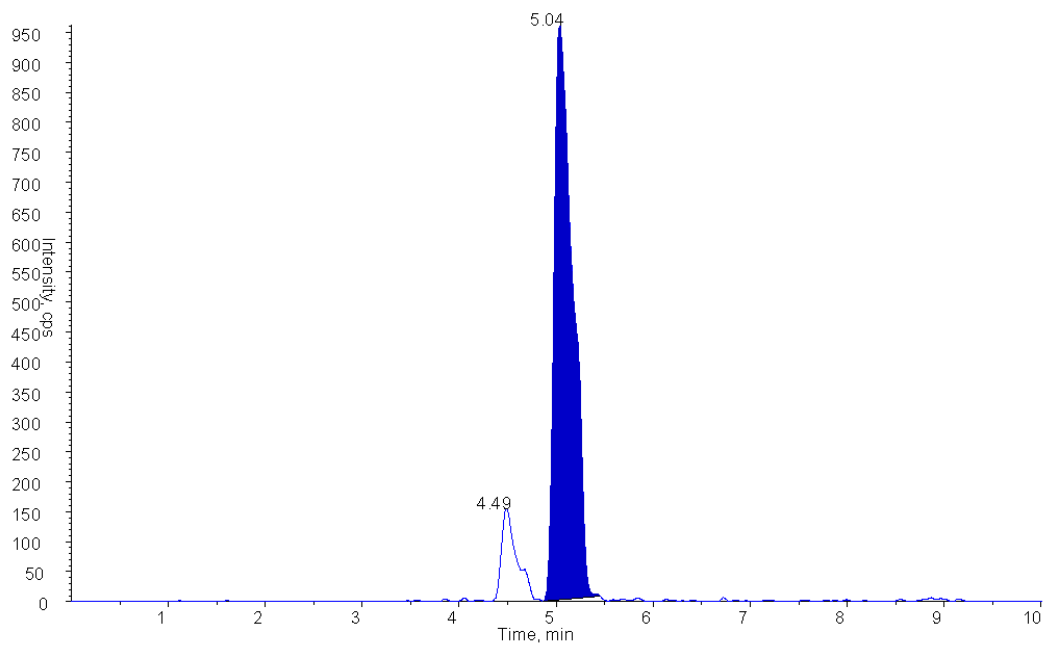


LC-MS chromatogram ของเมสทานิโตน (ภาพบน) และไฟแนสเตอร์ไรด์ (ภาพล่าง) ในตัวอย่างลูกปลานิลที่ตรวจหลังหยุดให้ฮอร์โมนผสมอาหาร 14 วัน

Sample23\_21B - Mestaline 305.3 / 269.3 (Unknown) 305.3/269.3 amu - sample 48 of 70 from 5April2011.wiff  
(peak not found)



Sample23\_21B - Finasteride 373.5 / 355.4 (IS) (Unknown) 373.5/355.4 amu - sample 48 of 70 from 5April2011.wiff  
Area: 18871.242 counts Height: 9.63e+002 cps RT: 5.04 min



LC-MS chromatogram ของเมสทาโนลิน (ภาพบน) และไฟแนสเตอร์ไรด์ (ภาพล่าง) ในตัวอย่างลูกปลา  
นิลที่ตรวจหลังหยุดให้ฮอร์โมนผสมอาหาร 21 วัน

**ภาคผนวกที่ 3** Studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in food producing animals: Validation of analytical methods used in residue depletion studies. VICH GL 49 (MRK) - metabolism and residue kinetics. February 2011 adopted at step 7 of the VICH Process by the VICH Steering Committee.

VICH GL 49 (MRK) – METABOLISM AND RESIDUE KINETICS

February 2011

For Implementation at Step 7 - Final

**STUDIES TO EVALUATE THE METABOLISM AND  
RESIDUE KINETICS OF VETERINARY DRUGS IN FOOD  
PRODUCING ANIMALS: VALIDATION OF ANALYTICAL  
METHODS USED IN RESIDUE DEPLETION STUDIES**

---

Adopted at Step 7 of the VICH Process  
by the VICH Steering Committee  
in February 2011  
for implementation in February 2012

This Guideline has been developed by the appropriate VICH Expert Working Group and is subject to consultation by the parties, in accordance with the VICH Process. At Step 7 of the Process the final draft will be recommended for adoption to the regulatory bodies of the European Union, Japan and the USA.

Secretariat : C/O IFAH, rue Defacqz, 1 - B - 1000 Bruxelles (Belgium) - Tel. +32-2-543.75.72,  
Fax +32-2-543.75.85  
e-mail : [sec@vichsec.org](mailto:sec@vichsec.org) - Website : <http://www.vichsec.org>

1. INTRODUCTION .....	53
1.1. Objective of the guidance.....	53
1.2. Background.....	53
2. GUIDANCE .....	54
2.1 Purpose .....	54
2.2. Scope .....	54
3. PERFORMANCE CHARACTERISTICS .....	54
3.1. Linearity .....	55
3.2. Accuracy .....	55
3.3. Precision.....	56
3.4. Limit of Detection .....	57
3.5. Limit of Quantitation .....	57
3.6. Selectivity .....	57
3.7. Stability in Matrix .....	58
3.8. Processed Sample Stability .....	58
3.9. Robustness.....	59
4. GLOSSARY .....	60

## 1. INTRODUCTION

### *1.1. Objective of the guidance*

This guidance document is intended to provide a general description of the criteria that have been found by the European Union (EU), Japan, United States of America (USA), Australia, New Zealand and Canada to be suitable for the validation of analytical methods used in veterinary drug residue depletion studies.

### *1.2. Background*

During the veterinary drug development process, residue depletion studies are conducted to determine the concentration of the residue or residues present in the edible products (tissues, milk, eggs or honey) of animals treated with veterinary drugs. This information is used in regulatory submissions around the world. Submission of regulatory methods (i.e., post approval control methods) and the validation requirements of the regulatory methods are usually well defined by various regulatory agencies worldwide and might even be defined by national or regional law. However, the residue depletion studies are generally conducted before the regulatory methods have been completed. Often times the in-house validated residue methods provide the framework for the methods submitted for regulatory monitoring. Harmonization of the validation requirements for methodology used during residue depletion studies and submitted to the regulatory agencies in support of the maximum residue limits (MRLs) and withdrawal periods should be achievable. It is the intent of this document to describe a validation procedure that is acceptable to the regulatory bodies of the EU, Japan, USA, Australia, New Zealand and Canada for use in the residue depletion studies. This validated method could continue on to become the “regulatory method” but that phase of the process will not be addressed in any detail in these guidelines.

A variety of validation guidelines exist for analytical methodology and many of the aspects of those validation procedures are incorporated in this document (VICH GL1 (Validation Definition), October 1998 and VICH GL2 (Validation Methodology), October 1998). However, there are aspects of residue validation procedures that are addressed in this guidance document that are not addressed in previous documents. The guidance provided here is intended to specifically address the validation of veterinary drug residue methods.

## 2. GUIDANCE

### *2.1 Purpose*

The purpose of this document is to provide a general description of procedures that can be used for the validation of the analytical methods developed for the analysis of tissue samples obtained in residue depletion studies.

For purposes of this guidance, “acceptable” refers to the scientific evaluation of the analytical method in terms of the described validation criteria.

### *2.2. Scope*

This guidance is only intended to apply to analytical procedures that have been developed for the evaluation of veterinary drug residue methods (assays developed to determine residues in marker residue depletion studies). It is not intended to define the criteria needed for validation of regulatory monitoring assay procedures.

This document provides performance characteristics of the residue assays that if followed would generally be considered acceptable by the regulatory agencies of the EU, Japan, USA, Australia, New Zealand and Canada. The intent is that methods validated according to this guidance will provide residue data that would generally be considered acceptable by the regulatory agencies in determining appropriate withdrawal periods.

## 3. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

In general, there are specific performance characteristics of a method validation. Those performance characteristics are defined as follows:

- Linearity
- Accuracy
- Precision
- Limit of Detection
- Limit of Quantitation
- Selectivity
- Stability in Matrix
- Process Sample Stability
- Robustness

Each of the characteristics will be described below as they apply to the validation of methods intended for use in veterinary drug residue depletion studies.

### **3.1. Linearity**

A calibration curve should be generated in which the linear relationship is evaluated across the range of the expected matrix (tissue, milk, egg or honey) concentrations. Calibration standard curves can be generated in three formats depending upon the methodology: standards in solvent/buffer, standards fortified into control matrix extract and standards fortified into control matrix and processed through the extraction procedure. Linearity should be described by a linear, polynomial or other (as appropriate) regression plot of known concentration vs. response using a minimum of 5 different concentrations. Acceptability of weighting factors should be determined by evaluation of the residuals across three runs to determine if the residuals are randomly distributed. Evaluation of the residuals should be carried out across at least three separate runs.

The recommended acceptance criterion for a standard curve is dependent upon the format of the standard curve. Calibration standard curves generated by fortification of control matrix and processed through the procedure are subject to the same acceptance criteria as the samples (see Section

3.3. *Precision*). Calibration standard curves generated by standards in solvent/buffer or by fortification of control matrix extract would require more stringent acceptance criteria (Repeatability  $\leq$  15% at all concentrations except at or below LOQ where it can be  $\leq$  20%).

Some assays (e.g. microbiological assays) could require log transformations to achieve linearity where other assays (e.g., ELISA, RIA) could require a more complicated mathematical function to establish the relationship between concentration and response. Again, acceptability of the function selected should be verified by evaluation of the residuals generated when that function is used.

### **3.2. Accuracy**

Accuracy refers to the closeness of agreement between the true value of the analyte concentration and the mean result that is obtained by applying the experimental procedure. Accuracy is closely related to systematic error (analytical method bias) and analyte recovery (measured as percent recovery). Recommended accuracy for residue methods will vary



depending upon the concentration of the analyte. The accuracy should meet the range listed below:

Analyte Concentration*	Acceptable Range for Accuracy
< 1 µg/kg	-50 % to +20 %
≥ 1 µg/kg < 10 µg/kg	-40 % to +20 %
≥ 10 µg/kg < 100 µg/kg	-30 % to +10 %
≥ 100 µg/kg	-20 % to +10 %

\* µg/kg = ng/g = ppb

### 3.3. Precision

Precision of a method is the closeness of agreement between independent test results obtained from homogenous test material under stipulated conditions of use. Analytical variability between different laboratories is defined as reproducibility, and variability from repeated analyses within a laboratory is repeatability. Single-laboratory validation precision should include a within-run (repeatability) and between-run component.

The within- and between-run precision of the analytical method can be determined as part of the validation procedure. There is generally not a need to determine reproducibility (between-laboratory precision) in order to conduct a residue depletion study, because the laboratory that is developing the method is often the same laboratory assaying the samples from the residue study. Instead of establishing reproducibility of the assay, a within-run precision, can be determined. Within- and between-run precision should be determined by the evaluation of a minimum of three replicates at three different concentrations representative of the intended validation range (which should include the LOQ) across three days of analysis.

For the purposes of the residue method validation, acceptable variability is dependent upon the concentration of the analyte. The precision should meet the range listed below.:

Analyte Concentration	Acceptable within-run precision (Repeatability), %CV	Acceptable between-run precision %CV*
< 1 µg/kg	30 %	45%
≥ 1 µg/kg < 10 µg/kg	25 %	32%
≥ 10 µg/kg < 100 µg/kg	15%	23%
≥ 100 µg/kg	10 %	16%

\* as determined by the Horwitz equation  $CV = 2^{(1-0.5 \log C)}$  where C = concentration expressed as a decimal fraction (e.g. 1 µg/kg is entered as  $10^{-9}$ ).

### 3.4. Limit of Detection

The limit of detection (LOD) is the smallest measured concentration of an analyte from which it is possible to deduce the presence of the analyte in the test sample with acceptable certainty. There are several scientifically valid ways to determine LOD and any of these could be used as long as a scientific justification is provided for their use. See Annex 1 and Annex 2 for examples of acceptable methods for determining LOD and Annex 3 for a suggested protocol for determining accuracy, precision, LOD, LOQ and selectivity in a single study.

### 3.5. Limit of Quantitation

The LOQ is the smallest measured content of an analyte above which the determination can be made with the specified degree of accuracy and precision. As with the LOD, there are several scientifically valid ways to determine LOQ and any of these could be used as long as scientific justification is provided. See Annex 1 and Annex 2 for examples of acceptable methods for determining LOQ and Annex 3 for a suggested protocol for determining accuracy, precision, LOD, LOQ and selectivity in a single study.

### 3.6. Selectivity

Selectivity is the ability of a method to distinguish between the analyte being measured and other substances which might be present in the sample being analyzed. For the methods used in residue depletion studies, selectivity is primarily defined relative to endogenous substances in the samples being measured. Because the residue depletion studies are well

controlled, exogenously administered components (i.e., other veterinary drugs or vaccines) could either be known or not be allowed during the study. If it is the intent to submit the validated method as a regulatory method, it might be prudent for the investigator to test known products used in the animals being tested for possible interference.

A good measure of the selectivity of an assay is the determination of the response of control samples (see section 3.5 above). That response should be no more than 20% of the response at the LOQ. See Annex 3 for a suggested protocol for determining accuracy, precision, LOD, LOQ and selectivity in a single study.

### ***3.7. Stability in Matrix***

Samples (tissue, milk, eggs or honey) collected from residue depletion studies are generally frozen and stored until assayed. It is important to determine how long these samples can be stored under the proposed storage conditions without excessive degradation prior to analysis. As part of the validation procedure or as a separate study, a stability study needs to be conducted to determine the appropriate storage conditions (e.g., 4°C, -20°C, or -70°C) and length of time the samples can be stored prior to analysis.

Samples should be fortified with known quantities of analyte and stored under the appropriate conditions. Samples should be periodically assayed at specified intervals (e.g. initially, 1 week, 1 month, 3 months). If the samples are frozen, freeze/thaw studies should be conducted (3 freeze/thaw cycles – one cycle per day at a minimum). Alternatively, incurred samples can be used with initial assays conducted to determine the starting concentrations. The recommended protocol for assessing stability in matrix is the analysis of two different concentrations in triplicate near the high and low end of the validation range. Stability in matrix is considered acceptable if the mean concentration obtained at the specified stability time point agrees with the initial assay results or freshly fortified control sample assay results within the accuracy acceptance criteria established in Section 3.2.

### ***3.8. Processed Sample Stability***

Often, the samples are processed one day and assayed on a second day or because of an instrument failure are stored additional days, e.g. over a weekend. The stability of the analyte in the process sample extract might be examined as necessary to determine stability under

processed sample storage conditions. Examples of storage conditions would be 4 to 24 hours at room temperature and 48 hours at 4°C. Other storage conditions might be investigated consistent with the method requirements. The recommended protocol for assessing processed sample stability is the analysis of two different concentrations in triplicate near the high and low end of the validation range. Processed sample stability is considered adequate if the mean concentration obtained at the specified stability time point agrees with the initial assay results or with freshly fortified and processed control sample assay results within the accuracy acceptance criteria established in Section 3.2.

### **3.9. Robustness**

Evaluation of the robustness of regulatory methods is of major importance. Evaluation of robustness for residue methodology is less of a concern for residue methods as these are usually conducted within a single laboratory using the same instrument. However, robustness should still be evaluated particularly for areas of the method that could undergo changes or modifications over time. These might include reagent lots, incubation temperatures, extraction solvent composition and volume, extraction time and number of extractions, solid phase extraction (SPE) cartridge brand and lots, analytical column brand and lots and HPLC elution solvent composition. During the development, validation or use of the assay, method sensitivity to any or all of these conditions can become apparent and variations in the ones most likely to affect the method performance should be evaluated.

### 3. GLOSSARY

**Accuracy** – The accuracy of an analytical procedure expresses the closeness of agreement between the true value of the analyte concentration and the mean result that is obtained by applying the analytical procedure. This is generally expressed as % recovery or % bias.

**Control sample** – Tissue, milk, egg or honey from an animal that has not been treated with the veterinary drug under investigation.

**Between-run Precision** – Between-run precision expresses within-laboratory between-run variations.

**Incurred sample** – Tissue, milk, egg or honey from an animal treated with the veterinary drug under investigation that has a residue concentration of the analyte of interest.

**Limit of Detection** – The limit of detection of an individual analytical procedure is the lowest amount of analyte in a sample that can be detected with acceptable certainty but not quantitated as an exact value.

**Limit of Quantitation** – The limit of quantitation of an individual analytical procedure is the lowest amount of analyte in a sample that can be quantitatively determined with acceptable precision and accuracy.

**Linearity** – The linearity of an analytical procedure is its ability (within a given range) to obtain test results that are directly proportional to the concentration (amount) of analyte in the sample.

**Marker residue** – The residue whose concentration is in a known relationship to the concentration of total residue in an edible tissue.

**Matrix** – The matrix is basic edible animal products (tissue, egg, milk or honey) that contains or could contain the residue of interest.

**Precision** – The precision of an analytical procedure expresses the closeness of agreement between a series of measurements obtained from multiple sampling of the same homogenous sample under prescribed conditions. The precision of an analytical procedure is usually expressed as the variance, standard deviation or coefficient of variation of a series of measurements.

**Processed Sample** – A processed sample is a sample that has been extracted or otherwise processed to remove the analyte from much of the original sample matrix.

**Repeatability** – Repeatability expresses the precision under the same operating conditions over a short interval of time.

**Reproducibility** – Reproducibility expresses the precision between laboratories.

**Residue** – Veterinary drug (parent) and/or its metabolite.

**Robustness**–The robustness of an analytical procedure is a measure of its capacity to remain unaffected by small variations in method parameters and provides an indication of its reliability during normal usage.

**Selectivity** – Selectivity is the ability to assess the analyte in the presence of components (endogenous materials, degradation products, other veterinary drugs) that might be expected to be present.

**Within-run Precision** – Within-run precision expresses within-laboratory within-run variations.

## Annex 1

### Examples of Methods for Determining LOD and LOQ

One commonly used approach is referred to as the IUPAC definition.<sup>i</sup> In that procedure the LOD is estimated as mean of 20 control sample (from at least 6 separate sources) assay results plus 3 times the standard deviation of the mean. The LOQ then becomes the mean of the same results plus 6 or 10 times the standard deviation of the mean. Testing of the accuracy and precision at the estimated LOQ will provide the final evidence for determination of the LOQ. If the %CV for the repeatability measurement at that concentration is less than or equal to the accuracy and precision acceptance criteria (Section 3.2 and 3.3), then the estimated LOQ is acceptable.

## Annex 2

### U.S. Environmental Protection Agency Method for Determining LOD and LOQ

The procedure described below is a slight modification of a procedure used by USDA's Interregional Project No. 4 program which is published, in 40 CFR Part 136, Appendix B).<sup>ii</sup> This modified procedure can be found in Appendix 1 of the U.S. Environmental Protection Agencies document entitled "Assigning Values to Non-detected/Non-quantified Pesticide Residues in Human Health Food Exposure Assessments"<sup>iii</sup>. The procedure is provided below with minor modifications making it more representative of a tissue marker residue assay procedure example.

In this procedure, the estimation of the LOD and LOQ of a specific method for a specific analyte in a specific matrix can be done in the following two steps.

- The first step is to produce a preliminary estimate of the LOD and LOQ and to verify that a linear relationship between concentration and instrument response exists. These preliminary estimates correspond to what some term the IDL (Instrument Detection Limit) and IQL (Instrument Quantitation Limit), respectively. The matrix of interest will be fortified (spiked) at the estimate LOQ in the next step for the actual estimation of LOD and LOQ of the method.
- The second step is to use the initial estimate of the LOD and LOQ determined in Step 1 to estimate the method detection limit and the method quantitation limit in the matrix of interest.



An illustrative example follows:

Step 1. The analyst derives a standard curve for the method of interest. In this particular instance, the analyst prepares the standard solution in buffer or water with the following concentrations of the analyte of interest: 0.005, 0.010, 0.020, 0.050 and 0.100  $\mu\text{g/mL}$ . For each concentration in the sample solution, the following instrument responses (measure peak height) are recorded:

Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Instrument Response (peak height)
0.100	206,493
0.050	125,162
0.020	58,748
0.010	32,668
0.005	17,552

In order to verify that a linear response is seen throughout the tested range, the instrument response is plotted as a function of injected concentration. The results (and associated statistics) are shown in Figure 1. Note from these results that the instrument response appears to be adequately linear throughout the range of tested concentrations (0.005 to 0.100  $\mu\text{g/mL}$ ), and that the  $R^2$  value from the "Summary of Fit" box in Figure 1 as the Root Mean Square Error) is 8986.8. The equation which describes this relationship (provided in the "Parameter Estimates" box of Figure 1) is as follows:

$$Y = 15,120 + 1,973,098 * (\text{Concentration})$$

Where Y is the instrument response (peak height)

The estimated LOD and LOQ are calculated as follows (assuming these values are set to 3 and 10 standard deviations above the blank response, respectively):

1. The Peak Height at the LOD ( $Y_{\text{LOD}}$ ) is calculated at 3 times the standard deviation while the Peak Height at the LOQ ( $Y_{\text{LOQ}}$ ) is calculated at 10 times the standard deviation

$$Y_{\text{LOD}} = 15120 + 3 * (8987) = 42,081$$

$$Y_{\text{LOQ}} = 15120 + 10 * (8987) = 104,990$$

2. These values (peak height at LOD and peak height and LOQ) are then used to calculate the concentrations associated with these peak heights as follows:

$$Y = 15,120 + 1,973,098 * (\text{Concentration})$$

Rearranging,

$$\text{Concentration} = (Y - 15,120) / 1,973,098$$

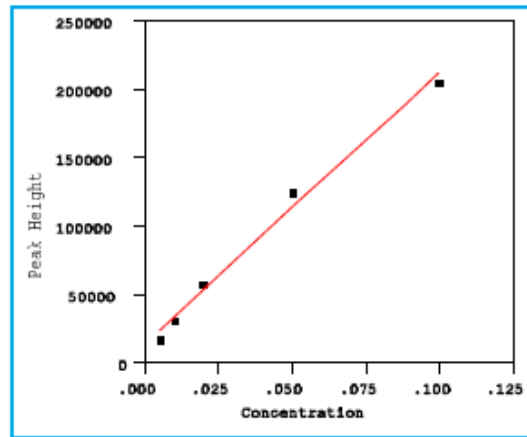
Therefore,

$$\text{LOD} = Y_{\text{LOD}} - 15,120 / 1,973,098 = (42,081 - 15,120) / 1,973,098 = 0.014 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{LOQ} = Y_{\text{LOQ}} - 15,120 / 1,973,098 = (104,990 - 15,120) / 1,973,098 = 0.046 \mu\text{g/mL}$$

Thus, the initial estimated LOD and LOQ are 0.014 and 0.046  $\mu\text{g/mL}$ , respectively which correspond to the IDL and IQL.

These estimated LODs (or IDLs) and LOQs (or IQLs) are expressed in terms of the solution concentration and not in terms of the matrix concentration. At this stage, the solution concentration ( $\mu\text{g/mL}$  solution) should be converted to the effective concentration in the matrix (e.g.,  $\mu\text{g/g}$  of matrix).



Summary of Fit	
R Square	0.99003
R Square Adj	0.986707
Root Mean Square Error	8986.837
Mean of Response	88124.6
Observations (or Sum Wgts)	5

Parameter Estimates						
Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t	Lower 95%	Upper 95%
Intercept	15119.954	5834.672	2.59	0.0810	-3448.891	33688.799
Concentration	1973098.5	114317.5	17.26	0.0004	1609283.2	2336913.9

Figure 1. Statistical Results

Step 2. With the initial estimate of LOD (or IDL) and LOQ (or IQL) obtained and linearity verified, Step 2 involves estimating the LOQ and LOD in spiked matrix samples. This procedure uses the estimated instrumental LOQ and the procedure detailed in 40 CFR Part 136, Appendix B<sup>4</sup> to provide a better estimate of LOQ and verifies that method recoveries are acceptable.

The method calls for the analysis of 7 or more untreated control samples spiked at the estimated LOQ. The standard deviation of these samples is measured and the LOD and LOQ are determined as follows:

$$\text{LOD} = t_{0.99} * S$$

$$\text{LOQ} = 3 * \text{LOD}$$

where  $t$  = one-tailed t-statistic at the 99% confidence level for n-1 replicates

$S$  = Standard Deviation of n sample spikes at the estimated LOQ

The following is a set of t-values for use in the above equation:

# of Replicates (n)	Degrees of Freedom (n-1)	$t_{0.99}$	# of Replicates (n)	Degrees of Freedom (n-1)	$t_{0.99}$
3	2	6.965	13	12	2.681
4	3	4.541	14	13	2.650
5	4	3.747	15	14	2.624
6	5	3.365	16	15	2.602
7	6	3.143	17	16	2.583
8	7	2.998	18	17	2.567
9	8	2.896	19	18	2.552
10	9	2.821	20	19	2.539
11	10	2.764	21	20	2.528
12	11	2.718	22	21	2.518

In this example, the analyst prepared 7 untreated control samples spiked at the above estimated LOQ of 0.05 µg/g. The following results were obtained:

Concentration detected (µg/g)	% Recovery
0.0397	79.4
0.0403	80.6
0.0400	80.0
0.0360	72.0
0.0498	99.6
0.0379	75.8
0.0388	77.6

Average Concentration: 0.0404 µg/g

Standard Deviation: 0.0044 µg/g

Average Recovery: 80.7%

Given that recoveries are adequate at the LOQ (average = 80.7%, range = 72.0% to 99.6%), the LOD and LOQ for the method are estimated as follows:

$$\begin{aligned}
 \text{LOD} &= t_{0.99} * S \text{ (for } 7-1 = 6 \text{ degrees of freedom)} \\
 &= 3.143 * 0.0044 \text{ µg/g} \\
 &= 0.0138 \text{ µg/g}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{LOQ} &= 3 * \text{LOD} \\
 &= 3 * 0.0138 \text{ µg/g} \\
 &= 0.0414 \text{ µg/g}
 \end{aligned}$$

## Annex 3

### Protocol for Residue Method Validation

Selectivity, LOD and LOQ are all interrelated and are affected by endogenous interferences that might be present in the matrix being assayed. LOD is often time difficult to determine particularly in LC/MS assays where control samples actually provide zero response at the retention time of the analyte. Without a response, it is impossible to calculate a standard deviation and therefore impossible to determine the LOD based on the mean plus 3 times the SD of the mean. Even if a mean plus 3 times the SD of the mean can be determined, it is often related to the instrument limit of detection rather than the method limit of detection. The following protocol is designed to determine specificity, LOD, LOQ, precision and accuracy in one study.

1. Collect drug free matrix from 6 separate sources (animals) and screen for any possible analyte contamination.
2. Fortify (spike) 1 each of a minimum of 3 samples (each source randomly selected such that each source is represented at least once at each concentration) of the 6 control samples at 0, at the estimated LOD (determined during assay development), at 3 times the estimated LOD (estimated LOQ), and 3 other concentrations that will encompass the expected concentration range (Table 1). Repeat the fortification process for Day 2 and Day 3 using a second and third set of 3 each (each source randomly selected such that each is represented at least once at each concentration) of the 6 control samples.

**Table 1. Example of Minimum Study Design to Allow Determination of LOD, LOQ, Accuracy and Precision (Six Sources/Animals: A, B, C, D, E, and F) Within One Study**

Fortification Concentration	Animal/Source ID†		
	Day/Run 1	Day/Run 2	Day/Run 3
0 (Control)	B, F, D	A, C, C	B, E, F
eLOD*	B, C, E	D, F, F	A, B, E
eLOQ (3 X eLOD)*	C, C, E	A, B, E	D, F, D
Lower part of Validation Range	A, B, E	A, C, D	B, E, F
Middle of Validation Range	B, C, E	C, E, F	A, D, F
Upper Part of Validation Range	A, B, B	D, F, F	A, C, E

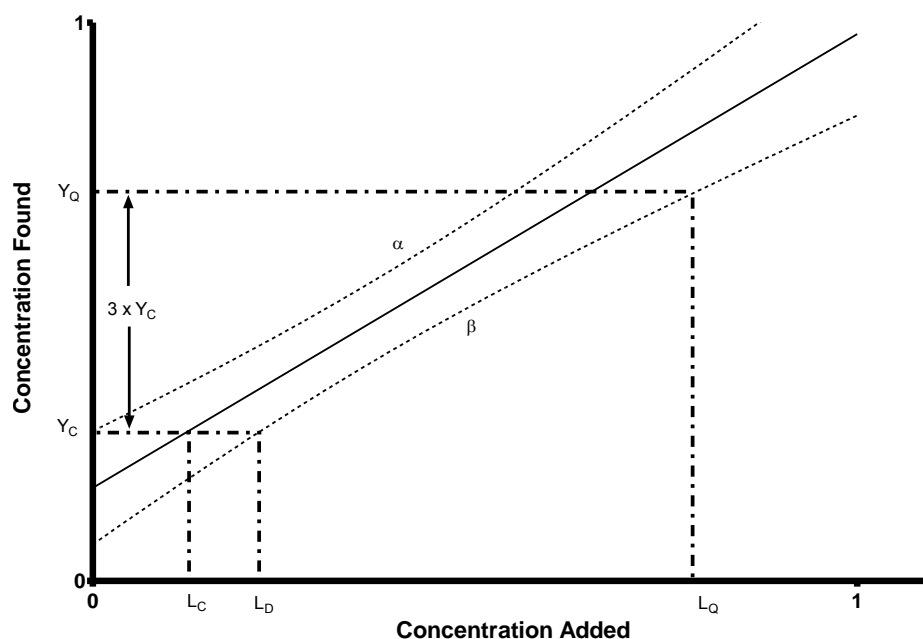
\* eLOD (estimated LOD) is generally determined from preliminary studies conducted during method development. eLOQ (estimated LOQ) is determined as 3 times eLOD.

† each source randomly selected such that each source is represented at least once at each concentration across the 3 validation runs.

3. Assay the 18 samples each day and evaluate the results against a calibration standard curve.
4. Plot the results of concentration found against concentration added across all three days of assays. This will normalize the data results across days and allow all the data from the 3 runs to be used in the determination of the LOD and LOQ.
5. Establish a decision limit by calculating prediction intervals around the weighted regression line with the upper confidence interval line based upon the probability  $\alpha$  (false positive) and the lower confidence interval line based upon the probability  $\beta$  (false negative)<sup>iv</sup>. The decision limit ( $Y_C$ ) then becomes the point at which the upper confidence limit crosses the Y-axis and can be converted to concentration by estimating from the regression line to the x-axis ( $L_C$ ). This is the critical point where 50% of the responses are real. The  $L_D$  or LOD can be determined by estimating concentration from the lower confidence limit  $\beta$  that reduces the false negative rate to what level is assigned to  $\beta$ . Typically, both  $\alpha$  and  $\beta$  are set equal to 5%.
6. Establish a determination limit ( $Y_Q$ ) by multiplying the detection limit ( $Y_C$ ) by 3 (commonly accepted ratio between LOD and LOQ is 3). The LOQ ( $L_Q$ ) can then be

determined by estimating where the line  $Y_Q$  crosses the lower confidence limit  $\beta$  that reduces the false negative rate for the determination of LOQ to what level is assigned to  $\beta$  (typically 5%).

- Inter-day precision can be determined by calculating the %CV at each concentration evaluated. Accuracy can be determined by comparison of the results obtained to the fortification levels. Acceptance criteria for accuracy and precision are provided in Sections 3.2 and 3.3, respectively.



This approach takes into consideration the interrelationship between specificity, LOD and LOQ. By determining LOD and LOQ using 6 different sources of matrix, the variability due to the matrix as well as the variability of the assay is taken into account. Since specificity for residue methods is dependent upon the possible interference of matrix components this approach also addresses specificity and insures that specificity is acceptable at the LOD and LOQ determined. This approach is consistent with the determination of the detection limit and quantitation limit specified in VICH GL2 (Validation Methodology) Guideline.

#### Data Set Example:

A validation procedure based on the above methodology was conducted on an LC-MS/MS milk assay procedure.



Control bovine milk obtained from six different animals were each fortified with the analyte at 0, 4.2, 14.0, 35, 140 and 400 ng/mL giving a total of 36 samples. Milk samples from 3 of the 6 animals (insuring that each of the 6 animals were run at least once) were randomly chosen at each of the fortification levels to be run on each of the 3 days of assay for a total of 18 samples per day.

Based on these three days of analyses which consisted of 54 assays total the following determinations were done: repeatability (within-day precision), between-day precision, LOD and LOQ. The raw data and the results of the statistical analyses are listed below:

Concentration of Analyte in Control Milk Fortified at 0, 4.2, 14.0, 35.0, 140 and 400 ng/mL Across Three Days of Analysis						
Conc. Added, ng/mL	Run 1		Run 2		Run 3	
	Animal ID	Conc. Found, ng/mL	Animal ID	Conc. Found, ng/mL	Animal ID	Conc. Found, ng/mL
0	B	0.494	A	0.233	B	0.154
	F	0.654	C	0.0012	E	0.120
	D	0.588	C	0.117	F	0.313
4.2	B	4.38	D	4.97	A	3.80
	C	4.13	F	3.85	B	4.12
	E	4.33	F	4.41	E	3.67
14.0	C	13.2	A	11.1	D	11.8
	C	13.5	B	12.0	F	10.5
	E	11.9	E	12.8	D	11.7
35.0	A	31.5	A	51.0	B	27.3
	B	32.7	C	33.2	E	29.4
	E	34.4	D	32.9	F	25.5
140	B	131	C	137	A	118
	C	147	E	124	D	106
	E	127	F	131	F	118
400	A	396	D	396	A	335
	B	394	F	390	C	316
	B	384	F	373	E	344

The statistical evaluation of the above data was conducted as follows: The percentage recovery was calculated for each sample using the concentration obtained and the fortification concentrations prior to analysis. A model which included the fixed effect of treatment (fortification level) and the random effects of run (day), sample preparation within the run, run by treatment interaction and residual was used to obtain the least squares means and estimates of variation.

In order to assess within-day variability, the residual variance was used in calculating the CV for each treatment and across treatments. The CVs were calculated by dividing the square root of the residual variance by the mean and multiplying by 100.

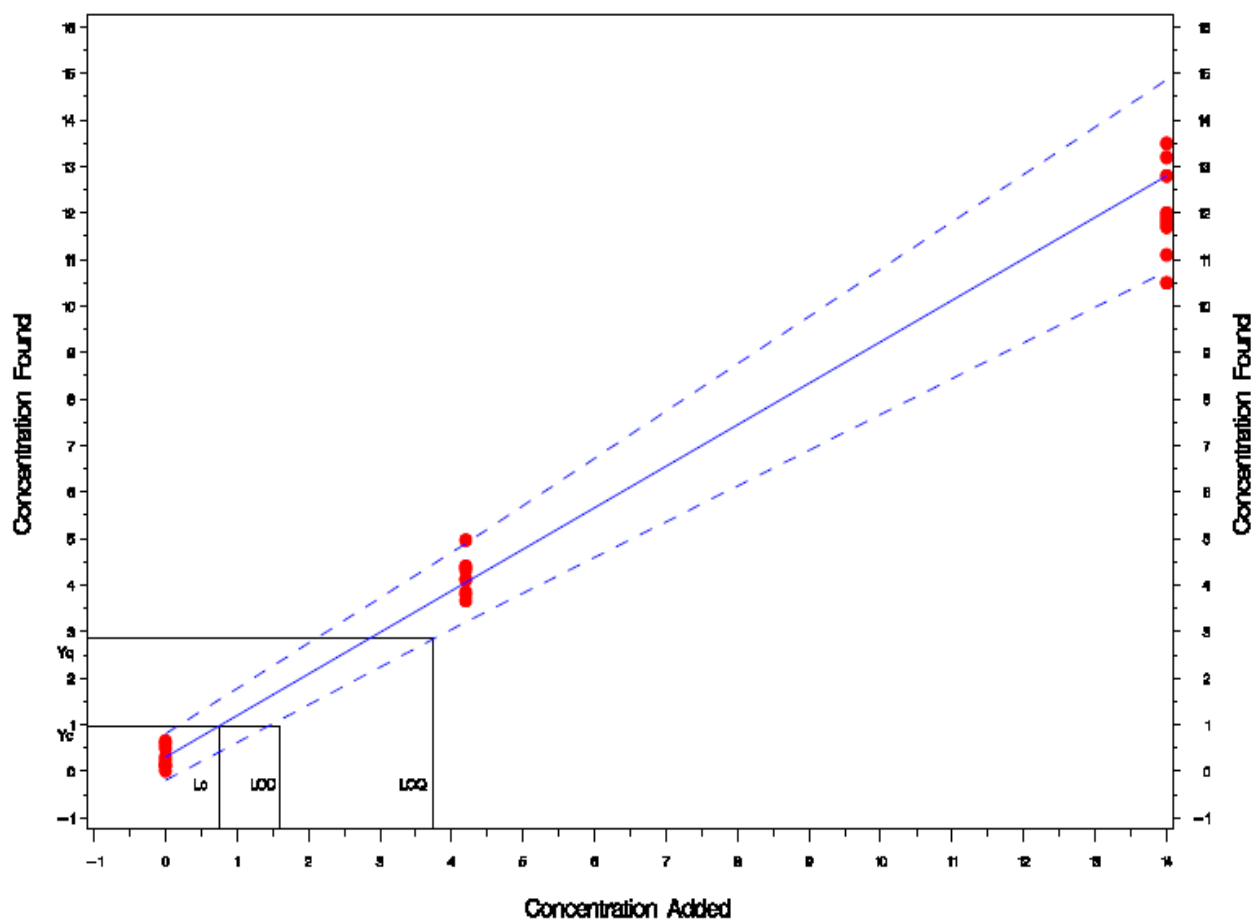
In order to assess across-day variability, the sum of the residual variance, the variance due to run, sample within run and run by treatment was used as the estimate of variance when calculating CVs for each treatment and overall treatments.

The results of the analysis were as follows:

#### Within- and Between-Run Assay Precision and Accuracy Determination

Theoretical Concentration, ng/mL	n	Mean* Recovery, %	95% Confidence Interval	Precision, %CV	
				Within-Run	Between-Run
4.2	9	99.6	87.9 – 111.4	7.8	10.2
14.0	9	86.1	75.0 – 97.2	7.1	7.5
35.0	9	94.6	77.3 – 111.9	19.3	22.6
140	9	90.4	79.5 – 101.3	5.8	9.2
400	9	92.4	82.1 – 102.8	3.0	8.2

A graphical representation of the determination of LOD and LOQ is provided below:



LOD = 1.6 ng/mL

LOQ = 3.7 ng/mL

This is a straightforward way to accurately determine precision, accuracy, LOD and LOQ within one study across three days of validation.

<sup>1</sup>Codex Alimentarius Procedural Manual, 15<sup>th</sup> Ed., Twenty-eight Session of the Codex Alimentarius Commission, Rome, 2005, p 81.

<sup>2</sup>U.S. Code of Federal Regulations, Title 40: Protection of Environment, Part 136 – Guidelines Establishing Test Procedures for the Analysis of Pollutants, Appendix B to Part 136 – Definition and Procedure for the Determination of the Method Detection Limit – Revision 1.11.

<sup>3</sup>U.S. Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs, March 23, 2000, “Assigning Values to Non-detected/Non-quantified Pesticide Residue in Human Health Food Exposure Assessments” Appendix 1, A-1 through A-8.

<sup>4</sup>Zorn ME, Gibbons RD, Sonzogni WC. Weighted Least-Squares Approach to Calculating Limits of Detection and Quantification by Modeling Variability as a Function of Concentration, *Anal Chem* 1997, 69, 3069-3075.