บทที่ 2
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

การเพาะเลี้ยงปลานิลของประเทศไทยและการตลาด

ปลานิล *Oreochromis niloticus* เป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งอยู่ในตระกูล Cichlidae มีถิ่นกำเนิดเดิมอยู่ในทวีปแอฟริกา พบทั่วไปตามหนอง บึง และทะเลสาบในประเทศซูดาน ยูกันดา แทนแกนยีกา (ยุพินท์ และพันธ์ศักดิ์, 2547) ปลานิลเป็นที่นิยมเพาะเลี้ยงทั่วไปทั้งในภาคพื้นเอเชียและประเทศสหรัฐอเมริกาเนื่องจากเจริญเติบโตเร็ว เลี้ยงง่าย และมีปัญหาเรื่องโรคน้อย ปัจจุบันความต้องการบริโภคปลานิลในตลาดโลกโดยเฉพาะในประเทศพัฒนาแล้วมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ส่วนหนึ่งเนื่องจากปลานิลเป็นปลาเนื้อขาวจึงเป็นที่ต้องการของกลุ่มผู้บริโภคที่ใส่ใจในสุขภาพ รวมถึงผู้สูงอายุซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นมาก ประกอบกับเนื้อปลานิลมีรสชาติดี สามารถดัดแปลงไปเป็นวัตถุดิบประกอบอาหารได้หลากหลายรูปแบบ และมีราคาถูกเมื่อเทียบกับปลาเนื้อขาวชนิดอื่น ๆ จึงเหมาะกับการนำมาเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่ม ขณะเดียวกันผลิตภัณฑ์แปรรูปจากปลานิลเริ่มได้รับความสนใจมากขึ้นจากตลาดโลก อาทิ เครื่องหนัง เช่น รองเท้า และกระเป๋า ซึ่งทำจากหนังปลานิลพบว่ามีความเหนียวและยืดหยุ่นสูงกว่าหนังวัว นอกจากนั้นเยลลีและคอลลาเจนที่สกัดจากหนังปลานิลยังสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง (ธนาคารเพื่อการส่งออกและนำเข้าแห่งประเทศไทย, 2550) ผลผลิตปลานิลทั่วโลกมีมากเป็นอันดับ 9 ของผลผลิตสัตว์น้ำทั่วโลกที่ได้มาจากการเพาะเลี้ยง และมีมากกว่าปลาแซลมอน กุ้งทะเล และหอยแมลงภู่ (World aquaculture, 2004) ในปีค.ศ. 2005 มีผลผลิตปลานิลทั่วโลกประมาณ 2.5 ล้านตัน โดยประมาณสองในสามของผลผลิตมาจากทวีปเอเชียสำหรับประเทศผู้ผลิตใน 5 อันดับแรกของโลกได้แก่ ประเทศจีน บังคลาเทศ อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และไทย และคาดการณ์กันว่าในปี พ.ศ. 2553 ผลผลิตปลานิลจากทั่วโลกจะสูงถึง 3.5-4 ล้านตัน (Agriculture Business Week, 2008)

สำหรับประเทศไทย ปลานิลจัดว่าเป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจเพราะสามารถเลี้ยงได้ทุกสภาพในภูมิภาคต่างๆ ของไทย และเป็นปลาที่ประชาชนนิยมเลี้ยงกันมาก ทั้งในรูปแบบอุตสาหกรรมการค้าและการเลี้ยงเพื่อบริโภคในครัวเรือน (ฝ่ายเผยแพร่กองส่งเสริมการประมง, 2544) ประเทศไทยสามารถผลิตปลานิลได้ปริมาณ 200,000 ตันต่อปี พบว่าปริมาณการผลิตเพียงพอต่อความต้องการภายในประเทศ (สมาคมอาหารแช่เยือกแข็งไทย, 2551) และสามารถเพิ่มศักยภาพในการผลิตเพื่อส่งออกได้แก่ สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น และทวีปยุโรป (กรมสินค้าส่งออก, 2548) โดยประเทศไทยจัดอยู่ในลำดับ 5 หรือ 6 ของโลกในการผลิตปลานิลสูงสุด (World aquaculture, 2004) มูลค่าการส่งออกปลานิลปัจจุบันประมาณ 600 ล้านบาท ซึ่งจัดว่าเป็นผลผลิตที่มีมูลค่าสูงสุดของสัตว์น้ำจืด และในเดือนพฤษภาคมปีนี้มีมูลค่าการส่งออกสูงถึง 248,830 ดอลลาร์สหรัฐ (Aquaculture fish database, 2009)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

วัตถุประสงค์ของการเลี้ยงเฉพาะปลานิลเพศผู้ (male monosex population)

สืบเนื่องจากความต้องการในการบริโภคปลานิลที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว มีการพัฒนาระบบการเลี้ยงปลานิลสู่ระบบอุตสาหกรรม เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงส่วนใหญ่จึงเร่งเพิ่มกำลังการผลิต โดยนิยมเลี้ยงเป็นแบบแยกเพศเนื่องจากปัญหาการเลี้ยงแบบรวมเพศ คือ มีการผสมพันธุ์และวางวางไข่ทำให้มีปลาหลายรุ่นและมีหนาแน่นมากภายในบ่อก่อให้เกิดการแย่งอาหารและพื้นที่ นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงปลานิลเพศผู้เพียงอย่างเดียว พบว่าให้ผลผลิตที่สูงเนื่องจากปลาเพศผู้มีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงกว่าและมีขนาดใหญ่กว่าเพศเมีย (El-Sayed A.M., 2006) วิธีการจัดเตรียมลูกปลาเพศผู้ล้วนประกอบด้วยหลายวิธีการ ได้แก่ (1) การคัดเลือกโดยพิจารณาจากลักษณะเพศภายนอก (2) การปรับปรุงทางพันธุกรรม เช่น การผสมข้ามพันธุ์ และการผลิตปลานิลเพศผู้แบบ supermale (Mair, *et al.*, 1997; Mires, 1982) (3) การเหนี่ยวนำลูกปลานิลให้เกิดการพัฒนาระบบสืบพันธุ์เพศผู้ ซึ่งมีหลายวิธีการ อาทิเช่น การใช้ฮอร์โมนแปลงเพศ เช่น การแช่ปลาในสารละลายฮอร์โมนและการผสมฮอร์โมนในอาหารให้ลูกปลากิน โดยฮอร์โมนที่ใช้คือ แอนโดรเจนหรือฮอร์โมนเพศผู้ซึ่งให้ผลเป็นลูกปลาเพศผู้ประมาณ 95% และเป็นวิธีที่ปฏิบัติเป็นส่วนใหญ่ในอุตสาหกรรมการผลิตปลานิล (ฝ่ายเผยแพร่กองส่งเสริมการประมง, 2547)

วิธีการในเหนี่ยวนำลูกปลานิลให้เกิดการพัฒนาระบบสืบพันธุ์เพศผู้

วิธีการในเหนี่ยวนำลูกปลานิลให้เกิดการพัฒนาระบบสืบพันธุ์เพศผู้นั้น มีหลายวิธีการ เช่น วิธีการทางกายภาพและวิธีการทางเคมี

1. วิธีทางกายภาพ

วิธีทางกายภาพ ได้แก่ การให้รังสี และการให้อุณหภูมิแก่ลูกปลานิลในระยะที่มีการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์เพื่อเหนี่ยวนำลูกปลานิลให้เกิดการพัฒนาระบบสืบพันธุ์เพศผู้ โดยการทดลองของ Desprez และ Me´lard ในปี 1998 แสดงให้เห็นถึงการไวรับต่ออุณหภูมิ โดยการได้รับอุณหภูมิสูงในช่วงที่มีการพัฒนาของตัวอ่อนปลานิลสายพันธุ์ *O. aureus* โดยร้อยละของปลานิลเพศผู้สูงถึง 97.8 % ในทำน่องเดียวกับการศึกษาของ Abucay และคณะในปี 1999 นอกจากนี้รายงานการศึกษาของWessels และ Horstgen-Schwark ในปี 2007 แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิมีบทบาทสำคัญในกระบวนการพัฒนาเพศ ในระยะที่ตัวอ่อนปลานิลมีการเจริญเติบโต โดยร้อยละของปลานิลเพศผู้เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิสูง และมีความเป็นไปได้ที่จะเหนี่ยวนำให้ปลาที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเพศเมียเปลี่ยนเป็นปลาที่มีลักษณะที่แสดงออกเป็นเพศผู้โดยการให้อุณหภูมิที่สูง (34-36 °C) ในระยะที่มีการพัฒนาของตัวอ่อน (คือในระยะบ่มไข่และระยะที่มีการ hatch) (Rougeot *et al.*, 2008) แต่อย่างไรก็ตามการให้อุณหภูมิที่สูงในช่วงการพัฒนาตัวอ่อนปลานิลอาจไม่ประสบผลสำเร็จเกือบ 100% เนื่องด้วยปัจจัยด้านพันธุกรรมมีส่วนเกี่ยวข้องต่อการพัฒนาเพศในปลานิล ตามรายงานการศึกษาของ Baroiller และคณะในปี 1999 และ Devlin และ Nagahama ในปี 2002

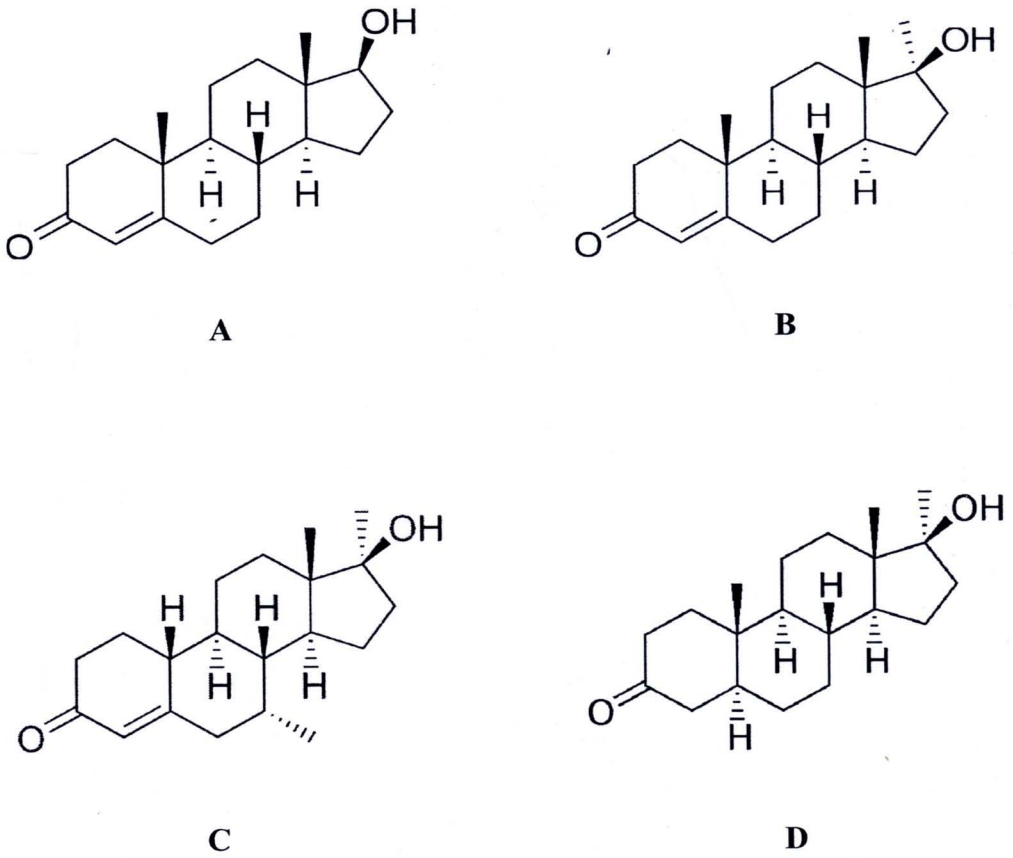
2. วิธีการทางเคมี

เป็นวิธีการที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน คือ การใช้ฮอร์โมนเหนี่ยวนำลูกปลานิลให้เกิดการพัฒนาระบบสืบพันธุ์เพศผู้ ซึ่งสามารถทำได้ทั้งวิธีการแช่ ฉีดเข้าตัวปลา และผสมในอาหารให้ปลากิน ซึ่งฮอร์โมนที่นิยมใช้ได้แก่ 17-อัลฟาเมทิลเทสโทสเทอโรน และทราไดออล-17 เบตา (tradiol-17 beta) (Pandian and Sheela, 1999) มีการศึกษาถึงการนำฮอร์โมนเพศผู้ชนิดต่างๆมาใช้ดังตารางที่ 2.1

17-อัลฟาเมทิลเทสโทสเทอโรน เป็นสารสเตอรอยด์ (steroid) สังเคราะห์ จุดหลอมเหลว 160-161 °C มีค่าครึ่งชีวิต 6-8 ชั่วโมง มีความคงตัวในอากาศ ละลายในแอลกอฮอล์และสารอินทรีย์ต่างๆ แต่ไม่ละลายในน้ำ (รูปที่ 2.1) การเตรียมอาหารผสมฮอร์โมนเหล่านี้สามารถทำได้ที่อุณหภูมิ 0-5 °C แล้วเริ่มให้อาหารผสมฮอร์โมนแก่ลูกปลาที่มีอายุ 1-2 สัปดาห์ (นวลมณี, 2537) สัตว์น้ำมีการใช้ฮอร์โมนเหนี่ยวนำลูกปลานิลให้เกิดการพัฒนาระบบสืบพันธุ์เพศผู้ คือ ปลานิลและปลากัด โดยเริ่มให้ฮอร์โมนเมื่อลูกปลามีอายุประมาณ 1 สัปดาห์ โดยผสมอาหารให้กินนาน 1 เดือนในอัตรา 30-60 mg/kg อาหาร ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการให้ฮอร์โมน คือ ปริมาณและชนิดของฮอร์โมน ปริมาณฮอร์โมนที่ให้จะแตกต่างกันตามชนิดของฮอร์โมนและชนิดปลา ปลานิลต้องการฮอร์โมนในปริมาณ คือ 30-60 mg/kg อาหาร ในขณะที่ปลาแซลมอนต้องการฮอร์โมนในระดับต่ำกว่า โดยจำเป็นต้องผ่านการทดสอบหาระดับฮอร์โมนที่เหมาะสมก่อนนำไปใช้ หากปริมาณฮอร์โมนสูงเกินไปอาจทำให้ปลาเป็นหมัน และอาจทำให้ปลาแสดงลักษณะของเพศตรงข้ามกับที่ต้องการ เช่น การให้ฮอร์โมนเมทิลเทสโทสเทอโรน ระดับสูงเกินไป ปลาเพศผู้อาจเปลี่ยนเป็นปลาเพศเมีย (paradoxical effect) สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับชนิดฮอร์โมน พบว่า ฮอร์โมนสเตอรอยดอล (steroidal hormone) ที่พบในธรรมชาติ มีประสิทธิภาพต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับฮอร์โมนสังเคราะห์ ฮอร์โมนเพศผู้ที่นิยมใช้ ได้แก่ 17-อัลฟาเมทิลเทสโทสเทอโรน และ 11- แอนโดรสทีนเดียน (11-β-androstenedione) และฮอร์โมนเพศเมียที่นิยมใช้ ได้แก่ 17-เบตาเอสตราไดออล(17-β-estradiol) ผลการเปลี่ยนแปลงเพศจากการใช้ฮอร์โมนไม่มีผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงในระดับพันธุกรรมของปลา แต่อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเพศกลับได้เมื่อปลามีอายุมากขึ้น (เกรียงศักดิ์, 2544)

สำหรับการใช้ฮอร์โมน 17-อัลฟาเมทิลเทสโทสเทอโรน เพื่อแปลงเพศลูกปลานิลเป็นเพศผู้นั้น ถึงแม้ว่าจะคุ้มทุนและให้ผลเป็นที่น่าพอใจ แต่อาจก่อให้เกิดปัญหาการตกค้างของฮอร์โมนในเนื้อเยื่อปลานิลและสิ่งแวดล้อมได้ เพราะหลังจากที่ปลานิลได้รับฮอร์โมนแล้วจะมีการดูดซึมเข้าสู่ระบบหมุนเวียนเลือดหรือบางส่วนเกิดการเปลี่ยนแปลง (biotransformation) เพื่อออกฤทธิ์ ฮอร์โมนบางส่วนอาจถูกขับทิ้ง และบางส่วนอาจยังตกค้างสะสมอยู่ในเนื้อเยื่อปลาได้ เช่น ปัญหาการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในมนุษย์ (drug resistance) การโน้มนำให้เกิดมะเร็ง (carcinogenicity) ความผิดปกติของเซลล์หรือเนื้อเยื่อต่างๆ (mutagenicity) ภาวะลูกวิรูป (teratogenicity) เป็นต้น (Prescott and Baggot, 1994) และไม่เป็นที่ยอมรับในระดับสากลทั้งในสหภาพยุโรปและสหรัฐอเมริกา ประเทศไทยอาจเกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจอันเนื่องมาจากการตรวจพบฮอร์โมนตกค้างในเนื้อปลา ดังนั้นการหาปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเทอโรน

ตกค้างในเนื้อเยื่อปลานิลเพาะเลี้ยง จึงสามารถสร้างความเชื่อมั่นให้แก่ผู้บริโภค และส่งเสริมอุตสาหกรรมการผลิตปลานิลให้มีมาตรฐานและเป็นที่ยอมรับในระดับสากล



รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีฮอร์โมนเพศผู้ที่นิยมนำมาใช้เหนี่ยวนำเพศผู้ในปลานิล เทสโทสเทอโรน (A), เมทิลเทสโทสเทอโรน (B), ไมโบเลอโรน (C) และเมสทาโนโลน (D)

ตารางที่ 2.1 ฮอร์โมนเพศผู้สังเคราะห์ชนิดอื่นๆที่นำมาใช้ผสมอาหารให้ปลานิลเพื่อวัตถุประสงค์ในการเหนี่ยวนำเพศ ขนาดที่ใช้ ชนิดของปลาที่ทดลอง และ%ของเพศผู้ที่ได้

ชนิดของฮอร์โมน	ชนิดของปลานิล	ขนาดที่ใช้	ประสิทธิภาพ	ผู้วิจัย
1-dehydrotestosterone	O. *aureus*	15 mg/kg	69.0% male	Guerrero (1975)
		30 mg/kg	59.0% male	
		60 mg/kg	44.0% male	
Ethylnyltestosterone	O. *aureus*	15 mg/kg	85.0% male	Guerrero (1975)
		30 mg/kg	98.0% male	
		60 mg/kg	100.0.0% male	
Fluoxymesterone	O. *niloticus*	1 mg/kg	87.3% male	Phelps and Popma
		5 mg/kg	100.0% male	(2000)
		25 mg/kg	100.0% male	
Mestanolone	O. *niloticus*	5 mg/kg	99.5% male	Soto (1992)
		10 mg/kg	97.0% male	
		20 mg/kg	99.0% male	
Mibolerone	O. *mossambicus*	1.5 mg/kg	84.0% male	Guerrero (1975)
		1.75 mg/kg	88.0% male	
		2.0 mg/kg	94.0% male	
19-norethisterone acetate	O. *mossambicus*	1 mg/kg	52.0% male	Varadaraj (1990)
Testosterone	O. *niloticus*	60 mg/kg	97.8% male	Phelps and Popma
				(2000)
Trenbolone acetate	O. *aureus*	25 mg/kg	98.3% male	Galvez et al (1996)
		50 mg/kg	99.3% male	
		100 mg/kg	99.0% male	

วิธีในการวิเคราะห์สารตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์อาหารที่มาจากสัตว์

การเลือกใช้วิธีการตรวจที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารตกค้างขึ้นอยู่กับปัญหาที่พบและวัตถุประสงค์ของการตรวจนั้น (Stolker and Brinkman, 2005) โดยแบ่งออกเป็นวิธีการใหญ่ คือ วิธีการตรวจแบบคัดกรอง (screening analytical method) และ วิธีการตรวจแบบยืนยัน (confirmatory analytical method)

วิธีการตรวจวิเคราะห์แบบคัดกรองสาร (screening analytical methodologies)

เนื่องจากเทคนิคในการวิเคราะห์ยืนยันสาร (confirmatory analytical method) เป็นกระบวนการที่ต้องใช้ประสบการณ์และความชำนาญทำให้เกิดความล่าช้าขึ้นในการตรวจวิเคราะห์จริงในทางปฏิบัติที่จำเป็น ต้องตรวจตัวอย่างที่มีจำนวนมากและหลายชนิด ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์แบบคัดกรอง (screening method) ซึ่งเป็นกระบวนการที่จะบอกว่าในตัวอย่างนั้นมียาสัตว์หรือสารตกค้างอยู่หรือไม่ (Aerts *et al.*, 1995) สามารถตรวจได้อย่างคร่าวๆโดยจะตรวจได้ตัวอย่างจำนวนมากภายในระยะเวลาอันสั้น วิธีการตรวจแบบนี้จะสามารถตรวจพบสารหรือประเภทของสารในระดับที่เราสนใจได้ ในขั้นตอนนี้สามารถยอมรับการตรวจแบบผลบวกเท็จ (false positives) ได้ เพราะในขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ยืนยันสารต่อไปจะทำการตรวจซ้ำอีกครั้งหนึ่งและจะเป็นขั้นตอนที่คัดตัวอย่างนั้นออกเอง แต่จะต้องหลีกเลี่ยงการตรวจที่ให้ผลลบเท็จ (false negative) เพราะจะเป็นการคัดตัวอย่างนั้นออกไปโดยที่ไม่ได้รับการตรวจซ้ำอีกในภายหลัง คุณสมบัติที่ต้องการสำหรับเทคนิคการวิเคราะห์แบบคัดกรองดังสรุปไว้ในตารางที่ 2 ในกรณีที่สารตกค้างมีค่า MRL (maximum residue limit) กำหนดไว้ วิธีการตรวจคัดกรองนี้ต้องมีความสามารถในการตรวจวัดสารได้ในปริมาณที่ต่ำกว่าค่า MRL นี้ (Toldrá and Reig, 2006)

ตารางที่ 2.2 คุณสมบัติที่ต้องการสำหรับวิธีการตรวจแบบ screening methodology

Requirements
Easy to use and handle
Low set-up and running costs
High through-put
Possibility of automatisation
Reduced time to obtain the result
Good sensitivity (ไม่ให้ผลลบเท็จ)
Good specificity (ให้ผลบวกเท็จน้อยที่สุด)

การตรวจแบบคัดกรองหาปริมาณยาหรือสารตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์อาหารที่มาจากสัตว์สามารถนั้นทำได้หลายวิธี เช่น วิธีการทางอิมมูโนโลยี (immunological methods) ซึ่งได้แก่เทคนิค enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA) radioimmunoassay (RIA) และ biosensors สำหรับวิธีการ ทาง chromatographic methods ได้แก่ HPTLC และ HPLC ดังแสดงในตารางที่ 3 (Toldrá and Reig, 2006)

ตารางที่ 2.3 วิธีการหลักในการตรวจแบบ screening methodology

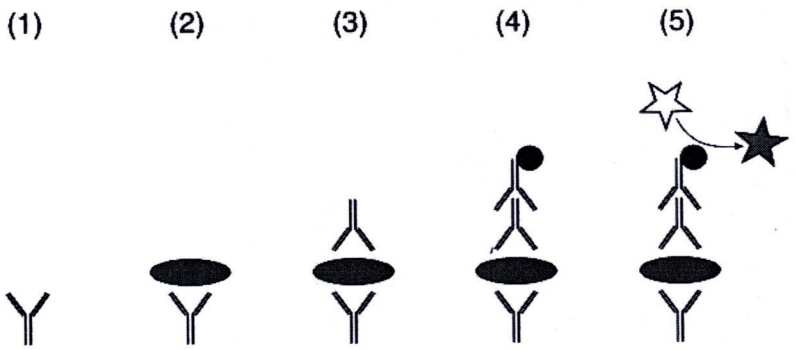
Immunological methods	Chromatography methods
ELISA test kits	High performance thin-layer chromatography (HPTLC)
Radioimmunoassay	High performance liquid chromatography (HPLC)
Multiarray biosensors	

Immunological Techniques

Enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA)

ELISA เป็นเทคนิคที่ใช้หลักการของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน (antigen) และแอนติบอดี (antibody) ใช้อย่างแพร่หลายในกระบวนการตรวจหาสารปนเปื้อนหรือยาสัตว์ตกค้าง ELISAนั้นมีหลายประเภท ที่ถูกนำมาใช้ได้แก่ sandwich ELISA และ direct competitive ELISA tests

หลักการของ Sandwich ELISA มีดังนี้แอนติบอดี ตัวแรกจะเกาะอยู่ใน well ของ plate (1) หลังจากนั้นจะใส่ ตัวอย่าง (ที่สงสัย) ที่สกัด แอนติเจนแล้วลงไป ซึ่งถ้ามีแอนติเจนอยู่จริงจะไปจับกับแอนติบอดี และยังคงติดอยู่ที่ well หลังผ่านการล้าง (2) ใส่ detectionแอนติบอดีลงไป หลังจากนั้น second แอนติบอดี ที่ถูกติดฉลากด้วย enzyme เช่น peroxidase จะถูกใส่ลงไป (4) และตามด้วย substrate (5) หลังจากผ่านการ incubate จะปรากฏสี โดยจะสัมพันธ์กับปริมาณของสารปนเปื้อนหรือสารตกค้างในตัวอย่าง (รูปที่ 2.2)



รูปที่ 2.2 หลักการของ Sandwich ELISA (Wikipedia, 2006)

หลักการของ direct competitive ELISA คือ จะมีการเคลือบแอนติบอดีตัวแรกไว้ที่ plate และ ใส่ตัวอย่างสกัดที่มีแอนติเจน (antigen) นำไป incubate หลังจากนั้นเติมแอนติเจนที่ถูกติดฉลากด้วย enzyme ลงไปซึ่งจะสามารถไปจับกับแอนติบอดีตัวแรกได้เฉพาะในตำแหน่ง binding sites ที่ว่างอยู่เท่านั้น ดังนั้นถ้าในตัวอย่างมีปริมาณแอนติเจนเยอะ ปริมาณแอนติเจนที่ถูกติดฉลากก็จะจับกับแอนติบอดีได้น้อย ดูการปรากฏของสีหลังการเติม substrate และนำไป incubated แต่ในวิธีการนี้การแปลผลจะสลับกัน กล่าวคือ ความสัมพันธ์ของสีที่เกิดขึ้นจะแปรผกผันกับปริมาณของสารปนเปื้อนหรือยาตกค้างในตัวอย่าง (Toldrá and Reig, 2006) ตัวอย่างสารตกค้างที่มีการตรวจด้วยวิธี direct competitive ELISA ได้แก่ การตรวจหายา fluoroquinolones ที่ตกค้างในเนื้อสัตว์ปีก ตับสุกร ไข่ ปลา และกุ้ง (Huet *et al.*, 2006)

นอกจาก ELISA ยังมีวิธี radioimmunoassay (RIA) ที่ใช้หลักการของการวัด radioactivity ของการเกิด immunological complex ขึ้น

Biosensors

Biosensors เป็นวิธีการตรวจแบบ screening อีกวิธีการหนึ่ง เครื่องมือนี้จะประกอบไปด้วย 2 ส่วน คือ (1) biological recognition element ซึ่งมักเป็นแอนติบอดีและ (2) signal transduction element ซึ่งจะเป็นตัวแปลงสัญญาณที่เกิดขึ้น Biosensor มีหลายประเภทเช่น enzymic biosensors, immunosensors microbial biosensors (Patel, 2002)

Chromatographic techniques

High performance thin-layer chromatography (HPTLC)

HPTLC เป็นวิธีการที่สามารถวัดทั้งปริมาณและชนิดของสารหรือยาสัตว์ตกค้างได้หลายชนิด แต่วิธีการนี้ได้ลดความนิยมลงหลังจากมีการพัฒนาเทคนิค HPLC มีตัวอย่างการศึกษาโดยใช้วิธีนี้ในการ

ตรวจหายา florfenicol ในปลาแซลมอน (Vega *et al.*, 2006) ในปัจจุบันมีการพัฒนาเป็นแบบ automated ในการตรวจด้วยวิธีนี้แล้ว (Toldrá and Reig, 2006)

High performance liquid chromatography (HPLC)

HPLC เป็นวิธีการแยกสารประกอบที่สนใจที่ผสมอยู่ในตัวอย่าง โดยอาศัยหลักความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของสารประกอบที่อยู่ stationary phase ของคอลัมน์โดย mobile phase จะเป็นตัวพาเคลื่อนที่ไป มี detector เป็นตัววัดสารที่ออกมาจาก column แสดงผลออกมาในรูปกราฟ (chromatogram) โดยวิธีการนี้สามารถตรวจวัดทั้งเชิงคุณภาพ (qualitative analysis) และเชิงปริมาณ (quantitative analysis) แต่ต้องนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับค่าของสารละลายมาตรฐาน เทคนิค HPLC ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการเพราะมีความสามารถในการวิเคราะห์สารหลายชนิดในตัวอย่างเดียวกันและใช้ระยะเวลาที่ไม่นาน ในปัจจุบันการตรวจด้วยวิธีนี้จะเป็นแบบ automated และควบคุมด้วย computer ในทุกขั้นตอน (Toldrá and Reig, 2006)

วิธีการวิเคราะห์แบบยืนยันสาร (confirmatory analytical method)

เมื่อผ่านการตรวจด้วยวิธี screening method แล้วพบว่ามียาสัตว์หรือสารตกค้างอยู่ในตัวอย่าง ขั้นตอนถัดมาคือการหาปริมาณของยาสัตว์หรือสารที่ตกค้างอยู่นั้นว่ามีปริมาณมากเพียงไร เกินค่า MRL ที่กำหนดไว้หรือไม่ และเพื่อเป็นการยืนยันชนิดของยาสัตว์หรือสารตกค้างนั้น (Aerts *et al.*,1995) โดยจะใช้วิธี confirmatory methodologies แต่วิธีการวิเคราะห์นี้จะสิ้นเปลืองเวลา จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์และเครื่องมือที่มีราคาสูง และนอกจากนั้นยังต้องการผู้ตรวจวิเคราะห์ที่มีประสบการณ์ด้วย (Toldrá and Reig, 2006) การเลือกเทคนิคที่แตกต่างกันขึ้นกับวัตถุประสงค์ในการตรวจ ตัวอย่างการตรวจวิเคราะห์นี้ได้แก่ การศึกษาวิเคราะห์การตกค้างของ malachite green ในเนื้อสัตว์ที่ Stolker และ Brinkman (2005) ได้อ้างถึงการศึกษาของ Bergweff และ Schloesser (2003) ที่ทำการวิเคราะห์ malachite green ตกค้างในเนื้อเยื่อโดยใช้เทคนิค liquid chromatography โดยใช้ detector คือ UV ในการตรวจแบบ screening method แล้วทำการวิเคราะห์ confirmatory method ด้วยเทคนิค LC-MS เช่นเดียวกับการศึกษาในภายหลังของ Andersen และคณะ (2006) ได้ใช้เทคนิค liquid chromatography ในขั้นตอน screening method แล้วใช้เทคนิค LC-MS เป็น confirmatory method ในการตรวจวิเคราะห์หา malachite green และ leucomalachite Green ที่ตกค้างในเนื้อปลาและกุ้ง

Comparing the analytical methods

ชุดทดสอบ immunological kits นั้นมีข้อได้เปรียบคือสามารถตรวจตัวอย่างได้ในจำนวนตัวอย่างที่มากต่อ 1 kit ทำงานได้ง่าย รวดเร็ว มี specificity และ sensitivity ที่สูง สามารถใช้ชุดตรวจสอบนี้ได้ในโรงงานขั้นตอนการผลิตอาหารโดยไม่ต้องส่งตัวอย่างมาตรวจที่ห้องปฏิบัติการ ในปัจจุบันมีชุดตรวจสอบ ELISA kits สำหรับตรวจสารได้หลากหลายชนิดของสาร เช่น β-agonists, corticoids, steroids, stilbenes,

resorcylic acid lactones และยาปฏิชีวนะบางตัว (Toldrá and Reig, 2006) แต่ในความเป็นจริงแล้ววิธีการตรวจวิธีนี้ต้องใช้เวลาในการ incubation การล้าง จนถึงการรอให้ปรากฏสี (colour development) จึงนำไปสู่การพยายามที่จะพัฒนาให้มีการตรวจ ELISA แบบอัตโนมัติ (automated ELISA tests) (Toldrá and Reig, 2006) สำหรับข้อดีและข้อเสียของ biosensors ดังแสดงในตารางที่ 2.4 วิธีการนี้เป็นเทคนิคที่ใช้ได้ดีในห้องปฏิบัติการเพราะลดระยะเวลาในการทำและสามารถตรวจวิเคราะห์ยาสัตว์หรือสารตกค้างหลายชนิดและใช้กับตัวอย่างที่มีจำนวนมากได้ เพราะเทคนิคนี้สามารถทำงานแบบอัตโนมัติ (fully automated) และถูกควบคุมด้วยระบบคอมพิวเตอร์

รายงานการศึกษาตรวจหาปริมาณยาปฏิชีวนะตกค้างในเนื้อปลาและเนื้อกุ้งด้วยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC) และวิธี gas chromatography (GC) เช่น Nagata และ Saeki (1992) ทำการตรวจหาปริมาณ chloramphenicol thiamphenicol และ florfenicol ตกค้างในกล้ามเนื้อของปลา yellowtail ด้วยวิธี liquid chromatography (HPLC) ในขั้นตอนการสกัด และวิเคราะห์สารที่ต้องการด้วย chromatorex ODS column โดยมี UV-Detectoer ที่ความยาวคลื่น 225-270 nm เป็นตัวตรวจจับสารที่ต้องการ มีอัตราการคืนกลับของสารที่ระดับความเข้มข้น 0.1 ppm มากกว่า 74 % ค่า limit of detection (LOD) อยู่ที่ระดับ 1 ng ต่อมา Van de Riet และคณะ (2003) ทำการตรวจสารตกค้าง chloramphenicol thiamphenicol florfenicol และ florfenicol-amine ในฟาร์มเลี้ยงสัตว์น้ำ ด้วยวิธี liquid chromatography-mass spectrometry โดยใช้คอลัมน์ reverse phase Hypersil C-18 และใช้ mass spectrometry ในการตรวจจับ ion ของสาร ได้ค่าการคืนกลับของสารเท่ากับ 71-107 % ที่ระดับความเข้มข้น 2 ng/g และมีค่า LOD เท่ากับ 0.1-1 ng/g ขณะที่ Neuhaus และคณะ (2002) ตรวจหาปริมาณ chloramphenicol ในกล้ามเนื้อของกุ้งโดยใช้คอลัมน์ C-18 ได้ค่าการคืนกลับเท่ากับ 85 -102 % และค่า LOD เท่ากับ 0.08 ไมโครกรัมต่อกรัมเนื้อเยื่อ และมีรายงานการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ chloramphenicol thiamphenicol และ florfenicol ตกค้างในกล้ามเนื้อของปลา yellow tail ด้วยวิธี capillary gas chromatography-mass spectrometry พบว่าอัตราการคืนกลับของสารที่ระดับความเข้มข้น 0.1 ppm ได้มากกว่า 65% โดยมี LOD อยู่ที่ระดับ 5 ng/g เนื้อเยื่อ (Nagata and Oka, 1996) ซึ่งเปรียบเทียบให้เห็นได้ว่าวิธีการที่มีแนวโน้มจะให้ผลการตรวจที่มีค่า specificity สูงสุดในที่นี้คือ LC-MS

ตารางที่ 2.4 แสดงข้อดีข้อเสียของเทคนิคการตรวจทั้งวิธีทาง immunology และ chromatography (Toldrá and Reig, 2006)

ข้อดี	ข้อเสีย
ELISA test kits	
1. ใช้ง่าย	1. ราคาแพง
2. มีชุดทดสอบสำเร็จรูป (เช่น สำหรับตรวจ clenbuterol, zeranol, etc.)	2. มีอายุการใช้งานที่จำกัดและต้องเก็บรักษาในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม
3. สามารถวิเคราะห์ได้หลายตัวอย่างในครั้งเดียว	3. แพงในกรณีที่เป็น RIA และต้องมีวิธีการในการกำจัดขยะ
4. ใช้เวลาสั้นในการทราบผล	4. อาจให้ผลบวกเท็จ (false positives)
5. Sensitivity สูง	5. ใช้ 1 ชุดทดสอบต่อการตรวจ 1 สาร
6. Specificity สูง	
7. สามารถนำไปใช้ได้จริงในกระบวนการผลิตอาหาร	
Biochip array biosensors	
1. ใช้งานง่าย	1. เครื่องมีราคาสูง
2. ให้ผลในระยะเวลาอันสั้น	2. Chips มีราคาสูง
3. สามารถวิเคราะห์ได้หลายสารในการทำครั้งเดียว one shot (as many as chips in an array)	3. การวิเคราะห์ Analysis restricted to available chips
4. ใช้แบบอัตโนมัติ จึงให้ผลผลิตที่สูง	
5. สามารถตรวจได้มากถึง 120 ตัวอย่างในหนึ่งชั่วโมง	
HPTLC	
1. สามารถตรวจได้หลายตัวอย่างพร้อมกันในการวิเคราห์แต่ละสาร	1. ต้องการผู้มีประสบการณ์
2. ใช้เวลาสั้นในการทราบผล	2. ต้องการการเตรียมตัวอย่าง (เช่น การสกัด การกรอง)
3. มีแบบอัตโนมัติ	3. อาจให้ผลบวกเท็จ (false positives)
4. Sensitive	4. Only one thin-layer plate per residue searched
5. Specificity ขึ้นกับเทคนิคในการตรวจวัดสาร	
6. สามารถแยกตัวอย่างเก็บไว้ใช้ในการวิเคราะห์ครั้งต่อไป	