

บทที่ 4

ผลการวิจัย

ส่วนที่ 1 การเหนี่ยวนำลูกปลานิลเพศผู้โดยใช้ฮอร์โมนเมสทาโนโลน

จากการศึกษาข้อมูลการเพาะเลี้ยงปลานิล พบว่าในการพัฒนาตัวอ่อนปลานิลตั้งแต่ระยะที่ 1 ถึง 5 ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิในระบบโรงเพาะฟัก โดยอุณหภูมิช่วง 30 °C เหมาะสมต่อการเปลี่ยนแปลงเป็นปลาวัยอ่อน ในระยะเวลา 3 วัน แต่การเปลี่ยนแปลงอาจยาวนานถึง 6 วัน หากอุณหภูมิของน้ำในโรงเพาะฟักลดลงจนถึง 20 °C หลังจากพัฒนาเป็นลูกปลาวัยอ่อนสมบูรณ์โดยสามารถว่ายน้ำและเริ่มกินอาหาร สามารถเริ่มแปลงเพศลูกปลานิลด้วยการกินอาหารผสมฮอร์โมนเมสทาโนโลนในขนาด 80 mg/kg อาหาร เป็นระยะเวลา 21-23 วัน ได้ผลเป็นปลานิลเพศผู้สูงถึง 100%

การตรวจคัดแยกเพศในปลานิลโดยการศึกษาเนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์ระดับมหภาค (gonadal squash technique)

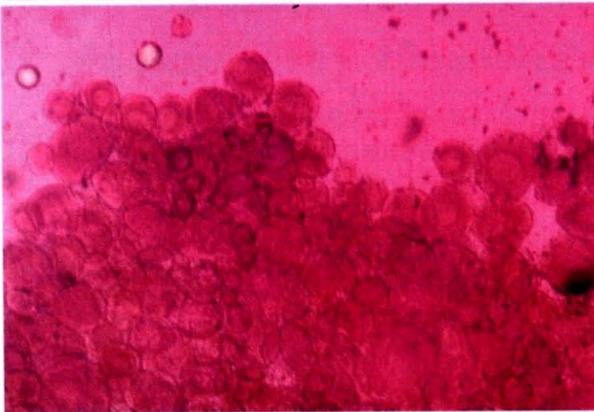
เนื้อเยื่อสด (fresh tissue imprint) ของอวัยวะระบบสืบพันธุ์ในปลานิลอายุ 60 วัน ผ่านการใช้สีย้อมอะซีโตคาร์มีน (aceto-carmin stain) และตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ดังรูปที่ 4.1 และ 4.2

การตรวจคัดแยกเพศในปลานิลโดยการศึกษาเนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์ระดับจุลกายวิภาค (histopathology)

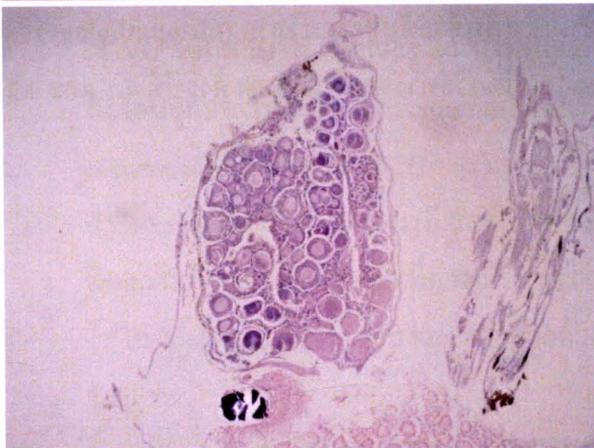
ตรวจเนื้อเยื่ออวัยวะระบบสืบพันธุ์ในปลานิลอายุ 100 โดยวิธีทางจุลพยาธิวิทยา ดังรูปที่ 4.1 และ 4.2



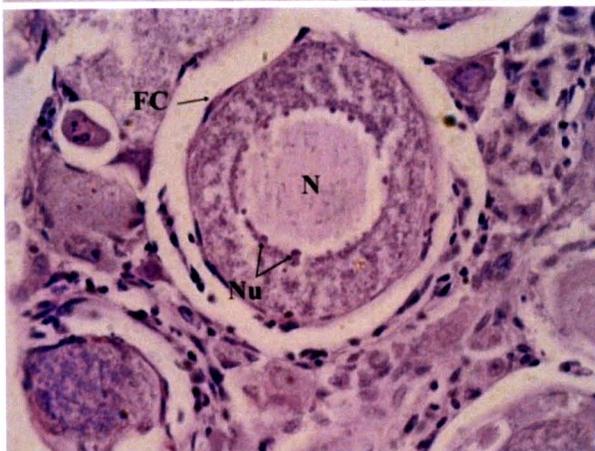
เนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์ในปลานิลเพศเมียอายุ 60 วัน โดย gonadal squash technique; แสดงเนื้อเยื่อโอวารี่ (ovary) และโอโอไซต์ (oocytes) (x40, aceto-carmine strains)



เนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์ในปลานิลเพศเมียอายุ 60 วัน โดย gonadal squash technique; แสดง โอโอไซต์ (x100, aceto-carmine strains)



รูปจุลพยาธิวิทยาแสดงเนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์เพศเมียในปลานิลอายุ 100 วัน; โอวารี่ (ovary) ภายในบรรจุโอโอไซต์ในระยะต่างๆของโอโอเจเนซิส (oogenesis) (x100, H&E stains)

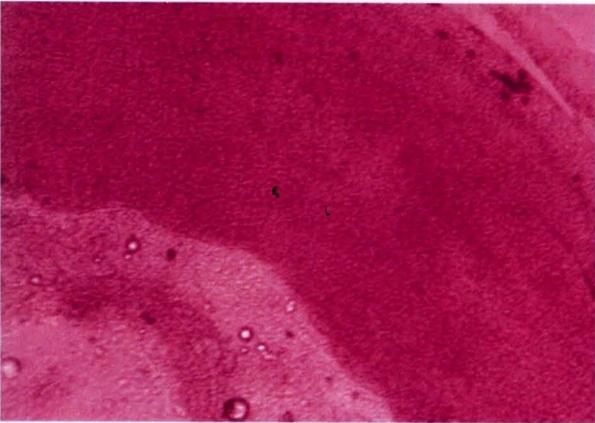


รูปจุลพยาธิวิทยาแสดงเนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์เพศเมียในปลานิลอายุ 100 วัน; โอโอไซต์ระยะแรก (early oocyte) มีนิวเคลียส (nucleus; N) ขนาดใหญ่อยู่ตรงกลาง มี (nucleoli; Nu) อยู่รอบๆนิวเคลียส และมีชั้นของเซลล์ฟอลลิคูล (follicle cell; FC) ซึ่งเป็น simple squamous cell ล้อมรอบโอโอไซต์แต่ละอัน (x1000, H&E stains)

รูปที่ 4.1 รูปแสดงเนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์เพศเมียในปลานิล (*Oreochromis niloticus*)



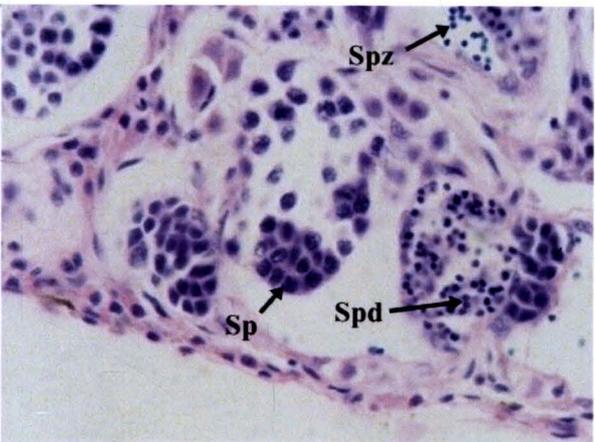
เนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์ในปลานิลเพศผู้อายุ 60 วัน โดย gonadal squash technique; แสดงเนื้อเยื่อเทสทิส (testis) (x40, aceto-carmine strains)



เนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์ในปลานิลเพศผู้อายุ 60 วัน โดย gonadal squash technique ; แสดงเนื้อเยื่อเทสทิส (testis) ที่ภายในมีลักษณะเนียนเป็นเนื้อเดียว (x100, aceto-carmine strains)



รูปจุลพยาธิวิทยาแสดงเนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์เพศผู้ในปลานิลอายุ 100 วัน; เทสทิส (testis) เป็นอวัยวะที่อยู่เป็นคู่ทางด้านบนของผนังลำตัว จะแขวนอยู่ทางด้านล่างของถุงลม (swimbladder) ด้วยเยื่อมีเซนเทอรี (mesenteries) โคยรอบ (x100, H&E stains)



รูปจุลพยาธิวิทยาแสดงเนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์เพศผู้ในปลานิลอายุ 100 วัน; ท่อเซมินิเฟอรัส (seminiferous tubule) ตัดตามยาว แสดงบริเวณตรงกลางท่อที่บรรจุไปด้วย สเปออร์มาโทไซต์ (spermatocytes; Sp) สเปออร์มาติด์ (spermatids; Spd) และ สเปออร์มาโตซัวส์ (spermatozoas; Spz) (x100, H&E stains)

รูปที่ 4.2 รูปแสดงเนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์เพศผู้ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

ส่วนที่ 2 การวิเคราะห์ปริมาณสารโชนเมสทาโนโชนในเนื้อปลานิล

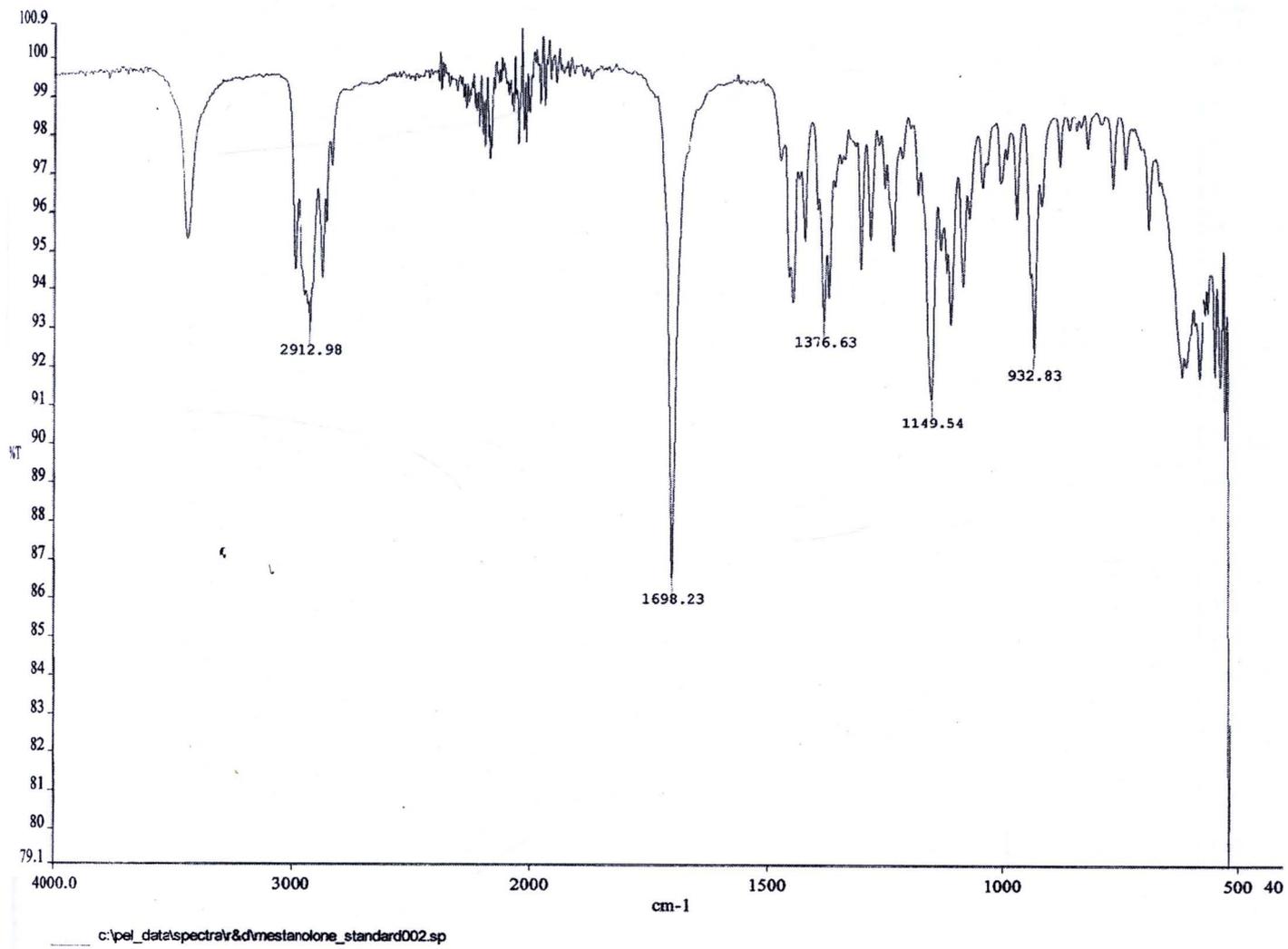
ผลจากการศึกษาเปรียบเทียบคุณลักษณะและคุณภาพของสารวัตถุบอร์โชนเมสทาโนโชนซึ่งในการศึกษานี้

1. การศึกษาลักษณะทางกายภาพภายนอก (appearance)

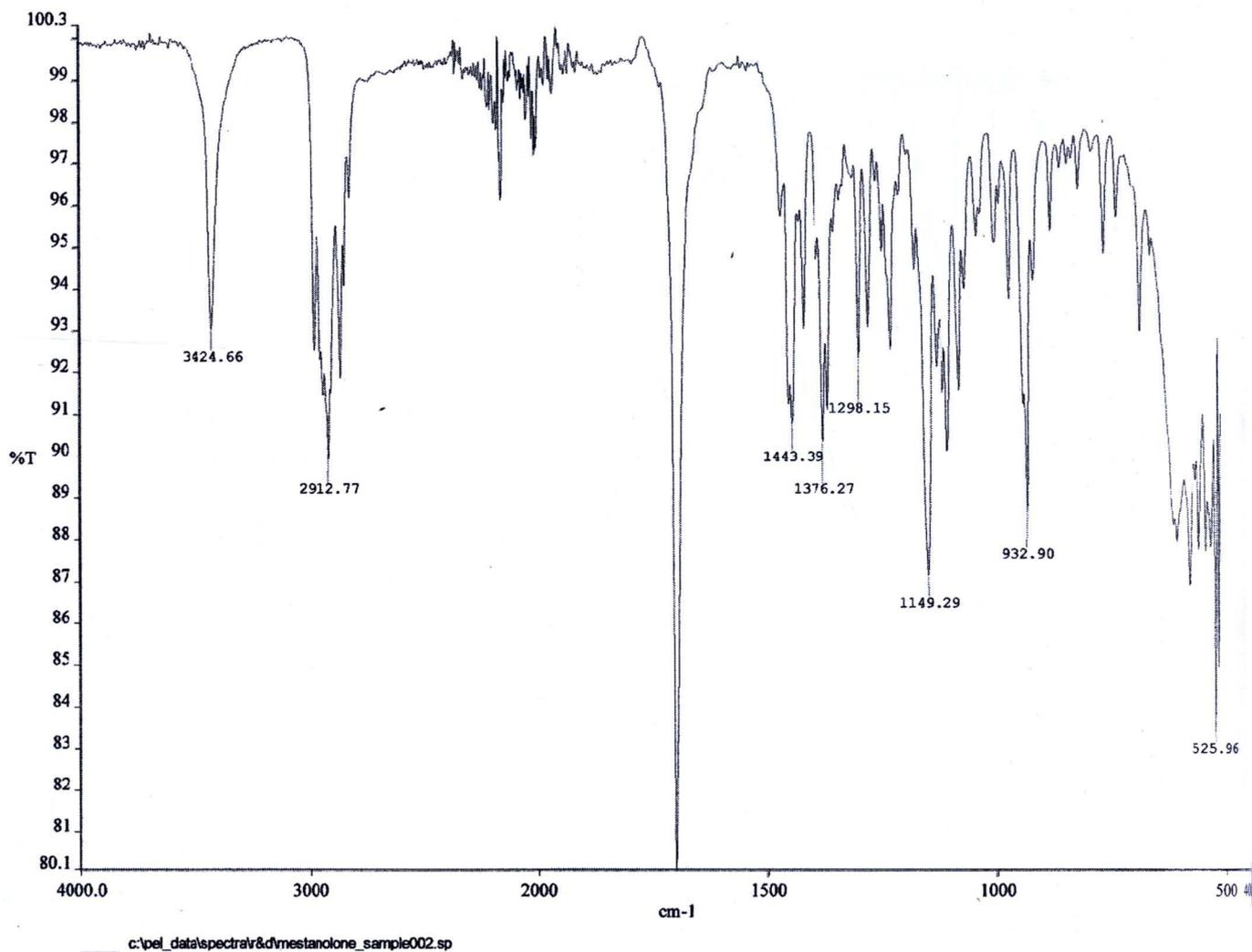
ผงผลึกสีขาว ไม่มีกลิ่น

2. การพิสูจน์เอกลักษณ์ (identification) ด้วยวิธีอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (FT-IR)

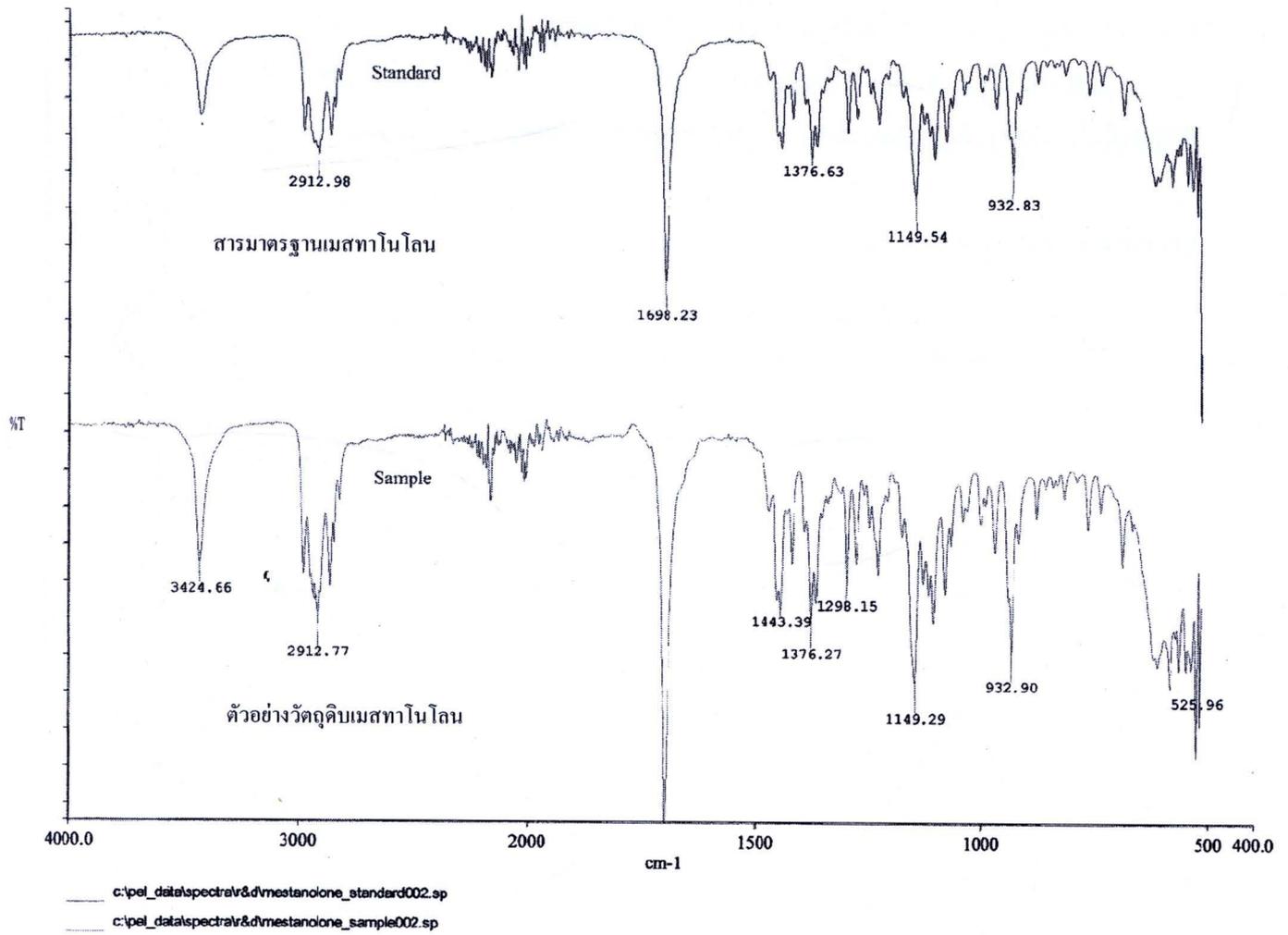
IR spectrum ของสารมาตรฐานเมสทาโนโชน และตัวอย่างวัตถุบอร์โชนเมสทาโนโชนแสดงดังรูปที่ 4.3 และ 4.4 ตามลำดับ เมื่อทำการ overlay IR spectrum ของสารมาตรฐานเมสทาโนโชน และตัวอย่างวัตถุบอร์โชนเมสทาโนโชน พบว่า IR spectrum ทั้งสองไม่แตกต่างกัน ดังรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.3 IR spectrum ของสารมาตรฐานเมสทานोलोन



รูปที่ 4.4 IR spectrum ของตัวอย่างวัตถุคิบเมสทาโนโลน



รูปที่ 4.5 overlay IR spectrum ของสารมาตรฐานเมสทาโนโลนและตัวอย่างวัตถุเมสทาโนโลน

3. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำด้วยวิธี Karl Fischer Titration (Kestens *et al.*, 2008)

การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำในตัวอย่างวัตถุคิบเมสทาโนโลนด้วยวิธี Karl Fischer Titration พบว่ามีปริมาณน้ำในตัวอย่างวัตถุคิบเมสทาโนโลนเท่ากับ 0.35 % ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.1 แสดงค่า titer ของ Karl Fischer Reagent

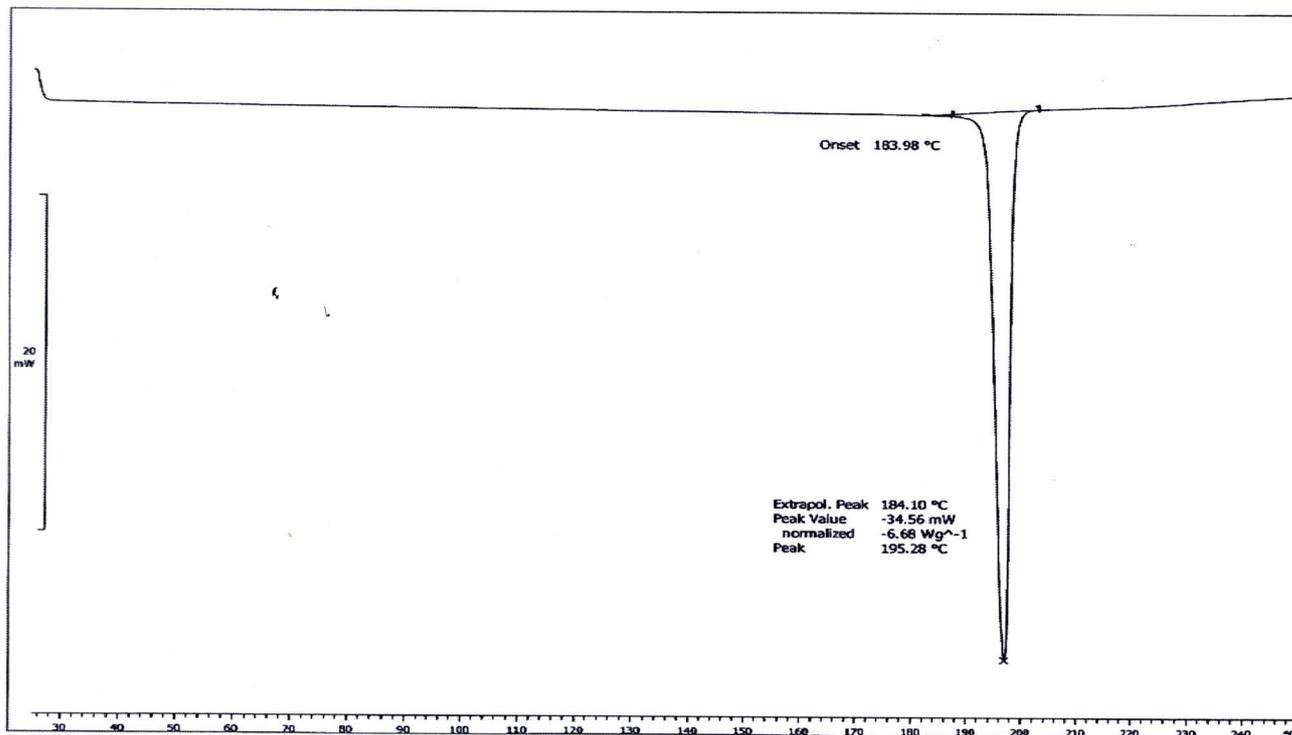
Sample	Weight of Sample (g)	Karl Fisher Reagent (ml)	Titer (mg/ml)
A	0.0098	2.114	4.6405
B	0.0098	2.114	4.6358
C	0.0102	2.204	4.6279
Average			4.6347
%Relative Standard Deviation (%RSD)			0.14

ตารางที่ 4.2 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำในตัวอย่างเมสทาโนโลนด้วยวิธี Karl Fischer Titration

Sample	Weight of Sample (g)	Karl Fisher Reagent (ml)	%water
A	0.1498	0.106	0.33
B	0.1516	0.122	0.37
Average			0.35

4. การวิเคราะห์หาจุดหลอมเหลว (melting point) ด้วยวิธี differential scanning calorimetry (DSC)

จากการวิเคราะห์หาจุดหลอมเหลว (melting point) ด้วยวิธี DSC ได้ DSC thermogram ดังแสดงในรูปที่ 4.6 โดยพบว่าตัวอย่างวัตถุคิบเมสทาโนโลนเริ่มหลอมเหลว (onset) ที่ $183.98\text{ }^{\circ}\text{C}$ และมีจุดหลอมเหลว (melting point) เท่ากับ $195.28\text{ }^{\circ}\text{C}$



รูปที่ 4.6 DSC thermogram ของวัตถุคิบเมสทาโนโลน

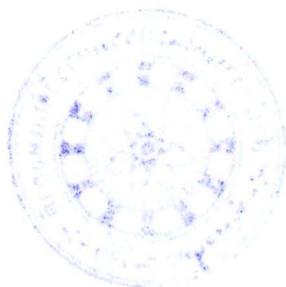


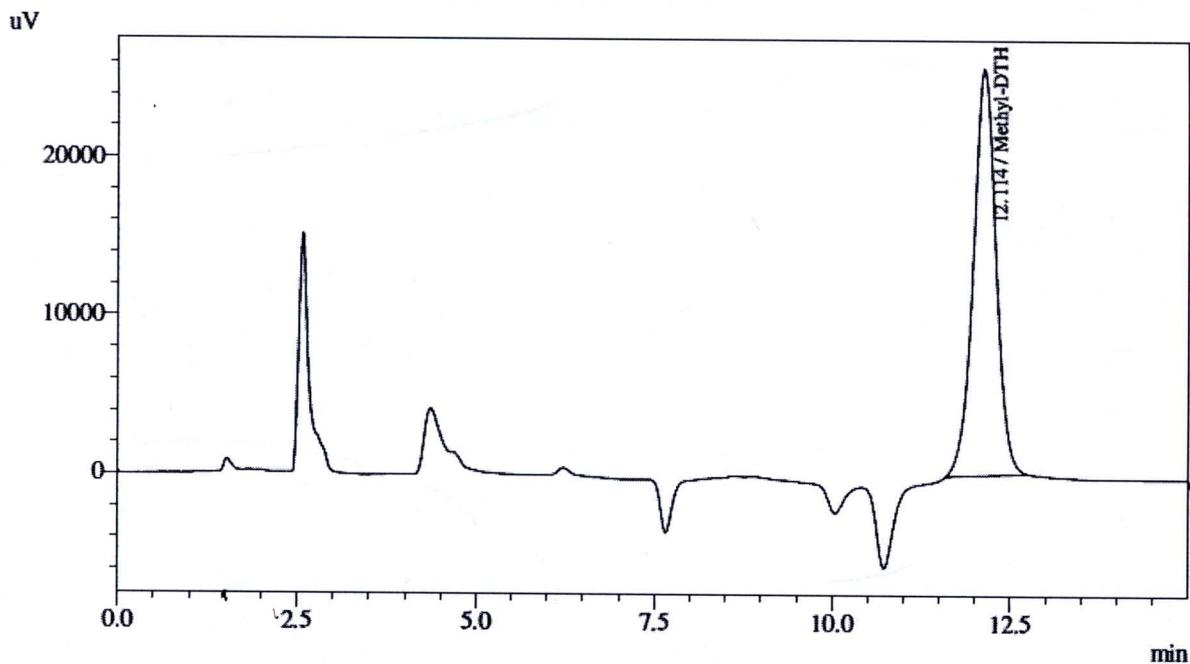
5. การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ (assay) ด้วยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC)

HPLC chromatogram ของสารละลายของสารมาตรฐานเมสทาโนโลน และตัวอย่างวัตถุคิบบเมสทาโนโลนได้แสดงในรูปที่ 4.7 และ 4.8 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญเมสทาโนโลนในตัวอย่างวัตถุคิบบเมสทาโนโลน พบว่ามีปริมาณสารสำคัญเมสทาโนโลน เท่ากับ 98.90 % ดังแสดงในตารางที่ 4.3

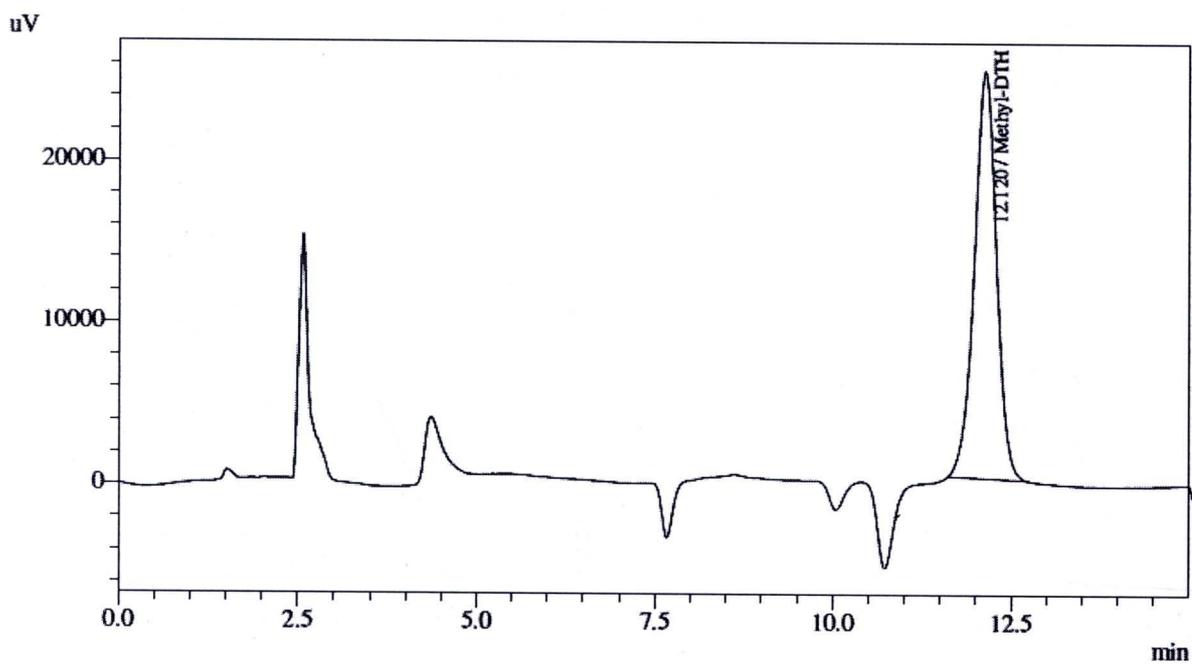
ตารางที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาเมสทาโนโลนในวัตถุคิบบ

	Weight of Sample (mg)	Average peak Height	%w/w
Standard	25.9	25801	-
Sample A	25.1	25067	98.25
Sample B	26.0	26309	99.55
SD	0.49	624.42	0.92
Average	25.67	25725.67	98.90
%RSD	1.92	2.43	0.93





รูปที่ 4.7 HPLC chromatogram ของสารมาตรฐานเมสทาโนโลน (1 mg/ml)



รูปที่ 4.8 HPLC chromatogram ของตัวอย่างวัตถุเมสทาโนโลน (1 mg/ml)

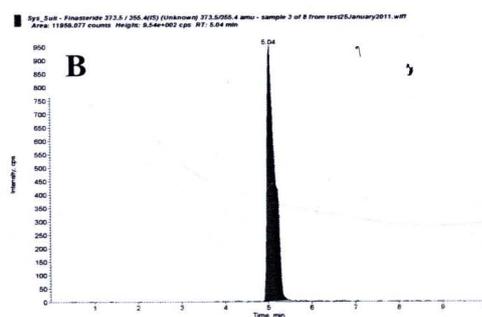
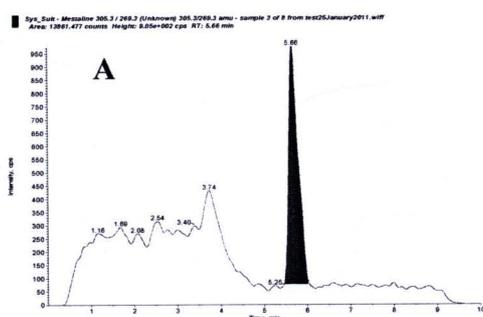
3.2 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ฮอร์โมนเมสทาโนโลนในเนื้อปลานิล

3.2.1 ผลการตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability test)

จาก LC-MS chromatogram ของการวิเคราะห์เมสทาโนโลนตกค้างในเนื้อปลานิล ในรูปที่ 4.4 พบว่า ค่าเฉลี่ยของ retention time ของเมสทาโนโลน และ ไฟแนสเตอร์ไรด์ เท่ากับ 5.67 และ 5.05 นาที ตามลำดับ โดยมีค่า % CV เท่ากับ 0.097 และ 0.177 ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.4 และพบว่าค่าเฉลี่ยของ resolution ระหว่างพีคของเมสทาโนโลน กับ ไฟแนสเตอร์ไรด์ เท่ากับ 2.32 โดยมีค่า % CV เท่ากับ 0.472 ดังตารางที่ 4.4 สำหรับค่า tailing factor ของ พีคเมสทาโนโลน และไฟแนสเตอร์ไรด์ เท่ากับ 1.13 และ 1.13 ตามลำดับ โดยมีค่า CV เท่ากับ 0.739 และ 0.885 ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 system suitability test ของวิธีวิเคราะห์เมสทาโนโลนที่ตกค้างในเนื้อปลานิล (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)



รูปที่ 4.9 LC-MS chromatogram ของการวิเคราะห์สารละลายผสมของสารมาตรฐานใช้งานเมสทาโนโลน และ ไฟแนสเตอร์ไรด์ ความเข้มข้น 5 ng/g (A) และ 50 ng/g (B) ตามลำดับ เข้าสู่ LC-MS system จำนวน 6 ครั้ง (system suitability test)

3.2.2 ผลการตรวจสอบความถูกต้อง (accuracy) และ ความเที่ยงตรง (precision) ของวิธีวิเคราะห์

การตรวจสอบความถูกต้อง และความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์เมสทาโนโลน ที่ตกค้างในเนื้อปลานิลที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน 3 ระดับ ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 การตรวจสอบความถูกต้องและความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์เมสทาโนโลนที่ตกค้างในเนื้อปลานิล

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

ในตารางที่ 4.5 พบว่า เมสทาโนโลนในเนื้อเยื่อปลานิล 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 ผลการทดลองจะเห็นได้ว่า ที่ทุกช่วงความเข้มข้น มีค่า % recovery ของเมสทาโนโลนอยู่ในช่วงของ 82.30-112.44 และมีค่า % CV น้อยกว่า 30

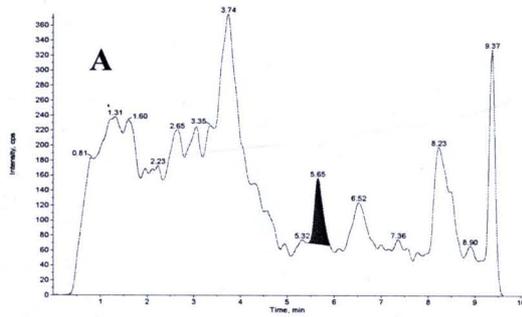
3.2.3 ผลการตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) และช่วงความเข้มข้น (range) ของวิธีวิเคราะห์

การตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ (method linearity) และช่วงความเข้มข้นที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณเมสทาโนโลนในเนื้อเยื่อปลานิลที่ความเข้มข้นของสารละลายเมสทาโนโลนที่สกัดจากเนื้อเยื่อปลานิล ต่างๆ กัน 7 ระดับ ได้แก่ 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 7.5, และ 10.0 ng/g โดยวิธีวิเคราะห์ความเข้มข้นละ 3 ครั้ง ได้ความสัมพันธ์ของอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้พีคของ เมสทาโนโลน กับ ไฟแนนสโตโรล (peak area ratio) กับ อัตราส่วนของความเข้มข้นของเมสทาโนโลนทั้ง 7 ความเข้มข้น (0.5-10.0 ng/g) กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานภายใน เป็นเส้นตรง โดยโดยมีสมการ linear เป็น $ax+b$ และ $r^2 = 0.9989$ ดังตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.10 -4.12

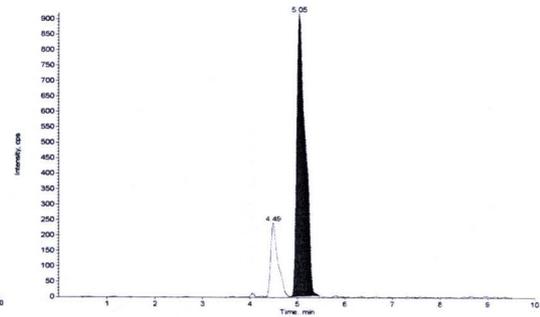
ตารางที่ 4.6 ความเป็นเส้นตรงและช่วงความเข้มข้นของวิธีวิเคราะห์เมสทาโนโลนในเนื้อเยื่อปลานิล (n=7)

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

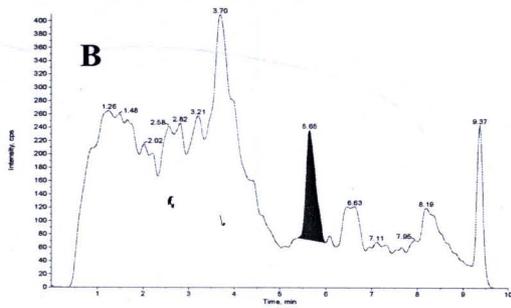
Std 0.5 ng - Mestaline 305.3 / 289.3 (Standard) 305.3269.3 amu - sample 29 of 57 from 24 January 2011.wiff
Area: 1078.510 counts Height: 8.64e+001 cps RT: 5.65 min



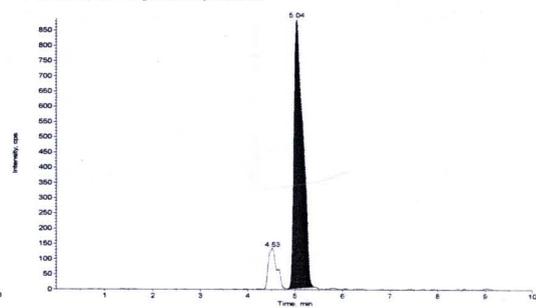
Std 0.5 ng - Finasteride 373.5 / 355.4(05) (Standard) 373.5235.4 amu - sample 29 of 57 from 24 January 2011.wiff
Area: 11722.542 counts Height: 9.16e+002 cps RT: 5.05 min



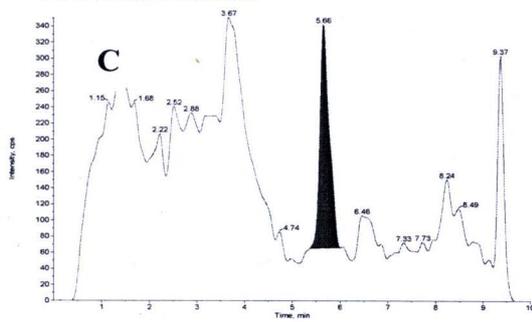
Std 1 ng - Mestaline 305.3 / 289.3 (Standard) 305.3269.3 amu - sample 49 of 57 from 24 January 2011.wiff
Area: 2422.791 counts Height: 1.65e+002 cps RT: 5.65 min



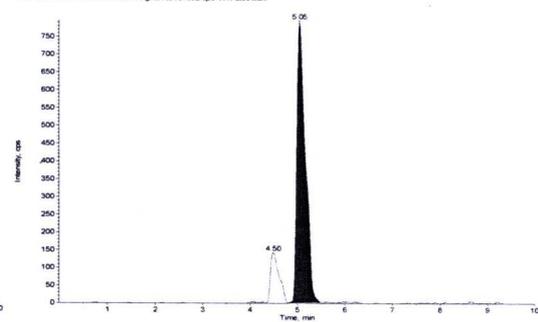
Std 1 ng - Finasteride 373.5 / 355.4(05) (Standard) 373.5235.4 amu - sample 49 of 57 from 24 January 2011.wiff
Area: 11708.110 counts Height: 8.86e+002 cps RT: 5.05 min



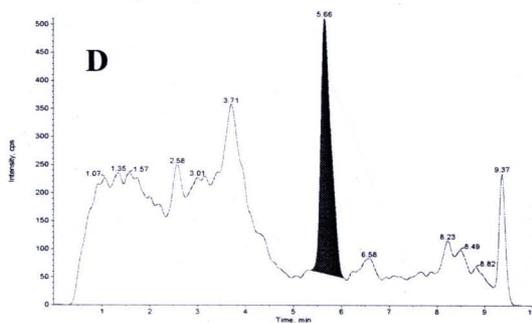
Std 2 ng - Mestaline 305.3 / 289.3 (Standard) 305.3269.3 amu - sample 36 of 57 from 24 January 2011.wiff
Area: 3871.997 counts Height: 2.79e+002 cps RT: 5.66 min



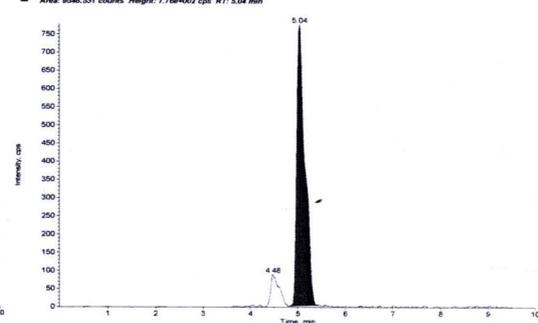
Std 2 ng - Finasteride 373.5 / 355.4(05) (Standard) 373.5235.4 amu - sample 36 of 57 from 24 January 2011.wiff
Area: 10181.011 counts Height: 7.19e+002 cps RT: 5.06 min



Std 3 ng - Mestaline 305.3 / 289.3 (Standard) 305.3269.3 amu - sample 37 of 57 from 24 January 2011.wiff
Area: 6748.889 counts Height: 4.56e+002 cps RT: 5.66 min

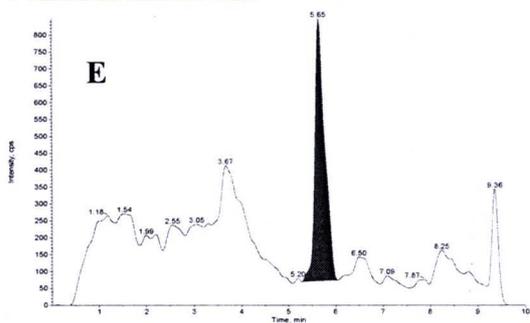


Std 3 ng - Finasteride 373.5 / 355.4(05) (Standard) 373.5235.4 amu - sample 37 of 57 from 24 January 2011.wiff
Area: 5048.521 counts Height: 7.17e+002 cps RT: 5.04 min

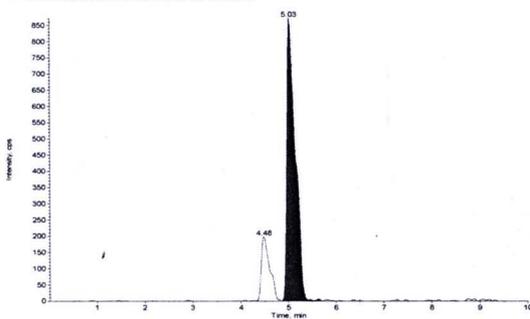


รูปที่ 4.10 LC-MS chromatogram ของสารละลายมาตรฐานใช้งานเมสทาโนโลน ความเข้มข้น 0.5 ng/g (A), 1 ng/g (B), 2 ng/g (C), 3 ng/g (D), 5 ng/g (E), 7.5 ng/g (F), และ 10 ng/g (G) (ซ้าย) กับสารมาตรฐานภายใน ไฟแนสเตอร์ไรส์ ความเข้มข้น 50 ng/g (ขวา)

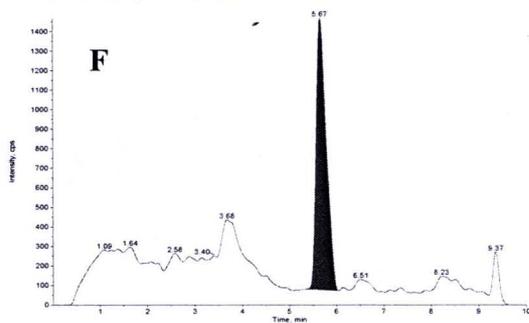
Std 5 ng - Mestaline 305.3 / 269.3 (Standard) 305.3/269.3 amu - sample 51 of 57 from 24.January2011.wiff
Area: 11504.889 counts Height: 7.78e+002 cps RT: 5.65 min



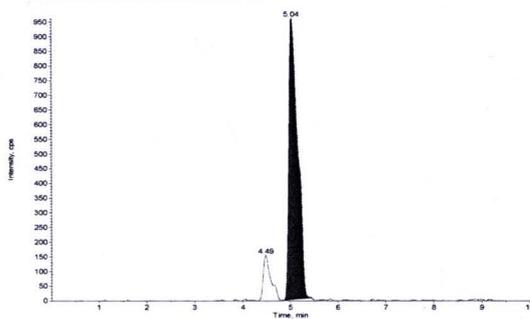
Std 5 ng - Finasteride 373.5 / 355.4(5) (Standard) 373.5/355.4 amu - sample 51 of 57 from 24.January2011.wiff
Area: 11085.639 counts Height: 8.76e+002 cps RT: 5.03 min



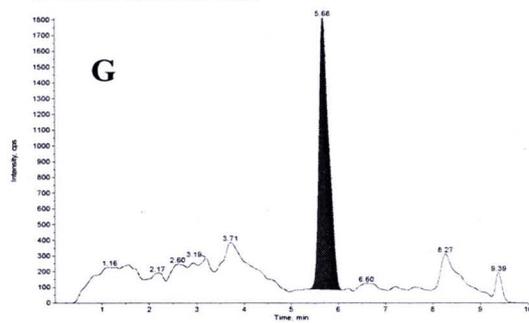
Std 7.5 ng - Mestaline 305.3 / 269.3 (Standard) 305.3/269.3 amu - sample 57 of 57 from 24.January2011.wiff
Area: 20963.424 counts Height: 1.39e+003 cps RT: 5.67 min



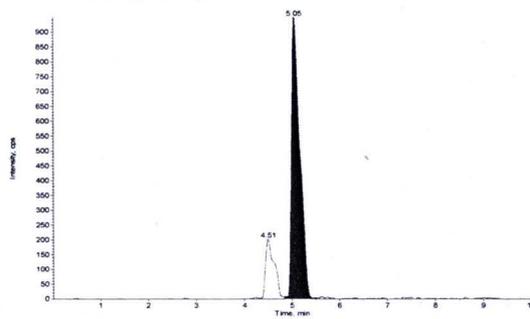
Std 7.5 ng - Finasteride 373.5 / 355.4(5) (Standard) 373.5/355.4 amu - sample 57 of 57 from 24.January2011.wiff
Area: 12765.621 counts Height: 9.63e+002 cps RT: 5.04 min



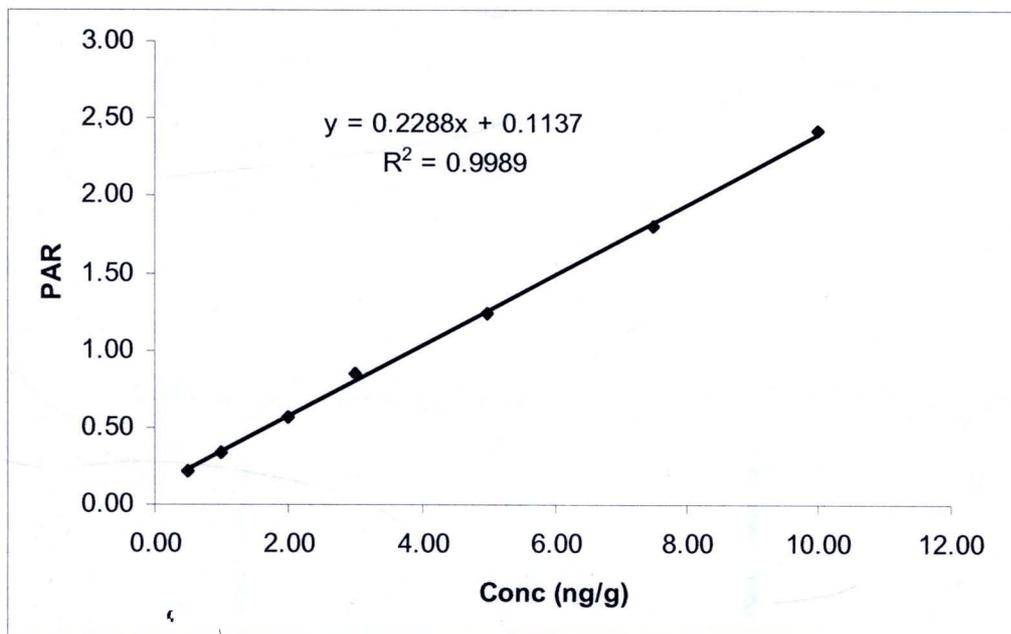
Std 10 ng - Mestaline 305.3 / 269.3 (Standard) 305.3/269.3 amu - sample 9 of 57 from 24.January2011.wiff
Area: 29265.485 counts Height: 1.74e+003 cps RT: 5.68 min



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

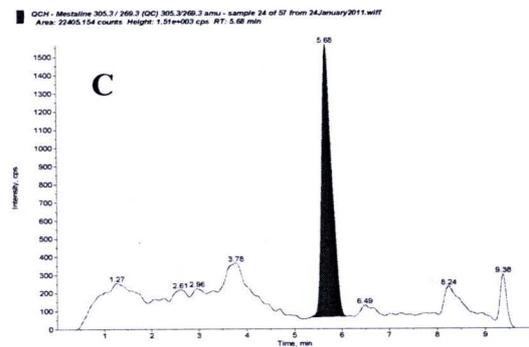
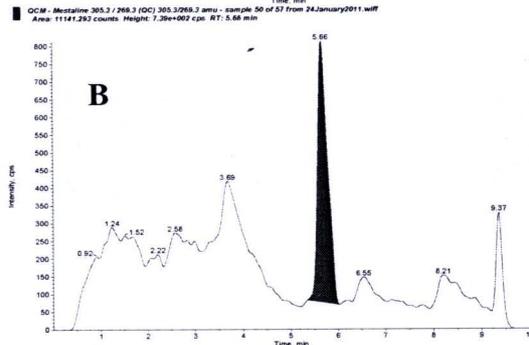
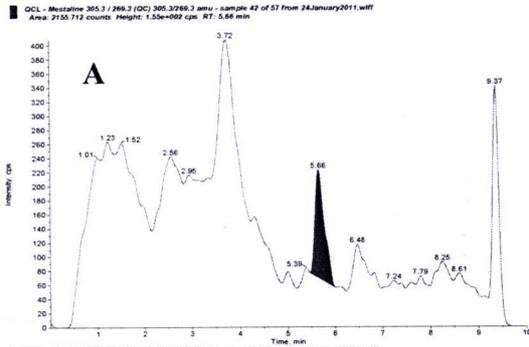


รูปที่ 4.10 (ต่อ) LC-MS chromatogram ของสารละลายมาตรฐานใช้งานเมสทาโนโลน ความเข้มข้น 0.5 ng/g (A), 1 ng/g (B), 2 ng/g (C), 3 ng/g (D), 5 ng/g (E), 7.5 ng/g (F), และ 10 ng/g (G) (ซ้าย) กับสารมาตรฐานภายในไฟแนสโตโรล ความเข้มข้น 50 ng/g (ขวา)

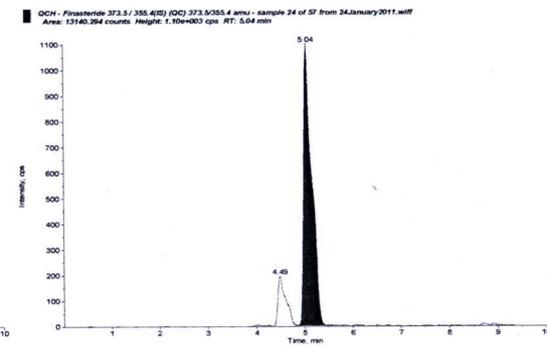
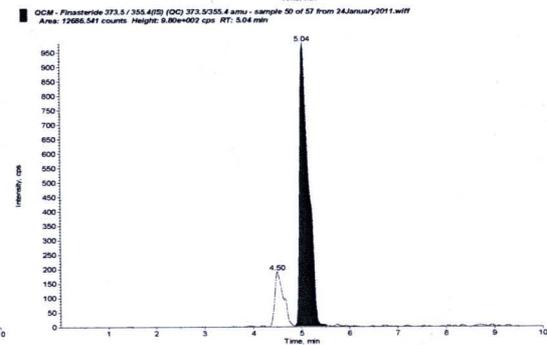
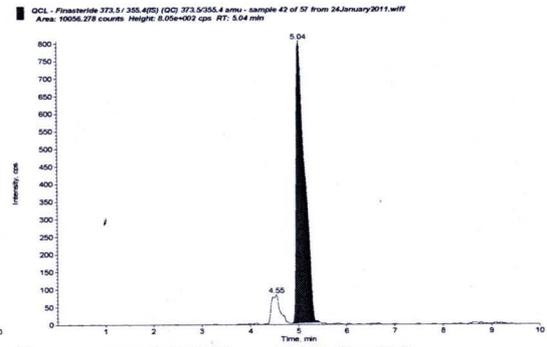


รูปที่ 4.11 ความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ (method linearity) ของวิธีวิเคราะห์เมสทาโนโลนในเนื้อปลาชนิดด้วย LC-MS

เมสทาโนโลน



ไฟแนสเตอร์ไคด์



รูปที่ 4.12 LC-MS chromatogram ของเมสทาโนโลน ความเข้มข้น 1 ng/g (A), 5 ng/g (B) และ 7.5 ng/g (C) ที่มีสารละลายมาตรฐานภายในไฟแนสเตอร์ไคด์ ความเข้มข้น 50 ng/g ที่สกัดจากเนื้อปาลานิล

ส่วนช่วงความเข้มข้นของเมสทาโนโลนในเนื้อปาลานิลที่มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงที่จะให้ผลการวิเคราะห์ได้ถูกต้องและแม่นยำ เมื่อพิจารณาช่วงความเข้มข้นที่ใช้ในการตรวจสอบความเป็นเส้นตรง พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.5-10.0 ng/g

3.2.4 ผลการตรวจสอบ limit of quantitation (LOQ) ของวิธีวิเคราะห์

จากการตรวจสอบ limit of quantitation (LOQ) ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณเมสทาโนโลนที่ตกค้างในเนื้อเยื่อปลานิล พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.5 ng/g ดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 Limit of quantitation ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณเมสทาโนโลนในเนื้อเยื่อปลานิล

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

3.2.5 ผลการตรวจสอบการกลับคืนของการสกัดเมสทาโนโลนจากเนื้อเยื่อปลานิล (recovery of extraction) ⁶

จากการตรวจสอบการกลับคืนของการสกัดเมสทาโนโลนจากเนื้อเยื่อปลานิล (recovery of extraction) ที่ความเข้มข้น 3 ระดับคือ 1, 2 และ 5 ng/g พบว่า %recovery ของการสกัดเมสทาโนโลนทั้ง 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 % ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 ผลการตรวจสอบการกลับคืนของการสกัดเมสทาโนโลนจากเนื้อเยื่อปลานิล (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		

3.2.6 ผลการตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (specificity)

จากการตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ โดยนำเนื้อเยื่อปลานิลมาสกัดและตรวจสอบความจำเพาะเจาะจง พบว่าวิธีวิเคราะห์ปริมาณเมสทาโนโลนที่ตกค้างในเนื้อปลานิลโดยใช้ LC-MS พบว่าไม่มีพีครบกวนการวิเคราะห์ทั้งเมสทาโนโลน และ ไฟแนสเทอไรค์ ที่ retention time 5.67 และ 5.04 นาที ตามลำดับ

3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสารตกค้างของเมสทาโนโลนในปลานิลที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารที่มีส่วนผสมของฮอร์โมนเมสทาโนโลน

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารตกค้างของเมสทาโนโลนในปลานิลที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารผสมฮอร์โมน แสดงใน ตารางที่ 4.9 ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า การให้อาหารที่มีส่วนผสมของฮอร์โมนเมสทาโนโลนแก่ลูกปลาจะพบสารตกค้างของเมสทาโนโลนในลูกปลาในระดับหนึ่งในล้านล้านส่วน (ppb) ซึ่งพบว่าลูกปลานิลที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมนเป็นระยะเวลา 23 วัน เมื่อหยุดให้อาหาร 1, 2 และ 3 วัน จะตรวจพบปริมาณเมสทาโน โลนเท่ากับ 3.224, 2.029 และ 1.046 ppb ตามลำดับ

ตารางที่ 4.9 ผลการวิเคราะห์สารตกค้างของเมสทาโน โลนในปลานิลที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารผสมฮอร์โมนเมสทาโน โลนเป็นเวลา 23 วัน

เวลาที่สุ่ม ตัวอย่าง (วัน)	ปริมาณสารตกค้าง (ppb)			ค่าเฉลี่ย (ppb)	%CV
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
1	3.235	3.230	3.206	3.224	0.481
2	2.003	2.028	2.056	2.029	1.307
3	1.091	1.033	1.014	1.046	3.835
5	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	-
7	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	-
14	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	-
21	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	-

จากผลการทดลองพบว่า เมื่อหยุดให้อาหารตั้งแต่ 5 วันขึ้นไป จะทำให้พบปริมาณสารตกค้างของเมสทาโน โลนในเนื้อปลาค่ากว่า 0.5 ppb