บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 คุณสมบัติของ Diethylstilbestrol และ Hexoestrol และการใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์

ไดเอทิลสติลเบสทรอล (Diethystilbestrol; DES) และอนุพันธ์ของ DES คือ เฮ็กโซเอสทรอล (Hexoestrol) จัดเป็นสารในกลุ่ม Stilbenes ที่ใช้เพื่อช่วยเร่งการเจริญเติบโตในปศุสัตว์ ออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน โครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 1 โดยที่ DES มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{18}H_{20}O_2$ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 268.34 มีจุดหลอมเหลวอยู่ระหว่าง 169 ถึง 172 องศาเซลเซียส ละลายตัวได้ดีใน แอลกอฮอล์ อีเทอร์ และกรดไขมัน ละลายตัวในเบนซีนได้เล็กน้อย ไม่ละลายในน้ำ (Budavari *et al.*, 1989) ขณะที่ Hexoestrol มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{18}H_{22}O_2$ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 270.36 มีจุดหลอมเหลวอยู่ระหว่าง 185 ถึง 188 องศาเซลเซียส สามารถละลายตัวในอะซีโตน และแอลกอฮอล์ ได้ดี ละลายตัวในเบนซีน และคลอโรฟอร์มได้เล็กน้อย สามารถละลายตัวได้ดีในน้ำมันพืชเมื่อให้ร่วมกับความร้อนระดับต่ำ พร้อมการเติมอัลคาไลน์ไฮดรอกไซด์ (Alkaline hydroxide) แต่จะไม่ละลายตัวในน้ำและกรดโลหะ (mineral acid) (Budavari *et al.*, 1989)

(a) (b)

รูปที่ 1 โครงสร้างเคมีของ DES (a) และ Hexoestrol (b) (Botsoglou and Fletouris, 2001)

DES เป็นสารชนิดแรกในกลุ่มนี้ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นในปี ค.ศ. 1938 (Dodds, 1938 cited in Rhee *et al.*, 1995) เพื่อใช้ในทางการแพทย์ (human medicine) และป้องกันการแท้งในสตรีมีครรภ์ (prevent miscarriage) (Center for Disease Control and Prevention: CDC, 2003; Raun and Preston, 2002) ต่อมามีการนำเอา DES มาวิจัยเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์

ในระยะแรก Dinusson และคณะ (1948) (Dinusson *et al.*, 1948 cited in Lone, 1997) ได้รายงานถึงประสิทธิภาพของการใช้ DES ชนิดฝังใต้ผิวหนัง (subcutaneous implantation) ในโคสาว (heifer) พบว่า DES สามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตได้ดีกว่าโคสาวกลุ่มควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Andrews และคณะ (1954) (Andrew *et al.*, 1954 cited in Lone, 1997) ที่ทดลองใช้ DES ในลูกแกะ ต่อมา Hale และคณะ (1953) ได้ทดลองให้ DES ทางปากแก่ลูกโค (oral DES) พบว่าให้ผลเช่นเดียวกับการฝังใต้ผิวหนัง นอกจากนี้มีงานวิจัยอื่นๆ ที่ทดลองใช้ DES ในช่วงเวลาดังกล่าว เพื่อช่วยเร่งการเจริญเติบโตใน โคเนื้อ แกะ และสัตว์ปีก พบว่า DES สามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตได้เช่นกัน ขณะที่การทดลองในสุกรให้ผลที่ไม่แน่นอน (Lone, 1997) สำนักงานอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกาได้อนุญาตให้ใช้ DES ชนิดผสมอาหารในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ในปี ค.ศ. 1954 และชนิดฝังในปี ค.ศ. 1957 (Raun and Preston, 2002) ส่วน Hexoestrol นั้นได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ในสหราชอาณาจักรช่วงปี ค.ศ. 1950 ทั้งชนิดผสมอาหารและชนิดฝังใต้ผิวหนัง พบว่า Hexoestrol สามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของโคตัวผู้ตอน (steer) และโคสาวโดยเฉลี่ยประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ และจากการทดลองในไก่เนื้อพบว่าสามารถเพิ่มอัตราการกินและน้ำหนักไก่ได้เมื่อให้ Hexoestrol ชนิดฝังขนาด 15 มิลลิกรัม สำหรับ Dienestrol พบว่าสามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตในปศุสัตว์ได้ แต่จะมีประสิทธิภาพน้อยกว่า DES และ Hexoestrol (Lone, 1997)

การใช้ DES และ Hexoestrol ในปศุสัตว์ในแต่ละชนิดนั้น มีความแตกต่างกันในแง่ขนาด (dose) วิธีการให้ (route and drug preparation) และการใช้อาจอยู่ในลักษณะผสมกับสารหรือฮอร์โมนตัวอื่น (ตารางที่ 1) สัตว์ที่ได้รับสารในกลุ่มนี้ กลไกของร่างกายจะตอบสนองแตกต่างกันออกไป ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดสัตว์ เพศ อายุ อาหาร ขนาดที่ให้ พบว่าสัตว์ที่ได้รับ DES จะมีระดับฮอร์โมนเจริญเติบโต (growth hormone) และ/หรืออินซูลินในร่างกายเพิ่มขึ้น มีผลต่อการกระตุ้นให้กรดอะมิโนผ่านเข้าสู่เซลล์มากขึ้น (Velle, 1982) อย่างไรก็ดีข้อมูลเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ของสารกลุ่มนี้ในร่างกายสัตว์มีไม่มากนัก (Lone, 1997) ในสัตว์ปีกที่ได้รับ DES หรือ Hexoestrol พบว่าจะมีผลต่อขบวนการเมตาบอลิสมของไขมันมากกว่าขบวนการเมตาบอลิสมของโปรตีน ทำให้เกิดการสะสมของไขมันในร่างกายเพิ่มขึ้นรวมไปถึงน้ำหนักของตัวไก่ที่เพิ่มมากขึ้นตาม นอกจากนี้จากการทดลองพบว่าไก่ตัวผู้จะให้การตอบสนองต่อ Stilbenes ได้ดีกว่าไก่ตัวเมีย (Lone, 1997; Velle, 1982) โดยขนาดที่มีการแนะนำให้ใช้ในไก่คือ 12 มิลลิกรัมต่อตัว (Herriman *et al.*, 1982; Lone, 1997; Velle, 1982) ซึ่งเป็นขนาดที่สูงกว่าสัตว์ชนิดอื่นเมื่อเทียบปริมาณของตัวสารกับน้ำหนักสัตว์ (Herriman *et al.*, 1982)

ตารางที่ 1 ขนาดของ DES และ Hexoestrol ที่ใช้ในปศุสัตว์ (Velle, 1982)

สารออกฤทธิ์	ขนาด	วิธีการให้	ชนิดสัตว์ที่ให้
DES	10-20 มิลลิกรัมต่อวัน	ผสมอาหาร	โคตอนตัวผู้ โคสาว
DES	30-60 มิลลิกรัมต่อวัน	ฝังใต้ผิวหนัง (ชนิดสื่อน้ำมัน)	โคตอนตัวผู้ ลูกโคขุน
Hexoestrol	12-60 มิลลิกรัม	ฝังใต้ผิวหนัง	โคตอนตัวผู้ แกะ ลูกโค สัตว์ปีก
DES และ Testosterone	25 มิลลิกรัม 120 มิลลิกรัม	ฝังใต้ผิวหนัง	ลูกโค
Hexoestrol และ Trenbolone acetate	30-45 มิลลิกรัม 300 มิลลิกรัม	ฝังใต้ผิวหนัง	โคตอนตัวผู้

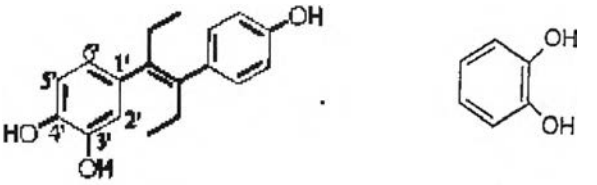
2.2 ความเป็นพิษของ DES และ Hexoestrol และการห้ามใช้ในปศุสัตว์

ในระยะแรกข้อมูลที่มีการรายงานถึงผลข้างเคียงและความเป็นพิษ ส่วนมากมักเป็นกรณีของ DES โดยในโคที่ได้รับ DES มักมีการเปลี่ยนแปลงทางพฤติกรรมและสรีรวิทยาเช่น การยกหางสูง (high tailheads) เต้านมขยายใหญ่ และมีพฤติกรรมคล้ายเป็นสัดตลอดเวลา นอกจากนี้ยังพบว่าคุณภาพซากโคที่ได้ลดลง เมื่อทำการชำแหละซากพบว่ากล้ามเนื้อของโคมีลักษณะสีคล้ำ (dark) และมีสัดส่วนของน้ำมากกว่าปกติ (Raun and Preston, 2002) จึงเกิดคำถามเกี่ยวกับความปลอดภัยของการใช้ DES ในปศุสัตว์ และมีความเป็นไปได้ที่จะมีอันตรายต่อผู้บริโภคเนื่องจาก DES ใช้เป็นยารักษาในคนโดยตรง และมีข้อมูลแสดงว่า DES อาจเกี่ยวข้องกับการทำให้เกิด Clear cell adenoma ของระบบสืบพันธ์ในผู้หญิงที่ได้รับ DES จึงทำให้เกิดความสงสัยในความปลอดภัยของการใช้สารนี้ (CDC, 2003) ในปี ค.ศ. 1972 องค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกาจึงได้ประกาศห้ามใช้ DES ชนิดผสมอาหาร และให้มีการหยุดยามากกว่า 120 วันสำหรับ DES ชนิดฝัง และต่อมาอีก 1 ปี จึงประกาศห้ามใช้ชนิดฝัง แต่ในปี ค.ศ. 1974 ได้มีการนำ DES มาใช้ในสหรัฐอเมริกาอีกครั้งโดยคำพิพากษาของศาลอุทธรณ์แห่งสหรัฐอเมริกา (United States Court of Appeal) ทำให้ประกาศของสำนักงานอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกาตกไป และให้มีการกำหนด Minimum detectable level แทน ในช่วงเวลาเดียวกันมีรายงานจากประเทศอิตาลีในปี ค.ศ. 1977 พบความผิดปกติของเด็กชายและเด็กหญิงที่เกิดลักษณะเต้านมขยายใหญ่ (breast

enlargement) ซึ่งจากข้อมูลทางระบาดวิทยาพบว่าสาเหตุของการเกิดลักษณะเต้านมขยายใหญ่ในเด็กเหล่านั้น น่าจะมาจากการปนเปื้อนสารหรือฮอร์โมนในกลุ่มเอสโตรเจนในอาหารที่ผลิตมาจากปศุสัตว์ (Fara *et al.*, 1979) ต่อมาในปี ค.ศ. 1979 เมื่อสำนักงานอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกาประกาศว่าเป็นไปไม่ได้ที่จะกำหนดค่า Minimum detectable level สำหรับสารที่มีแนวโน้มในการก่อมะเร็ง จึงได้มีการห้ามใช้ DES และอนุพันธ์ทุกชนิด ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ของสหรัฐอเมริกา (Raun and Preston, 2002) ขณะที่ประเทศในยุโรปห้ามใช้สารในกลุ่มนี้ในปี ค.ศ. 1981 (Wiener and Rogers, 2002) และในช่วงต้นทศวรรษที่ 80 ได้มีการรายงานข้อมูลที่สำคัญอันนำไปสู่การห้ามใช้สารกลุ่มนี้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทย คือ รายงานการเกิดภาวะการเจริญพันธุ์เร็วกว่าปกติในเด็กของประเทศเปอร์โตริโก อันเนื่องมาจากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อน DES (Carmen *et al.*, 1985)

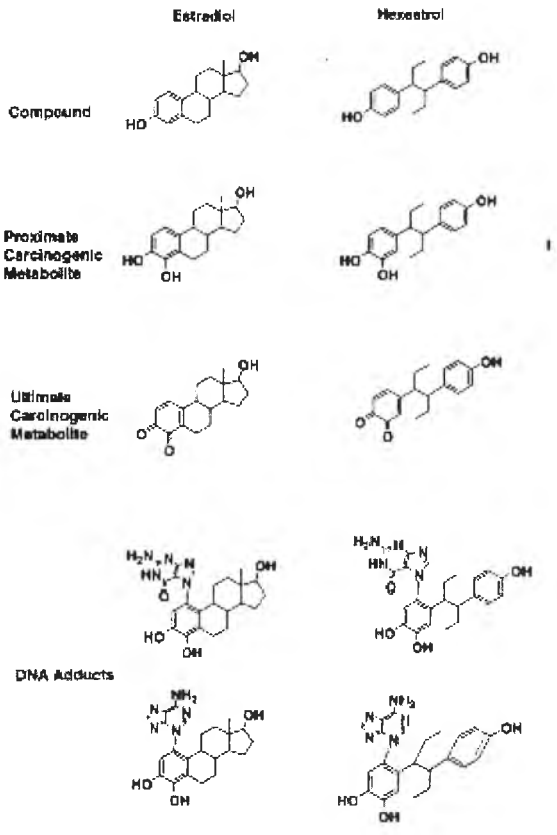
สถาบันวิจัยมะเร็งนานาชาติ (International Agency of Research on Cancer; IARC) ได้ประเมินความเป็นพิษของสารในกลุ่มนี้และจัดให้อยู่ในสารกลุ่มที่ 1 (Group 1: The agent is carcinogenic to humans) (IARC, 1987) โดยพบว่า DES ก่อให้เกิดมะเร็งที่เต้านม มดลูก รังไข่ และลำไส้ส่วนปลายในผู้หญิง มะเร็งที่ต่อมลูกหมากและอัณฑะในผู้ชาย ข้อมูลในสัตว์ทดลองพบว่า DES ก่อให้เกิดเนื้องอกของหนูไมซ์ (mice) หนูแรท (rat) แฮมสเตอร์ กบ ลิงกระรอก (squirrel monkeys) ในอวัยวะต่างๆ เช่น ปากมดลูก (cervix) ช่องคลอด (vagina) ปีกมดลูก (uterine) รังไข่ (ovary) เยื่อบุมดลูก (endometrium) และเต้านมในสัตว์เพศเมีย นอกจากนี้ยังพบว่า DES เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดเนื้องอกที่ตับและต่อมใต้สมอง (pituitary gland) ในหนูแรทเพศเมีย ส่วนในสัตว์เพศผู้พบมะเร็งของ Seminal vesicle, Cowper's gland และเนื้องอกที่ไตในหนูแฮมสเตอร์ จากการทดลองยังพบอีกว่า DES มีความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม (genotoxic) ในสัตว์ทดลอง (IARC, 1987) โดยจะทำให้เกิดการรบกวนการทำงานของ microtubule proteins ในการผลิตโครโมโซมสำหรับเซลล์รุ่นถัดไป ส่งผลให้จำนวนโครโมโซมผิดปกติ (aneuploidy) (Sakakibara *et al.*, 1990) การศึกษาทางระบาดวิทยาพบว่าผู้หญิงที่เกิดจากมารดาที่เคยได้รับ DES ในปริมาณสูงขณะตั้งครรภ์ จะมีอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งของระบบสืบพันธุ์มากกว่าปกติ (Wiseman and Halliwell, 1993) และมีข้อมูลแสดงให้เห็นว่าการได้รับ DES ในช่วงที่มีการพัฒนาของตัวอ่อน (embyo) จะทำให้ขบวนการสร้างอวัยวะต่างๆ (Organogenesis) ผิดปกติไป (Scientific committee on veterinary measures relating to public health, 1999) ในกรณีของ Hexoestrol ถึงแม้จะมีข้อมูลด้านความเป็นพิษไม่มากเท่ากับของ DES แต่ก็เพียงพอสำหรับการจัดเข้าเป็นสารกลุ่มที่ 1 เนื่องจากการออกฤทธิ์ของสารนี้ก็เหมือนกับ DES โดยพบว่า Hexoestrol ก่อให้เกิดมะเร็งและมีความผิดปกติของ DNA ที่ไตในหนูแฮมสเตอร์เพศผู้ (Liehr *et al.*, 1985) จากการทดลองพบ

ว่าเมตาบอไลท์สำคัญของ Hexoestrol ที่ก่อให้เกิดความผิดปกติในระดับโมเลกุลจนนำไปสู่การเกิดมะเร็งนั้น มีโครงสร้างคล้ายกับ Cathecols ของ Estradiol ซึ่งเป็นเมตาบอไลท์ที่ก่อให้เกิดมะเร็งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Cavalieri and Rogan, 2002)



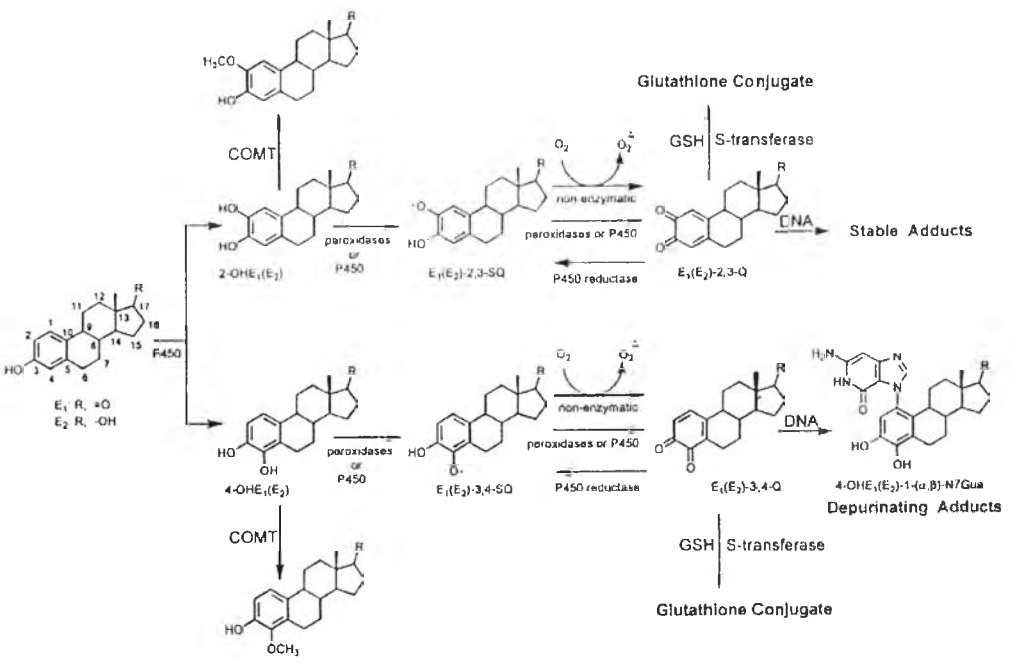
(a) (b)

รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของ 3′-OH-DES (a)
เปรียบเทียบกับ Cathecol (b)



รูปที่ 3 แสดงเมตาบอไลท์ที่สำคัญที่ก่อให้เกิดขบวนการ DNA adducts เปรียบเทียบระหว่าง Estradiol และ Hexoestrol (ดัดแปลงจาก Cavalieri and Rogan, 2002)

จากการทดลองพบว่า DES และ Hexoestrol สามารถที่จะให้เมตาบอไลท์ที่สำคัญคือ 3′-OH-DES และ 3′-OH-HES ตามลำดับ ซึ่งสารเหล่านี้จัดเป็น Proximate carcinogenic metabolite และมีความใกล้ชิดในแง่โครงสร้างจนอาจถือได้ว่าเป็นอนุพันธ์ของ Cathecols (รูปที่ 2) โดยทั่วไปแล้วเมื่อเกิดขบวนการออกซิเดชั่น Cathecols จะถูกเปลี่ยนไปเป็น Cathecol quinones ซึ่งเป็น Ultimate carcinogen metabolite ของการเกิดมะเร็ง โดยเมตาบอไลท์ดังกล่าวจะจับกับสารพันธุกรรม (carcinogen-DNA adducts) (รูปที่ 3 และ 4) แล้วก่อความเสียหายกับรหัสพันธุกรรม เมื่อมีความเสียหายเกิดขึ้นมากเกินกว่าที่ร่างกายจะซ่อมแซมได้ จะทำให้เกิดขบวนการ depurination ของกรดอะมิโน โดยเฉพาะที่ตำแหน่งของ Adenine และ Guanine เกิด apurinic sites ขึ้น นำไปสู่ขบวนการกลายพันธุ์ตามมา (mutation) และท้ายสุดจะก่อให้เกิดเนื้องอกหรือมะเร็ง คล้ายกับการเกิดขบวนการ DNA adducts ของเอสโตรเจน (รูปที่ 4) (Cavalieri *et al.*, 1997; Cavalieri and Rogan, 2002) นอกจากนี้ผลของเอสโตรเจนยังสามารถขยาย (amplified) Estrogen receptor protein (ER) กระตุ้นให้เกิดขบวนการ down-regulation ของ ER ชนิด α ซึ่งเป็น Mediated agent ที่ทำให้เกิด Biological activities ของเอสโตรเจนในเยื่อบุเซลล์โดยเฉพาะที่เต้านมได้ ซึ่งจากการตรวจวิเคราะห์ในระดับโมเลกุลพบว่า ผู้ป่วยมะเร็งเต้านมจะมี ERα เพิ่มมากขึ้นจากปกติ 5-10 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ดีกลไกการเกิดมะเร็งในส่วนนี้ยังไม่เป็นที่แน่ชัด (Ali and Coombes, 2000)



รูปที่ 4 ขบวนการเกิด DNA adducts ของเอสโตรเจน (Cavalieri *et al.*, 1997)

2.3 การตกค้างของ DES และ Hexoestrol

จากการศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์ของ DES ในหนู ลิง มนุษย์ สัตว์เคี้ยวเอื้อง โดยวิธี radiolabel ด้วย ^{14}C พบว่า รูปแบบการกระจายตัวของ DES จะมีสองส่วนหลักคือ ส่วนที่ถูกขับออกจากร่างกายในระยะเวลาอันสั้นกับส่วนที่ตกค้างในร่างกาย ส่วนที่ถูกขับออกจากร่างกายโดยมากอยู่ในรูปของ DES ของสารตั้งต้นที่ให้ (Botsoglou and Fletouris, 2001; Lone, 1997) โดยส่วนใหญ่จะผ่าน enterohepatic circulation และถูกกำจัดออกจากร่ายกายสัตว์ทางอุจจาระทั้งในรูปสารละลาย (soluble) และเกาะติดกับสารอื่น (conjugates) และบางส่วนจะถูกกำจัดออกทางปัสสาวะ โดยในอุจจาระจะพบ ^{14}C-DES เป็นหลักและอาจพบที่อยู่ในรูป 3-ρ-hydroxyphenyl-2-hexen-4-one และ ρ-hydroxy-propiophenone เล็กน้อย แสดงถึง DES บางส่วนถูกทำให้สลายตัว (degradation) ในระบบทางเดินอาหาร (Botsoglou and Fletouris, 2001; Lone, 1997) สำหรับส่วนที่ตกค้างอยู่ในร่างกายจะพบในช่วงระยะเวลาหนึ่งตามอวัยวะต่างๆ ทั้งในรูปของสารตั้งต้นและเมตาบอไลท์ จากการตรวจวิเคราะห์ DES ในเนื้อเยื่อของโคหลังจากการให้กิน DES 1 วันพบว่ามีการตกค้างของ DES อยู่ในอวัยวะต่างๆ รวมทั้งในกล้ามเนื้อประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์จากขนาดที่ให้เริ่มต้น อวัยวะที่มีการตกค้างสูงที่สุดคือไตและตับ (Botsoglou and Fletouris, 2001; Lone, 1997) (ตารางที่ 2) โดยมีความเข้มข้นของการตกค้างสูงกว่าการตกค้างในกล้ามเนื้อ ขณะที่

ตารางที่ 2 ปริมาณการตกค้างของ Hexoestrol ในอวัยวะของสัตว์ชนิดต่างๆ
(หน่วย: นาโนกรัมต่อกรัม) (Lone, 1997)

ชนิดสัตว์ (ขนาดที่ให้)	ระยะที่ให้ยา (วัน)	กล้ามเนื้อ	ตับ	ไต	ไขมัน
โค (36 มิลลิกรัม)[1]	90	0.03	0.1	0.5	-
แกะ (12 มิลลิกรัม)[1]	60	0.08	1.0	3.0	น้อยกว่า 0.05
แกะตัวผู้ตอน[2]	41	0.245	0.74	0.43	0.315
แกะตัวผู้ตอน[3]	41	0.1525	0.34	0.13	0.6425
สัตว์ปีก (12 มิลลิกรัม)[1]	44	0.5	6.2	-	1.27

[1] *ให้โดยวิธีการฝัง*

[2] *ให้โดยวิธีการฉีดและน้ำหนักสัตว์โดยเฉลี่ยที่ใช้ทดลองเท่ากับ 23.2 กิโลกรัม*

[3] *ให้โดยวิธีการฉีดและน้ำหนักสัตว์โดยเฉลี่ยที่ใช้ทดลองเท่ากับ 72.3 กิโลกรัม*

การให้ DES โดยวิธีการฝังใต้ผิวหนังพบว่ามีการตกค้างสูงสุดที่ตำแหน่งกล้ามเนื้อส่วนคอซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีการฝังสารหรือฮอร์โมน และจะพบการตกค้างลดลงตามลำดับเมื่อนำกล้ามเนื้อในตำแหน่งที่ห่างจากตำแหน่งที่ฝังมาทำการตรวจวิเคราะห์ (Lone, 1997) Herriman และคณะ (1982) ได้ทดลองให้ Hexoestrol ในไก่ชนิดฝังขนาด 12 มิลลิกรัมต่อตัว จากนั้นนำมาวิเคราะห์การตกค้างหลังจากทดลอง 44 วัน พบระดับการตกค้างของ Hexoestrol ที่กล้ามเนื้อคอ ตับ กล้ามเนื้อหน้าอก กล้ามเนื้อขาในระดับ 0.584, 0.062, 0.005 และ 0.004 นาโนกรัมต่อกรัม และจากการศึกษาในสัตว์ปีกพบว่าการให้ DES โดยวิธีการกินตรวจวิเคราะห์ไม่พบการตกค้างของ DES ขณะที่การให้โดยวิธีการฝังพบการตกค้างอยู่ในกล้ามเนื้อนานถึง 3 เดือน ในไก่จะพบการตกค้างในร่างกายสูงที่สุดเมื่อเทียบกับสัตว์ชนิดอื่น เนื่องจากขนาดของ Hexoestrol ที่ให้จะมีความเข้มข้นต่อน้ำหนักตัวไก่มากที่สุด โดยทั่วไปแล้วกล้ามเนื้อจะมีปริมาณการตกค้างโดยเฉลี่ยน้อยที่สุด และอยู่ในรูป free Hexoestrol ขณะที่การตกค้างในตับและไตจะอยู่ในรูป Hexoestrol glucuronide เป็นส่วนใหญ่ (Lone, 1997)

2.4 สถานภาพการใช้และการควบคุม DES และ Hexoestrol ในประเทศไทย

จากการที่รัฐบาลได้ตระหนักถึงความเป็นพิษและอันตรายของ DES และ Hexoestrol ตามที่ได้กล่าวมาข้างต้น ทำให้พระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2525 กำหนดให้ DES เป็นวัตถุที่ห้ามใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารสัตว์ และเป็นเภสัชเคมีภัณฑ์ที่ต้องขออนุญาตในการนำเข้ามาในราชอาณาจักรและห้ามมิให้ผู้ใดนำเข้า เว้นแต่จะได้รับอนุญาตจากรัฐมนตรีว่าการกระทรวงพาณิชย์หรือผู้ซึ่งรัฐมนตรีว่าการกระทรวงพาณิชย์มอบหมาย ตามประกาศกระทรวงพาณิชย์ เรื่อง การนำยา เภสัชเคมีภัณฑ์ และเภสัชเคมีภัณฑ์กึ่งสำเร็จรูปเข้ามาในราชอาณาจักร พ.ศ. 2545 สำหรับ Hexoestrol โดยคำสั่งกระทรวงสาธารณสุขได้มีการห้ามใช้ในการเลี้ยงสัตว์ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2529 อย่างไรก็ตามในการเลี้ยงไก่ระดับอุตสาหกรรมรายย่อยเพื่อผลิตไก่ตอนบางแห่งยังมีการลักลอบใช้ Hexoestrol กันอยู่ (ประเทือง สุดสาคร, ติดต่อส่วนตัว) จากการสำรวจข้อมูลจากผู้เลี้ยงไก่พบว่า ขนาดปริมาณของตัวยา Hexoestrol ที่เกษตรกรใช้ในการผลิตไก่ในประเทศคือ 15-30 มิลลิกรัมต่อตัว ซึ่งเป็นระดับที่สูงกว่าการใช้ในต่างประเทศในอดีตที่นิยมใช้ชนิดเม็ดแบบฝัง เริ่มทำการฝังเมื่อไก่อายุ 40-50 วัน โดยทำการฝังใต้ผิวหนังเพียงครั้งเดียวบริเวณด้านหลังลำคอไก่หรือปีกไก่ด้านล่าง ระยะเวลาที่ให้ก่อนส่งชำแหละคือ 14-45 วัน ให้ได้ทั้งตัวผู้และตัวเมีย สามารถใช้ไก่ได้หลายพันธุ์แต่ที่นิยมคือไก่เนื้อพันธุ์สามสาย ขณะที่ DES ถึงแม้จะไม่มีข้อมูลยืนยันถึงการนำมาใช้ในการเร่งการเจริญเติบโตในไก่ แต่ก็มีความเป็นไปได้เช่นกันอาจจะพบการนำ DES มาประยุกต์ใช้แทน Hexoestrol ในขั้นตอนของการเลี้ยง จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้

เห็นว่าคนไทยที่ยังมีความเสี่ยงต่อการได้รับสารตกค้างเหล่านี้ และนำไปสู่การเกิดมะเร็งจากการบริโภคไก่ที่ผลิตในลักษณะดังกล่าว

2.5 วิธีวิเคราะห์การตกค้างของ DES และ Hexoestrol

เนื่องจากการตรวจวิเคราะห์หา DES และ Hexoestrol ยังไม่มีวิธีที่เป็นมาตรฐาน จึงมีการพัฒนาการตรวจสอบด้วยวิธีต่างๆ ขึ้นมา เพื่อตรวจหาระดับการตกค้างของ DES และ/หรือ Hexoestrol รวมทั้งสารและฮอร์โมนในกลุ่มใกล้เคียงกันในอวัยวะและสิ่งคัดหลั่งของสัตว์ โดยส่วนใหญ่การตรวจวิเคราะห์สารตกค้างในกลุ่มนี้อาจอยู่ในรูปการตรวจสารที่สงสัยเพียงชนิดเดียวหรือหลายๆ ชนิดพร้อมกัน

2.4.1 วิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางจุลกายวิภาคศาสตร์ (Histological method)

เป็นวิธีวิเคราะห์ทางอ้อม อาศัยหลักการการตอบสนองของร่างกายเมื่อได้รับฮอร์โมนหรือสารที่ออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมน และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ของสัตว์ จากการทดลองในโคและลูกโค พบว่าสัตว์ที่ได้รับ DES, Zeranol และ Hexoestrol จะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อของต่อมลูกหมากและต่อมบัลโบยูเรทอล (bulbo-urethal glands) ในสัตว์เพศผู้และเกิดการเปลี่ยนแปลงของปากมดลูก ช่องคลอด เต้านม ต่อมบาร์โทลิน (glands of Bartholin) ในสัตว์เพศเมีย อย่างไรก็ตามวิธีวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ไม่เป็นที่แพร่หลายมากนักเนื่องจากความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ต่ำ (Ferrando, 1980)

2.4.2 วิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางชีวภาพ (biological method)

เป็นวิธีวิเคราะห์ทางอ้อมเช่นเดียวกับวิธีแรก โดยอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักของมดลูกสัตว์ก่อนและหลังจากที่ได้รับฮอร์โมนหรือสารในกลุ่มเอสโตรเจน (Ferrando, 1980) จากการทดลองให้ Hexoestrol ในหนูแรทเพศเมีย ขนาด 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน เป็นเวลา 4 วันพบว่าน้ำหนักของมดลูกเพิ่มขึ้น 49 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยคาดว่าการที่น้ำหนักของมดลูกเพิ่มขึ้นน่าจะมาจากการเกิดภาวะ luminal epithelium hypertrophy and hyperplasia, myometrial hypertrophy และ stromal hypertrophy and oedema (Hart, 1990) อย่างไรก็ตามวิธีนี้ไม่เป็นที่แพร่หลายมากนัก เนื่องจากความจำเพาะต่ำและไม่สามารถวัดการตกค้างในเชิงปริมาณ (quantity) ได้

2.4.3 วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunological methods)

เป็นวิธีที่ส่วนมากพัฒนามาในรูปแบบของชุดทดสอบสำเร็จรูปและใช้เพื่อตรวจวิเคราะห์ในแบบคัดกรอง (screening test) ประกอบด้วย

2.4.3.1 วิธี Radio-immunoassay (RIA)

เป็นวิธีแรกของวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยาที่ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อตรวจวิเคราะห์หาสารในกลุ่ม Stilbenes โดยใช้แอนติ้บอดี้ที่จำเพาะต่อสารในกลุ่มนี้เคลือบที่วัสดุของชุดทดสอบและใช้เอนติเจนที่ติดฉลาก (label) ด้วยสารกัมมันตภาพรังสี เช่น tritium หรือ ^{3}H รวมทั้งเอนติเจนที่ไม่ติดฉลากเป็นตัวบ่งชี้ในการยึดเกาะกับสารที่ต้องการหาในตัวอย่าง จัดเป็นวิธีที่มีความไวสูงมี Limit of Detection[1] (LOD) ได้ที่ระดับ 0.05 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ DES และ 0.04 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ Hexoestrol (Ferrando, 1980) (ตารางที่ 3) จากการทดลองตรวจวิเคราะห์หา DES ในปัสสาวะโคพบว่าค่า LOD เป็น 0.23 ไมโครกรัมต่อลิตร และมี Limit of Quantitation[2] (LOQ) เป็น 0.38 ไมโครกรัมต่อลิตร (Heitzman, 1994) Herriman และคณะ (1982) ได้ใช้วิธี RIA ในการตรวจหาระดับการตกค้างของ Hexoestrol ในเนื้อไก่พบว่าให้ผลการวิเคราะห์ที่ดี อย่างไรก็ดีเนื่องจากขั้นตอนการวิเคราะห์ส่วนหนึ่งใช้กัมมันตภาพรังสี ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อผู้วิเคราะห์ได้ ประกอบกับประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ยังไม่ดีนักในแง่ของความคงตัวของเอนติเจนที่ติดฉลาก ความช้าของวิธีการวัดปริมาณที่ตกค้างซึ่งต้องอาศัยขบวนการไตเตรทสารบ่งชี้ (tritiated markers) (Degand *et al.*, 1989) ภายหลังจึงมีวิธีวิเคราะห์อื่นที่มีความปลอดภัยมากกว่าขึ้นมาทดแทน

2.4.3.2 วิธี Enzyme-immunoassay (EIA) หรือวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

เป็นวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาเพื่อทดแทนวิธี RIA ซึ่งใช้หลักในการหาสารตกค้างเช่นเดียวกัน แตกต่างกันที่วิธีนี้ใช้เอนไซม์ในการจับกับเอนติเจนแทนที่ของกัมมันตภาพรังสี เอนไซม์ที่ใช้ได้แก่ urea peroxide, tetramethylbenzidine, horseradish peroxidase หรือ *Bacillus licheniformis* β-lactamase เป็นต้น Meyer และ Hoffmann (1987)

[1] *Limit of Detection หมายถึง ปริมาณของสารที่มีอยู่ในตัวอย่างที่สามารถวัด*

[2] *Limit of Quantitation หมายถึง ปริมาณของสารที่มีอยู่ในตัวอย่างที่สามารถวัดได้ โดยมีความถูกต้องและแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ในทางสถิติ*

(Meyer and Hoffmann, 1987 cited in Degand *et al.*, 1989) รายงานการใช้วิธี EIA ในการวิเคราะห์หา DES ในปัสสาวะโค พบว่าความไวของวิธีนี้ให้ผลใกล้เคียงกับการวิธีวิเคราะห์ด้วย RIA โดยมี LOD เป็น 0.5 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร อัตราการคืนกลับของสาร (recovery rate) เท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ และสามารถลดปัญหาการรบกวนการวิเคราะห์อันเนื่องมากจากความหลากหลายของชนิดตัวอย่าง (biological matrix) ได้ดีกว่า อย่างไรก็ดีความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ยังไม่เป็นที่น่าพอใจนัก ในระยะหลังวิธี EIA มักจะถูกเรียก ELISA แทน ได้มีการพัฒนาเทคนิคเพื่อเพิ่มความไวและความจำเพาะให้มากขึ้น ซึ่งจะอาศัยหลักการในการตรวจวิเคราะห์หาแอนติเจนในตัวอย่าง โดยเคลือบแอนตี้บอดี้ที่จำเพาะต่อสารกลุ่ม Stilbenes ไว้ที่ microtitre plate เมื่อทำการวิเคราะห์ แอนติเจนที่ต้องการหาในตัวอย่างจะยึดเกาะกับแอนตี้บอดี้ จากนั้นทำการเติมเอนไซม์ที่ติดฉลากเพื่อทำการยึดเกาะกับแอนติเจนและใส่สาร substrate เพื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ ปฏิกิริยาดังกล่าวจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ Sawaya และคณะ (1998) ได้ใช้ชุดทดสอบ Ridascreen® ELISA kit ซึ่งใช้วิธี competitive ELISA ในการตรวจหา DES ที่ตกค้างในเนื้อไก่ ปัสสาวะแพะ ในประเทศคูเวต พบว่า LOD เป็น 0.2 และ 0.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร อัตราการคืนกลับของสารเป็น 68 และ 90 เปอร์เซ็นต์ในเนื้อไก่และปัสสาวะแพะตามลำดับ โดยชุดตรวจสอบดังกล่าวมีเปอร์เซ็นต์ Cross-reactivity ต่อสาร DES, Hexoestrol และ Dienestrol เป็น 100, 22 และ 8 ตามลำดับ นอกจากนี้จากข้อมูลของบริษัท Randox Laboratories ประเทศสหราชอาณาจักร พบว่าชุดทดสอบ Stilbene ELISA® ให้เปอร์เซ็นต์ Cross-reactivity ต่อ Hexoestrol 100 เปอร์เซ็นต์ และมี LOD ของ Hexoestrol เท่ากับ 0.25 นาโนกรัมต่อกรัม[1] สำหรับการตรวจวิเคราะห์ในเนื้อเยื่อสัตว์ (Randox, personal communication) อย่างไรก็ดีจากการสืบค้นข้อมูลไม่ปรากฏรายงานการใช้ชุดทดสอบนี้ในวารสารทางวิชาการ และข้อจำกัดของวิธีวิเคราะห์ด้วย ELISA อีกประการหนึ่งคือค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ที่ค่อนข้างสูง ทำให้ไม่สามารถนำวิธีดังกล่าวมาใช้ในประเทศไทยได้อย่างเหมาะสม

2.4.3.3 วิธี Chemiluminescence immunoassay (CLIA)

เป็นวิธีที่พัฒนามาเพื่อตรวจวิเคราะห์หา 19-nortestosterone และ 17α-methyltestosterone (Degand *et al.*, 1989) ในเนื้อเยื่อและปัสสาวะโค อาศัยหลักการเช่นเดียวกับวิธี RIA และ EIA แตกต่างกันที่ใช้สารเรืองแสง (chemiluminescence) เป็นวัสดุติดฉลาก อย่างไรก็ตามวิธีนี้ไม่เป็นที่นิยมมากนัก อีกทั้งไม่ปรากฏ

[1] *แหล่งที่มา: E-Mail: Lynsey.Smith@randox.com*

ข้อมูลในการพัฒนาเทคนิคนี้ในการวิเคราะห์การตกค้างของ DES และ Hexoestrol ในเนื้อเยื่อหรือสิ่งคัดหลั่งจากสัตว์

2.4.4. วิธีทางเคมีกายภาพ (physicochemical methods)

เป็นวิธีวิเคราะห์ที่มักใช้เพื่อยืนยันผลการวิเคราะห์จากการตรวจแบบคัดกรอง ใช้หลักการทางโครมาโทรกราฟฟี่ (chromatography) เป็นหลัก โดยอาศัยความแตกต่างของการกระจายตัวของสารตัวอย่างระหว่างเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) กับเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ประกอบด้วย

2.4.4.1 วิธี Thin-Layer Liquidchromatography (TLC) และ High Performance Thin-Liquid Chromatography (HPTLC)

TLC และ HPTLC จัดเป็นวิธีทาง Chromatography ชนิดแผ่น (planar chromatogrophy) ทั้งสองวิธีมีความแตกต่างกันที่วัสดุใช้เคลือบบนเฟสเคลื่อนที่ โดย HPTLC จะใช้วัสดุที่มีความละเอียดในการแยกสารตัวอย่างที่สูงกว่า สามารถใช้ตรวจวิเคราะห์ในเชิงคุณภาพเพื่อตรวจวิเคราะห์การตกค้างของสารและยาในกลุ่มสเตียรอยด์ Verbeke (1979) ได้ทดลองใช้ TLC เพื่อตรวจวิเคราะห์หาการตกค้างของ DES ในปัสสาวะและกล้ามเนื้อโคจากโรงฆ่าสัตว์ พบว่ามี LOD ของ DES และ Hexoestrol เป็น 0.5 และ 2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ Nascimento และคณะ (1996) ใช้ HPTLC ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณของตัวยา DES และ Hexoestrol พบว่า LOD มีค่าเท่ากับ 20 นาโนกรัม อย่างไรก็ดีวิธี TLC และ HPTLC ยังมีข้อจำกัดในด้านขั้นตอนของการทำสารให้บริสุทธิ์ (purification) ในห้องปฏิบัติการ (Casademont *et al.*, 1996) และจำเป็นต้องใช้เครื่อง densitometer ประกอบ หากต้องการวิเคราะห์หาปริมาณสาร

2.4.4.2 วิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

เป็นวิธีที่มีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง เพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์การตกค้างของสารกลุ่ม Stilbenes และสารอื่นในกลุ่มที่ใกล้เคียงกัน Jansen และคณะ (1985) ทำการทดลองโดยใช้ HPLC พร้อม Ultraviolet-Visible (UV) detector เพื่อวิเคราะห์ DES ในปัสสาวะโค พบว่าเป็นวิธีที่เหมาะสมในการใช้เป็นวิธีวิเคราะห์แบบคัดกรองที่ต้องการการวิเคราะห์เป็นจำนวนมาก Reuvers และคณะ (1991) ใช้วิธี HPLC แบบ Reverse phase พร้อม

Electrochemical detector (ED) ในการตรวจหา DES ในเนื้อโค พบว่า LOD มีค่าเท่ากับ 0.1-0.2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีอัตราการคืนกลับของสารเป็น 68 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ขณะที่ Nascimento และคณะ (1996) ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างยา DES และ Hexoestrol ทั้งชนิดเม็ดและชนิดสารสะลายในรูปสื่อน้ำมัน ด้วยวิธี HPLC แบบ Isocratic-reverse phase พร้อม Diode-array detector (DAD) ที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตรสำหรับ DES และที่ความยาวคลื่น 240 นาโนเมตรสำหรับ Hexoestrol ได้ค่า LOD ของ DES และ Hexoestrol เป็น 0.20 และ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และค่า LOQ ของ DES และ Hexoestrol เป็น 0.40 และ 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ มีอัตราการคืนกลับของสารโดยเฉลี่ยเป็น 90.5 เปอร์เซ็นต์ Sadex และคณะ (1995) (1998) ได้ใช้ HPLC แบบ reverse phase ในการวิเคราะห์หาปริมาณของ 17β-estradiol, trenbolone acetate, zeranol และ DES ในเนื้อและตับไก่ ซึ่งให้ผลในการวิเคราะห์ในระดับที่น่าพอใจ นอกจากนี้ Koole และคณะ (1999) ได้ทดลองหาสภาวะของเครื่อง HPLC พร้อม DAD เพื่อวิเคราะห์สารในกลุ่ม Anabolic hormone จำนวน 21 ชนิด รวมทั้ง DES และ Hexoestrol ในปัสสาวะลูกโค พบว่าสภาวะของเครื่อง HPLC ที่เหมาะสมในการตรวจหา DES และ Hexoestrol ประกอบไปด้วยการใช้คอลัมน์ชนิด Reverse phase ที่ความยาวคลื่น 242 นาโนเมตรสำหรับ DES และ 230 นาโนเมตรสำหรับ Hexoestrol ได้ค่า LOD ของสารทั้งสองชนิดที่ 0.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ซึ่งมีแนวโน้มที่ดีในการพัฒนาวิธีนี้เพื่อตรวจวิเคราะห์สารตกค้างในกลุ่มฮอร์โมนแอนาบอลิก โดยเฉพาะในกรณีการตรวจเพื่อเฝ้าระวังสารหลายๆ ชนิด (multi-residue analysis) (Koole *et al.*, 1999)

2.4.4.3 วิธี Gas Chromatography (GC)

เป็นวิธีที่ AOAC international แนะนำให้ใช้ร่วมกับ Mass spectrometry (MS) เพื่อตรวจวิเคราะห์แบบยืนยันผลการตกค้างของสารในกลุ่ม Stilbenes มีความไวและความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์สูง ในระยะแรก Stan และ Abraham (1980) ทำการศึกษาการตกค้างของ 17β-estradiol, DES, hexoestrol, dienoestrol, stilbestrol, ethynylestradiol และ zeranol ในเนื้อสัตว์ร่วมกับการทำ Derivatization พบว่าค่า LOD ของสารในกลุ่ม Stilbenes มีค่าเป็น 1 นาโนกรัมต่อกรัม ขณะที่ Bagnati และคณะ (1990) ทำการศึกษาเพื่อวิเคราะห์หา DES, dienoestrol และ Hexoestrol ในพลาสมาและปัสสาวะโคพบว่า LOD มีค่าเท่ากับ 10-100 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของไอออน (Ion) ที่ใช้ในการวิเคราะห์ และมีอัตราการคืนกลับของสารเท่ากับ 28-96 เปอร์เซ็นต์ ต่อมาได้มีการใช้วิธี GC-MS ในการตรวจวิเคราะห์การตกค้างของสารในกลุ่ม Stilbenes และ Anabolic hormone ในปัสสาวะโคและแกะ

ตับ กล้ามเนื้อ ของไก่ แกะ และโค ร่วมกับการทำ Derivatization พบว่าค่า LOD อยู่ในช่วง 5-100 นาโนกรัมต่อกิโลกรัม (Casademont *et al.*, 1996; Heitzman, 1994; Marchand *et al.*, 2000; Sawaya *et al.*, 1998) อย่างไรก็ดีการใช้วิธี GC-MS ยังมีข้อจำกัดในด้านเครื่องมือ และบุคลากรในการวิเคราะห์ เนื่องจากเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์มีราคาและต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญสูง เมื่อเทียบกับวิธีวิเคราะห์ชนิดอื่น

2.4.4.4 วิธี Liquid Chromatography (LC)

Maria และ Barcelo (2001) ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ DES และสารในกลุ่มฮอร์โมนแอนาบอลิกด้วย Liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry (LC-DAD-MS) เพื่อตรวจหาระดับการตกค้างในน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติ พบว่าวิธีวิเคราะห์มีค่า LOD เป็น 10-20 นาโนกรัมต่อลิตร และมีอัตราการคืนกลับของสารเป็น 96-111 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ดีวิธีนี้ยังไม่มีการพัฒนาเพื่อนำมาตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างที่ได้จากสัตว์

2.4.5 การผสานวิธีเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ (combination methods)

เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ จึงมีการนำวิธีวิเคราะห์ข้างต้นมาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาสารในกลุ่ม Stilbenes Heitzman และคณะ (1994) ทำการรวบรวมเอกสารเกี่ยวกับวิธีวิเคราะห์พบว่าวิธี HPLC-HPTLC ถูกนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารในกลุ่มแอนาบอลิกในไขมันหุ้มไต (perirenal fat) มีค่า LOD เป็น 1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ขณะที่การใช้วิธี HPLC-RIA ในการตรวจวิเคราะห์ DES, Hexoestrol และ Dienestrol ในเนื้อเยื่อสัตว์ พบค่า LOD เป็น 0.1-1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม อย่างไรก็ดีการผสานวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวทำให้ขั้นตอนในการวิเคราะห์มีความซับซ้อนเพิ่มมากขึ้น

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์การตกค้างของ DES และ Hexoestrol ที่สำคัญในเนื้อเยื่อจากสัตว์

วิธีวิเคราะห์	ชนิดสาร	ชนิดสัตว์และเนื้อเยื่อที่วิเคราะห์	LOD	ข้อดี	ข้อเสีย	อ้างอิง
RIA	DES	โค; ปัสสาวะ	0.05 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (พีพีบี)	ความไวสูง	ความจำเพาะต่ำ	Degand *et al.*, 1989;
	Hexoestrol	โค; ปัสสาวะ	0.04 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (พีพีบี)		อันตราย	Heitzman, 1994;
		ไก่; กล้ามเนื้อ ตับ ไขมัน			ใช้เวลานาน	Herriman *et al.*, 1982
EIA/ELISA	DES และ	โค; ปัสสาวะ กล้ามเนื้อ	0.2 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (พีพีบี)	ง่าย วิธีไม่ซับซ้อน	ชุดทดสอบราคาสูง	Meyer and Hoffmann 1987;
	Hexoestrol	แพะ; ปัสสาวะ		ความไวสูง		Lone, 1997
		ไก่; กล้ามเนื้อ				Sawaya *et al.*, 1998
TLC	DES	โค; ปัสสาวะ กล้ามเนื้อ	0.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (พีพีบี)	ความจำเพาะสูง	ยุ่งยากต้องใช้	Verbeke, 1979
					Densitometer	
					ในการหาปริมาณ	
HPLC	DES	โค; กล้ามเนื้อ ปัสสาวะ	0.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (พีพีบี)	ไม่ยุ่งยาก	ความไวต่ำ	Reuvers *et al.*, 1991
	Hexoestrol	โค; ปัสสาวะ	0.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (พีพีเอ็ม)	ความจำเพาะสูง		Koole *et al.*, 1999
GC-MS	DES และ	โค แกะ; ปัสสาวะ	10 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร (พีพีที)	ความไวสูง	วิธีวิเคราะห์ยุ่งยาก	Bagnati *et al.*, 1990
	Hexoestrol	โค ไก่; ตับ กล้ามเนื้อ		ความจำเพาะสูง	ค่าใช้จ่ายสูง	Casademont *et al.*, 1996