



รายงานการวิจัย

โครงการส่งเสริมการทำงานวิจัยเชิงลึกในสาขาวิชาที่มีศักยภาพสูง

โครงการนำร่องการพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารเติมแต่ง สารปนเปื้อน สาร
ตกค้าง สารสำคัญในอาหารและผลิตภัณฑ์การเกษตร

**Preprimary Research on the Development of Determination Techniques for Efficient
Analyses of Additives, Contaminants, Nutrients, Residues in Food and Agricultural
Products**

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐชนันท์ ลิพิพัฒนไพบุลย์ (หัวหน้าโครงการ)

รองศาสตราจารย์ ดร.ชรรมนุญ หนูจักร

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ มล.ศิริพัสตร์ ไชยันต์

อาจารย์ ดร.ลักขณา คูบาส

อาจารย์ ดร.มนพิชา ศรีสะอาด

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	i
สารบัญรูป	iv
สารบัญตาราง	vi
สัญลักษณ์และคำย่อ	vii
บทคัดย่อภาษาไทย	xi
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	xii
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มา ปัญหา และความสำคัญ	1
1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	2
1.3 วัตถุประสงค์ของ โครงการ	3
1.4 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
1.5 ขอบเขตการวิจัย	4
1.6 วิธีการดำเนินงานวิจัย	5
1.7 ประโยชน์ที่ได้รับจาก โครงการงานวิจัยนําร่อง	5
1.8 เอกสารอ้างอิง	6
บทที่ 2 การวิเคราะห์สารกลุ่มยาเสพติดคํ้างหลายชนิดพร้อมกัน ในเนื้อไก่ด้วยอํานตรกิริยาแบบไฮโดรฟิลิกลิควิดโครมาโทกราฟีเชื่อมกับแทนเดมแมสสเปกโทรเมตรี	
2.1 บทนำ	7
2.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย	8
2.3 การทดลอง	11
2.3.1 สารเคมีที่ใช้	11
2.3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน	12
2.3.3 เครื่องมือที่ใช้และสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์	12
2.3.4 การเตรียมตัวอย่าง	13
2.3.5 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี	14
2.4 ผลของการวิจัยและการวิจารณ์การทดลอง	15
2.4.1 ภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดด้วย HILIC-ESI-MS/MS	15
2.4.2 ภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่าง	18

	หน้า
2.4.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการ	20
2.4.3.1 การบ่งชี้สาร (Identification)	20
2.4.3.2 ค่าการเลือกจำเพาะ (Selectivity or Specificity)	21
2.4.3.3 ผลของเมทริกซ์	21
2.4.3.4 ความเป็นเส้นตรง (Linearity)	21
2.4.3.5 ค่าร้อยละการคืนกลับ (Recovery)	24
2.4.3.6 ความเที่ยง (precision)	25
2.4.3.7 ขีดจำกัดการวิเคราะห์ (Analytical Limit)	25
2.4.4 การประยุกต์ใช้กับตัวอย่างจริง	28
2.5 สรุปผลของการวิจัย	28
2.6 เอกสารอ้างอิง	29
บทที่ 3 การวิเคราะห์แบบพร้อมกันของสารปฏิชีวนะหลายกลุ่มที่ตกค้างในน้ำด้วยการ สกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพาและตรวจวัด ด้วยเทคนิค โครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูงมาก-แทนเคมเมสสเปกโทรเมตรี	
3.1 บทนำ	31
3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย	33
3.2.1 สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้	33
3.2.2 วิธีการเตรียมสารมาตรฐาน	33
3.3 ระบบการตรวจวัดด้วยเครื่องมือ	34
3.4 ขั้นตอนของเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวง	34
3.5 ผลการวิจัย อภิปรายและวิจารณ์ผลการทดลอง	39
3.5.1 ผลของเวลาที่ใช้ในการจุ่มเส้นใยกลวงที่มีต่อการเพิ่มความเข้มข้น ของสาร	39
3.5.2 ผลของสารตัวพาและการเลือกตัวทำละลาย	40
3.5.3 ผลของสารละลายตัวให้และสารละลายตัวรับ	41
3.5.4 ผลของเวลาที่ใช้ในการสกัด	44
3.6 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการ	46
3.7 การใช้เทคนิคการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดย ใช้สารตัวพาในการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำ	47

	หน้า	
3.8	สรุปและข้อเสนอแนะ	49
3.9	เอกสารอ้างอิง	50
บทที่ 4	แบบจำลองเชิงทฤษฎีของการแยกแบบจำเพาะสำหรับสารประกอบที่มีประจุใน ไมเซลล์าร์อีเล็กโทรโครมาโทกราฟี	
4.1	บทนำ	54
4.2	การทดลอง	56
4.2.1	เครื่องมือ	56
4.2.2	สารเคมี	56
4.2.3	การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Capillary Electrophoresis (CE)	56
4.2.4	การเตรียมบัฟเฟอร์	57
4.2.5	การเตรียมสารทดสอบ	57
4.3	ผลและวิเคราะห์ผลการทดลอง	57
4.3.1	แบบจำลองทางทฤษฎี ของ separation selectivity ใน MEKC สำหรับสารที่มีประจุ	57
4.3.2	ค่า α_{MEKC} ที่ได้จากการทดลองและค่าที่ได้จากการทำนายสำหรับ สารที่มีประจุลบใน MEKC ภายใต้ภาวะ normal elution mode โดย ใช้สารลดแรงตึงผิวเป็น SDS ซึ่งมีประจุลบ	61
4.4	สรุปผลการทดลอง	64
4.5	เอกสารอ้างอิง	65
	กิตติกรรมประกาศ	69
	ภาคผนวก	
	สรุปผลงานตีพิมพ์ภายใต้ทุนวิจัยโครงการนำร่อง	70
	เอกสารแนบท้าย	
	ประวัติผู้วิจัย	71
	หัวหน้าโครงการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐชนน ลิขิตพัฒน์ไพบูลย์	
	ประวัติผู้วิจัยร่วม รองศาสตราจารย์ ดร.ธรรมนุญ หนูจักร	75
	ประวัติผู้วิจัยร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ มล.ศิริพัศตร์ ไชยันต์	79
	ประวัติผู้วิจัยร่วม อาจารย์ ดร.ลักขณา คูบาส	81
	ประวัติผู้วิจัยร่วม อาจารย์ ดร.มนพิชา ศรีสะอาด	83
	เอกสารแนบท้าย ผลงานตีพิมพ์ฉบับที่ 1	
	เอกสารแนบท้าย ผลงานตีพิมพ์ฉบับที่ 2	
	เอกสารแนบท้าย ผลงานตีพิมพ์ฉบับที่ 3	

สารบัญรูป

	หน้า	
รูปที่ 2.1	ชื่อและโครงสร้างทางเคมีของยาสัตว์ 24 ชนิดที่ศึกษาในงานวิจัยนี้	9
รูปที่ 2.2	แผนผังการสกัดตัวอย่างเนื้อไก่อก่อนการวิเคราะห์	14
รูปที่ 2.3	การเปรียบเทียบสเปกโทรและรูปร่างพีกของสาร amprolium และ spiramycin	17
รูปที่ 2.4	อิทธิพลของความเข้มข้นของ TCA ที่มีต่อค่าร้อยละการคืนกลับที่ระดับความเข้มข้น MRL ของยาสัตว์ทั้ง 24 ชนิด	19
รูปที่ 2.5	ภาพโครมาโทแกรมเปรียบเทียบความแรงของตัวทำละลายที่มีผลต่อการแยกสาร lincomycin (LIN) และ pyrilimycin (PIR) ที่ระดับความเข้มข้น MRL	22
รูปที่ 2.6	ผลของเมทริกซ์ในการตรวจวัดด้วยเทคนิค LC-MS/MS แสดงค่าเปรียบเทียบร้อยละของความแตกต่างของสัญญาณการตอบสนองกรณีสารมาตรฐานอยู่ในตัวทำละลายเทียบกับกรณีสารมาตรฐานอยู่ในสารละลายสกัดเมทริกซ์ที่ระดับความเข้มข้น MRL ของสารทุกชนิดที่ทำการตรวจวัด	24
รูปที่ 3.1	ผลของเวลาที่ใช้ในการจุ่มเส้นใยกลวงในตัวทำละลายที่มีต่อการเพิ่มความเข้มข้นของสาร	39
รูปที่ 3.2	ผลของตัวทำละลายชนิดต่างๆแบบไม่มีสารตัวพาที่มีต่อการเพิ่มความเข้มข้นของสาร	42
รูปที่ 3.3	ผลของปริมาณสารตัวพาใน DHE ที่มีต่อการเพิ่มความเข้มข้นของสาร	43
รูปที่ 3.4	โครมาโทแกรมของสารปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิดจากเครื่องโครมาโทกราฟชนิดของเหลวสมรรถนะสูงมาก-เทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี ผ่านการสกัดด้วยเทคนิคสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพา	49
รูปที่ 4.1	แบบจำลองทางทฤษฎีของ α_{MEKC} ที่ได้จากการทำนายสำหรับสารที่มีประจุสองตัว กำหนด โดยใช้สมการที่ 4.7	60

	หน้า	
รูปที่ 4.2	อิเล็กโทรฟีโรแกรมของพาราเบนภายใต้ภาวะ (a) 0 CZE, (b) 20, (c) 40, และ 60 mM SDS ใน 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ที่ปรับ pH ด้วย 1.0 NaOH ภาวะอื่น ๆ ของ CE: uncoated fused-silica capillary 50 μm i.d. \times 40.2 cm (30 cm ถึงเครื่องตรวจวัด) อุณหภูมิคอลัมน์ 25 $^{\circ}\text{C}$, ศักย์ไฟฟ้า 15 kV, ตรวจวัดที่ 220 nm การบรรจุสารแบบอัดความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 3 วินาที	62
รูปที่ 4.3	α_{MEKC} ที่ได้จากการทดลอง (สัญลักษณ์) และจากการทำนาย (เส้นทึบ) สำหรับสารที่มีประจุสองตัวใน MEKC (a) ที่ [SDS] ต่าง ๆ (b) ที่ค่า k_1 ต่าง ๆ สำหรับค่าที่ได้จากการทำนายคำนวณโดยใช้สมการที่ 4.7 และข้อมูลในตารางที่ 4.2	65

สารบัญตาราง

	หน้า	
ตารางที่ 2.1	สรุปวิธีการวิเคราะห์สารกลุ่มยาสัตว์ตกค้างจากรายงานที่ผ่านมา	10
ตารางที่ 2.2	Molecular weights, retention times, t_R (acceptable ranges, ± 3 SD), ion transitions, optimized MS/MS parameters, and ion ratios	23
ตารางที่ 2.3	Established maximum residue limit (MRL) for 24 veterinary drugs in chicken muscle and analytical limits of 24 analytes in chicken muscle extracts	26
ตารางที่ 2.4	Recovery, repeatability, within-laboratory reproducibility, and acceptable RSD values for chicken muscle at different spiking levels.	27
ตารางที่ 3.1	สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดลอง	35
ตารางที่ 3.2	ตัวแปรต่างๆในระบบ Multiple reactions monitoring ของสารปฏิชีวนะในการวิเคราะห์ด้วยแทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี	38
ตารางที่ 3.3	ผลของสารตัวทั้ง 3 ชนิดที่มีต่อการเพิ่มความเข้มข้นด้วยเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพา	43
ตารางที่ 3.4	ผลของสารละลายตัวรับและค่า pH ที่มีต่อการเพิ่มความเข้มข้นของสาร	45
ตารางที่ 3.5	ความใช้ได้ของวิธีการจากการใช้เทคนิคการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพาในการวิเคราะห์สารปฏิชีวนะหลายกลุ่มตกค้างในน้ำพร้อมกันในสภาวะที่เหมาะสม	48
ตารางที่ 4.1	แสดง แบบจำลองทางทฤษฎี ของ separation selectivity ใน MEKC (α_{MEKC})	59
ตารางที่ 4.2	Mobility selectivity (α_{CZE}), retention selectivity (α_k), retention factor (k_1), selectivity ratio (ρ), และชนิดของแบบจำลอง α_{MEKC}	63

สัญลักษณ์และคำย่อ

$\Delta\mu$	ความแตกต่างของค่า μ ของสาร
A	Selectivity
α_{CZE}	mobility selectivity ใน CZE
α_k	retention selectivity
α_{MEKC}	mobility selectivity ใน MEKC
$\alpha(CH_2)$	methylene selectivity
α_m	mobility selectivity.
β	อัตราส่วนของ $\mu_{0,1}/\mu_{mc}$
μ	ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า (electrophoretic mobility)
μ_{∞}	ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารกับ CD
μ°	ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าที่ความแรงของไอออนิกใกล้ศูนย์ (absolute electrophoretic mobility)
μ_0	ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารใน CZE หรือภาวะที่ไม่มี CD
μ_{eff}	effective electrophoretic mobility
μ_{eo}	ความสามารถในการเคลื่อนที่ของอิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmotic mobility)
v_{eo}	ความเร็วอิเล็กโทรออสโมซิส
v_{mc}	ความเร็วของไมเซลล์
H	ความสูงของเพลตเชิงทฤษฎี (total theoretical plates height)
K	รีเทนชันแฟกเตอร์ (retention factor)
K	ค่าคงที่ของการกระจาย (distribution constant)
K_{ow}	ค่าคงที่การกระจายตัวของออกทานอล-น้ำ
L	ความยาวคอลัมน์
N	ประสิทธิภาพการแยกของสาร (efficiency หรือ theoretical plates)
\bar{N}	ค่าเฉลี่ยของประสิทธิภาพของพีค (peak efficiency)
R_s	ค่าการแยกของสาร (resolution)
t_{eo}	ไมเกรชันไทม์ของ EOF marker
t_m	ไมเกรชันไทม์ของสาร
t_{mc}	ไมเกรชันไทม์ของเฟสคงที่เทียม marker
t_0	รีเทนชันไทม์ของ unretained compound

t_R	รีเทนชันไทม์ (retention time) ของสาร
V_{aq}	ปริมาตรของเอควิวีสเฟส
V_m	ปริมาตรของเฟสคงที่เทียม
Z	จำนวนคาร์บอนในสายโซ่ตรงของอัลคิลเบนซีน
ACN	Acetonitrile
Aliquat 336	Tricaprylmethylammonium chloride
AMOX	Amoxicillin
AMP	Ampicillin
AMPR	Amprolium
BGE	background electrolyte
BZ	Alkylbenzene
$CC\alpha$	decision limit
$CC\beta$	detection capability
CD	Cyclodextrin
CE	capillary electrophoresis
CIP	Ciprofloxacin
CTC	chlortetracycline
CZE	capillary zone electrophoresis
CEKC	capillary electrokinetic chromatography
CMC	critical micellar concentration
D2EHPA	Bis(2-ethylhexyl) monohydrogenphosphoric acid
DAN	Danofloxacin
DB	1-phenyldodecane
DHE	Dihexyl ether
DSTR	Dihydrostreptomycin
EKC	electrokinetic chromatography
ENR	enrofloxacin
EOF	electroosmotic flow
ERY	Erythromycin
ESI+	positive mode electrospray ionization

HFBA	heptafluorobutyric acid
HILIC	Hydrophilic interaction liquid chromatography
HOAc	acetic acid
HPLC	high-performance liquid chromatography
IP	Identification point
LCL	lowest calibrated level
LIN	Lincomycin
LIX 84	2-Hydroxy-5-nonylaceto-phenoneoxime
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantitation
MEKC	micellar electrokinetic chromatography
MeOH	Methanol
MRL	Maximum residue limit
MRM	Multireaction monitoring
MS/MS	Tandem mass spectrometry
OTC	Oxytetracycline
OXO	oxolinic acid
PEN G	penicillin G
PIR	Pirlimycin
QuEChERS	Quick, easy, cheap, efficient, rugged, safe
RP	Reversed phase
RSD	ค่าส่วนเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ (relative standard deviation)
SDMX	Sulfadimethoxine
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDZ	sulfadiazine
SMZ	Sulfamethazine
S/N	Signal to noise ratio
SPE	Solid phase extraction
SPEC	Spectinomycin
SPI	Spiramycin
STR	streptomycin

STZ	Sulfathiazole
TC	Tetracycline
TCA	Trichloroacetic acid
TIL	Tilmicosin
TOF	Time of flight
TYL	Tylosin
UPLC	Ultra performance liquid chromatography

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นโครงการวิจัยนำร่องผู้โครงการหลักมหาวิทยาลัยวิจัย คลัสเตอร์อาหารและน้ำ หัวข้อการพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารเติมแต่ง สารปนเปื้อน สารตกค้าง สารสำคัญในอาหารและผลิตภัณฑ์เกษตร นำเสนอการตรวจวัดสารยาเสพติดตกค้างในเนื้อไก่การวิเคราะห์สารปนเปื้อนเหล่านี้ในสินค้าปศุสัตว์ทั้งสิ้น 24 ชนิด จาก 8 กลุ่มหลักได้แก่ กลุ่ม aminoglycosides 3 ชนิด, กลุ่ม β -lactam 3 ชนิด, กลุ่ม lincosamides 2 ชนิด, กลุ่ม macrolides 4 ชนิด, กลุ่ม quinolones 4 ชนิด, กลุ่ม sulfonamides 4 ชนิด, กลุ่ม tetracyclines 3 ชนิด และ amprolium โดยสกัดด้วยตัวทำละลายและวิเคราะห์ด้วยเทคนิคliquid chromatography tandem mass spectrometry โดยใช้คอลัมน์แยกในระบบไฮโครฟิลิก วิธีการมีประสิทธิภาพสูงโดยมีขีดจำกัดต่ำสุดการวิเคราะห์ที่ 0.1-10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่าร้อยละการคืนกลับและความเที่ยงที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ยอมรับได้มีค่าอยู่ที่ 53-99% และ $\leq 15\%$ ตามลำดับ วิธีการนี้ได้ทดลองใช้ในตัวอย่างเนื้อไก่ กุ้ง และไข่ พบว่าใช้ได้ดีและสามารถใช้งานได้ในงานวิเคราะห์ที่ทำประจำในห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ได้ทดลองใช้เทคนิคการสกัดด้วยเส้นใยกลวง สกัดยาปฏิชีวนะ 11 ชนิดในน้ำ เส้นใยกลวงมีรูพรุน ขนาดเล็ก ราคาถูก สามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารที่ต้องการตรวจวัดได้ถึง 156 เท่า มีขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำถึง 10-250 นาโนกรัมต่อลิตร ค่าร้อยละการคืนกลับของวิธีการนี้เป็นที่น่าพอใจที่ระดับ 78-118%

นอกจากนี้ได้นำเสนอสมการและแบบจำลองทางทฤษฎีสำหรับค่าจำเพาะการแยกสารใน MEKC (α_{MEKC}) เพื่ออธิบายการเปลี่ยนแปลงการแยกและลำดับการเคลื่อนที่ของสารที่มีประจุใน MEKC ซึ่ง α_{MEKC} สัมพันธ์กับตัวแปรที่ไม่มีหน่วยของค่าความจำเพาะของ μ (ความสามารถในการเคลื่อนที่) ในอะซิลาโรโซนิลิก โทรฟอริซิส (α_{CZE}) และค่าความจำเพาะของรีเทนชันใน MEKC (α_k) โดยที่ α_{CZE} นิยามเป็นอัตราส่วนของ μ ใน CZE และ α_k นิยามเป็นอัตราส่วนของค่า k ใน MEKC สำหรับสองสารมีประจุ เมื่อใช้อัลทิลพาราเบนเป็นสารทดสอบ พบว่า α_{MEKC} จากการทดลองสอดคล้องกับค่าทำนายจากแบบจำลองทางทฤษฎี

Abstract

This work consisted of three pilot researches under the Food and Water Cluster of the National Research University Program in the developmental of determination techniques for efficient analyses of additives, contaminants, nutrients, and residues in food and agricultural products section. We report a simple and sensitive method for multiresidue analysis of 24 common veterinary drugs from 8 classes (3 aminoglycosides, 3 β -lactams, 2 lincosamides, 4 macrolides, 4 quinolones, 4 sulfonamides, 3 tetracyclines, and amprolium) in chicken muscle. The method employed simple liquid-liquid extraction step followed by analysis by liquid chromatography–tandem mass spectrometric using hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC). The method proved to be very efficient with 0.1-10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ limits of detection, recoveries ranged between 53–99% at 0.5-MRL, MRL, and 1.5-MRL spiking levels, satisfactory precision ($\text{RSD} \leq 15\%$) were also observed. The method was successfully tested on real samples (chicken muscle, shrimp, and egg).

Alternative extraction method, a carrier-mediated hollow-fiber liquid-phase microextraction (HF-LPME), was evaluated on antibiotic residues in water matrix. Eleventh common antibiotics were selected and the HF-LPME procedure was optimized in water using small and inexpensive disposable hollow fiber membrane. The proposed HF-LPME procedure was much superior to traditional extraction technique and provided up to 156 times enrichment. The detection limits ranged from 10-250 ngL^{-1} with relative recovery between 79-118%

Lastly, a theoretical separation selectivity model of MEKC (α_{MEKC}) was developed using a simple mathematical model for the prediction of separation and migration order. It was discovered that α_{MEKC} is related to the dimensionless values of electrophoretic mobility (μ), the selectivity of capillary zone electrophoresis (α_{CZE}), and the retention selectivity (α_k) of MEKC. Where α_{CZE} and α_k are defined as the ratio of μ in CZE and the ratio of k in MEKC for two charged analytes, respectively. Alkylparaben analogs were employed as model compounds. Excellent correlations were observed between the predicted and experimental values.

บทที่ 1

บทนำ

โครงการวิจัยนำร่อง

การพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารเติมแต่ง สารปนเปื้อน สารตกค้าง สารสำคัญในอาหารและผลิตผลการเกษตร

1.1 ที่มาปัญหาและความสำคัญ

ปัจจุบันความปลอดภัยอาหาร (Food Safety) ถือเป็นประเด็นสำคัญที่มีการกล่าวถึงกันอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะประเทศที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจ เช่น สหภาพยุโรป สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น มีมาตรการความปลอดภัยด้านอาหารอย่างเข้มงวด กำหนดค่าสูงสุดของการปนเปื้อนสารตกค้างต่างๆ เช่น ยาฆ่าแมลง ยาสัตว์ตกค้าง โลหะหนัก สารพิษชีวภาพ ครอบคลุมสินค้าเกษตรหลายรายการ ประเทศไทยในฐานะประเทศผู้ส่งออกสินค้าเกษตรกรรมจึงมักประสบปัญหาในการควบคุมและตรวจสอบการปนเปื้อนตามกฎหมายของประเทศคู่ค้า ในปี ค.ศ.2006 ประเทศญี่ปุ่นประกาศใช้ระบบการกำหนดปริมาณสารปนเปื้อนและค่าสูงสุดที่ยอมให้ตกค้างในอาหารได้เรียกเป็น “Positive List System” ควบคุมการตรวจสอบสารมากกว่า 799 ชนิด หากสารใดไม่ปรากฏในรายการที่กำหนดขีดการปนเปื้อนสูงสุดที่ยอมรับได้ไว้ ให้สารนั้นๆ มีระดับการปนเปื้อนสูงสุดได้ไม่เกิน 0.01 พีพีเอ็ม ถือเป็นระดับที่ต่ำมากและผู้ตรวจสอบต้องพิสูจน์และแสดงศักยภาพรายงานการตรวจวิเคราะห์ให้ครบถ้วน เพื่อสร้างความมั่นใจว่าสามารถตรวจสอบได้จริง สหภาพยุโรปกำลังดำเนินมาตรการตามประเทศญี่ปุ่นเช่นกัน การตรวจสอบการปนเปื้อนในเนื้อเมทริกซ์อาหารที่ต่างกัน เช่น ผัก ผลไม้ เนื้อสัตว์ น้ำผึ้ง อาหารสัตว์ ฯลฯ นับเป็นสิ่งที่ท้าทายนักวิเคราะห์ เนื่องจากมีโอกาสเกิดข้อผิดพลาดได้มาก อีกทั้งการตรวจสอบสินค้าส่งออกหลายรายการเช่น ผัก ผลไม้ ต้องการวิธีการตรวจสอบที่รวดเร็ว ถูกต้อง ค่าใช้จ่ายต่ำ ต้องไม่ส่งผลกระทบต่อต้นทุนสินค้าและเป็นที่ยอมรับต่อประเทศคู่ค้า

งานวิจัยนี้มีเป้าหมายที่จะพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารปนเปื้อน สารตกค้างและสารสำคัญในอาหารและผลิตผลการเกษตร โดยใช้ทั้งงานการศึกษาด้านทฤษฎี ความแข็งแกร่งของทีมงานที่มีเชี่ยวชาญในเครื่องมือวิเคราะห์ร่วมกันพัฒนาวิธีการตรวจสอบ เน้นการเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว ใช้เทคโนโลยีปัจจุบันที่มีศักยภาพเข้ามาแทนที่เทคนิคเดิม เพิ่มศักยภาพการตรวจสอบลดขีดจำกัดต่ำสุดการตรวจวิเคราะห์ ลดเวลา และต้นทุนแต่คงความเที่ยง ความแม่นยำสูงสุด เสริมสร้างความเชื่อมั่นต่อคุณภาพอาหารส่งออกของไทยและพร้อมรองรับต่อการมาตรการตรวจสอบสินค้าปลอดภัยของประเทศคู่ค้า รวมถึงการสร้างบุคลากรที่มีความรู้ ความสามารถในการตรวจวิเคราะห์และการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

โครงการนำร่องนี้จะเป็งานวิจัยที่มีระยะการดำเนินงาน 1 ปี เป็นการเตรียมความพร้อมเพื่อนำไปสู่งานวิจัยด้านการพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารเติมแต่ง สารปนเปื้อน สารตกค้าง สารสำคัญในอาหารและผลิตภัณฑ์เกษตร ที่ได้วางแผนระยะยาวไว้ในระยะไม่น้อยกว่า 3 ปี

1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ปัจจุบันความปลอดภัยอาหาร (Food Safety) ถือเป็นประเด็นสำคัญที่มีการกล่าวถึงกันอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะประเทศที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจ เช่น สหภาพยุโรป สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น มีมาตรการความปลอดภัยด้านอาหารอย่างเข้มงวด กำหนดค่าสูงสุดของการปนเปื้อนสารตกค้างต่างๆ เช่น ยาฆ่าแมลง ยาสัตว์ตกค้าง โลหะหนัก สารพิษชีวภาพ ครอบคลุมสินค้าเกษตรหลายรายการ ประเทศไทยในฐานะประเทศผู้ส่งออกสินค้าเกษตรกรรมจึงมักประสบปัญหาในการควบคุมและตรวจสอบการปนเปื้อนตามกฎหมายเกณฑ์ของประเทศคู่ค้า ในปี ค.ศ.2006 ประเทศญี่ปุ่นประกาศใช้ระบบการกำหนดปริมาณสารปนเปื้อนและค่าสูงสุดที่ยอมให้ตกค้างในอาหารได้เรียกเป็น “Positive List System” ควบคุมการตรวจสอบสารมากกว่า 799 ชนิด หากสารใดไม่ปรากฏในรายการที่การกำหนดขีดการปนเปื้อนสูงสุดที่ยอมรับได้ไว้ ให้สารนั้นๆ มีระดับการปนเปื้อนสูงสุดได้ไม่เกิน 0.01 พีพีเอ็ม ถือเป็นระดับที่ต่ำมากและผู้ตรวจสอบต้องพิสูจน์และแสดงศักยภาพรายงานการตรวจวิเคราะห์ให้ครบถ้วน เพื่อสร้างความมั่นใจว่าสามารถตรวจสอบได้จริง สหภาพยุโรปกำลังดำเนินมาตรการตามประเทศญี่ปุ่นเช่นกัน การตรวจสอบการปนเปื้อนในเนื้อเมทริกซ์อาหารที่ต่างกัน เช่น ผัก ผลไม้ เนื้อสัตว์ น้ำผึ้ง อาหารสัตว์ ฯลฯ นับเป็นสิ่งที่ท้าทายนักวิเคราะห์ เนื่องจากมีโอกาสเกิดข้อผิดพลาดได้มาก อีกทั้งการตรวจสอบสินค้าส่งออกหลายรายการเช่น ผัก ผลไม้ ต้องการวิธีการตรวจสอบที่รวดเร็ว ถูกต้อง ค่าใช้จ่ายต่ำ ต้องไม่ส่งผลกระทบต่อต้นทุนสินค้าและเป็นที่ยอมรับต่อประเทศคู่ค้า

งานวิจัยนี้มีเป้าหมายที่จะพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารปนเปื้อน สารตกค้างและสารสำคัญในอาหารและผลิตภัณฑ์เกษตร โดยใช้ทั้งงานการศึกษาด้านทฤษฎี ความแข็งแกร่งของทีมงานที่มีเชี่ยวชาญในเครื่องมือวิเคราะห์ร่วมกันพัฒนาวิธีการตรวจสอบ เน้นการเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว ใช้เทคโนโลยีปัจจุบันที่มีศักยภาพเข้ามาแทนที่เทคนิคเดิม เพิ่มศักยภาพการตรวจสอบลดขีดจำกัดต่ำสุดการตรวจวิเคราะห์ ลดเวลา และต้นทุนแต่คงความเที่ยง ความแม่นยำสูงสุด เสริมสร้างความเชื่อมั่นต่อคุณภาพอาหารส่งออกของไทยและพร้อมรองรับต่อการมาตรการตรวจสอบสินค้าปลอดภัยของประเทศคู่ค้า รวมถึงการสร้างบุคลากรที่มีความรู้ ความสามารถในการตรวจวิเคราะห์และการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

โครงการนำร่องนี้จะเป็งานวิจัยที่มีระยะการดำเนินงาน 1 ปี เป็นการเตรียมความพร้อมเพื่อนำไปสู่งานวิจัยด้านการพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารเติมแต่ง สารปนเปื้อน สารตกค้าง สารสำคัญในอาหารและผลิตภัณฑ์เกษตร ที่ได้วางแผนระยะยาวไว้ในระยะไม่น้อยกว่า 3 ปี

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1) เตรียมความพร้อมและมุ่งเป้าพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารสำคัญ สารเติมแต่ง สารปนเปื้อน สารตกค้าง ด้านเคมีของอาหารผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร
- 2) เพิ่มศักยภาพห้องปฏิบัติการ บุคลากร และก้าวสู่ความเป็นผู้นำด้านเทคโนโลยีการตรวจสอบอาหาร
- 3) ผลิตบัณฑิตระดับปริญญาโทและเอกที่มีความสามารถด้านเครื่องมือวิเคราะห์และการตรวจสอบสารสำคัญ สารเติมแต่ง สารปนเปื้อน สารตกค้าง ด้านเคมีของอาหารและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร

1.4 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การตรวจสอบสารสำคัญ สารเติมแต่ง สารปนเปื้อนและสารตกค้างในอาหารนั้นนับเป็นสิ่งที่สำคัญในการตรวจสอบข้อมูลด้านความปลอดภัย ทุกประเทศให้ความสำคัญในการคิดค้นพัฒนา การทดลองและงานวิจัยที่สอดคล้องในทางปฏิบัติด้านการตรวจสอบกันอย่างกว้างขวาง[1, 2, 3] เพื่อให้ได้วิธีการตรวจสอบที่มีความไว ความแม่นยำและความเที่ยง ที่ตอบสนองสถานการณ์ที่อาจเกิดขึ้นและส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคได้ และงานด้านการตรวจสอบอาหารปลอดภัยปัจจุบันยังถือเป็นมาตรการกีดกันทางการค้าอีกรูปแบบหนึ่งด้วย [4] การตรวจสอบยาฆ่าแมลงปนเปื้อนในผลผลิตการเกษตรนั้น มีการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์มาอย่างยาวนานมากกว่า 40 ปี ปัจจุบันสถานการณ์การตรวจสอบไม่ลดลง กลับเพิ่มจำนวนสารที่ต้องตรวจสอบและมุ่งเป้าการตรวจวัดในระดับต่ำในครอบคลุม จึงจำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือวิเคราะห์ที่มีราคาสูง ใช้ตัวทำละลายปริมาณมาก เวลาวิเคราะห์นาน อีกทั้งต้องอาศัยผู้ปฏิบัติงานที่มีความชำนาญสูง จึงจะได้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่เชื่อถือได้ อีกทั้งยังต้องจำแนกวิธีการเตรียมตัวอย่างออกตามกลุ่มของยาฆ่าแมลงอีกด้วย สารกลุ่มยาฆ่าแมลงตกค้างเป็นสารอีกกลุ่มหนึ่งที่มีผลกระทบต่อประชากร หลายประเทศมีมาตรการควบคุมการปนเปื้อนที่เข้มงวดและต้องครอบคลุมการตรวจวิเคราะห์ในระดับต่ำ [5] สารหลายชนิดเช่นสารกลุ่มไนโตรพิวเรนและอนุพันธ์ คลอแรมเฟนิคอล ที่ทางสหภาพยุโรปมีการคุมเข้มการตรวจสอบในสินค้าสัตว์น้ำและสัตว์ปีก มูลค่าการส่งออกของสินค้ากลุ่มนี้ลดลงกว่าสองหมื่นล้านบาทในปี 2002 ในปีถัดมายังพบการปนเปื้อนของสารกลุ่มมาลาไคท์ กรีน ในสัตว์น้ำ สีข้อมกลุ่ม Para red Sudan Red ในพริก และเครื่องแกงบางชนิด รวมถึงปัญหาการปนเปื้อนของสารเมลามีนในนมผง อาหารปลอมปน เช่นเนื้อสัตว์ปลอมปน ไข่ปลอมเป็นต้น ล้วนแต่สร้างความตระหนก ให้กับผู้บริโภค และกระทบต่อปัญหาเศรษฐกิจ ความพร้อมของระบบห้องปฏิบัติการการตรวจวิเคราะห์จึงเป็นปัญหาที่สำคัญ หลายประเทศวางมาตรการจำกัดการปนเปื้อนของสารหลายชนิดที่ระดับต้องตรวจสอบไม่พบหรือ Zero tolerance ซึ่งปัจจุบันใช้เป็นค่าต่ำสุดของสมรรถนะการตรวจวิเคราะห์ (Minimum Requirement Performance Limit, MRPL) หมายความว่าห้องปฏิบัติการต้องแสดงศักยภาพการตรวจวิเคราะห์ด้วย

เครื่องมือที่มีสมรรถนะสูง เพื่อให้การตรวจวิเคราะห์สามารถตอบสนองได้ในระดับที่ต่ำมาก ๆ ซึ่งเป็นงานยากและท้าทายนักวิเคราะห์เป็นอย่างมาก หากสารเหล่านี้อยู่ในเนื้อเมทริกซ์ที่แตกต่างกันเช่นในส่วนของเนื้อเยื่อที่มีไขมันสูง ไขมันต่ำ เนื้อสัตว์ เครื่องใน ผัก ผลไม้ อาหารสำเร็จรูป จึงจำกัดการตรวจวิเคราะห์จะแตกต่างกันไปตามเทคนิคการวิเคราะห์และการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ ในปี ค.ศ.2003 มีผู้นำเสนอเทคนิคการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ที่ให้ชื่อว่า QuEChERS [6] ที่เป็นคำย่อของอักษรหน้าในภาษาอังกฤษที่รวมความต้องการของนักวิเคราะห์เข้าไว้ด้วยกันคือ เร็ว สะดวก ประหยัด ประสิทธิภาพสูง ทนทาน ปลอดภัย (Quick, Easy, Cheap, Efficient, Rugged and Safe) ใช้ของแข็งดูดซับสิ่งรบกวนกระจายลงในสารละลายสกัดตัวอย่าง กำจัดสิ่งรบกวนให้แยกตัวออกจากสารละลายก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ และนับจากปี 2003 จนถึงปัจจุบันมีผลงานตีพิมพ์ของการนำเทคนิคนี้มาประยุกต์ใช้กับงานวิเคราะห์สารประเภทต่างๆ มากกว่าหนึ่งร้อยผลงาน [7, 8] สามารถนำมาใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมไปถึงการนำเทคนิค Molecular Imprinted Polymer มาช่วยเพิ่มสภาพไวการตรวจวิเคราะห์และการกำจัดสารรบกวน นอกจากนี้การใช้ความรู้ในทางทฤษฎีของเครื่องมือวิเคราะห์แต่ละประเภทมาเสริมให้การทำงานของเครื่องมือวิเคราะห์มีประสิทธิภาพสูงขึ้น รวมถึงการสร้างและการใช้คอลัมน์ขนาดเล็กที่มีความเฉพาะเจาะจงมากขึ้น [9] และการนำเทคนิคด้านไมโครฟลูอิดิก [10, 11] มาช่วยพัฒนางานวิเคราะห์ทดสอบ เทคนิคนี้เริ่มเข้ามามีบทบาทในการวิเคราะห์สารตกค้าง สารพิษในอาหาร [12] เพิ่มความรวดเร็วใช้ตัวอย่างและสารเคมีน้อย พัฒนาต่อให้อยู่ในรูปแบบการวิเคราะห์แบบต่อเนื่องได้ เป็นก้าวหนึ่งของการพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจสอบที่ทางกลุ่มวิจัยต้องการนำทุกรูปแบบมาเสริมศักยภาพของการตรวจวิเคราะห์ ก้าวสู่ความเป็นผู้นำทางด้านเทคโนโลยีการตรวจสอบอาหารปลอดภัยด้านเคมีของประเทศและภูมิภาค

1.5 ขอบเขตการวิจัย

ขอบเขตของงานวิจัย โครงการวิจัยนำร่องนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยระยะยาว 3 ปี เพื่อเตรียมความพร้อมเข้าสู่ขอบเขตงานวิจัยทั้งโครงการ ในปีแรกนั้น จะครอบคลุม 2 โครงการหลัก ได้แก่

- 1) การพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารปนเปื้อน สารตกค้าง ด้านเคมีของอาหารและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร โดยเครื่องมือ HPLC, LC-MS, และ GC-LC/MS/MS เน้นในสินค้าส่งออกที่สำคัญของไทย ได้แก่ ผลไม้ (เช่น มังคุด สัตว์ปีก และสัตว์น้ำ) เนื้อสัตว์ (เช่น ไก่และกุ้ง) และพืชสมุนไพร โดยให้ความสำคัญกับสารกลุ่มยากกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ และยาปฏิชีวนะ
- 2) การศึกษาและเปรียบเทียบประสิทธิภาพการแยกและวิเคราะห์สารในกลุ่มที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกันด้วยเทคนิค μ HPLC และ CE รวมถึงการสร้างคอลัมน์ชนิดใหม่เพื่อตอบสนองการวิเคราะห์ ในรูปแบบเชิงทฤษฎี ประสานกับงานปฏิบัติ

1.6 วิธีดำเนินการวิจัย

จาก 2 โครงการย่อยที่กล่าวในข้อ 1.5 ดำเนินงานแบบคู่ขนาน ดังนี้

โครงการย่อยที่ 1 : การพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ สารปนเปื้อน สารตกค้าง ด้านเคมี ของอาหารและผลิตผลทางการเกษตร แยกออกเป็น 2 งานวิจัยหลัก คือ

- 1.1 การวิเคราะห์สารกลุ่มยาสัตว์ตกค้างหลายชนิดพร้อมกันในเนื้อไก่ด้วยอันตรกิริยาแบบไฮโครฟิลลิกลิควิด โครมาโทกราฟีเชื่อมกับแทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี รายละเอียดแสดงในบทที่ 2 และ
- 1.2 การวิเคราะห์แบบพร้อมกันของสารปฏิชีวนะหลายกลุ่มที่ตกค้างในน้ำด้วยการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวง โดยใช้สารตัวพาและตรวจวัดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูงมาก-แทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี รายละเอียดแสดงในบทที่ 3

1.7 ประโยชน์ที่ได้รับจากโครงการวิจัยนำร่องโครงการย่อยที่ 2 : การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการแยกวิเคราะห์สารในกลุ่มที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกันด้วยเทคนิค HPLC, μ HPLC และ Capillary Electrophoresis รวมถึงการสร้างคอลัมน์ชนิดใหม่เพื่อตอบสนองการวิเคราะห์ ในรูปแบบเชิงทฤษฎีประสานกับงานปฏิบัติ โดยในโครงการนำร่องนำเสนองานวิจัยเรื่องแบบจำลองเชิงทฤษฎีของการแยกแบบจำเพาะสำหรับสารประกอบที่มีประจุในไมเซลล์าร์อีเล็กโตรโครเนติกโครมาโทกราฟี ดังรายละเอียดในบทที่ 4

- 1) ความพร้อมในการวางแผนวิจัยและแนวทางการวิจัยเบื้องต้นและงานวิจัยเชิงทฤษฎี ในการพัฒนาเทคนิคการเตรียมตัวอย่าง และการตรวจวิเคราะห์ที่ครอบคลุมงานด้านการตรวจสอบสารสำคัญ สารเติมแต่ง สารปนเปื้อน และสารตกค้างในอาหารและผลิตผลทางการเกษตร เสริมความเชื่อมั่นในอาหารปลอดภัยและส่งเสริมคุณภาพสินค้าอาหารและการเกษตรของประเทศไทย
- 2) ผลิตบัณฑิตที่มีความชำนาญด้านการตรวจสอบการวิเคราะห์อาหารทั้งระดับปริญญาโทและเอกตามเป้าหมาย
- 3) ปูแนวทางการเป็นผู้นำในด้านการตรวจสอบอาหารเชิงเคมีในระดับชาติและภูมิภาค โดยมีผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการต่างประเทศที่ได้รับการยอมรับ

1.8 เอกสารอ้างอิง

1. N.Umetsu, "Japan Positive List System: Contribution of the Pesticide Science Society of Japan to Understanding of its Operation and Issues Regarding Pesticide residues in Crops." *Foods Food Ingredients J. Jpn.*, Vol.211 No. 8, 2006
2. Alexander J. Krynitsky and Steven J Lehotay., "Overview of analytical techniques available to regulatory laboratories for the determination of pesticide residues." *Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals*. Pp 753-786, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2002
3. Schenck, F., Lehotay, S.J, Vega, V., *J.Sep.Sci.*, 2002, 25, 883-890.
4. คณะเศรษฐศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, "โครงการการศึกษามาตรการกีดกันการค้ารูปแบบใหม่ของสหรัฐอเมริกาและสหภาพยุโรป" เสนอต่อกรมเศรษฐกิจระหว่างประเทศ กระทรวงต่างประเทศ มีนาคม 2549
5. *Analytical Control Guidelines, Document SANCO/10232/2007*, European Union, Brussels, 2007
6. Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D. and Schenck, F, *J.AOAC Int*, 86, 412-431 (2003)
7. Lehotay, S.J., *J.AOAC Int*. 90(2) 485-520 (2007).
8. Koesukwiwat, U., Sanguankaew, K., Leepipatpiboon, N., *Analytica Chimica Acta*, 626 (1), pp. 10-20 (2008).
9. Soonthorntantikul, W., Leepipatpiboon, N., Ikegami, T., Tanaka, N., Nhujak, T., *Journal of Chromatography A*, 1216 (31), pp. 5868-5874 (2009).
10. Huebner, A., Sharma, S., Srisa-Art, M., Hollfelder, F. Edel, J.B., DeMello, A.J. *Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology* 8 1244-1254, (2008).
11. Srisa-Art, M., Dyson, E.C., DeMello, A.J., Edel, J.B. , *Analytical Chemistry* 80, 7063-7067, (2008).
12. Skurtys, O.; Aguilera, J. M., *Food Biophysics*, 3, (1), 1-15 (2008).

บทที่ 2

การวิเคราะห์สารกลุ่มยาสัตว์ตกค้างหลายชนิดพร้อมกันในเนื้อไก่ด้วยแอนติบอดีแบบ ไฮโดรฟิลิกลิควิดโครมาโทกราฟีเชื่อมกับแทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี

2.1 บทนำ

งานด้านปศุสัตว์จัดเป็นกลุ่มงานทางเกษตรกรรมที่มีความสำคัญเพราะนอกจากช่วยเพิ่มแหล่งอาหารให้กับประชากรแล้วยังช่วยเพิ่มพูนรายได้ให้กับเกษตรกร สัตว์ที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยได้แก่ ไก่ หมู และวัวนม ในการดูแลสัตว์ในฟาร์มเลี้ยงนั้น นอกจากอาหารสัตว์ที่จัดเป็นสิ่งสำคัญพื้นฐานแล้ว ยาสัตว์นับว่ามีความจำเป็นไม่น้อยไปกว่ากัน กลุ่มยาสัตว์ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ กลุ่ม aminoglycosides, β -lactams, coccidiostats, lincosamides, quinolones, sulfonamides และ tetracyclines [1] ดังนั้นจึงมีโอกาที่ยาเหล่านี้อาจยังคงตกค้างอยู่ในเนื้อสัตว์ ส่งผลข้างเคียงสู่ผู้บริโภคได้ ดังนั้นในหลายประเทศจึงมีการกำหนดกฎเกณฑ์ควบคุมการตกค้างและ/หรือกำหนดปริมาณสูงสุดที่ยอมรับให้มีได้ในผลิตภัณฑ์ประเภทต่างๆ เพื่อคุ้มครองผู้บริโภค

การวิเคราะห์สารปนเปื้อนหรือสารตกค้างที่มีปริมาณน้อยในอาหารนั้นนับเป็นงานยาก โดยเฉพาะสารกลุ่มยาสัตว์นี้จัดเป็นสารที่มีโอกาสเกิดผลข้างเคียงต่อผู้บริโภคสูง ในหลายประเทศจึงมีมาตรการควบคุมที่เข้มงวด [2] เครื่องมือที่ตรวจวิเคราะห์จะต้องให้ความเฉพาะเจาะจงและมีสภาพไว การตรวจวิเคราะห์สูง ในงานวิจัยที่ผ่านมาเทคนิค microbial assays [3-5] นับเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วต่อการวิเคราะห์ แต่ขาดความเฉพาะเจาะจงและสภาพไวการตรวจวิเคราะห์ต่ำ ปัจจุบันเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีที่เชื่อมต่อกับแทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี (liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) จัดเป็นเทคนิคที่ได้นิยมใช้มากที่สุดในการตรวจวัดสารอินทรีย์ตกค้างในอาหาร มีความเลือกเฉพาะ สภาพไว ความเที่ยงและความแม่นยำสูง และตอบสนองข้อกำหนดของสหภาพยุโรปที่มีเกณฑ์การตรวจวัดที่เข้มงวดได้เป็นอย่างดี (EU 657/2002) งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าวิธีการวิเคราะห์ที่มีการพัฒนาขึ้นนั้นจะตอบสนองการตรวจวัดสารเฉพาะกลุ่ม เช่น เฉพาะกลุ่ม sulfonamides [6] quinolones [7] β -lactams และ cephalosporins [8] aminoglycosides [9, 10] วิธีการจะแตกต่างกันไปตามสมบัติของยาสัตว์แต่ละกลุ่มและเนื้อเมทริกซ์ที่ต้องการตรวจวัด งานวิจัยที่ทำการวิเคราะห์สารหลายกลุ่มพร้อมกันยังมีอยู่น้อยมาก เทคนิคการเตรียมตัวอย่างที่มีรายงานการศึกษาได้แก่ เทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลาย [11-13] การสกัดด้วยเฟสของแข็ง (Solid phase extraction, SPE) [14,15] การสกัดด้วยเทคนิค QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) [16] การสกัดด้วยเทคนิคควบคุมความดันของเหลว (pressurized liquid extraction, PLE) [17] งานวิจัยที่จัดว่าน่าสนใจที่สุดในด้านนี้คือ

งานของ Yamada และคณะ [18] เขาพัฒนาวิธีการที่สามารถตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มยาตัวได้พร้อมกันถึง 130 ชนิด แต่ไม่รวมกลุ่ม aminoglycoside และ tetracyclines และล่าสุดในปี ค.ศ.2008 Kaufmann และคณะ [19] รายงานวิธีการตรวจวัดยาตัว 100 ชนิด ในเนื้อสัตว์หลากหลายประเภท โดยใช้เทคนิค Ultra performance liquid chromatography (UPLC) ต่อเชื่อมกับแมสสเปกโตรเมทรีระบบ Time of flight (TOF) แต่ไม่ครอบคลุมยาตัวกลุ่ม aminoglycoside เช่นกัน

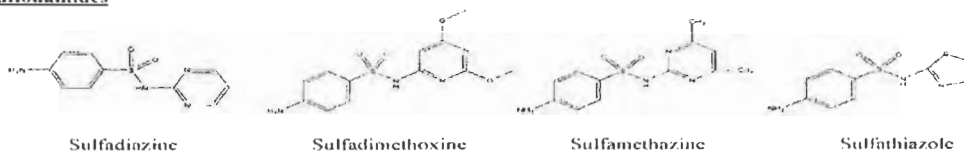
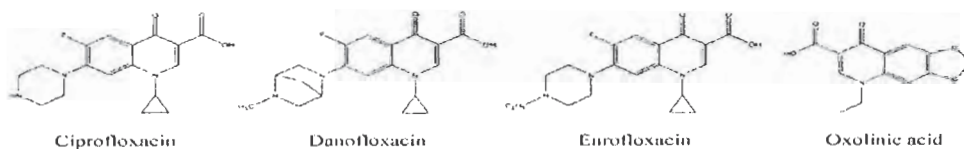
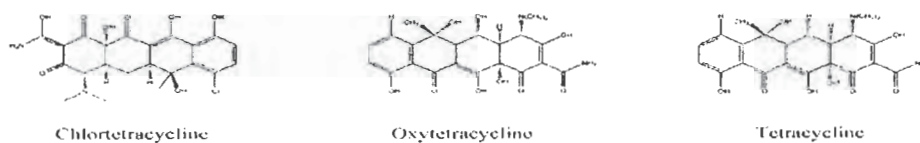
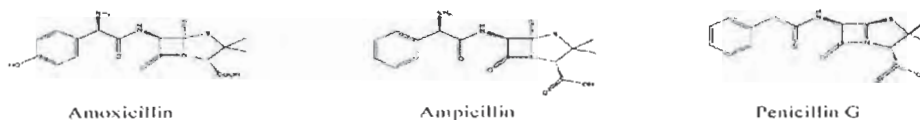
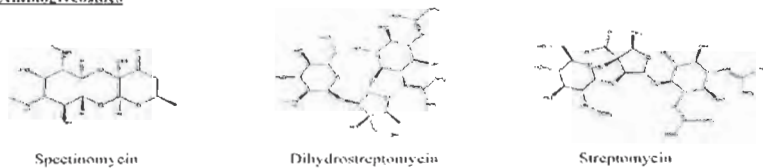
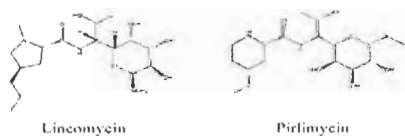
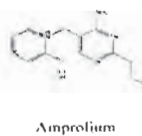
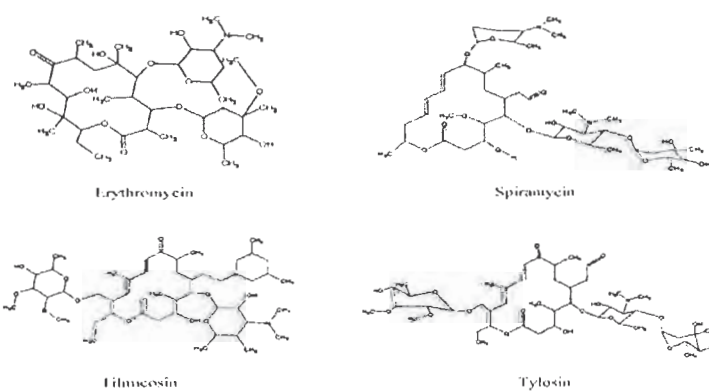
โดยทั่วไปแล้ว วิธีการที่จะทำการตรวจวัดสารหลายชนิดพร้อมกันได้นั้น นอกจากจะต้องอาศัยเทคนิคการเตรียมตัวอย่างที่ดีแล้วยังต้องอาศัยเทคนิคการวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพที่สามารถครอบคลุมสารที่ต้องการตรวจวัดได้ทั้งหมด งานวิจัยนี้จึงมีเป้าประสงค์ที่จะพัฒนาวิธีการตรวจวัดให้ครอบคลุมสารหลายกลุ่มและหลายชนิด โดยเฉพาะกลุ่ม aminoglycoside ซึ่งยังไม่มีปรากฏในรายงานวิจัยใดในปัจจุบัน

2.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย

จากการรวบรวมข้อมูลกลุ่มยาตัวที่นิยมใช้ในงานทางปศุสัตว์ รวมถึงกฎระเบียบด้านความปลอดภัยของอาหารและการนำเข้าสินค้าปศุสัตว์ของประเทศคู่ค้า ผู้วิจัยเลือกสารตัวแทนการศึกษาพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารปนเปื้อนเหล่านี้ในสินค้าปศุสัตว์ทั้งสิ้น 24 ชนิด จาก 8 กลุ่มหลักได้แก่ กลุ่ม aminoglycosides 3 ชนิด, กลุ่ม β -lactam 3 ชนิด, กลุ่ม lincosamides 2 ชนิด, กลุ่ม macrolides 4 ชนิด, กลุ่ม quinolones 4 ชนิด, กลุ่ม sulfonamides 4 ชนิด, กลุ่ม tetracyclines 3 ชนิด และกลุ่ม amprolium สารทั้ง 24 ชนิด จาก 8 กลุ่มนี้ มีความแตกต่างกันทั้งในแง่ของโครงสร้างทางเคมี สมบัติทางเคมีและกายภาพ โครงสร้างของสารทั้งหมดแสดงไว้ในรูปที่ 2.1

จากนั้นได้รวบรวมเทคนิคการวิเคราะห์ การทดลองและข้อสรุปที่มีผู้รายงานการศึกษา มาก่อน แสดงข้อสรุปของชนิดของสารที่วิเคราะห์ เนื้อเมทริกซ์ที่ใช้ สภาวะการทดลอง ซีดจำกัดการตรวจวัด และสภาพไวการวิเคราะห์ไว้ในตารางที่ 2.1

จากตารางที่ 2.1 จะเห็นได้ว่าผู้วิจัยหลายกลุ่มมีแนวความคิดที่จะรวมสารหลายกลุ่มเข้าด้วยกันและพยายามพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ให้ทำได้ในขั้นตอนเดียว หรือที่เรียกว่า Multiresidue method แต่พบว่าในงานที่ผ่านมา ยังไม่สามารถรวมกลุ่มยาทุกกลุ่มเข้าด้วยกันและทำการตรวจวัดพร้อมกันได้ กลุ่มยาตัวที่ไม่สามารถรวมเข้ากับกลุ่มยาอื่นๆ ในการวิเคราะห์คือกลุ่ม aminoglycosides เนื่องจากสารกลุ่มนี้มีสภาพขั้วสูง ยากต่อการสกัดและวิเคราะห์ด้วยระบบ high performance liquid chromatography (HPLC) ที่นิยมใช้กันทั่วไปคือระบบ reversed phase สารกลุ่มนี้มีค่าการละลายในน้ำสูง จะไม่สามารถคงค้างอยู่ในคอลัมน์ได้ หากต้องการหน่วงเหนี่ยวสารให้อยู่ภายในคอลัมน์ วิธีการที่นิยมใช้กันมากคือการใช้เทคนิคการจับคู่ไอออนหรือ Ion-pairing chromatography แต่เทคนิคนี้ต้องมีการเติมสารรีเอเจนต์ที่มีคู่ประจุลงไป

Sulfonamides**Quinolones****Tetracyclines****Penicillins****Aminoglycosides****Lincosamides****Coccidiostats****Macrolides**

รูปที่ 2.1 ชื่อและโครงสร้างทางเคมีของยาสัตว์ 24 ชนิดที่ศึกษาในงานวิจัยนี้

ตารางที่ 2.1 สรุปวิธีการวิเคราะห์สารกลุ่มยาสัตว์ปีกค้างจากรายงานที่ผ่านมา

Analyte	Matrix	LC mode	Column	Mobile phase	Detection	Sensitivity ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Reference
Quinolones (6), sulfonamides (5), tetracyclines (1), other veterinary drugs (6)	Shrimp	RP	Water YMC Phenyl 4 mm \times 50 mm, 3 μm	A: 95:5 (v/v) 0.1% formic acid in water– MeCN B: 15:85 (v/v) 0.05% formic acid in water–MeCN	APCI–MS	LOD = 10-200	[10]
Sulfonamides (4) β -lactams (3), macrolides (4), quinolones (4), tetracyclines (4)	Muscle Kidney	RP	Genesis C18 2.1 mm \times 50 mm, 4 μm	A: MeCN B: 0.2% formic acid in water containing 0.1 mM oxalic acid	ESI–MS/MS	LOD = 2-15	[11]
β -lactams (7), macrolides (4), quinolones (9), sulfonamides (14), tetracyclines (4), other veterinary drugs (1)	Chicken	RP	C18 Acquity UPLC BEH, 2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm	A: 0.2% formic acid in water containing 1 mM oxalic acid B: 0.1% formic acid in MeCN	ESI–MS/MS	CC β = 6.9-337.2	[12]
Quinolones (12), sulfonamides (16), other veterinary drugs (13)	Chicken	RP	Synergi Fusion 2 mm \times 100 mm, 2.5 μm	A: 0.1% formic acid in water B: 0.1% formic acid in MeCN C: 0.1% formic acid in MeOH	ESI–MS/MS	CC β = 0.45-487	[15]
Aminoglycosides (3), β -lactams (8), macrolides (7), sulfonamides (17), tetracyclines (5), amphenicols (2)	Honey	Ion-pair	Zorbax SB-C18 2.1 mm \times 50 mm, 1.8 μm	A: 1 mM NFPA in 0.5% formic acid in water B: 0.5% formic in (50:50, v/v) of MeCN-methanol	ESI–MS/MS	LOD = 27-80	[16]
β -lactams (2), lincosamides (1), macrolides (4), quinolones (7), sulfonamides (10), tetracyclines (3), other veterinary drugs (4)	Meat	RP	Xterra MS C18 2.1 mm \times 100 mm, 3.5 μm	A: 10 mM formic acid in MeOH B: 10 mM formic acid in water	ESI–MS/MS	LOD = 3-15	[17]
Lincosamides (3), macrolides (10), quinolones (14), sulfonamides (12), tetracyclines (7), other veterinary drug (1)	Milk	RP	C18 Aqua 2.1 mm \times 150 mm, 3 μm	A: 0.2% formic acid in water B: 0.2% formic acid in MeCN	ESI–MS/MS	CC β = 7.9-325	[18]
Aminoglycosides (3), amprolium, β -lactams (3), lincosamides (2), macrolides (4), quinolones (4), sulfonamides (4), tetracyclines (3)	Chicken muscle	HILIC	ZIC-HILIC 2.1 mm \times 100 mm, 3.5 μm	A: 50 mM ammonium formate in water at pH 2.5 B: MeCN	ESI(+)-MS/MS	LOD = 0.1-10, except STR and DSTR = 20	This work

ทำให้มีปริมาณเกลือสูงไม่เหมาะกับระบบตรวจวัดแมสสเปกโตรเมตรีที่มีความจำเป็นในการตรวจยืนยันเชิงคุณภาพ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงวางเป้าหมายการตรวจวัดสารทั้ง 8 กลุ่ม โดยจะทดลองใช้สภาวะการแยกแบบ Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) และคาดหวังที่จะได้วิธีการตรวจวัดที่สามารถตรวจวัดสารทุกกลุ่มได้พร้อมกัน และจะพัฒนาวิธีการสกัดสารกลุ่มนี้จากเมทริกซ์เนื้อสัตว์ ให้ได้วิธีการที่มีสภาพไวการวิเคราะห์สูง และขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำ ตามมาตรฐานการส่งออกของประเทศคู่ค้า

2.3 การทดลอง

2.3.1 สารเคมีที่ใช้

สารมาตรฐานทุกชนิดที่ใช้มีความบริสุทธิ์สูงกว่า 95% โดยแยกเป็น Ampicillin (AMP), amprolium (AMPR), chlortetracycline (CTC), ciprofloxacin (CIP), enrofloxacin (ENR), erythromycin (ERY), lincomycin (LIN), oxolinic acid (OXO), oxytetracycline (OTC), penicillin G (PEN G), spectinomycin (SPEC), spiramycin (SPI), sulfadimethoxine (SDMX), tetracycline (TC), tilmicosin (TIL), and tylosin (TYL) จากบริษัท Dr.Ehrenstorfer (Augsburg, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมัน Dihydrostreptomycin (DSTR) และ streptomycin (STR) จากบริษัท Fluka (Buchs, สวิตเซอร์แลนด์). Amoxicillin (AMOX), sulfadiazine (SDZ) and sulfathiazole (STZ) จากบริษัท Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, สหรัฐอเมริกา). Danofloxacin (DAN) จากบริษัท Riedel-de Haën (Seelze, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมัน). Sulfamethazine (SMZ) จากบริษัท Wako Chemicals (VA, สหรัฐอเมริกา). Pirlimycin (PIR) จากบริษัท Pfizer (NY, สหรัฐอเมริกา).

ตัวทำละลาย Methanol (MeOH) ใช้เกรด HPLC และ acetonitrile (MeCN) ใช้เกรด HPLC ในการสกัดตัวอย่างและใช้เกรด LC/MS ในการวิเคราะห์โดยเป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท J.T. Baker (Deventer, ประเทศเนเธอร์แลนด์). สารเคมีที่ใช้ทั้งหมดเป็นเกรดความบริสุทธิ์สูง สำหรับงานวิเคราะห์ โดย เกลือ Ammonium formate, ammonium acetate, formic acid, and acetic acid (HOAc) ของบริษัท Fluka. Trichloroacetic acid (TCA) and heptafluorobutyric acid (HFBA) ของบริษัท Fisher Scientific (Leicestershire, สหราชอาณาจักร). Hexane ของบริษัท Kanto Chemical (Tokyo, ประเทศญี่ปุ่น) น้ำที่ใช้เป็นน้ำบริสุทธิ์คุณภาพสูง ผ่านระบบเตรียมน้ำบริสุทธิ์ของ Milli-Q purification system (Millipore, Billerica, MA, สหรัฐอเมริกา) มีค่าความต้านทาน $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$

แก้วที่ใช้กับเครื่องมือวิเคราะห์ทั้งแก๊สโครมาโทกราฟีและอาร์คอน เป็นแก้วที่มีความบริสุทธิ์สูง 99%

2.3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

สารละลายมาตรฐานตั้งต้นของสารทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองมีความเข้มข้น 0.1 กรัม ต่อลิตร และเลือกใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมกับสารแต่ละชนิด ได้แก่ aminoglycosides และ β -lactams เตรียมในน้ำ SAs, MCs, ENR และ OXO ละลายในตัวทำละลายอะซิโทไนไตรล์ TCs, LAs, AMPR, CIP และ DAN เตรียมในตัวทำละลายเมทานอล สารละลายทุกชนิดเก็บในขวดโพลีโพรพิลีน ที่อุณหภูมิ -20°C ยกเว้น β -lactams, cephalosporins และ aminoglycosides เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

สารละลายของสารมาตรฐานที่ใช้ในการปรับค่าเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของสารแต่ละชนิด เตรียมที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรในตัวทำละลายผสมเมทานอล-น้ำ อัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร

สารละลายที่ใช้ในการเตรียมกราฟเทียบมาตรฐาน เตรียมความเข้มข้นสูงสุดที่ระดับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตรในตัวทำละลายผสมเมทานอล-น้ำ อัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร และนำไปเจือจางให้ได้ระดับความเข้มข้นที่ต้องการโดยใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกันคือตัวทำละลายผสมเมทานอล-น้ำ อัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร

2.3.3 เครื่องมือที่ใช้และสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

เครื่องมือ LC-MS/MS ใช้เครื่อง Water Acquity Ultra performance liquid chromatography system คู่กับ Micromass Quattro Premier™ XE triple quadrupole mass spectrometer ของบริษัท Water, MA สหรัฐอเมริกา

คอลัมน์ zwitterionic ZIC-HILIC 2.1 mm x 100 mm; 3.5 μm particle size ของบริษัท Sequant (Umea ประเทศสวีเดน)

อุณหภูมิคอลัมน์ 40°C

อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 0.2 มิลลิิตรต่อนาที

ปริมาตรการฉีด 10 ไมโครลิตร

เฟสเคลื่อนที่
A. 50 mM ammonium formate pH 2.5
B. Acetonitrile

สัดส่วนการผสมเฟสเคลื่อนที่ 90% B (1.5 นาที) และลดลงเป็น 40%B ในเวลา 4 นาที และ 10% B ในเวลา 6 นาที และทิ้งระยะในคอลัมน์เข้าสู่สมดุลในสภาวะเริ่มต้นเป็นเวลา 5 นาที ก่อนการเริ่มต้นฉีดครั้งถัดไป

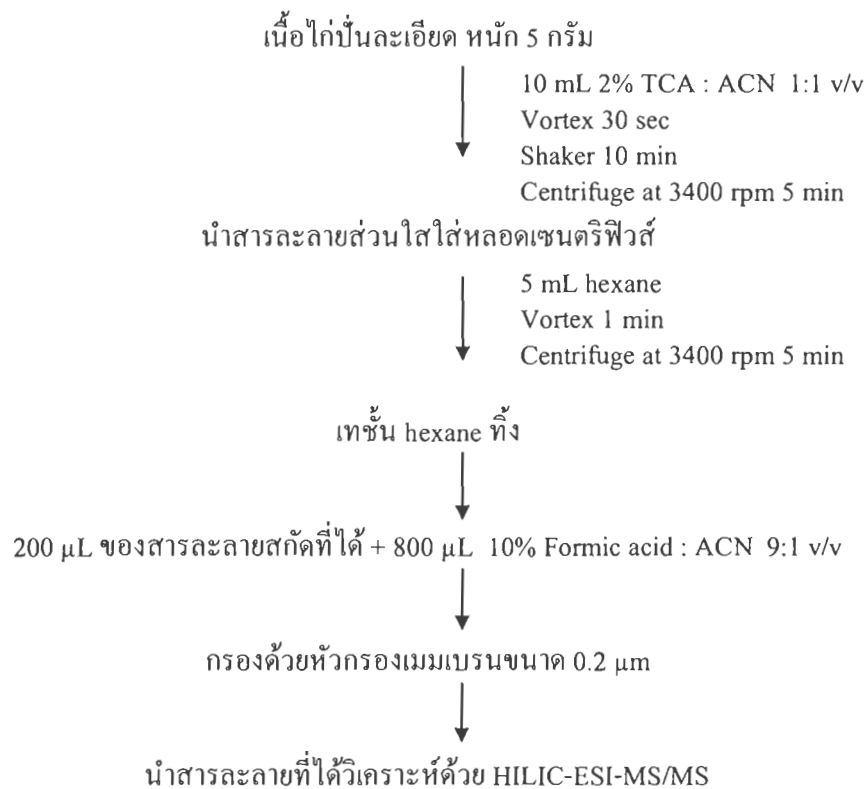
ระบบแมสสเปกโทเมตรีใช้ระบบ positive mode electrospray ionization (ESI+) สภาวะการทดลองที่ใช้ได้แก่

Capillary voltage	1.0 kV
Source temperature	120 °C
Desolvation temperature	350 °C
Extractor voltage	3 V
Cone gas (N ₂) flow	50 ลิตร ต่อชั่วโมง
Desolvation gas (N ₂) flow	1000 ลิตรต่อชั่วโมง
Collision gas (Ar)	3.5 x 10 ⁻³ mbar

2.3.4 การเตรียมตัวอย่าง

ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการเลือกใช้น้ำในท้องตลาด ทำการลอกหนังและแกะกระดูกออก สับและปั่นให้ละเอียด ทำการวิเคราะห์เบื้องต้นให้แน่ใจว่าไม่มียาเสพติดค้าง เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ -20 °C

การสกัดสารตัวอย่างทำโดยการนำเนื้อไก่ปั่นละเอียด 5 กรัม ซึ่งให้ทราบน้ำหนักละเอียดใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์ที่ทำด้วยโพลีโพรพิลีน เดิมสารละลายสกัด ที่เตรียมจาก สารละลายผสม 2%TCA กับตัวทำละลายอะซิโตนไตรล 1:1 โดยปริมาตร ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ทำการเขย่าโดยใช้ vortex เป็นเวลา 30 วินาที และเขย่าด้วยเครื่องเขย่าต่ออีก 10 นาที ทำการเซนตริฟิวส์ที่ความเร็วรอบ 3400 rpm (~945 rcf) เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายส่วนใสใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์หลอดใหม่ และเติมตัวทำละลายเฮกเซน 5 มิลลิลิตรเพื่อสกัดส่วนของไขมันที่ปนมาออก ทำการ vortex 1 นาที และเซนตริฟิวส์ที่ความเร็วรอบเดิมอีกครั้งเป็นเวลา 5 นาที เทชั้นของสารละลายเฮกเซนทิ้ง และใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายที่ได้จากการสกัดนี้ปริมาณ 200 ไมโครลิตรใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เจือจางด้วยสารละลายผสม 10% กรดฟอร์มิกในน้ำ ต่ออะซิโตนไตรล 1:9 โดยปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน และกรองสารละลายนี้โดยใช้ หัวกรองเมมเบรนชนิดไนลอนขนาด 0.2 ไมโครเมตร (ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Whatman , NJ สหรัฐอเมริกา) และนำไปวิเคราะห์ด้วย HILIC-ESI-MS/MS ขั้นตอนการสกัดเขียนให้เข้าใจง่ายขึ้นดังแผนภาพรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 : แผนผังการสกัดตัวอย่างเนื้อไก่ก่อนการวิเคราะห์

2.3.5 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการในงานวิจัยนี้ดำเนินการตามวิธีการของสหภาพยุโรป 2002/657/EC ครอบคลุมการบ่งชี้ ความเฉพาะเจาะจง ช่วงเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ ร้อยละการคืนกลับ ความเที่ยง และขีดจำกัดการวิเคราะห์

การบ่งชี้ชนิดของสารใช้คาร์เท็นชันใหม่ และคะแนนการบ่งชี้ (identification points) ของสารแต่ละชนิดตามข้อกำหนดของสหภาพยุโรป และใช้ค่าอัตราส่วนสัมพัทธ์ของไอออนที่เลือกใน Multireaction monitoring (MRM) transitions ค่าความจำเพาะของวิธีการทำโดยการวิเคราะห์ตัวอย่างแบบลงก์ของเนื้อไก่ที่ปราศจากสารตกค้างจากแหล่งต่างๆ กัน จำนวน 20 ตัวอย่าง ตรวจสอบค่าการรบกวนในช่วงเวลา และไอออนที่เข้ามารบกวนการวิเคราะห์ การศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ใช้วิธีการเติมสารมาตรฐานลงไปในการสกัดตัวอย่างแบบลงก์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 10 ระดับ ในช่วง 0.5-100 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยให้ครอบคลุมช่วง MRL (Maximum residue limit) หรือช่วงความเข้มข้นสูงสุดที่ยอมให้มีได้ ของสารแต่ละชนิด ค่าร้อยละการคืนกลับและค่าความเที่ยงทำโดยการเติมสารมาตรฐานลงไปในตัวอย่างไม่ใช่เนื้อไก่ที่ใช้เป็นแบบลงก์ที่ 3 ระดับความเข้มข้น (0.5, 1.0 และ 1.5 เท่าของค่า

MRL) 10 ตัวอย่างต่อการศึกษาแต่ละระดับความเข้มข้น และทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกันนี้ซ้ำเป็นเวลา 3 วัน ค่าความเที่ยงรายงานโดยใช้ค่าร้อยละของค่าความเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ของการทำซ้ำ 10 ครั้งภายใต้สภาวะการทดลองเดียวกัน ผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน วันเดียวกัน ห้องปฏิบัติการเดียวกัน และในวันที่แตกต่างกัน 3 วัน (รวมข้อมูลการศึกษาที่แต่ละระดับความเข้มข้น 30 ข้อมูล, n=30)

ในการวิเคราะห์ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดต่ำสุดของการทำปริมาณวิเคราะห์ (Limit of quantitation, LOQ) ของสารแต่ละชนิด ทำโดยการเติมสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่ำที่สุดลงไป ตัวอย่างเนื้อไก่ที่ใช้เป็นแบล็กและวัดค่าความสูงของสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (Signal to noise ratio, S/N) โดยคิดค่า LOD ที่ S/N = 3 และ LOQ ที่ S/N = 10 และทำการประมาณค่าขีดจำกัดการตัดสินใจ (decision limit, CC α) และขีดจำกัดความสามารถการตรวจวัด (detection capability, CC β) โดยการเติมสารมาตรฐานทั้ง 24 ชนิดในระดับความเข้มข้นที่ MRL ของสารแต่ละชนิดลงในตัวอย่างเนื้อไก่แบล็กจำนวน 20 ตัวอย่าง ทำการสกัดและวิเคราะห์และคำนวณค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ค่า CC α คือค่าความเข้มข้นที่กำหนดบวกด้วยค่า 1.64 เท่าของค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่า CC β คือค่าความเข้มข้นที่ระดับ CC α บวกด้วยค่า 1.64 เท่าของค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน

และเนื่องจากตามข้อกำหนดของสารบางชนิดค่า MRL จะคิดเป็นค่ารวมของสารทั้งกลุ่ม ดังนั้นในการเติมสารมาตรฐานของกลุ่มยา Sulfonamides จะทำการเติมสารแต่ละชนิดของกลุ่มนี้ที่ระดับ 0.1, 0.2 และ 0.4 เท่าของ MRL และ ENR และ CIP ที่ระดับ 0.2, 0.5 และ 1.0 เท่าของ MRL ในการศึกษาเชิงปริมาณของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการนี้

2.4 ผลของการวิจัยและการวิจารณ์การทดลอง

2.4.1 ภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดด้วย HILIC-ESI-MS/MS

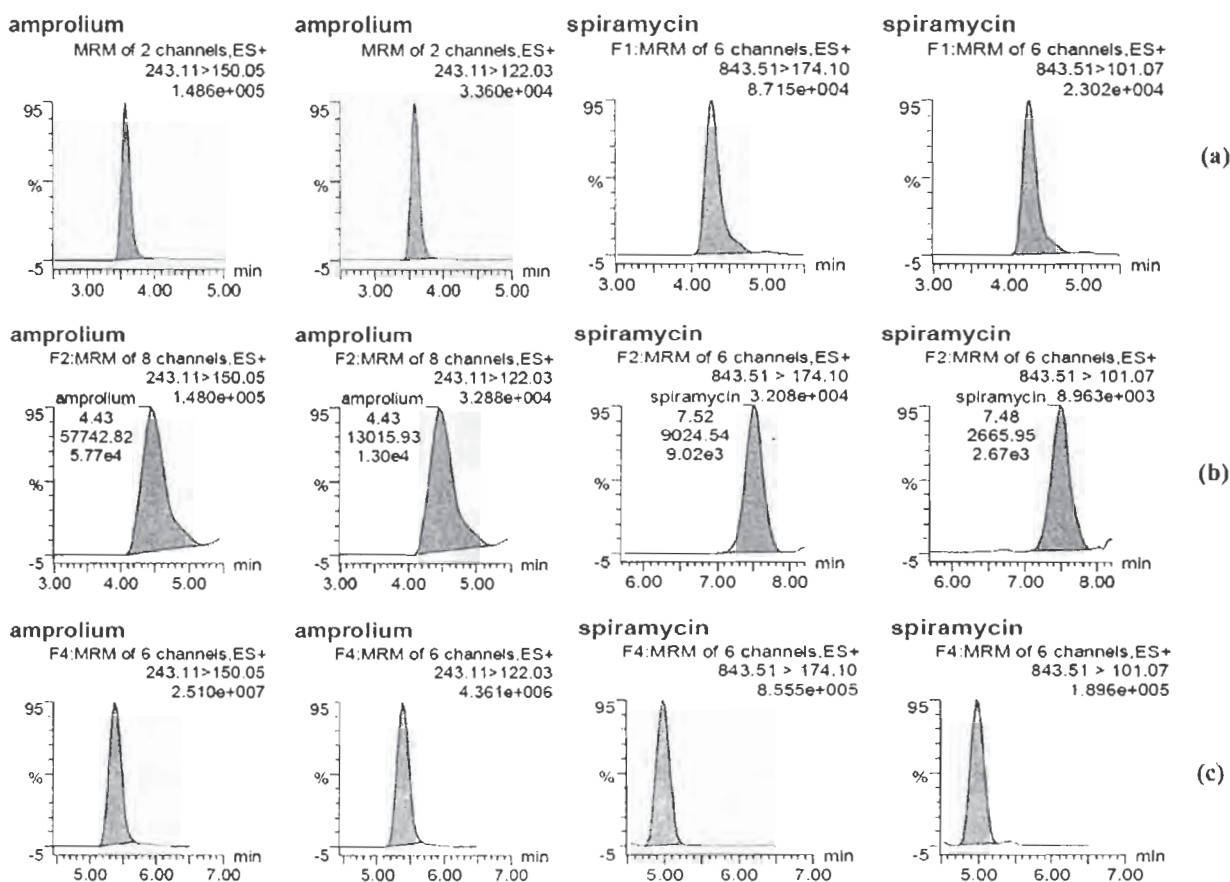
ตามที่ได้กล่าวไว้ในตอนต้นของงานวิจัยนี้ว่าสารที่มีสภาพขั้วสูงจะไม่เกิดการหน่วงเหนี่ยวในคอลัมน์ ชนิด reversed phase ได้ สารจะหลุดออกมาอย่างรวดเร็วพร้อมกับตัวทำละลายและไม่สามารถทำการวิเคราะห์สารเชิงปริมาณได้ หากทำการแยกโดยใช้ ion-pair chromatography อาจแก้ปัญหานี้ได้แต่สัญญาณที่ได้จะมีค่าต่ำ รูปร่างของพีคไม่ดีเท่าที่ควร อีกทั้งการเกิดไอออนจะมีค่าลดลงเนื่องจากการรบกวนของสาร ion-pair ที่ใช้ ด้วยเหตุผลดังกล่าวนี้ ผู้วิจัยจึงคาดว่า HILIC จะเป็นวิธีการแยกที่สามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้สารที่มีสภาพขั้วสูงจะเกิดการหน่วงเหนี่ยวในคอลัมน์ HILIC ได้ดีและจะออกมาได้ช้ากว่าสารที่มีสภาพขั้วต่ำ การที่จะชะสารออกมาให้เร็วขึ้นทำได้โดยการเพิ่มปริมาณของน้ำให้มากขึ้นซึ่งวิธีการนี้จะตรงกันข้ามกับวิธีการแยกโดย reversed phase ที่นิยมใช้กันทั่วไป คอลัมน์ HILIC ที่

มีจำหน่ายทางการค้า มีความแตกต่างกันทั้งหมู่ฟังก์ชันและโครงสร้าง ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยเลือกคอลัมน์ HILIC ที่แตกต่างกัน 2 ชนิดคือ ZIC-HILIC และ Acquity UPLC BEH HILIC พบว่าคอลัมน์ชนิด ZIC-HILIC ให้รูปร่างพีก โครมาโทแกรมการแยกที่ดีกว่า ใช้เวลาสั้นกว่า และสัญญาณการตอบสนองของสารทุกชนิดดีกว่าอีกคอลัมน์หนึ่งมาก ZIC-HILIC มีโครงสร้างของเฟสคงที่แบบ zwitterionic คือมีทั้งประจุบวกและประจุลบอยู่ในโครงสร้าง คือมีหมู่ sulfoalkylbetaine บิดเหนียวพันระกบโครงสร้างซิลิกาที่ทำหน้าที่เป็นวัสดุค้ำจุน เฟสคงที่นี้จะสามารถหน่วงเหนี่ยวสารได้ทั้งสารที่มีสภาพขั้ว มีประจุ และสารที่เป็นกลางได้ ทำให้มีความเลือกเฉพาะของการหน่วงเหนี่ยวสารได้กว้างขวางครอบคลุมสารหลากหลายชนิด

องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่นับว่ามีส่วนสำคัญในระบบการตรวจวิเคราะห์ LC-ESI-MS(MS) โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับการวิเคราะห์สารปริมาณน้อย เพราะจะต้องเลือกเฟสเคลื่อนที่ที่ช่วยเพิ่มการแตกตัวเป็นไอออน เกิดการแยกได้ดี และมีการรบกวนการวิเคราะห์ต่ำ ในงานนี้เลือกใช้เกลือแอมโมเนียมฟอร์มเมท เป็นเฟสเคลื่อนที่ชนิด A เพราะมีค่าประสิทธิภาพการแตกตัวเป็นไอออนสูง และมีค่าการละลายที่ดีในสารละลายอะซิโตนไทรล์ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ B เมื่อเทียบกับการใช้เกลือแอมโมเนียมอะซิเตท ในการทดลองนี้ได้ทำการปรับค่า pH ที่ 2.5, 3 และ 4 และทดลองใช้ความเข้มข้นของเกลือที่ 10, 50 และ 100 mM ทำการเปรียบเทียบค่าสัญญาณการตอบสนองและค่ารีเทนชันไทม์ พบว่าสัญญาณการตอบสนองมีค่าสูงสุดและรีเทนชันไทม์มีค่าน้อยสุดเมื่อใช้สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมฟอร์มเมทที่ pH 2.5 และที่ความเข้มข้น 50 mM โดยเฉพาะสารที่ออกมาช้าที่สุดคือ aminoglycosides จะมีสภาพไวสูงและพีกมีลักษณะสมมาตรในภาวะการทดลองดังกล่าว

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทดลองปรับเปลี่ยนอัตราส่วนการผสมของเฟสเคลื่อนที่เพื่อให้ได้การแยกที่ดีที่สุดและเวลาที่สั้นที่สุด ซึ่งพบว่าภาวะที่ดีที่สุดใช้เวลาในการวิเคราะห์ 15 นาที สารตัวสุดท้ายออกมาที่เวลา 7.65 นาที ที่อัตราส่วนการผสม 90% A แต่ต้องทิ้งเวลาอีก 10 นาที เพื่อให้สารรบกวนทั้งหมดออกจากคอลัมน์ให้หมดและทิ้งเวลาให้ระบบกลับเข้าสู่สมดุลเพื่อพร้อมต่อการฉีดตัวอย่างถัดไป อัตราส่วนการผสมแสดงไว้แล้วในหัวข้อเครื่องมือและภาวะการทดลอง

เพื่อเป็นการยืนยันให้เห็นชัดเจนถึงประสิทธิภาพของ ZIC-HILIC ผู้วิจัยได้ทำการทดลองวิเคราะห์สารยาตัวทั้ง 24 ชนิดโดยเทียบกับ reversed-phase และ ion-pair mode จะเห็นได้ชัดเจนดังรูปที่ 3 ว่าการแยกใน HILIC นั้นจะได้สภาพไวและรูปร่างพีกที่ดีกว่ามาก HILIC ช่วยลดการเกิดหางพีก และมีสภาพไวของการวิเคราะห์สาร AMPR มากกว่า 1690-1700 เท่า และ SPI 100-270 เท่า เมื่อเทียบกับ reversed-phase และ ion-pair mode ซึ่งมีผลให้ได้ S/N มีค่าสูง และค่าขีดจำกัดการวิเคราะห์ต่ำลงด้วย



รูปที่ 2.3 : การเปรียบเทียบสภาพไวและรูปร่างพีกของสาร amprolium และ spiramycin ภาพ (a) reversed-phase ใช้คอลัมน์ water acquity UPLC BEH shield RP18 (2.1 mm x100 mm; 1.7 μ m) ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เฟสเคลื่อนที่ A: 0.3% HOAc ใน 10 mM ammonium acetate และเฟสเคลื่อนที่ B: 0.3% HOAc ใน MeOH-MeCN (1:1,v/v) (b) ion-pair ใช้คอลัมน์ water acquity UPLC BEH shield RP18 (2.1 mm x100 mm; 1.7 μ m) ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เฟสเคลื่อนที่ A: 0.01 M HFBA ใน MeCN-น้ำ (5:95, v/v) และเฟสเคลื่อนที่ B: 0.01 M HFBA ใน MeCN-น้ำ (95:5, v/v) และ (c) HILIC ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ภาพการทดลองแสดงไว้ในหัวข้อ เครื่องมือและภาวะการทดลอง

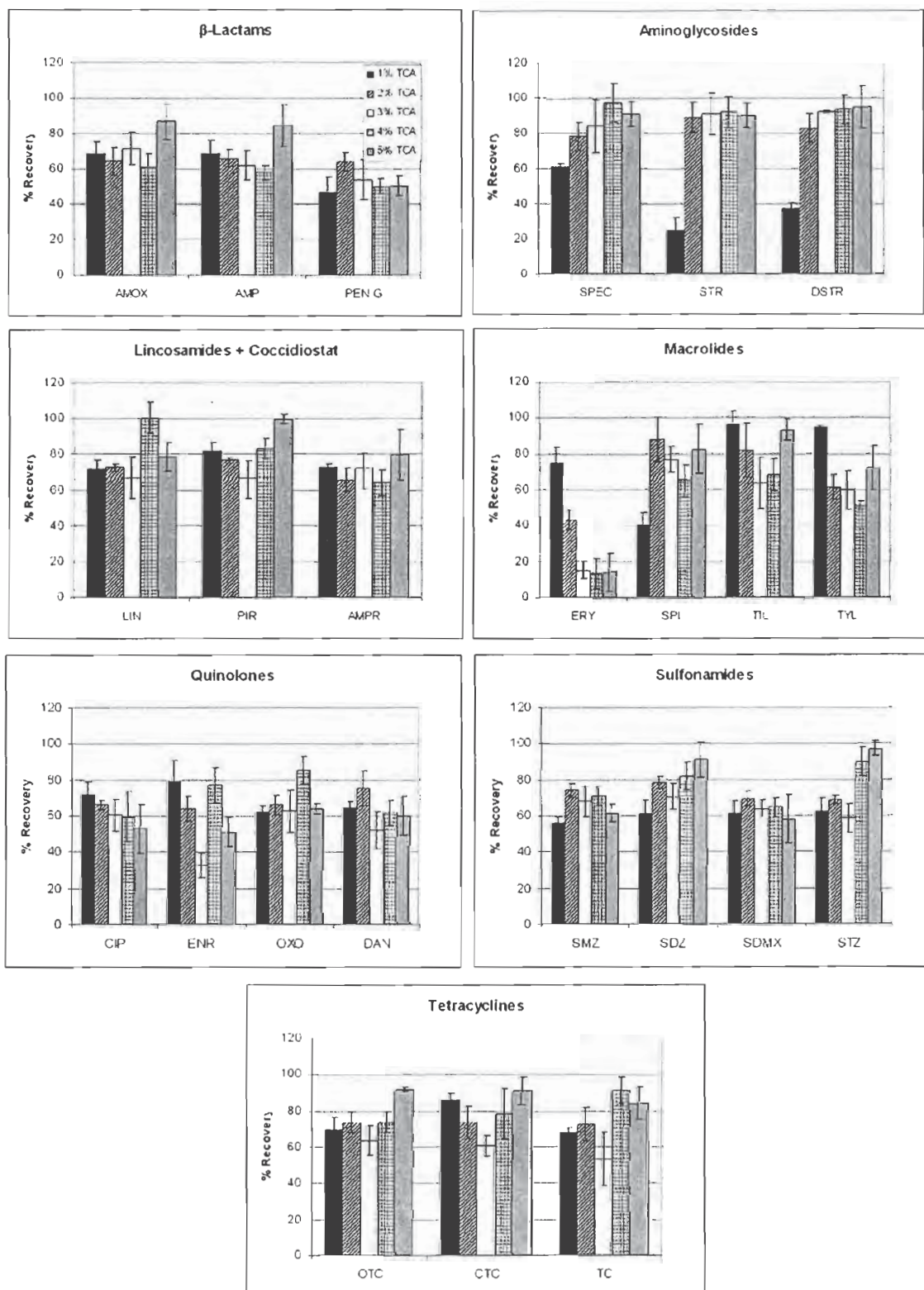
2.4.2 ภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่าง

การทำกรวิเคราะห์สารยาสัตว์นั้นไม่ว่าจะทำกรวิเคราะห์สารกลุ่มเดียวหรือกรวิเคราะห์หลายกลุ่มพร้อมกัน สิ่งที่ต้องคำนึงถึงคือสมบัติทางเคมีของสารนั้นๆ เนื้อเยื่อของสัตว์มีองค์ประกอบของโปรตีนสูงที่สามารถห่อหุ้มยาสัตว์ไว้ภายใน โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารที่มีสภาพขั้วสูง ดังนั้นการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมจึงเป็นสิ่งจำเป็นที่ต้องคำนึงถึงเป็นอย่างยิ่ง

ตัวทำละลายอินทรีย์เช่น อะซิโทไนไตรท์ (MeCN) เมทานอล (MeOH) หรือเอทานอล (EtOH) สามารถใช้ในการตกตะกอนโปรตีนในตัวอย่างชีวภาพได้ โดยทั่วไปนิยมใช้ MeCN เนื่องจากมีประสิทธิภาพการสกัดสูงและลดปริมาณไขมันในสารละลายสกัด Trichloro acetic acid (TCA) เป็นสารที่นิยมใช้ในการตกตะกอนโปรตีนจากเนื้อเยื่อสัตว์เช่นเดียวกับตัวทำละลายอินทรีย์ TCA เป็นกรดที่มีความแรงทำให้ค่า pH ของสารละลายลดลงมากเป็นผลให้โปรตีนเปลี่ยนสภาพและเกิดการตกตะกอน ช่วยปลดปล่อยสารที่ต้องการวิเคราะห์ให้หลุดออกมาจากโมเลกุลของโปรตีนเข้ามาอยู่ในสารละลายสกัดได้มากขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยทำให้สารที่ต้องการวิเคราะห์หลายชนิดอยู่ในภาวะเป็นกลางเช่นสารกลุ่ม aminoglycosides มีงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ระบุไว้ว่าค่าร้อยละการคืนกลับของสารกลุ่มยาสัตว์นี้จะมีค่าสูงขึ้นถ้าสกัดด้วย 5% TCA การตกตะกอนโปรตีนขึ้นกับค่า pH, ionic strength, อุณหภูมิของสารละลาย ความเข้มข้นและสมบัติทางเคมีและกายภาพของโปรตีนนั้นๆ ดังนั้นผู้วิจัยจึงนำข้อดีของ MeCN และ TCA มาใช้ โดยเลือกใช้สารละลายผสมของ TCA ในน้ำ-MeCN, 1:1%, v/v จะทำให้ได้การสกัดโปรตีนที่เหมาะสมและมีค่าร้อยละการคืนกลับของสารทุกชนิดที่ศึกษาดีที่สุด รูปที่ 2.4 แสดงผลของความเข้มข้นของ TCA ต่อค่าร้อยละการคืนกลับที่ได้จากการทดลองนี้

ที่ความเข้มข้น 1% TCA สาร PEN G, DSTR และ STR มีค่าร้อยละการคืนกลับต่ำ เนื่องจากสารที่กล่าวนี้มีหมู่อะมิโนอยู่เป็นจำนวนมาก จึงเกิดการรวมตัวกับโปรตีนได้ดี ทำให้สกัดออกมาได้ยาก ภาวะการทดลองนี้จะไม่สามารถสกัดสารที่มีประจุออกมาได้มากนัก หากเพิ่มปริมาณกรด TCA ให้มากขึ้นประสิทธิภาพในการสกัดสาร ในกลุ่ม aminoglycoside จะทำได้ดีขึ้น แต่สารบางชนิดจะมีค่าร้อยละการคืนกลับและสัญญาณการตอบสนองลดลงเมื่อใช้สารสกัดที่มี %TCA สูง โดยเฉพาะสาร ERY จะมีค่าร้อยละการคืนกลับน้อยกว่า 20 สารชนิดนี้อาจเสื่อมสภาพในสารละลายที่มีค่าความเป็นกรดสูง ดังนั้นที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 2% TCA ในสารละลาย น้ำ:MeCN, 1:1 v/v จะให้ค่าที่เหมาะสมทั้งค่าร้อยละการคืนกลับและสัญญาณการตอบสนองรวมถึงไม่ทำให้สารเสื่อมสภาพด้วย

สารสกัดที่เลือกใช้นี้ไม่เพียงแต่จะทำให้การสกัดดีขึ้นเท่านั้น แต่ยังทำให้การแยกและฟีกที่ปรากฏดีขึ้นมีความเหมาะสมในการใช้วิเคราะห์สารหลายชนิดพร้อมกันได้ สารกลุ่ม Sulfonamides, PEN G และ OXO มีค่ารีเทนชันไทม์อยู่ระหว่าง 1.42-1.76 นาที ในช่วงที่เฟสเคลื่อนที่มีปริมาณ MeCN สูง ทำให้ปราศจากสารรบกวน รูปร่างฟีกสมมาตรและมีสัญญาณการตอบสนองสูง กรณีสาร SPEC,



รูปที่ 2.4 อิทธิพลของความเข้มข้นของ TCA ที่มีต่อค่าร้อยละการคืนกลับที่ระดับความเข้มข้น MRL ของยาสัตว์ทั้ง 24 ชนิด (ทำซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละการทดลอง) ภาพการวิเคราะห์ตามทีระบุนิวไวน หัวข้อเครื่องมือและภาวะการทดลอง

DSTR และ STR ซึ่งเป็นสารที่มีสภาพขั้วสูงมาก จะหน่วงเหนี่ยวอยู่ในคอลัมน์ได้นาน ทำให้ใช้เวลานานที่สุดเมื่อเทียบกับสารอื่นโดยมีคาร์เทนชันใหม่ในช่วง 6.33 ถึง 7.65 นาที เมื่อสารออกมาช้า ทำให้สัญญาณการตอบสนองต่ำกว่าสารอื่นๆ ที่ออกมาก่อน ส่วนสาร TYL ถึง AMPR เป็นสารที่ออกมาในช่วงกลางของการแยก จะเป็นช่วงที่มีการรบกวนของการแยกสูง สารรบกวนหลายชนิดจะออกมาในช่วงนี้เช่นกัน ดังนั้นจึงอาจพบพีกคู่ในภาพของการวิเคราะห์สาร PIR และ LIN ผู้วิจัยคาดว่าผลจากตัวทำละลายจะทำให้เกิดการแยกพีกของสารสองชนิดนี้ ดังนั้นตัวทำละลายที่ใช้ในการทดลองจึงมีความสำคัญ และพบว่าตัวทำละลายที่เหมาะสมในการทดลองนี้คือใช้ตัวทำละลายผสม 10% formic acid ในน้ำ : MeCN อัตราส่วน 1:9 v/v จากการทดลองใช้อัตราส่วนของตัวทำละลายที่แตกต่างกัน จะเห็นได้ว่าที่อัตราส่วนการผสมตัวทำละลายที่มีสัดส่วนของน้ำสูงจะทำให้พีกของสาร PIR และ LIN เกิดการแยกออกเป็น 2 พีกดังเห็นได้ชัดในรูปที่ 2.5

ที่อัตราส่วนการผสมระหว่างสารละลายสกัดตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 3:7 (v/v) จะได้ค่าสัญญาณการตอบสนองการตรวจวัดสูงสุดและพีกที่ชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับที่อัตราส่วนผสม 2:8 (v/v) แต่พบว่าที่อัตราส่วนนี้นั้นสารที่ต้องการวิเคราะห์ชนิดอื่นจะมีค่าสัญญาณการตอบสนองต่ำ และกราฟเทียบมาตรฐานไม่เป็นเส้นตรง ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้ค่าอัตราส่วนการเจือจางสารที่ระดับ 2:8 (v/v) ในการศึกษาต่อไป

2.4.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการ

ในงานวิจัยนี้ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ยาเสพติดคั่งค้างทั้ง 24 ชนิด ในเนื้อไก่ที่พัฒนาขึ้น โดยดำเนินการตรวจสอบตามสหภาพยุโรป 2002/657/EC เพื่อให้วิธีการเป็นที่ยอมรับตามเกณฑ์การตรวจสอบตกค้างเพื่อการส่งออก ตัวแปรที่ศึกษาได้แก่ การบ่งชี้ ความเฉพาะเจาะจง ผลของเมทริกซ์ที่มีต่อการตรวจวัด ความเป็นเส้นตรง ร้อยละการคืนกลับ ความเที่ยง และขีดจำกัดการตรวจวัด ดังแสดงผลดังนี้

2.4.3.1 การบ่งชี้สาร (Identification)

ตามข้อกำหนดการระบุชนิดของยาตกค้าง ประเภทที่จำแนกอยู่ในกลุ่ม B คือสารที่มีเกณฑ์ความเข้มข้นสูงสุดของการตกค้างที่จ่อมให้มีได้ระบุอยู่ จะต้องใช้เกณฑ์คะแนนการบ่งชี้ไม่น้อยกว่า 3 คะแนน (Identification point, IP) ในกรณีผู้วิจัยเลือกการตรวจวัดสารทั้ง 24 ชนิด โดยเลือกวิธีการ MRM (Multireaction monitoring) โดยเลือก 1 precursor ion และ เลือก 2 product ions จาก precursor ion ที่กำหนดนี้ ดังนั้นแต่ละสารจึงมีคะแนน 4 คะแนน (precursor = 1 คะแนน, product ion = 1.5 คะแนน) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงนับได้ว่าเป็นที่น่าเชื่อถือและระบุบ่งชี้สารได้สูงกว่าเกณฑ์ที่กำหนด นอกจากนี้ยังใช้คาร์เทนชันใหม่ของสารแต่ละชนิดโดยวางค่าการยอมรับเวลาที่สารผ่านออกมานี้ให้อยู่ในช่วง ± 3 sd รวมถึงการพิจารณารูปร่างพีกและค่าสมมาตรประกอบด้วย และนอกเหนือจากนั้นยังใช้ค่า

อัตราส่วนของไอออนของทั้ง 2 transitions (จาก 2 MRM ที่เลือก) เข้ามาพิจารณาร่วมด้วย โดยค่าเกณฑ์การยอมรับอัตราส่วนไอออนนี้จะอยู่ในช่วง ± 3 sd เช่นเดียวกัน ดังแสดงผลในตารางที่ 2.2

2.4.3.2 ค่าการเลือกจำเพาะ (Selectivity or Specificity)

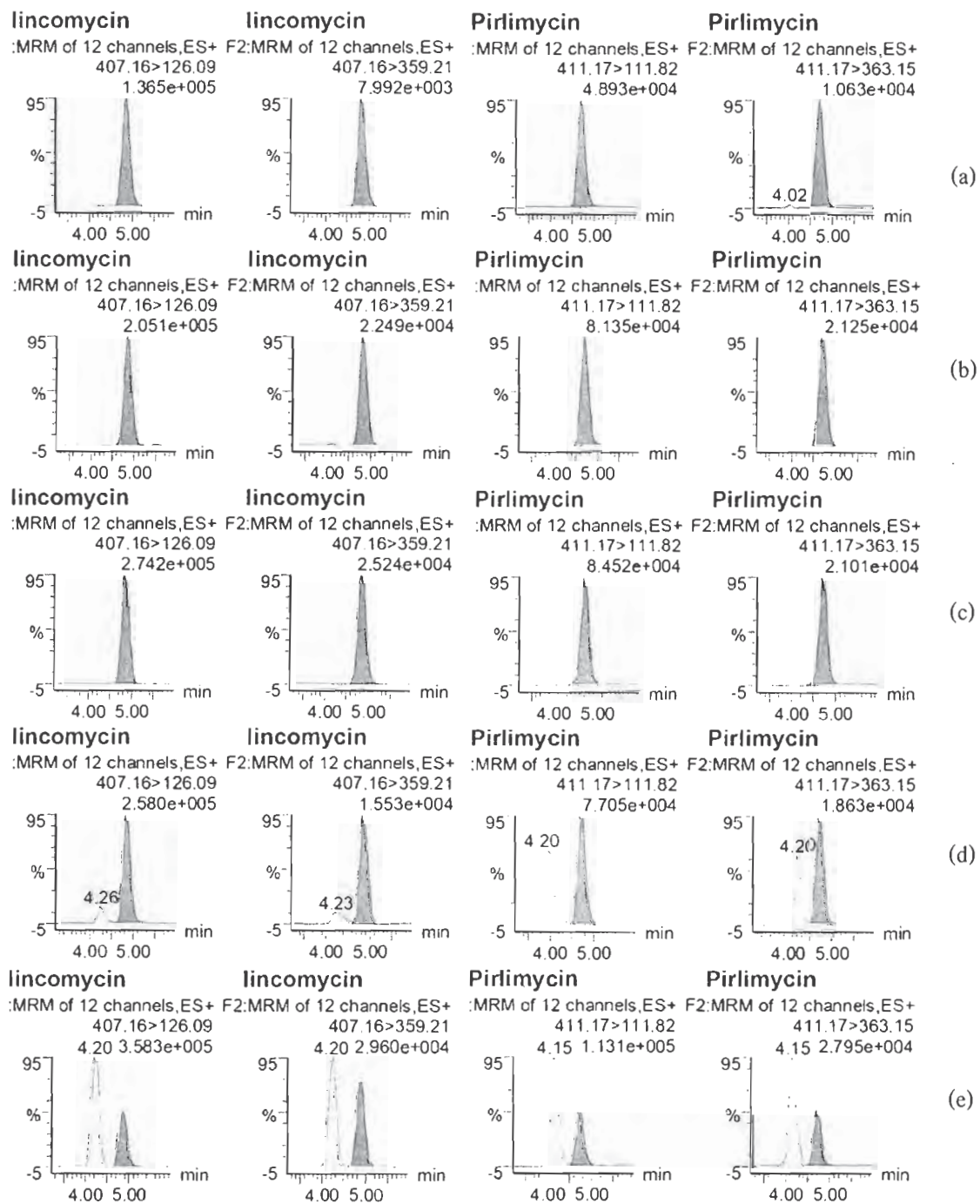
ค่าการเลือกจำเพาะนั้นนับว่ามีความสำคัญในการจำแนกสารที่สนใจออกจากสารชนิดอื่นๆ ในการทดลองนี้ทำโดยการเลือกตัวอย่างเนื้อไก่ที่ใช้เป็นแบล็กจากแหล่งผลิตหลายแหล่งที่แตกต่างกันเพื่อให้มีความหลากหลายขององค์ประกอบการรบกวนการตรวจวัด จำนวน 20 ตัวอย่าง และทำการเติมสารมาตรฐานลงไปในตัวอย่างไม่ไก่แบล็กเหล่านั้น ทำการวิเคราะห์ที่รีเทนชันไทม์ อัตราส่วนไอออน เพื่อการกำหนดค่าอัตราส่วนไอออนและเกณฑ์การยอมรับในการแยกความแตกต่างระหว่างสารที่ต้องการตรวจวัดกับสารรบกวนได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น

2.4.3.3 ผลของเมทริกซ์

ตัวอย่างเนื้อไก่จัดเป็นเมทริกซ์ที่มีโปรตีนและไขมันสูง ทำให้มีผลต่อการตรวจวัดและประสิทธิภาพของการวิเคราะห์โดยเฉพาะอย่างยิ่งในวิธีการตรวจวัดด้วยระบบ ESI-MS เพราะจะทำให้เกิดการลดลงของสัญญาณการเกิดไอออน นอกจากนี้ยังทำให้เกิดความสับสนในการตรวจวัด ดังนั้นในการหาค่าการรบกวนการตรวจวัดจากอิทธิพลของเมทริกซ์ทำได้โดยการวิเคราะห์เปรียบเทียบสัญญาณการตอบสนองของสารแต่ละชนิดเมื่ออยู่ในตัวทำละลายกับสัญญาณการตอบสนองของสารเมื่ออยู่ในสารละลายสกัดเมทริกซ์ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 5 จะเห็นได้ว่าการตอบสนองสัญญาณของสารจะลดลงในช่วงร้อยละ 79-99 ยกเว้นสาร DSTR และ STR ที่มีค่าเพิ่มขึ้นร้อยละ 53 และ 4 ตามลำดับ ด้วยเหตุผลนี้ในการทดลองนี้จึงเลือกที่จะใช้การเทียบมาตรฐานในสารละลายที่มีเนื้อเมทริกซ์เพื่อตัดการรบกวนของเมทริกซ์ที่มีผลให้การวิเคราะห์เชิงปริมาณผิดพลาดในการทดลองต่อไป

2.4.3.4 ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

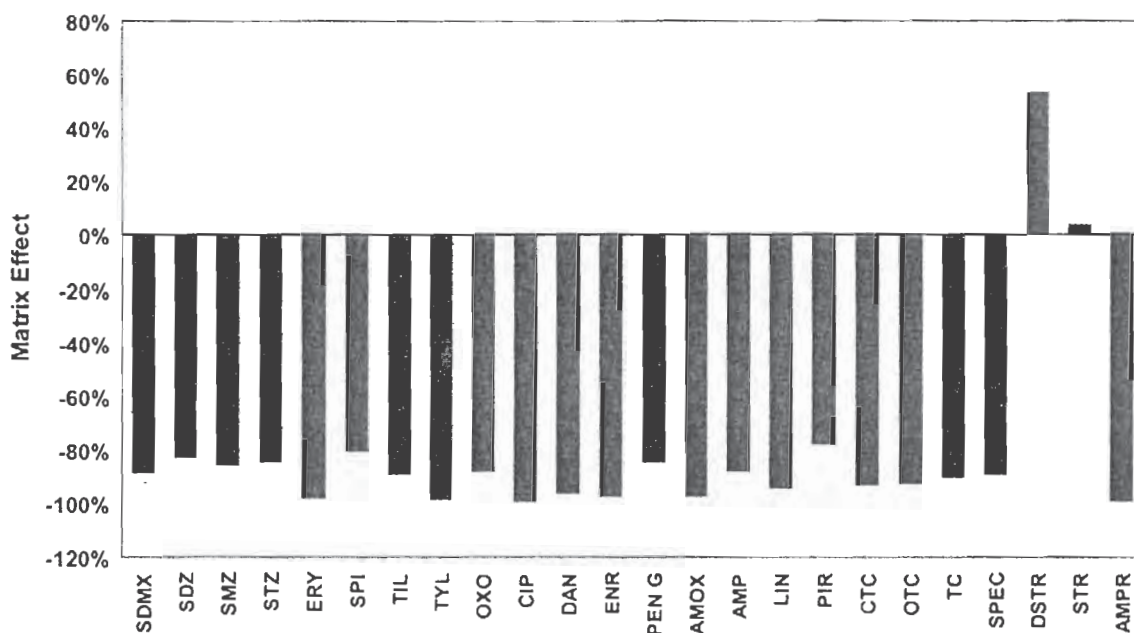
ความเป็นเส้นตรงของวิธีการตรวจวัดทำโดยการสร้างกราฟเทียบมาตรฐานโดยใช้สารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายสกัดเมทริกซ์แบล็ก โดยเตรียม 10 ระดับความเข้มข้น ในช่วง 1-100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และพิจารณาความเป็นเส้นตรงโดยใช้สมการ linear regression และพิจารณาค่า R^2 พบว่าสารทั้ง 24 ชนิดให้ค่าความเป็นเส้นตรงที่ดีที่สุด ค่า R^2 อยู่ในช่วง 0.9991-0.9938 ดังแสดงในตารางที่ 2.3



รูปที่ 2.5 ภาพโครมาโทแกรมเปรียบเทียบความแรงของตัวทำละลายที่มีผลต่อการแยกสาร lincomycin (LIN) และ pirlimycin (PIR) ที่ระดับความเข้มข้น MRL อัตราส่วนสารละลายสกัดตัวอย่างต่อตัวทำละลายผสม (10% formic acid ในน้ำ : MeCN (1:9, v/v); (a) 1:9, (b) 2:8, (c) 3:7, (d) 4:6 และ (e) 5:5

ตารางที่ 2.2 Molecular weights, retention times, t_R (acceptable ranges, ± 3 SD), ion transitions, optimized MS/MS parameters, and ion ratios (acceptable ranges, ± 3 SD) vs. concentrations of the 24 veterinary drugs in HILIC-UPLC-ESI(+)-MS/MS.

Analyte		M.W.	t_R (min)	Cone voltage (V)	Quantification transition (m/z)	CE (eV)	Confirmation transition (m/z)	CE (eV)	Ion ratio		
									0.5-MRL	MRL	1.5-MRL
Sulfadimethoxine	SDMX	310.3	1.42 \pm 0.03	40	311.08 > 156.16	25	311.08 > 108.16	35	0.34 \pm 0.03	0.34 \pm 0.03	0.35 \pm 0.01
Sulfamethazine	SMZ	278.3	1.47 \pm 0.02	35	279.09 > 186.02	20	279.09 > 124.07	30	0.56 \pm 0.06	0.55 \pm 0.03	0.56 \pm 0.03
Penicillin G	PEN G	334.4	1.50 \pm 0.01	45	335.32 > 217.24	15	335.32 > 90.91	35	0.83 \pm 0.18	0.80 \pm 0.06	0.82 \pm 0.02
Oxolinic acid	OXO	261.2	1.50 \pm 0.02	32	262.10 > 244.13	20	262.10 > 216.02	35	0.07 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01
Sulfadiazine	SDZ	250.3	1.55 \pm 0.02	25	251.10 > 155.91	15	251.10 > 107.84	25	0.48 \pm 0.03	0.48 \pm 0.03	0.48 \pm 0.01
Sulfathiazole	STZ	255.3	1.76 \pm 0.02	30	256.09 > 107.87	25	256.09 > 155.93	15	0.40 \pm 0.03	0.41 \pm 0.02	0.41 \pm 0.02
Tylosin	TYL	916.1	4.37 \pm 0.03	57	916.48 > 174.19	40	916.48 > 772.94	35	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01
Erythromycin	ERY	733.9	4.44 \pm 0.06	25	734.57 > 576.38	25	734.57 > 522.34	25	0.30 \pm 0.09	0.29 \pm 0.10	0.29 \pm 0.08
Enrofloxacin	ENR	359.4	4.55 \pm 0.06	30	360.14 > 245.09	35	360.14 > 316.00	26	0.68 \pm 0.17	0.69 \pm 0.18	0.65 \pm 0.09
Chlortetracycline	CTC	478.9	4.62 \pm 0.03	30	479.11 > 462.07	18	479.11 > 444.16	20	0.91 \pm 0.23	0.91 \pm 0.09	0.90 \pm 0.09
Danofloxacin	DAN	357.3	4.65 \pm 0.03	35	358.15 > 82.22	45	358.15 > 340.00	35	0.31 \pm 0.10	0.30 \pm 0.10	0.29 \pm 0.06
Ciprofloxacin	CIP	331.3	4.69 \pm 0.02	37	332.22 > 314.22	23	332.22 > 245.22	25	0.58 \pm 0.16	0.55 \pm 0.14	0.62 \pm 0.13
Pirlimycin	PIR	410.1	4.71 \pm 0.02	35	411.17 > 111.82	27	411.17 > 363.15	18	0.25 \pm 0.05	0.24 \pm 0.02	0.24 \pm 0.02
Ampicillin	AMP	349.4	4.75 \pm 0.02	25	350.23 > 105.90	20	350.23 > 192.10	15	0.31 \pm 0.08	0.34 \pm 0.12	0.36 \pm 0.13
Amoxicillin	AMOX	365.4	4.81 \pm 0.06	20	366.25 > 208.15	13	366.25 > 349.20	10	0.57 \pm 0.13	0.58 \pm 0.19	0.56 \pm 0.06
Tetracycline	TC	444.4	4.82 \pm 0.03	25	445.25 > 410.45	20	445.25 > 154.15	25	0.72 \pm 0.16	0.69 \pm 0.09	0.71 \pm 0.07
Lincomycin	LIN	406.5	4.85 \pm 0.02	40	407.16 > 126.09	30	407.16 > 359.21	20	0.07 \pm 0.04	0.08 \pm 0.02	0.07 \pm 0.03
Tilcomycin	TIL	869.1	4.88 \pm 0.03	55	869.53 > 174.39	55	869.53 > 696.51	50	0.53 \pm 0.14	0.52 \pm 0.09	0.56 \pm 0.18
Oxytetracycline	OTC	460.4	4.89 \pm 0.04	27	461.19 > 426.18	20	461.19 > 443.21	13	0.52 \pm 0.12	0.46 \pm 0.11	0.50 \pm 0.08
Spiramycin	SPI	843.1	4.97 \pm 0.04	30	843.51 > 174.10	45	843.51 > 101.07	58	0.22 \pm 0.12	0.24 \pm 0.11	0.24 \pm 0.05
Amprolium	AMPR	278.8	5.41 \pm 0.05	20	243.11 > 150.05	15	243.11 > 122.03	25	0.14 \pm 0.08	0.12 \pm 0.01	0.12 \pm 0.03
Spectinomycin	SPEC	332.3	6.33 \pm 0.03	35	351.21 > 333.27	20	351.21 > 97.75	30	0.76 \pm 0.15	0.80 \pm 0.14	0.79 \pm 0.16
Dihydrostreptomycin	DSTR	583.6	7.57 \pm 0.04	60	584.14 > 263.18	30	584.14 > 246.15	40	0.35 \pm 0.10	0.37 \pm 0.08	0.37 \pm 0.07
Streptomycin	STR	581.6	7.65 \pm 0.03	65	582.14 > 263.27	30	582.14 > 246.14	40	0.54 \pm 0.27	0.53 \pm 0.13	0.51 \pm 0.21



รูปที่ 2.6 ผลของเมทริกซ์ในการตรวจวัดด้วยเทคนิค LC-MS/MS แสดงค่าเปรียบเทียบร้อยละของความแตกต่างของสัญญาณการตอบสนองของกรณีสารมาตรฐานอยู่ในตัวทำละลายเทียบกับกรณีสารมาตรฐานอยู่ในสารละลายสกัดเมทริกซ์ที่ระดับความเข้มข้น MRL ของสารทุกชนิดที่ทำการตรวจวัด

2.4.3.5 ค่าร้อยละการคืนกลับ (Recovery)

การยืนยันความแม่นยำของวิธีการทำโดยการหาค่าร้อยละการคืนกลับ เมื่อเติมสารมาตรฐานลงไปในตัวอย่างไม่่ไอ้แบบล็ก ในงานวิจัยนี้ทดลองทำที่ 3 ระดับความเข้มข้นคือระดับค่า 0.5, 1.0 และ 1.5 เท่าของค่า MRL ของสารแต่ละชนิด ในการศึกษาที่แต่ละความเข้มข้นจะทำการวิเคราะห์ซ้ำ 10 ตัวอย่าง ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 2.4 ซึ่งจะเห็นได้ว่าสารส่วนใหญ่ให้ค่าร้อยละการคืนกลับดีมากในช่วง 70-99 ในทุกระดับความเข้มข้นที่ทำการศึกษา และอยู่ในเกณฑ์การยอมรับของสหภาพยุโรปที่กำหนดอยู่ที่ 70-120% แต่อย่างไรก็ตามมีสาร sulfonamides, ERY และ SPI มีค่าร้อยละการคืนกลับต่ำ คาดว่าน่าจะเกิดจากการที่สารสลายตัว กลุ่ม sulfonamides ให้ค่าร้อยละการคืนกลับในช่วง 60-73 และมีค่าเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ $\leq 11\%$ สำหรับ ERY ค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 53-57 และมีค่าเท่ากันในทุกระดับความเข้มข้น แสดงให้เห็นถึงการสูญหายไปของสารในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างหรืออาจเนื่องจากการที่ ERY มีค่า $pK_a \sim 8.8$ จะเกิดการแตกตัวเป็นประจุเมื่อทำการสกัดด้วยกรดและอาจเข้าร่วมตัวกับเมทริกซ์จึงทำให้มีค่าร้อยละการคืนกลับต่ำ อีกทั้งจากการศึกษาผลของเมทริกซ์พบว่าสาร

ชนิดนี้มีผลการรบกวนของเมทริกซ์สูงกว่า 98% ในกรณีของ SPI จะให้ผลคล้ายคลึงกันกับ ERY โดยมีค่าร้อยละการคืนกลับที่ 65-75 แต่แม้ว่าทั้งสารกลุ่ม sulfonamides, ERY และ SPI จะให้ค่าร้อยละการคืนกลับต่ำ แต่ให้ค่าความเที่ยงหรือค่าความเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ต่ำ $\leq 15\%$ จึงสรุปได้ว่าวิธีการนี้มีความแม่นยำในเกณฑ์ที่เป็นที่ยอมรับในการศึกษาทั้ง 24 ชนิด

2.4.3.6 ความเที่ยง (precision)

ความเที่ยงของวิธีการอธิบายได้ในเทอมของค่า repeatability (intra-day precision) และ within-laboratory reproducibility (inter-day precision) โดยใช้ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) จากการตรวจวัดซ้ำที่ระดับความเข้มข้น 0.5 MRL และ MRL ซึ่ดจำกัดของค่าความเที่ยงนั้นขึ้นกับระดับความเข้มข้นที่ศึกษาซึ่งจะใช้ค่าที่ทำนายได้จากสมการฮอร์วิทซ์ (Horwitz equation) ในการกำหนดเกณฑ์การยอมรับ ผลการศึกษาแสดงในตารางที่ 2.4 พบว่าความเที่ยงในวันเดียวกันของทุกสารที่ทำการศึกษามีค่าความเที่ยงน้อยกว่า 15% RSD ทั้งในระดับ MRL และ 0.5 MRL ยกเว้น AMOX มีค่า 18% RSD ที่ระดับ 0.5 MRL และ MRL และ SDZ อยู่ที่ระดับ 16% RSD ที่ 0.1 MRL ในการศึกษาความเที่ยงที่ทำในวันนั้นค่าความเที่ยงของสารทุกชนิดยังคงอยู่ในระดับน้อยกว่า 15% RSD เช่นเดียวกัน ค่าความเที่ยงของวิธีการนี้ไม่เกินค่าขีดจำกัดของสมการฮอร์วิทซ์ ดังนั้นจึงถือได้ว่าวิธีการตรวจวัดมีความเที่ยงในเกณฑ์ดีและเป็นที่ยอมรับได้

2.4.3.7 ขีดจำกัดการวิเคราะห์ (Analytical Limit)

ในการตรวจสอบความใช้ได้ของกลุ่มสารที่มีการกำหนดค่า MRL โดยใช้ค่ารวมความเข้มข้นของสารทั้งกลุ่มนั้น วิธีการจำเป็นที่จะต้องต้องมีข้อมูลที่มั่นใจของค่าความเข้มข้นต่ำสุดของกราฟมาตรฐาน (lowest calibrated level, LCL) ในงานวิจัยนี้เตรียมกราฟเทียบมาตรฐานโดยใช้สารมาตรฐานที่อยู่ในตัวทำละลายเนื้อเมทริกซ์หรือที่เรียกว่า matrix-matched calibration standards ค่า LODs และ LOQs ทำโดยการใช้ตัวอย่างเนื้อไก่เบลงก์ที่เติมสารที่ระดับความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ระดับ LCL ทำการวัดค่าสัญญาณการตอบสนอง และคำนวณค่าความเข้มข้นที่จะให้สัญญาณการตอบสนองที่เป็น 3 และ 10 เท่าของสัญญาณรบกวนตามลำดับ โดยเลือกเฉพาะค่า transition ที่ให้สัญญาณสูงสุดของสารแต่ละชนิดในการกำหนดค่า พบว่าค่า LODs ของสารทั้งหมดอยู่ระหว่าง 0.1-20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ LOQs อยู่ที่ 0.3-60 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ยกเว้น aminoglycosides และ AMPR จะมีค่า LOD และ LOQ สูงกว่าสารอื่น เนื่องจากสารเหล่านี้ออกมาจากคอลัมน์ช้าที่สุดทำให้มีค่าสภาพไวต่ำ และผลของเมทริกซ์รบกวนมากกว่าสารอื่นๆ แต่ค่าที่ได้นั้นยังคงต่ำกว่าค่า MRL ของสารแม้ว่าในการตรวจวัดของวิธีการนี้จะทำการเจือจางสารถึง 2:8 แต่สามารถตรวจวัดได้ต่ำกว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยอมรับได้ ดังนั้นวิธีการนี้จึงจัดได้ว่ามีประสิทธิภาพในการตรวจวัดได้อย่างดียิ่ง

ตารางที่ 2.3 Established maximum residue limit (MRL) for 24 veterinary drugs in chicken muscle and analytical limits of 24 analytes in chicken muscle extracts

Analyte	MRL (EU) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Typical R^2	LCL ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	CC α ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	CC β ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
SDMX	100 ^a	0.9938	0.5	0.1	0.3	108	115
SDZ	100 ^a	0.9987	0.5	0.1	0.3	110	117
SMZ	100 ^a	0.9970	0.5	0.1	0.3	107	117
STZ	100 ^a	0.9971	0.5	0.1	0.3	108	117
CIP	100 ^b	0.9940	1.0	1.5	5.0	112	136
DAN	200	0.9953	5.0	0.2	0.7	213	232
ENR	100 ^b	0.9945	1.0	0.5	1.7	110	124
OXO	100	0.9986	2.0	3.0	10	108	116
CTC	100	0.9973	2.0	1.0	3.0	106	120
OTC	100	0.9972	2.0	3.0	10	108	120
TC	100	0.9985	2.0	1.0	3.0	109	125
AMOX	50	0.9942	1.0	2.5	8.5	68	81
AMP	50	0.9973	1.0	1.5	5.0	58	73
PEN G	50	0.9989	1.0	1.5	5.0	58	65
LIN	100	0.9989	2.0	0.5	1.8	106	125
PIR	100	0.9988	2.0	0.2	0.7	105	120
ERY	200	0.9955	5.0	1.5	5.0	205	211
SPI	200	0.9970	5.0	4.0	13	213	226
TIL	50	0.9973	1.0	0.5	1.7	67	84
TYL	100	0.9991	2.0	1.5	5.0	105	109
AMPR	200	0.9956	5.0	8.0	25	215	233
DSTR	500	0.9988	10	20	60	509	522
SPEC	300	0.9974	5.0	10	30	307	320
STR	500	0.9979	10	20	60	510	525

^a Expressed in form of sum-MRLs of all sulfonamides

^b Expressed in form of sum-MRLs of ENR and its metabolite (CIP)

ตารางที่ 2.4 Recovery, repeatability, within-laboratory reproducibility, and acceptable RSD values for chicken muscle at different spiking levels.

Analyte	% Recovery (%RSD) ^a			Repeatability ^b						Within-laboratory reproducibility ^c		Acceptable RSD value ^d	
	0.5-MRL	MRL	1.5-MRL	0.5-MRL			MRL			0.5-MRL	MRL	0.5-MRL	MRL
				Day1	Day2	Day3	Day1	Day2	Day3				
SMZ ^e	61(11)	66 (3)	68 (8)	11	11	8	3	8	5	10	6	19	17
SDZ ^e	65 (8)	70 (4)	72 (7)	8	16	5	4	12	4	12	8	19	17
SDMX ^e	60 (11)	66 (4)	66 (6)	11	12	5	4	10	5	10	7	19	17
STZ ^e	68 (10)	73 (6)	66 (7)	8	11	4	6	7	4	9	7	19	17
CIP ^f	85 (6)	84 (10)	84 (5)	10	15	11	10	5	11	12	10	19	17
DAN	82 (8)	86 (9)	93 (6)	8	8	6	9	12	9	9	10	15	13
ENR ^f	77 (6)	93 (6)	92 (10)	6	13	12	6	7	7	11	7	19	17
OXO	72 (6)	68 (5)	99 (4)	6	12	5	5	9	4	8	6	17	15
CTC	79 (12)	80 (4)	89 (6)	12	15	10	4	4	9	14	7	17	15
OTC	70 (14)	73 (6)	93 (4)	14	9	8	6	6	5	13	6	17	15
TC	83 (10)	83 (4)	83 (5)	10	10	9	4	9	10	10	9	17	15
AMOX	68 (14)	76 (14)	68 (14)	14	18	13	14	14	12	15	13	19	17
AMP	73 (15)	71 (7)	79 (7)	15	4	9	7	6	8	13	8	19	17
PEN G	64 (6)	70 (5)	87 (5)	6	8	7	5	4	7	7	7	19	17
LIN	75 (4)	71 (2)	98 (3)	4	2	6	2	7	9	5	8	17	15
PIR	71 (3)	73 (5)	90 (4)	3	6	6	5	2	7	6	5	17	15
ERY	53 (6)	57 (4)	55 (7)	6	12	10	4	4	6	11	6	15	13
SPI	75 (7)	67 (7)	65 (7)	7	11	8	7	9	8	10	10	15	13
TIL	85 (10)	81 (6)	84 (5)	10	15	12	6	14	9	13	11	19	17
TYL	80 (4)	75 (4)	80 (7)	4	11	4	4	3	3	8	4	17	15
AMPR	77 (7)	85 (9)	91 (4)	7	8	8	9	9	9	8	11	15	13
DSTR	82 (12)	72 (8)	84 (9)	12	10	5	8	8	9	9	9	13	12
SPEC	83 (6)	77 (6)	88 (6)	6	8	8	6	5	7	7	6	15	13
STR	83 (12)	74 (9)	84 (3)	12	11	9	9	5	9	11	9	13	12

^a Recovery results of spiked samples for 10 replicates of 3 days at each spiking level

^b Repeatability results of spiked samples for 10 replicates at each spiking level

^c Within-laboratory reproducibility results for 3 days (n=30) at each spiking level

^d Acceptable RSD values calculated from Horwitz equation at each concentration levels

^e All sulfonamides spiked at 0.1-, 0.2-, and 0.4-MRL ^f ENR and CIP spiked at 0.2-, 0.5- and 1.0-MRL

ค่าขีดจำกัดการตัดสินใจ (decision limit, $CC\alpha$) ของวิธีการสามารถหาได้จากค่าความคลาดเคลื่อนทางสถิติที่ระดับ 5% ของความเชื่อมั่น หรือโอกาสที่จะเป็นความผิดพลาดในเชิงบวก (false positive) และขีดจำกัดความสามารถ (detection capability, $CC\beta$) คือค่าความเข้มข้นของสารที่วิธีการสามารถตรวจวัด บ่งชี้ และหาปริมาณได้ โดยมีความผิดพลาดของการระบุผลผิดน้อยกว่า 5% (false negative) กรณีสารที่มีค่า MRL กำหนด การหาค่า $CC\alpha$ และ $CC\beta$ ทำได้โดยการใช้กราฟเทียบมาตรฐาน หรือใช้ตัวอย่างเนื้อไก่แบลงก์ที่เติมสารมาตรฐานทุกชนิดที่ระดับความเข้มข้น MRL ลงไป จำนวน 20 ตัวอย่างก่อนการสกัด ในงานวิจัยนี้เลือกใช้วิธีการหลังเนื่องจากให้ความมั่นใจได้มากกว่า จากการตรวจวัดทั้ง 20 ตัวอย่าง หาค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (sd) จากนั้นรายงานค่า $CC\alpha$ โดยใช้ค่า $MRL + 1.64\ sd$ และค่า $CC\beta$ มีค่าเท่ากับค่า $CC\alpha - 1.64\ sd$ แสดงผลไว้ในตารางที่ 2.3

2.4.3 การประยุกต์ใช้กับตัวอย่างจริง

เพื่อเป็นการยืนยันความเหมาะสมของวิธีการ ผู้วิจัยจึงได้ทดลองใช้วิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้ในการตรวจสอบตัวอย่างเนื้อไก่ในท้องตลาดจำนวน 30 ตัวอย่างจากแหล่งจำหน่ายแตกต่างกันในกรุงเทพมหานคร และใช้กราฟเทียบมาตรฐานในเนื้อเมทริกซ์เช่นเดิม โดยใช้หลักการบ่งชี้สารที่มีค่ารีเทนชันใหม่ในช่วง $\pm 3\ sd$ และค่าอัตราส่วนไอออนของทั้ง 2 transitions ที่เลือกต้องอยู่ในช่วง $\pm 3\ sd$ เช่นกัน (จากค่าที่เคยกำหนดไว้ในขั้นตอนการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการ) พบว่าในเนื้อไก่ตัวอย่างที่ตรวจสอบนั้น พบเฉพาะสาร ENR ในตัวอย่างเดียวเท่านั้น ในระดับปริมาณ 6.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งไม่เกินค่า MRL ของสารนี้ที่กำหนดอยู่ที่ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งจากงานวิจัยนี้จะเห็นได้ว่าเนื้อไก่ที่จำหน่ายในท้องตลาดมีความปลอดภัยจากการปนเปื้อนสารกลุ่มยาสัตว์ และผู้วิจัยยังได้ทดลองใช้วิธีการเดียวกันนี้ในการตรวจสอบสารตกค้างกลุ่มนี้ในตัวอย่างกุ้งและไข่ พบว่าสามารถใช้ในการตรวจสอบได้ดีเช่นเดียวกัน

2.5 สรุปผลของการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้วิธีการตรวจวัดสารกลุ่มยาสัตว์ในเนื้อไก่ที่ครอบคลุมกลุ่มของยา 7 กลุ่ม คือ Sulfonamides, Quinolones, Tetracyclines, Penicillins, Aminoglycosides, Lincosamides, Coccidiostats และ Macrolides โดยเลือกสารตัวแทนของแต่ละกลุ่ม รวมสารที่ใช้ในการศึกษาทั้งสิ้น 24 ชนิด โดยใช้วิธีการสกัดตัวอย่างที่ง่ายและวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UPLC-MS/MS ใช้คอลัมน์แยกในระบบ HILIC สามารถแยกและวิเคราะห์สารเชิงปริมาณได้อย่างดีเยี่ยม การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการทำตามหลักเกณฑ์ของมาตรฐานวิธีการตรวจสอบสารตกค้างของสหภาพยุโรป ผลการทดสอบทั้งค่าการบ่งชี้ความเฉพาะเจาะจง ความเที่ยง ความแม่นยำ ความเป็นเส้นตรง และขีดจำกัดการวิเคราะห์ สารดชี้ให้เห็นชัดเจนว่าวิธีการที่พัฒนาขึ้นมานี้เป็นวิธีการที่ง่าย ตรวจสอบได้รวดเร็ว ครอบคลุมสารที่มีสมบัติทางเคมีที่

แตกต่างกัน สามารถตรวจวัดตัวอย่างได้ไม่น้อยกว่า 30-40 ตัวอย่างต่อวัน มีประสิทธิภาพความเที่ยงและความแม่นยำสูง เป็นที่ยอมรับในระดับสากล

2.6 เอกสารอ้างอิง

1. A.A.M. Stolker, U.A.T. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 15–53.
2. Commission of the European Communities, Decision of 12 August 2002 (2002/657/EC). *Off. J. Eur. Commun.* 221 (2002) 8–36.
3. A. Strasser, R. Dietrich, E. Usleber, E. Martlbauer, *Anal. Chim. Acta* 495 (2003) 11–19.
4. S. Sachetelli, C. Beaulac, J. Lagace, *Biochim. Biophys. Acta* 1379 (1998) 35–41.
5. T.F.H. Bovee, M.G. Pikkemaat, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 8035–8050.
6. A. Posyniak, J. Zmudzki, K. Mitrowska, *J. Chromatogr. A* 1087 (2005) 259–264.
7. S. Herranz, M.C. Moreno-Bondi, M.D. Marazuela, *J. Chromatogr. A* 1140 (2007) 63–70.
8. M. Becker, E. Zittlau, M. Petz, *Anal. Chim. Acta* 520 (2004) 19–32.
9. A. Kaufmann, K. Maden, *J AOAC Int.* 88 (2005) 1118–1125.
10. W. Zhu, J. Yang, W. Wei, Y. Liu, S. Zhang, *J. Chromatogr. A* 1207 (2008) 29–37.
11. K. Granelli, C. Branzell, *Anal. Chim. Acta* 586 (2007) 289–295.
12. J. Chico, A. Rabies, F. Centrich, R. Company, M.D. Prat, M. Granados, *J. Chromatogr. A* 1213 (2008) 189–199.
13. Y.A. Hammel, R. Mohamed, E. Gremaud, M.H. LeBreton, P.A. Guy, *J. Chromatogr. A* 1177 (2008) 58–76.
14. H. Li, P.J. Kijak, S.B. Turnipseed, W. Cui, *J. Chromatogr. B, Biomed. Appl.* 836 (2006) 22–38.
15. D.A. Bohm, C.S. Stachel, P. Gowik, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 8217–8223.
16. G. Stubbings, T. Bigwood, *Anal. Chim. Acta* 637 (2009) 68–78. 585
17. V. Carretero, C. Blasco, Y. Pico, *J. Chromatogr. A* 1209 (2008) 162–173.
18. R. Yamada, M. Kozono, T. Ohmori, F. Morimatsu, M. Kitayama, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70 (2006) 54–65. 588
19. A. Kaufmann, P. Butcher, K. Maden, M. Widmer, *J. Chromatogr. A* 1194 (2008) 66–79. 590
20. A.J. Alpert, *J. Chromatogr.* 499 (1990) 177–196.
21. T. Ikegami, K. Tomomatsu, H. Takubo, K. Horie, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A* 1184 (2008) 474–503.

22. E.S. Grumbach, D.M. Wagrowski-Diehl, J.R. Mazzeo, B. Alden, P.C. Iraneta, LC–GC N. Am. 22 (2004) 1010–1023.
23. A.R. Oyler, B.L. Armstrong, J.Y. Cha, M.X. Zhou, Q. Yang, R.I. Robinson, R. Dunphy, D.J. Burinsky, J. Chromatogr. A 734 (1996) 378–383.
24. W. Jiang, G. Fischer, Y. Girmay, K. Irgum, J. Chromatogr. A 1127 (2006) 82–91.
25. A.J. Alpert, M. Shukla, A.K. Shukla, L.R. Zieske, S.W. Yuen, M.A.J. Ferguson, A. Mehlert, M. Pauly, R. Orlando, J. Chromatogr. A 676 (1994) 191–202.
26. C.P. Dell’Aversano, P. Hess, M.A. Quilliam, J. Chromatogr. A 1081 (2005) 190–201.
27. G. Karlsson, S. Winge, H. Sandberg, J. Chromatogr. A 1092 (2005) 246–249.
28. Z. Huang, M.A. Richards, Y. Zha, R. Francis, R. Lozano, J. Ruan, J. Pharm. Biomed. Anal. 50 (2009) 809–814.
29. R. Oertel, V. Neumeister, W. Kirch, J. Chromatogr. A 1058 (2004) 197–201.
30. R. Oertel, U. Renner, W. Kirch, J. Pharm. Biomed. Anal. 35 (2004) 633–638.
31. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate- General, Guidelines for the Implementation of Decision 2002/657/EC, 609 SANCO/2004/2726 rev. 4, 2008.
32. SeQuant, A Practical Guide to HILIC, SeQuant, Umeå, Sweden, 2008.
33. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 22, 2009, Nutrient Data Laboratory Home Page: www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl. (assessed on October 2010)
34. U. Koesukwiwat, S. Jayanta, N. Leepipatpiboon, J. Chromatogr. A 1140 (2007) 147–156. 616
35. W. Horwitz, R. Albert, J. AOAC Int. 89 (2006) 1095–1109.

บทที่ 3

การวิเคราะห์แบบพร้อมกันของสารปฏิชีวนะหลายกลุ่มที่ตกค้างในน้ำด้วยการ สกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพาและตรวจวัดด้วยเทคนิค โครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูงมาก-แทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี

3.1 บทนำ

ปัญหาสิ่งแวดล้อมเป็นปัญหาที่ทั่วโลกให้ความสนใจทั้งในด้านอันตรายและผลกระทบต่อระยะยาว จำนวนประชากรและแหล่งอุตสาหกรรมที่เพิ่มขึ้นส่งผลอย่างมากต่อการเกิดมลภาวะทั่วโลก โดยเฉพาะมลภาวะทางน้ำ ปริมาณของเสียที่ปล่อยลงสู่แหล่งน้ำมีมากเกินไปที่ระบบนิเวศจะรองรับได้ สารเคมีปนเปื้อนในแหล่งน้ำจัดเป็นปัญหาสำคัญก่อให้เกิดผลกระทบต่อทั้งทางสิ่งแวดล้อมและสุขภาพของประชากร เช่น การที่สารปฏิชีวนะตกค้างในแหล่งน้ำจะส่งผลให้เกิดการดื้อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียหรือการดื้อยา ลดประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะ [1-4] เนื่องจากสารปฏิชีวนะนิยมใช้ในการรักษาและป้องกันการติดเชื้อจากแบคทีเรีย หรือใช้เร่งการเจริญเติบโตของฝูงปศุสัตว์อย่างผิดกฎหมาย กลุ่มสารปฏิชีวนะสำคัญที่พบว่าเป็นปัญหาปนเปื้อนในแหล่งน้ำมี 4 กลุ่ม คือ Macrolide, Sulfonamide, Tetracycline และ Quinolone [5] สารปฏิชีวนะกลุ่ม Macrolide นิยมใช้ในการรักษาโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจของสัตว์ กลุ่ม Sulfonamide ใช้ป้องกันและรักษาโรคสัตว์ในฟาร์มสัตว์เลี้ยงและสัตว์น้ำ กลุ่ม Tetracycline เป็นยาสำหรับมนุษย์และปศุสัตว์รักษาโรคจากแบคทีเรียชนิดแกรมบวกและแกรมลบ กลุ่ม Quinolone รักษาโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะของมนุษย์และสัตว์ สารปฏิชีวนะหลายชนิดออกฤทธิ์ร่วมกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงาน และจากการนำไปใช้อย่างกว้างขวาง สารปฏิชีวนะจึงนับเป็นแหล่งสารพิษสำคัญที่มักตรวจพบปนเปื้อนในแหล่งน้ำผ่านหลายวิธีการ [6] มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับปริมาณของสารปฏิชีวนะต่างๆที่พบในแหล่งน้ำอย่างกว้างขวาง [5,7] ความหลากหลายของสารปฏิชีวนะหลายกลุ่มที่มีสมบัติทางกายภาพและทางเคมีแตกต่างกัน ประกอบกับการที่สารปฏิชีวนะมีการตกค้างในแหล่งน้ำอยู่ในระดับต่ำ (ไมโครกรัมต่อลิตรถึงนาโนกรัมต่อลิตร) ทำให้การตรวจวิเคราะห์สารตกค้างหลายชนิดในน้ำมีความยากและซับซ้อน ต้องอาศัยวิธีการวิเคราะห์ที่มีความจำเพาะและสภาพไวสูง

เทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง-แทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี (high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการตรวจวัดสารปฏิชีวนะเนื่องจากสามารถแยกและตรวจวัดสารในสารผสมไม่ว่าจะเป็นสารในกลุ่มเดียวกันหรือสารต่างกลุ่มกัน นอกเหนือจากเทคนิคดังกล่าว เทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูงมาก-แทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี (ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry) เข้ามาแทนที่เทคนิคเดิมเนื่องจากมีประสิทธิภาพในการแยกสารและสภาพไวการวิเคราะห์สูงกว่า [8,9]

เทคนิคการสกัดด้วยของเหลว (liquid-liquid extraction) และเทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (solid-phase extraction) เป็นเทคนิคการเตรียมตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำ [4,8-12] เทคนิคดังกล่าวเป็นเทคนิคที่ยอมรับกันทั่วไป แต่ต้องใช้ตัวทำละลายและอุปกรณ์ที่มีราคาแพง การสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวง (hollow-fiber liquid-phase microextraction) พัฒนาโดย Pedersen-Bjergaard และคณะ [13] เป็นเทคนิคที่มีข้อดีเหนือกว่าเนื่องจากมีความจำเพาะและประสิทธิภาพในการเพิ่มความเข้มข้น (enrichment factor) สูง เส้นใยกลวงมีลักษณะเหมือนกับเมมเบรนขนาดใหญ่ แต่มีขนาดเล็กกว่า ราคาถูกสามารถใช้แล้วทิ้งได้ทันที ทำให้ไม่พบปัญหาสารตกค้างเหมือนในเมมเบรนขนาดใหญ่ และการที่เส้นใยกลวงมีขนาดเล็กทำให้มีข้อได้เปรียบหลายด้าน เช่น ใช้งานง่าย ไม่ต้องอาศัยปั๊มแรงดันสูงหรือเมมเบรนขนาดใหญ่ที่มีราคาแพง ใช้ตัวทำละลายปริมาณน้อยมาก และมีประสิทธิภาพในการขจัดสิ่งรบกวน (clean up) สูง ตัวทำละลายที่บรรจุอยู่ในรูพรุนที่ผนังของเส้นใยกลวงทำหน้าที่เป็นเมมเบรนชนิดของเหลว สารที่ต้องการวิเคราะห์จะถูกสกัดจากสารตัวอย่างหรือเรียกว่าสารละลายตัวให้ (Donor) ผ่านเมมเบรนชนิดของเหลวหรือตัวทำละลาย และสกัดเข้าสู่สารละลายตัวรับ (Acceptor) ที่บรรจุอยู่ภายในท่อกลวงของเส้นใยกลวง หากสารที่ต้องการวิเคราะห์เป็นกรดหรือเบสที่มีหมู่ฟังก์ชันที่เกิดประจุได้ จะใช้เทคนิคการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงชนิด 3 เฟส [14-16] การสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงมีการนำไปใช้ในการเพิ่มความเข้มข้นของสารในตัวอย่างน้ำประเภทต่างๆ เช่น น้ำดื่ม [17] น้ำประปา [18] น้ำจากแม่น้ำ [19] น้ำทิ้ง [20]

การสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพา (carrier-mediated hollow-fiber liquid-phase microextraction) พัฒนาโดย Ho และคณะ [21] อาศัยหลักการการจับคู่ของประจุ (ion-pairing) เพื่อเพิ่มขีดความสามารถในการสกัดของการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงให้สามารถสกัดสารที่ละลายน้ำได้โดยการสร้างสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสภาพเป็นกลางระหว่างสารที่ต้องการวิเคราะห์และสารตัวพา (carrier) ซึ่งละลายอยู่ในตัวทำละลาย ทำหน้าที่ให้เกิดการจับคู่ของประจุ (ion-pairing agent) ตัวอย่างของสารตัวพาที่มีการนำไปใช้ เช่น Aliquat336 [22-25], D2EHPA [22, 24, 26, 27], 2-ethylhexyl phosphonic acid [24] และ Sodiumoctanoate [21, 28] การสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพามีการนำไปศึกษาสารปฏิชีวนะกลุ่ม Tetracycline ในตัวอย่างชีวภาพ พบว่าสามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารได้ 3 ชนิดแต่ต้องเป็นสารที่มีสมบัติทางกายภาพและทางเคมีเหมือนกัน ทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง-ยูวีวิสิเบิลสเปกโตรเมตรีได้ที่ระดับไมโครกรัมต่อลิตร [25] สำหรับการสกัดสารปฏิชีวนะจากหลายกลุ่มในตัวอย่างน้ำมีการศึกษาโดยใช้อุปกรณ์สำหรับการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวง 4 รูปแบบที่แตกต่างกัน เพิ่มความเข้มข้นสารปฏิชีวนะ 4 ชนิดจาก 4 กลุ่ม ผลการทดลองพบว่าสามารถตรวจวัดสารปฏิชีวนะได้เพียง 3 ชนิดโดยใช้อุปกรณ์การสกัด 3 รูปแบบที่แตกต่างกันสำหรับสารแต่ละชนิด [29] ประสิทธิภาพในการเพิ่มความเข้มข้นสำหรับเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคใน

เฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น ค่าคงที่การแตกตัวของกรด (pKa) ชนิดของสารตัวพา สภาพะในการสกัด การเพิ่มความเข้มข้นของสารที่แตกต่างกันจะเป็นสมบัติเฉพาะตัวของสารที่ขึ้นกับสมบัติทางกายภาพและทางเคมี งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพาในการสกัดสารปฏิชีวนะ 11 ชนิดจาก 4 กลุ่มได้พร้อมกันจากการใช้อุปกรณ์การสกัดเพียงรูปแบบเดียว จากการใช้เส้นใยกลวงจุ่มในตัวทำละลายที่มีสารตัวพาและทำการศึกษาหาตัวแปรที่เหมาะสมในการสกัดเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุดในการเพิ่มความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ในตัวอย่างน้ำจากนั้นนำสารที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูงมาก-แทนเดมเมสสเปกโทรเมตรี

3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้

สารปฏิชีวนะมาตรฐานที่ใช้มีทั้งหมด 11 ชนิดจาก 4 กลุ่ม ได้แก่ Erythromycin (ERY), Spiramycin (SPI), Tilmicosin (TIL), Ciprofloxacin (CFC), Enrofloxacin (EFC), Danofloxacin (DFC), Sulfathiazole (STZ), Sulfamethazine (SMZ), Sulfamerazine (SMR), Oxytetracyclinehydrochloride (OTC) และ Tetracycline hydrochloride (TC) โครงสร้างทางเคมีและค่าคงที่การแตกตัวของกรดของสารปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิดแสดงในตารางที่ 3.1

สำหรับสารตัวพาที่ใช้ศึกษามี 3 ชนิด ได้แก่ Tricaprylmethylammonium chloride (Aliquat 336), Bis(2-ethylhexyl) monohydrogenphosphoric acid (D2EHPA) และ 2-Hydroxy-5-nonylacetophenoneoxime (LIX 84) สารเคมีอื่นๆที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ Dihexyl ether (DHE), Ammonium acetate, Ammonium formate, Disodium tetraborate decahydrate, Acetonitrile, Acetic acid, Hydrochloric acid, Formic acid, Sodium hydroxide, Methanol และน้ำบริสุทธิ์สูง (Milli-Q water)

3.2.2 วิธีการเตรียมสารมาตรฐาน

สารละลายมาตรฐานผสมของสารปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิดมีความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมได้จากการละลายสารปฏิชีวนะ ERY, SPI, TIL, STZ, SMZ, SMR, DFC และ EFC แต่ละชนิดใน Acetonitrile และสำหรับสารปฏิชีวนะ OTC และ TC ละลายสารแต่ละชนิดใน Methanol และละลายสาร CFC ด้วยสารละลาย 0.1 M formic acid การเก็บรักษาสารละลายมาตรฐานดังกล่าวทำได้โดยเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส และเมื่อนำไปใช้ให้นำสารละลายมาตรฐานทั้ง 11 ชนิดนี้เจือจางด้วยน้ำบริสุทธิ์สูงเพื่อให้ได้สารละลายผสมที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.3 ระบบการตรวจวัดด้วยเครื่องมือ

เครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูงมาก-แทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี

เครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูงมากใช้ระบบ Acquity ของบริษัท Waters เชื่อมต่อกับ ระบบ Micromass Quattro Premier™ XE benchtop quadrupole ของส่วนแทนเดมแมสสเปกโตรเมตรีโดยใช้การสร้างประจุแบบ positive electrospray ionization (ESI+) สำหรับการแยกสารในส่วนเครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูงมากจะใช้ระบบเฟสเคลื่อนที่ 2 ชนิดด้วยการแยกแบบ gradient elution และใช้คอลัมน์ในการแยกสารคือ Acquity UPLC BEH ของบริษัท Waters มีขนาดความยาวเท่ากับ 100 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายในขนาด 2.1 มิลลิเมตร และเฟสอยู่กับที่มีขนาด 1.7 ไมโครเมตร อัตราการไหลของสารเท่ากับ 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิคอลัมน์เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส เฟสเคลื่อนที่ชนิด A คือ 10 mM ammonium acetate และ 0.3% (v/v) acetic acid เฟสเคลื่อนที่ชนิด B คือ methanol:acetonitrile (50:50 v/v) และ 0.3% (v/v) acetic acid ปริมาณสารที่ฉีดเข้าเครื่องคือ 10 ไมโครลิตร การแยกสารปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิดใช้เวลา 5.5 นาที โดยใช้ระบบการแยกแบบ gradient elution ดังนี้ เริ่มต้นที่อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 95:5 (v/v) A:B ในเวลา 1.5 นาที จากนั้นเปลี่ยนเป็น 35:65 (v/v) A:B ที่เวลา 3.0 นาที และรักษาอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่นี้เป็นระยะเวลา 2.0 นาที จากนั้น ใช้เป็น 100% B ที่เวลา 5.5 นาที และรักษาอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่นี้เป็นระยะเวลา 4.5 นาที จากนั้นขั้นสุดท้ายใช้ 5% B ที่เวลา 10.5 นาที

ในส่วนของระบบแทนเดมแมสสเปกโตรเมตรีจะใช้สภาวะของเครื่องดังนี้ capillary voltage 1 kV, extractor voltage 3 V, source temperature 120°C, desolvation temperature 350°C, cone gas (nitrogen) flow 50 L h⁻¹, desolvation gas (nitrogen) flow 1000 L h⁻¹ และ collision gas (argon) 0.22 mL min⁻¹ ที่ cell pressure 0.35 Pa ตรวจวัดประจุด้วยระบบ Multiple reactions monitoring โดยการเลือกช่วง transition ที่มีสภาพไวสูงสุด 2 ช่วงใช้สำหรับการวิเคราะห์ทางคุณภาพและทางปริมาณ ซึ่งช่วง transition ของสารปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิดที่เลือกใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.2 ระบบควบคุมเครื่องมือและประมวลผลใช้ MassLynx 4.1 software package

3.4 ขั้นตอนของเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวง

เส้นใยกลวงที่ใช้ศึกษาเป็นชนิด polypropylene รุ่น Accurel® PP Q3/2 ของบริษัท Membrana มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในเท่ากับ 600 ไมโครเมตร ความหนาของผนังเท่ากับ 200 ไมโครเมตร มีขนาดรูพรุนเท่ากับ 0.2 ไมโครเมตร และมีความเป็นรูพรุนคิดเป็น 75% การเตรียมอุปกรณ์การสกัดเริ่มจากการกำจัดสิ่งสกปรกบนเส้นใยกลวงด้วยการทำ sonication ใน acetone จากนั้นทิ้งให้แห้ง ซึ่งเส้นใยกลวงแต่ละชิ้นจะใช้เพียงครั้งเดียวเท่านั้นเพื่อลดปัญหาสารตกค้าง เส้นใยกลวงจะนำไปจุ่มใน 20%(w/v) Aliquat 336 ใน DHE เป็นเวลา 60 นาที เป็นการบรรจุตัวทำละลายที่มีสารตัวพาให้เข้าสู่ภายในรูพรุนของ

เส้นใยกลวง จากนั้นเป่าไล่ตัวทำละลายส่วนเกินที่อยู่ภายในท่อกลวงด้วยอากาศเพื่อให้สามารถบรรจุสารละลายตัวรับเข้าสู่ท่อกลวงโดยใช้กระบอกเข็มฉีดยาประเภท gastight รูปแบบของอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดมีการดัดแปลงจากงานวิจัยของ Pedersen-Bjergaard และ Rasmussen [13] คือ บริเวณปลายทั้ง 2 ด้านของเส้นใยกลวงจะยึดด้วยปลายเข็มฉีดยาและแขวนในลักษณะรูปตัว U อยู่บนฝาของขวดทดลองขนาด 24 มิลลิลิตร

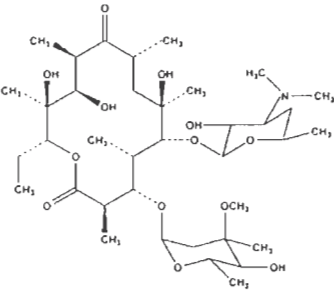
การสกัดเริ่มจากการบรรจุสารละลายตัวอย่างหรือเรียกว่าสารละลายตัวให้ที่ปรับค่า pH ให้ได้ตามต้องการด้วย Sodium tetraborate ลงในขวดทดลองขนาด 24 มิลลิลิตร และนำส่วนของเส้นใยกลวงที่บรรจุสารละลายตัวรับ 20 ไมโครลิตรและแขวนเตรียมไว้บนฝาขวดแล้วในลักษณะรูปตัว U มาจุ่มลงในขวดทดลองและนำไปวางบนเครื่อง multi-station magnetic stirrer ของบริษัท IKA เพื่อทำการสกัดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเป่าไล่สารละลายตัวรับในท่อกลวงลงสู่ขวด vial และเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียสจนกระทั่งวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูงมาก-แทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี ค่าประสิทธิภาพในการเพิ่มความเข้มข้นจะใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของวิธีการ มีสูตรในการคำนวณค่า [23] ดังนี้

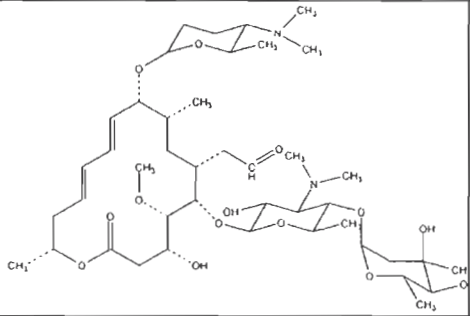
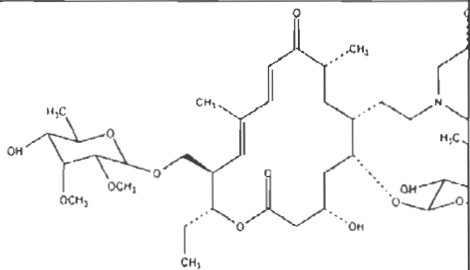
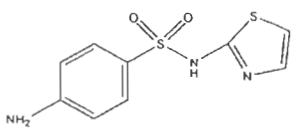
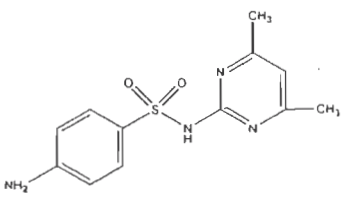
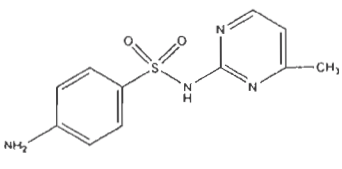
$$\text{Enrichment factor (EF)} = \frac{C_a}{C_d} = \frac{n_a V_d}{n_d V_a}$$

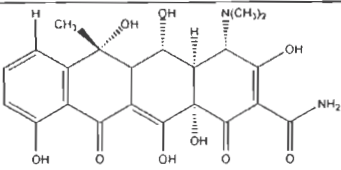
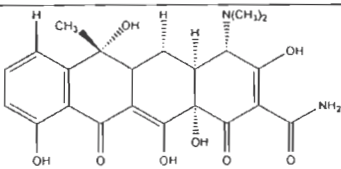
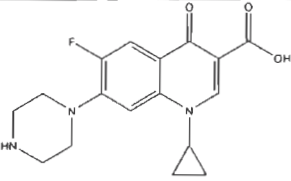
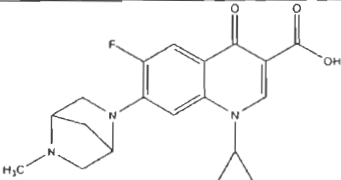
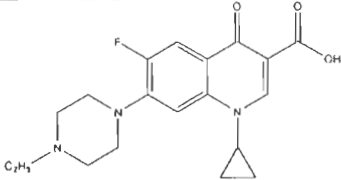
เมื่อ c_d และ c_a คือความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ในสารละลายตัวให้ (d) และสารละลายตัวรับ (a)

ค่า n_d และ n_a คือ จำนวนโมลของสารที่ต้องการวิเคราะห์ สำหรับ V_d และ V_a คือ ปริมาตรของสารละลายตัวให้และสารละลายตัวรับ

ตารางที่ 3.1 สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดลอง

กลุ่ม	สารที่ต้องการวิเคราะห์	โครงสร้างทางเคมี	น้ำหนักโมเลกุล	pKa [31,33]
Macrolide	Erythromycin (ERY)		733.93	8.9

กลุ่ม	สารที่ต้องการ วิเคราะห์	โครงสร้างทางเคมี	น้ำหนัก โมเลกุล	pKa [31,33]
	Spiramycin (SPI)		843.05	7.9
	Tilmicosin (TIL)		855.11	7.4 8.5
Sulfonamide	Sulfathiazole (STZ)		255.32	2.0 7.1
	Sulfamethazine (SMZ)		278.33	2.1 7.5
	Sulfamerazine (SMR)		264.30	2.1 7.0

Tetracycline	Oxytetracycline (OTC)		460.43	3.2 7.5 8.9
	Tetracycline (TC)		444.43	3.3 7.9 9.6
Quinolone	Ciprofloxacin (CFC)		331.34	3.0 6.1 8.7 10.6
	Danofloxacin (DFC)		357.38	3.9 6.1 8.6 9.9
	Enrofloxacin (EFC)		359.39	3.9 6.2 7.6 9.9

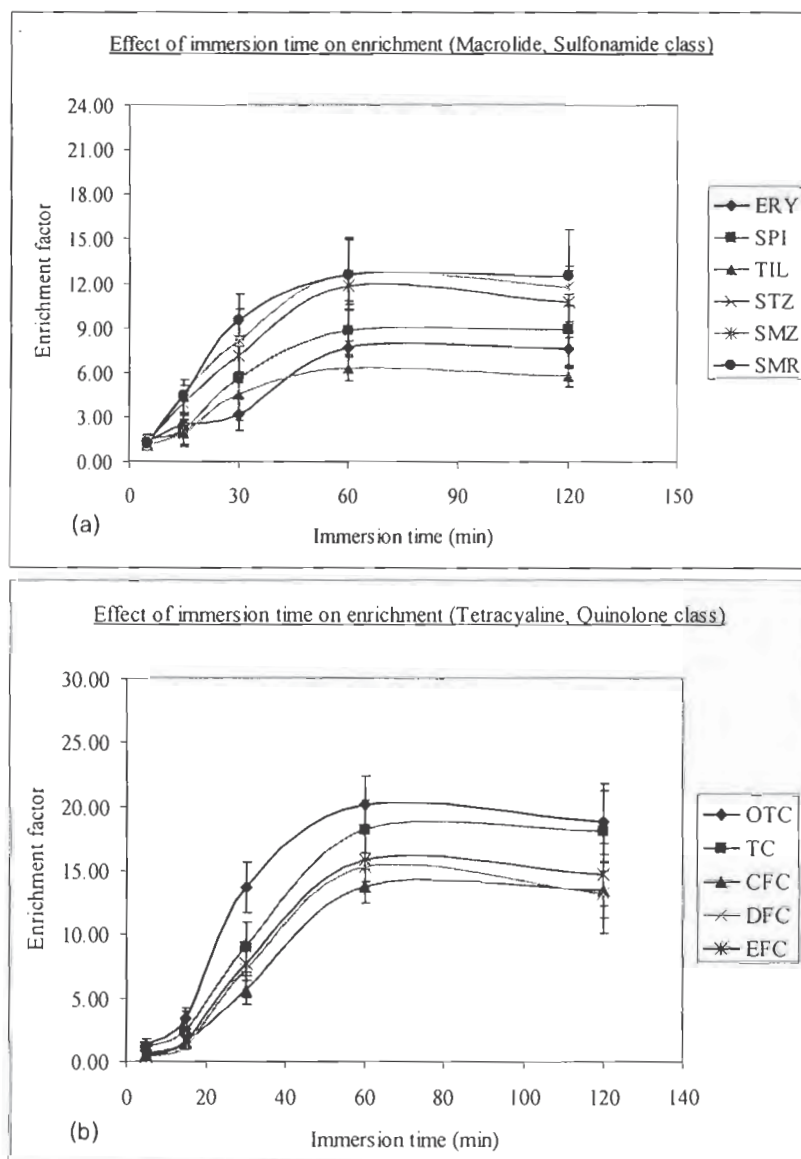
ตารางที่ 3.2 ตัวแปรต่างๆในระบบ Multiple reactions monitoring ของสารปฏิชีวนะในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโทรเมตรี

สารปฏิชีวนะ	Retention time (min)	Dwell time (s)	Cone voltage (V)	Quantification transition	Collision energy (ev)	Confirmation transition	Collision energy (ev)
Erythromycin	4.76	0.03	40	734.45 > 158.28	30	734.45 > 576.26	30
Spiramycin	4.22	0.02	30	843.51 > 174.10	45	843.51 > 101.07	58
Tilmicosin	4.49	0.03	55	869.53 > 696.51	55	869.53 > 174.39	50
Sulfathiazole	3.99	0.03	30	256.09 > 155.93	15	256.09 > 107.87	25
Sulfamethazine	4.40	0.03	35	279.09 > 186.02	20	279.09 > 124.07	30
Sulfamerazine	4.18	0.02	30	265.08 > 171.99	20	265.08 > 155.96	25
Oxytetracycline	4.18	0.1	27	461.10 > 426.14	25	461.10 > 443.07	15
Tetracycline	4.12	0.1	30	445.08 > 410.11	20	445.08 > 153.88	27
Ciprofloxacin	4.12	0.04	35	332.05 > 314.09	25	332.05 > 245.04	30
Danofloxacin	4.07	0.05	35	358.15 > 340.00	45	358.15 > 82.22	35
Enrofloxacin	4.17	0.05	30	360.14 > 245.09	35	360.14 > 316.00	35

3.5 ผลการวิจัย อภิปรายและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.5.1 ผลของเวลาที่ใช้ในการจุ่มเส้นใยกลวงที่มีต่อการเพิ่มความเข้มข้นของสาร

ก่อนที่จะเข้าสู่กระบวนการสกัด รูปพรุนที่ผนังของเส้นใยกลวงจะต้องบรรจุด้วยตัวทำละลาย ด้วยการจุ่มเส้นใยกลวงลงในตัวทำละลาย ทำการศึกษาหาเวลาที่ใช้ในการจุ่มที่เหมาะสม โดยศึกษาที่ระยะเวลาต่างๆ ได้แก่ 5, 15, 30, 60 และ 120 นาที เพื่อดูประสิทธิภาพการเพิ่มความเข้มข้นของสาร ปฏิชีวนะซึ่งแสดงในรูปของค่า enrichment factor จากผลการทดลองดังแสดงในรูปภาพที่ 1 พบว่าค่า enrichment factor เพิ่มขึ้นเมื่อใช้ระยะเวลาในการจุ่มนานขึ้นจนถึงเวลา 60 นาที หลังจากนั้นค่า



รูปที่ 3.1 ผลของเวลาที่ใช้ในการจุ่มเส้นใยกลวงในตัวทำละลายที่มีต่อการเพิ่มความเข้มข้นของสาร
(a) สารปฏิชีวนะกลุ่ม macrolide และ sulfonamide (b) สารปฏิชีวนะกลุ่ม tetracycline และ quinolone

enrichment factor จะคงที่ การจุ่มเส้นใยกลวงเป็นระยะเวลาสั้นๆอาจทำให้การบรรจุของสารในรูพรุนไม่สมบูรณ์ ดังนั้นเวลาในการจุ่มสารที่เหมาะสมคือ 60 นาทีโดยสามารถจุ่มเส้นใยกลวงได้หลายเส้นพร้อมๆกันในตัวทำละลายเพื่อใช้ในการศึกษาตัวแปรอื่นต่อไป

3.5.2 ผลของสารตัวพาและการเลือกตัวทำละลาย

ตัวทำละลายที่บรรจุภายในรูพรุนที่ผนังของเส้นใยกลวงสำหรับเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพาถือเป็นตัวแปรสำคัญที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัด ตัวทำละลายที่ใช้ในการเพิ่มการแพร่ของสารที่ต้องการวิเคราะห์จากสารละลายตัวให้สู่สารละลายตัวรับควรมีคุณสมบัติที่ดีคือไม่เข้ากันกับน้ำและเหมาะสมกับวัสดุที่เป็นเส้นใยกลวง ทำการศึกษาทดลองเบื้องต้นเพื่อให้สามารถเลือกตัวทำละลายในการสกัดสารปฏิชีวนะหลายชนิดจากหลายกลุ่มที่มีสมบัติทางกายภาพและทางเคมีที่แตกต่างกันได้อย่างเหมาะสม โดยศึกษาผลของตัวทำละลายแบบไม่มีสารตัวพาด้วยตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วแตกต่างกัน 6 ชนิดในการสกัดด้วยเทคนิคนี้ คือ 1-octanol, 1-decanol, DHE, undecane, dodecane และ toluene จากผลการทดลองดังแสดงในรูปภาพที่ 2 พบว่าค่า enrichment factor ของสารปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิดมีค่าต่ำอยู่ในช่วง 1-12 เท่า DHE เป็นตัวทำละลายที่ให้ค่าสูงสุดเนื่องจากมีสภาพขั้วเหมาะสมกับสารที่ต้องการวิเคราะห์จึงเลือกเป็นตัวทำละลายในการศึกษาผลของการเติมสารตัวพาไกลของการสกัดด้วยเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงแบบไม่มีสารตัวพาขึ้นกับการแพร่แบบ passive ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ในสารละลายตัวให้และสารละลายตัวรับ [30]

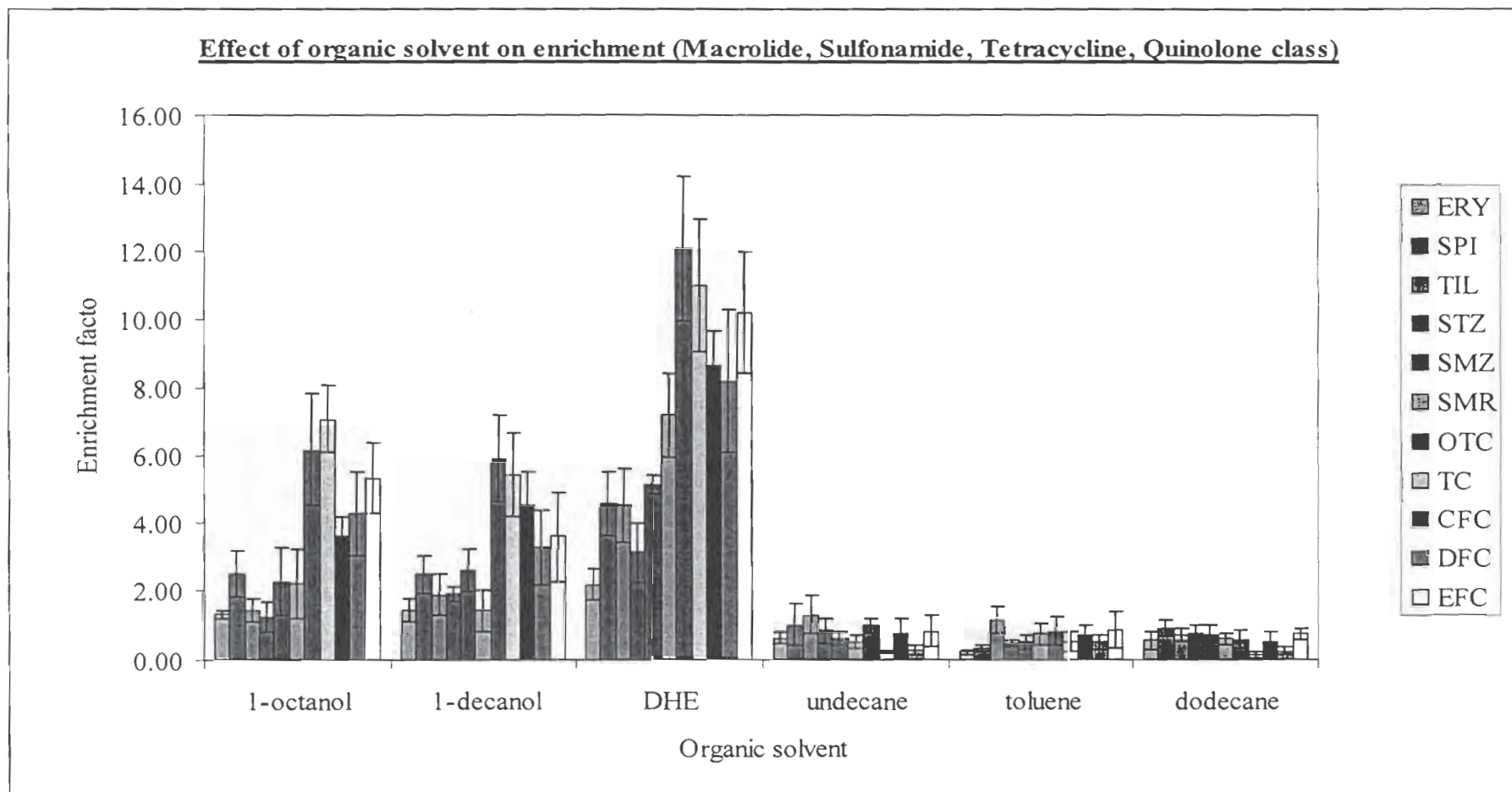
เทคนิคการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพามีกลไกในการสกัดหลายชนิด ได้แก่ การแพร่ ผลของการจับคู่ประจุ (ion-pairing effect) ค่าความแตกต่างของ pH (pH gradient) ค่าคงที่การแตกตัวของกรดของสารปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิดในตารางที่ 3.1 ใช้ในการทำนายค่า pH ที่เหมาะสมในการสกัดสารแต่ละชนิด โครงสร้างของสารปฏิชีวนะกลุ่ม Macrolide ประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันเบส [-N(CH₃)₂] และมีค่า pKa ประมาณ 8 [31] สภาพความเป็นเบสของโครงสร้างทำให้สารอยู่ในรูปประจุบวกและเป็นกลางในสารละลายตัวให้ที่เป็นเบส สำหรับโครงสร้างของสารปฏิชีวนะกลุ่ม Sulfonamide ประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันเบส [-NH₂] และหมู่ฟังก์ชันกรด [-NH-] มีค่า pKa อยู่ในช่วง 2.0–2.1 สัมพันธ์กับการ protonation ของหมู่เบส aniline และช่วง pKa 7.0–7.5 สัมพันธ์กับการ deprotonation of ของหมู่กรด amide สารปฏิชีวนะกลุ่ม Sulfonamide มีแนวโน้มอยู่ในรูปประจุลบในสารละลายที่เป็นเบส [32, 33] ค่า pKa ของสารปฏิชีวนะกลุ่ม Tetracycline มีค่าเท่ากับ 3.3, 7.7 และ 9.3 จากหมู่ฟังก์ชัน tricarbonyl, dimethylamine และ beta-diketone ตามลำดับ [25, 31–33] ทำให้สารอยู่ในรูปประจุลบและเป็นกลางในสารละลายเบส ส่วนสารปฏิชีวนะกลุ่ม quinolone มีคุณสมบัติ amphoteric คือมีสภาพทั้งกรดและเบสจากหมู่ฟังก์ชัน carboxylic และ amino ที่เกาะกับวง heterocyclic จากการที่มีค่า pKa หลายช่วง (3.0–3.9, 6.1–6.2, 7.6–8.7 และ 9.9–10.6) ทำให้สารสามารถอยู่ได้ทั้งสภาพประจุบวก ประจุลบ เป็นกลางหรือประจุบวกและลบในสารละลายตัวให้ที่เป็นเบส [31,32]

สารตัวพาที่ทำการศึกษามี 3 ชนิด คือ Aliquat 336 (สารตัวพาที่เป็นประจุบวก), D2EHPA (สารตัวพาที่เป็นประจุลบ) และ LIX 84 (สารตัวพาที่เป็นกลาง) โดยทำการละลายใน DHE จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.3 พบว่า Aliquat 336 เป็นสารตัวพาที่สามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิดได้สูงกว่าสารตัวพาอีก 2 ชนิด เนื่องจากสารตัวพาที่เป็นประจุบวกสามารถเกิด ion-pair formation กับสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้แข็งแรงในสภาวะ pH ที่เลือก นอกจากนี้ Yamini และคณะได้ทำการศึกษาผลของตัวทำละลายที่ใช้ในการละลาย Aliquat 336 ที่แตกต่างกัน [22] พบว่าระหว่างการ ใช้ DHE และ 2-heptanone เป็นตัวทำละลาย การใช้ DHE จะให้ค่า enrichment factor ที่สูงกว่า ในงานวิจัยนี้ ศึกษาผลของความเข้มข้นของ Aliquat 336 ตั้งแต่ 5 ถึง 40% ใน DHE พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารตัวพาที่ต่ำเกินไป (5 และ 10%) จะให้ค่า enrichment factor ต่ำเนื่องจากเกิด ion-pair formation ไม่สมบูรณ์ ในขณะที่ค่าความเข้มข้นของสารตัวพาที่สูงเกินไป (30 และ 40%) จะให้ค่า enrichment factor ต่ำเช่นกันเนื่องจากสารตัวพาในปริมาณมากจะทำให้ตัวทำละลายภายในรูพรุนที่ผนังของเส้นใยกลวงมีความหนืดสูงทำให้การสกัดผ่านเส้นใยกลวงเกิดได้ยากขึ้น จากผลการทดลองดังแสดงในรูปภาพที่ 3 จึงเลือกใช้ 20% Aliquat 336 ใน DHE เป็นตัวทำละลายที่มีสารตัวพาในปริมาณที่เหมาะสม

3.5.3 ผลของสารละลายตัวให้และสารละลายตัวรับ

การสกัดสารที่ต้องการวิเคราะห์จากสารตัวอย่างสู่สารละลายตัวรับต้องอาศัยการปรับค่า pH ที่เหมาะสมระหว่างสารละลาย 2 ชนิด เพื่อปรับค่าประสิทธิภาพในการเพิ่มความเข้มข้นและค่าร้อยละของการคืนกลับของสาร (recovery) ควรทำการปรับค่า pH ของสารตัวอย่างเพื่อให้สารที่ต้องการวิเคราะห์อยู่ในรูปที่สามารถสกัดด้วยตัวทำละลายได้มากที่สุดเพื่อให้เกิด ion-pair formation สูงสุด เติมสารละลาย sodium tetraborate เพื่อทำการศึกษาที่ค่า pH 7-12 ค่าที่ทำให้การเพิ่มความเข้มข้นสารสูงสุดคือ pH 8 เมื่อพิจารณาจากค่า pKa ของสารทั้ง 11 ชนิดพบว่าค่า pH 8 ของสารตัวอย่างทำให้สารที่ต้องการวิเคราะห์อยู่ในรูปที่เหมาะสมต่อการสกัดด้วยเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพา

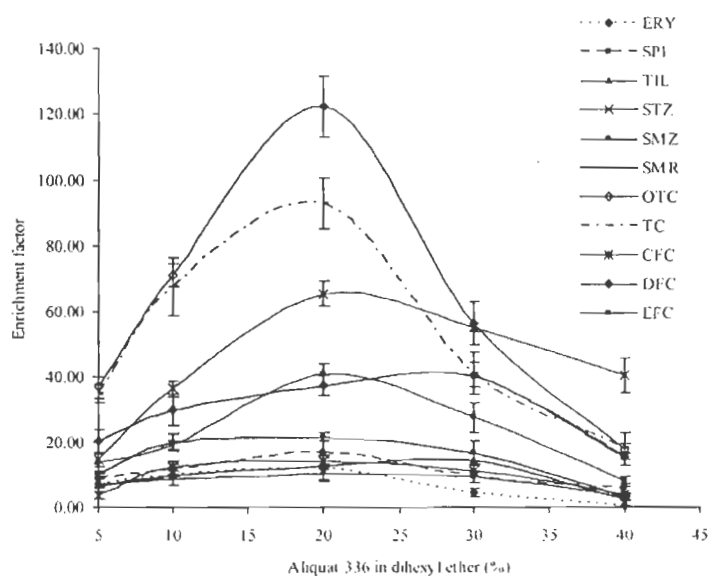
สารละลายตัวรับจะต้องมีสมบัติคือค่า pH เหมาะสมในการจับสารที่ต้องการวิเคราะห์และป้องกันการสกัดย้อนกลับสู่สารตัวอย่างด้วยการเกิด ion-pair formation ควรให้สารละลายตัวรับมีปริมาณโปรตอนมากเพียงพอเพื่อใช้เป็น exchanged counter-ion ทั้งนี้ ค่า pH ของสารละลายตัวรับต้องไม่ต่ำมากจนเกินไปเพื่อให้เหมาะกับการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง-แทนเดมแมสสเปกโทรเมตรี สารละลายตัวรับที่ทำการศึกษามี 2 ชนิด คือ acetic acid และ formic acid ทำการศึกษาในช่วง pH 3-6 เนื่องจากสารดังกล่าวเป็นกรดอ่อนสามารถนำไปฉีดเพื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูงมาก-แทนเดมแมสสเปกโทรเมตรีได้โดยตรง ไม่ต้องผ่าน



รูปที่ 3.2 ผลของตัวทำละลายชนิดต่างๆแบบไม่มีสารตัวพาที่มีต่อการเพิ่มความเข้มข้นของสาร

ตารางที่ 3.3 ผลของสารตัวทั้ง 3 ชนิดที่มีต่อการเพิ่มความเข้มข้นด้วยเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพา

สารปฏิชีวนะ	Enrichment factor (n=3)		
	Aliquat 336	D2EHPA	LIX 84
Erythromycin	3.1 ± 1.6	1.5 ± 0.7	1.9 ± 0.9
Spiramycin	6.1 ± 1.9	0.9 ± 0.3	2.7 ± 1.3
Tilmicosin	14.0 ± 4.5	1.8 ± 0.5	3.5 ± 1.3
Sulfathiazole	5.9 ± 2.0	0.9 ± 0.2	2.9 ± 1.6
Sulfamethazine	10.7 ± 2.5	0.7 ± 0.3	1.6 ± 0.4
Sulfamerazine	9.5 ± 1.8	1.1 ± 0.3	2.3 ± 1.7
Oxytetracycline	74.4 ± 9.5	3.7 ± 1.5	5.5 ± 3.1
Tetracycline	49.5 ± 7.6	2.1 ± 0.9	11.7 ± 3.9
Ciprofloxacin	25.9 ± 3.8	1.9 ± 1.0	4.8 ± 1.4
Danofloxacin	15.6 ± 2.5	2.6 ± 0.9	5.6 ± 2.6
Enrofloxacin	13.0 ± 2.9	2.6 ± 1.8	8.1 ± 4.1



รูปที่ 3.3 ผลของปริมาณสารตัวพาใน DHE ที่มีต่อการเพิ่มความเข้มข้นของสาร

ขั้นตอนการเจือจางสาร จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.4 พบว่า เมื่อใช้สารละลาย acetic acid ที่ pH 4 เป็นสารละลายตัวรับ สารปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิดจะมีค่า enrichment factor ที่สูง (10.9–153 เท่า) เมื่อเทียบกับที่ pH 5 (8.9–105 เท่า) เนื่องจากที่ pH 4 มีปริมาณโปรตอนมากกว่าและค่า pH ที่มากจะส่งผลให้เกิดความแตกต่างของค่า pH ระหว่างสารตัวอย่างกับสารละลายตัวรับน้อย ทำให้สารที่ต้องการวิเคราะห์เกิดการสกัดได้ดี ดังนั้น สารละลาย acetic acid ที่ pH 4 จึงมีความเหมาะสมในการใช้เป็นสารละลายตัวรับในการสกัดสารปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิดด้วยเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพา

3.5.4 ผลของเวลาที่ใช้ในการสกัด

เทคนิคการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพาเป็นเทคนิคการสกัดที่ขึ้นกับสมดุลของระบบ ซึ่งปริมาณสารที่ถูกสกัดขึ้นกับเวลา ดังนั้นเวลาที่ใช้ในการสกัดจึงเป็นตัวแปรสำคัญที่ใช้ในการตัดสินใจเวลาที่ใช้ในการเข้าสู่สมดุล เนื่องจากสารที่ต้องการวิเคราะห์ในสารละลายตัวรับจะมีความเสถียรและมีอยู่ในปริมาณที่สูงสุดที่จุดสมดุล จึงให้ค่า enrichment factor สูงสุด เวลาในการสกัดที่ทำการศึกษาเพื่อดูผลที่มีต่อการเพิ่มความเข้มข้นของสารคือ 5 ถึง 90 นาที ผลการทดลองที่ได้มีแนวโน้มคล้ายกับงานวิจัยอื่นๆ [18–20, 23, 25] คือ เมื่อเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้น ค่า enrichment factor จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆและเพิ่มสูงสุดที่จุดสมดุล จากนั้นค่า enrichment factor จะคงที่หลังจุดสมดุล ในงานวิจัยนี้เลือกใช้เวลาในการสกัด 60 นาที แม้ว่าขั้นตอนของเทคนิคทั้งหมดจะใช้เวลาค่อนข้างนานแต่จากการที่สามารถจุ่มเส้นใยกลวงหลายเส้นในตัวทำละลายได้พร้อมกัน ทำให้ลดเวลาที่ใช้ในการจุ่มเส้นใย และเนื่องจากปริมาณสารตัวอย่างที่ใช้น้อย (20 มิลลิลิตร) อุปกรณ์การสกัดมีขนาดเล็ก ทำให้สามารถสกัดได้หลายตัวอย่างพร้อมๆ กัน งานวิจัยนี้สามารถทำการสกัดสารตัวอย่างได้พร้อมกันตั้งแต่ 1-17 ตัวอย่างโดยใช้เครื่อง multistirrer เพื่อเป็นการลดเวลาที่ใช้ในการสกัดลงไปได้มาก

ตารางที่ 3.4 ผลของสารละลายตัวรับและค่า pH ที่มีต่อการเพิ่มความเข้มข้นของสาร

สารปฏิชีวนะ	Enrichment factor							
	Acceptor = CH ₃ COOH				Acceptor = HCOOH			
	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6
Erythromycin	3.59	13.1	8.94	6.78	2.26	8.10	2.46	1.34
Spiramycin	5.41	19.0	14.1	9.56	4.59	10.2	3.58	0.96
Tilmicosin	12.4	14.0	9.67	4.12	3.53	8.58	9.81	4.23
Sulfathiazole	3.47	12.2	14.1	11.9	5.52	7.82	6.99	2.17
Sulfamethazine	8.37	21.5	14.9	2.68	12.9	14.9	7.61	5.42
Sulfamerazine	2.89	10.9	11.5	1.59	9.40	9.76	7.50	6.34
Oxytetracycline	68.6	153	105	47.8	48.6	76.2	30.2	19.7
Tetracycline	52.3	110	79.1	33.6	14.9	49.4	50.2	20.9
Ciprofloxacin	22.0	69.2	70.8	19.78	37.4	45.8	20.1	16.3
Danofloxacin	9.87	30.6	19.2	9.24	13.2	21.1	22.7	3.59
Enrofloxacin	13.6	48.8	50.2	11.8	26.7	35.6	31.5	15.9

3.6 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการ

ความเป็นเส้นตรง ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด ประสิทธิภาพในการเพิ่มความเข้มข้น และความแม่นยำ

ในการประเมินเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพาจะใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลอง คือ เวลาในการจุ่มเส้นใยกลวง 60 นาที ใช้สารตัวพา 20%

Aliquat 336 ในDHE เป็นตัวทำละลาย สารละลายตัวให้ pH 8 ปริมาณ 20 มิลลิลิตร เดิมสารปฏิชีวนะแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้ acetic acid pH 4 ปริมาณ 20 ไมโครลิตรเป็นสารละลายตัวรับ เวลาในการสกัด 60 นาที ความเร็วในการคนเท่ากับ 200 รอบต่อนาที โดยใช้สภาวะดังกล่าวในการศึกษาความเป็นเส้นตรง ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด และความแม่นยำ ดังแสดงผลในตารางที่ 3.5

ศึกษาความเป็นเส้นตรงของเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพาที่ความเข้มข้น 0.5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละความเข้มข้น เพื่อทำการสร้างกราฟมาตรฐานของสารปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิดระหว่างความเข้มข้นของสารกับสัญญาณพื้นที่ได้กราฟที่ได้จากเครื่องโครมาโทกราฟชนิดของเหลวสมรรถนะสูงมาก-แทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี ได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) อยู่ในช่วง 0.9823 (STZ) และ 0.9974 (CFC) แสดงว่าวิธีการนี้สามารถนำไปใช้ในการหาปริมาณของสารปฏิชีวนะหลายกลุ่มได้พร้อมกัน สำหรับขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดและขีดจำกัดต่ำสุดในการบอกปริมาณซึ่งก็คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ให้สัญญาณภายใต้สภาวะของเครื่องแทนเดมแมสสเปกโตรเมตรีสูงกว่าสัญญาณรบกวน 3 เท่าและ 10 เท่า ตามลำดับทำการคำนวณได้จากกราฟมาตรฐานให้ค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดของสารปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิดอยู่ในช่วง 10–250 นาโนกรัมต่อลิตร และค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการบอกปริมาณอยู่ในช่วง 40–850 นาโนกรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 3.5 จากการที่ค่า pK_a ของสารทั้ง 11 ชนิดมีค่าในช่วงกว้าง ทำให้ได้ค่า enrichment factor ตั้งแต่ 12.5 เท่า (ERY) จนถึง 156 เท่า (OTC) ทำการศึกษาความแม่นยำภายในวันเดียวกัน (intra-day) และระหว่างวัน (inter-day) โดยทำการสกัดที่ความเข้มข้นของสารทั้ง 11 ชนิดเท่ากับ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำซ้ำ 10 ครั้งใน 1 และ 2 วัน ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์สำหรับความแม่นยำภายในวันเดียวกันอยู่ในช่วง 3.27% ถึง 11.0% และสำหรับความแม่นยำระหว่างวันอยู่ในช่วง 6.50% ถึง 11.4% แม้ว่าจะไม่มีนโยบายมาตรฐานระดับนานาชาติในการควบคุมสารปฏิชีวนะในแหล่งน้ำ แต่พบข้อมูลใช้ในการอ้างอิงได้จากบทความวิจัยอื่นๆ [5, 7] ซึ่งให้ข้อมูลในการสำรวจปริมาณสารปฏิชีวนะในแหล่งน้ำต่างๆ (ส่วนใหญ่มีอยู่ในระดับนาโนกรัมต่อลิตรถึงมิลลิกรัมต่อลิตร) ทางสหภาพยุโรปได้สร้างกฎเกณฑ์ในการตรวจวัดสารปฏิชีวนะในอาหารที่ได้จากเนื้อสัตว์ [34] ทำให้สามารถนำงานวิจัยนี้เป็นแนวทางเพื่อเพิ่มประโยชน์จากการนำวิธีการไปใช้กับตัวอย่างประเภทอื่น และจากข้อมูลต่ำสุดในการตรวจวัดและขีดจำกัดต่ำสุดในการบอกปริมาณที่ได้จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าวิธีการดังกล่าวมีประสิทธิภาพ

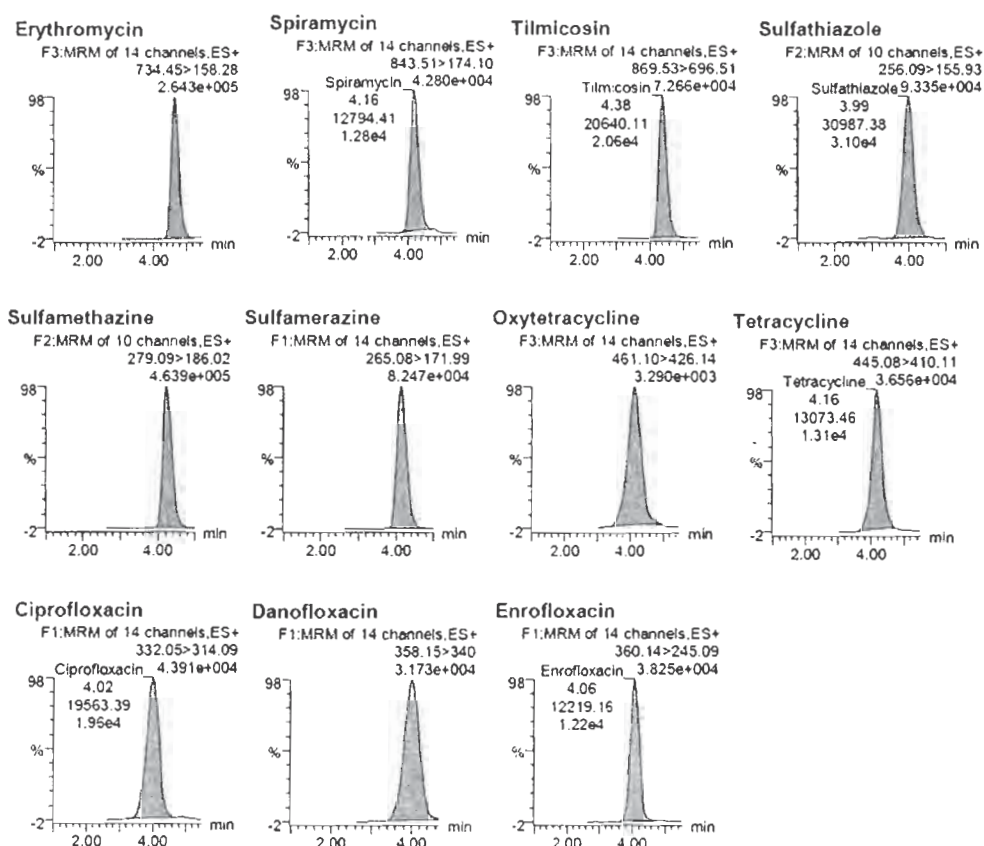
ไว้ใน การตรวจวัดสูงเพียงพอสำหรับสารปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิดในน้ำที่ระดับความเข้มข้นนาโนกรัมต่อลิตร

3.7 การใช้เทคนิคการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพาในการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำ

เมื่อนำเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพาที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการวิเคราะห์สารปฏิชีวนะได้หลายชนิดพร้อมกันไปใช้วิเคราะห์ตัวอย่างน้ำที่เก็บจากแม่น้ำในจังหวัดกรุงเทพฯ ประเทศไทย เริ่มต้นด้วยการกรองน้ำตัวอย่างเพื่อกำจัดตะกอนและบรรจุเก็บในขวดแก้วสีชาขนาด 100 มิลลิลิตร เมื่อนำไปวิเคราะห์พบว่าในน้ำตัวอย่างไม่ปรากฏสารปฏิชีวนะตกค้างจึงทำการเติมสารปฏิชีวนะมาตรฐาน 2 ความเข้มข้นคือ 2 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อศึกษาวิธีการ จากนั้นทำการปรับค่า pH ของสารตัวอย่างให้เป็น pH 8 แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น ตารางที่ 3.5 แสดงถึงค่าร้อยละของการคืนกลับของสารปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิดในน้ำตัวอย่างจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคดังกล่าวพบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 79.2% (SPI) ถึง 119% (STZ) คำนวณจากความเข้มข้นระหว่างความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้ (คำนวณจากสมการที่ได้จากการสร้างกราฟมาตรฐานของสารปฏิชีวนะแต่ละชนิดระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นของสาร) เทียบกับความเข้มข้นที่เติมในสารตัวอย่าง รูปภาพที่ 4 แสดงโครมาโทแกรมของสารปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิดจากเครื่องโครมาโทกราฟชนิดของเหลวสมรรถนะสูงมาก-แทนเดมเมสสเปกโทรเมตรี ผ่านการสกัดด้วยเทคนิคสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพา เลือกใช้สภาวะที่ได้จากการทดลองและทำการเติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรในน้ำตัวอย่าง พบว่า ไม่มีผลจากเมทริกซ์เมื่อเทียบผลที่ได้จากการใช้สารปฏิชีวนะมาตรฐานกับผลจากน้ำตัวอย่างที่เติมสารปฏิชีวนะ แสดงถึงข้อดีของเทคนิคในการ clean-up และการเพิ่มความเข้มข้นซึ่งเหมาะสมต่อการนำไปวิเคราะห์น้ำประเภทต่างๆ

ตารางที่ 3.5 ความใช้ได้ของวิธีการจากการใช้เทคนิคการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใย
กลวงโดยใช้สารตัวพาในการวิเคราะห์สารปฏิชีวนะหลายกลุ่มตกค้างในน้ำพร้อมกันใน
สภาวะที่เหมาะสม

สารปฏิชีวนะ	Linearity		LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Enrichment factor	Precision (%RSD)		Recovery (%)
	Linear range ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Correlation coefficient (r)				Intra- day	Inter- day	
Erythromycin	0.5-50	0.9966	0.02	0.07	12.5 ± 2.2	11.0	10.8	110
Spiramycin	0.5-50	0.9886	0.08	0.27	19.2 ± 2.6	7.98	11.4	79.2
Tilmicosin	0.5-50	0.9936	0.03	0.09	14.4 ± 1.9	3.27	6.50	94.5
Sulfathiazole	0.5-50	0.9823	0.07	0.22	12.7 ± 3.0	10.1	7.99	118
Sulfamethazine	0.5-50	0.9935	0.01	0.04	20.0 ± 3.4	5.65	8.92	94.9
Sulfamerazine	0.5-50	0.9916	0.06	0.21	12.7 ± 2.3	6.49	9.64	105
Oxytetracycline	0.5-50	0.9929	0.25	0.85	156 ± 11	8.91	7.81	98.7
Tetracycline	0.5-50	0.9950	0.13	0.43	113 ± 12	9.56	9.64	99.3
Ciprofloxacin	0.5-50	0.9974	0.06	0.20	68.9 ± 8.7	7.66	7.19	84.2
Danofloxacin	0.5-50	0.9878	0.06	0.18	31.3 ± 3.6	5.80	6.67	90.2
Enrofloxacin	0.5-50	0.9931	0.04	0.14	50.4 ± 5.9	8.11	10.2	83.5



รูปที่ 3.4 โครมาโทแกรมของสารปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิดจากเครื่องโครมาโทกราฟชนิดของเหลวสมรรถนะสูงมาก-แทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี ผ่านการสกัดด้วยเทคนิคสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพา

3.8 สรุปและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาเทคนิคสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพาเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะหลายกลุ่มได้พร้อมกันสำหรับการวิเคราะห์สารที่มีระดับต่ำมากในน้ำ ทำให้การเตรียมตัวอย่างสามารถทำได้ง่าย มีราคาถูก และมีความจำเพาะต่อสาร รวมทั้งมีศักยภาพสูงในการเพิ่มความเข้มข้นและการ clean-up สามารถนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟชนิดของเหลวสมรรถนะสูงมาก-แทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี ได้โดยตรงไม่ต้องผ่านขั้นตอนการเจือจางสาร เทคนิคนี้สามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะได้ตั้งแต่ 12.5 ถึง 156 เท่า มีระดับขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดที่ต่ำในช่วง 10–250 นาโนกรัมต่อลิตร และระดับขีดจำกัดต่ำสุดในการบอกปริมาณในช่วง 40–850 นาโนกรัมต่อลิตร จากการประเมินความใช้ได้ของวิธีการ พบว่า เทคนิคนี้มีความเหมาะสมต่อการ

นำไปใช้ควบคุมคุณภาพน้ำในประเทศไทยและที่อื่น เมื่อนำไปใช้วิเคราะห์ตัวอย่างน้ำจริงพบว่าสามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารได้อย่างมีประสิทธิภาพให้ค่าร้อยละของการคืนกลับในช่วง 79.2% ถึง 119% ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นการวิเคราะห์สารตกค้างระดับต่ำในน้ำอีกทางเลือกหนึ่งที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และสามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารที่มีสมบัติแตกต่างกันหลายชนิดได้พร้อมกัน

3.9 เอกสารอ้างอิง

1. Richardson SD (2009) Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Anal Chem* 81:4645
2. Hernández F, Sancho JV, Ibáñez M, Guerrero C (2007) Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. *Trends Anal Chem* 26:466
3. Kümmerer K (2003) Significance of antibiotics in the environment. *J Antimicrob Chemother* 52:5
4. Kostopoulou M, Nikolaou A (2008) Analytical problems and the need for sample preparation in the determination of pharmaceuticals and their metabolites in aqueous environmental matrices. *Trends Anal Chem* 27:1023
5. Kemper N (2008) Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecol Indic* 2:1
6. Stolker AAM, Brinkman UAT (2005) Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals-A review *J Chromatogr A* 1067:15
7. Kümmerer K (2009) Antibiotics in the aquatic environment-A review-Part I. *Chemosphere* 75:417
8. Li B, Zhang T, Xua Z, Fang HHP (2009) Rapid analysis of 21 antibiotics of multiple classes in municipal wastewater using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 645:64
9. Chico J, Rúbies A, Centrich F, Companyó R, Prat MD, Granados M (2008) High-throughput multiclass method for antibiotic residue analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1213:189
10. Babić S, Ašperger D, Mutavdžić D, Horvat AJM, Kaštelan-Macan M (2006) Solid phase extraction and HPLC determination of veterinary pharmaceuticals in wastewater. *Talanta* 70:732

11. Reverté S, Borrull F, Pocurull E, Marcé RM (2003) Determination of antibiotic compounds in water by solid-phase extraction–high-performance liquid chromatography–(electrospray) mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1010:225
12. Gros M, Petrović M, Barceló D. (2006) Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta* 70:678
13. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE (1999) Liquid-Liquid-Liquid Microextraction for Sample Preparation of Biological Fluids Prior to Capillary Electrophoresis. *Anal Chem* 71:2650
14. Psillakis E, Kalogerakis N (2003) Developments in liquid-phase microextraction. *Trends Anal Chem* 22:565
15. Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S (2004) Developments in hollow fibrebased, liquid-phase microextraction. *Trends Anal Chem* 23:1
16. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE (2008) Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid–liquid extraction. *J Chromatogr A* 1184:132
17. Kou D, Wang X, Mitra S (2004) Supported liquid membrane microextraction with high-performance liquid chromatography–UV detection for monitoring trace haloacetic acids in water. *J Chromatogr A* 1055:63
18. Esrafilí A, Yamini Y, Shariati S (2007) Hollow fiber-based liquid phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for extraction and determination of some antidepressant drugs in biological fluids. *Anal Chim Acta* 604:127
19. Berhanu T, Liu J, Romero R, Megersa N, Jönsson JÅ (2006) Determination of trace levels of dinitrophenolic compounds in environmental water samples using hollow fiber supported liquid membrane extraction and high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1103: 1
20. Quintana JB, Rodil R, Reemtsma T (2004) Suitability of hollow fibre liquid-phase microextraction for the determination of acidic pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry without matrix effects. *J Chromatogr A* 1061:19

21. Ho TS, Halvorsen TG, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE (2003) Liquid-phase microextraction of hydrophilic drugs by carrier-mediated transport. *J Chromatogr A* 998:61
22. Yamini Y, Reimann CT, Vatanara A, Jönsson JÅ (2006) Extraction and preconcentration of salbutamol and terbutaline from aqueous samples using hollow fiber supported liquid membrane containing anionic carrier. *J Chromatogr A* 1124:57
23. Piriyaipittaya M, Jayanta S, Mitra S, Leepipatpiboon N (2008) Micro-scale membrane extraction of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water followed by high-performance liquid chromatography and post-column derivatization with fluorescence detector. *J Chromatogr A* 1189:483
24. Zhang Z, Zhang C, Su X, Ma M, Chen B, Yao S (2008) Carrier-mediated liquid phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography for determination of illicit drugs in human urine. *Anal Chim Acta* 621:185
25. Shariati S, Yamini Y, Esrafil A (2009) Carrier mediated hollow fiber liquid phase microextraction combined with HPLC–UV for preconcentration and determination of some tetracycline antibiotics. *J Chromatogr B* 877:393
26. Mulugeta M, Megersa N (2004) Carrier-mediated extraction of bipyridilium herbicides across the hydrophobic liquid membrane. *Talanta* 64:101
27. Drapata A, Wieczorek P (2004) Facilitated SLM extraction of peptides with D2EHPA as a carrier. *Desalination* 163:47
28. Ho TS, Reubsaet JLE, Anthonsen HS, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE (2005) Liquid-phase microextraction based on carrier mediated transport combined with liquid chromatography–mass spectrometry New concept for the determination of polar drugs in a single drop of human plasma. *J Chromatogr A* 1072:29
29. Hylton K, Sangwan M, Mitra S (2009) Microscale Membrane Extraction of Diverse Antibiotics from Water. *Anal Chim Acta* 653:116
30. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE (2005) Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques. *J Chromatogr B* 817:3
31. Qiang Z, Adams C (2004) Potentiometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics. *Water Res* 38:2874

32. Seifrtová M, Nováková L, Lino C, Pena A, Solich P (2009) An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters. *Anal Chim Acta* 649:158
33. Babić S, Horvat AJM, Pavlović DM, Kaštelan-Macan M (2007) Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients. *Trends Anal Chem* 26:1043
34. Commission Decision 2377/90/EEC (1990) Laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Off J Eur Commun L* 224:1

บทที่ 4

แบบจำลองเชิงทฤษฎีของการแยกแบบจำเพาะสำหรับสารประกอบที่มีประจุใน ไมเซลล์าร์อิเล็กโทรโครมาโทกราฟี

4.1 บทนำ

ไมเซลล์าร์อิเล็กโทรโครมาโทกราฟี (micellar electrokinetic chromatography, MEKC) เป็นประเภทหนึ่งของ CE ที่มีบัฟเฟอร์ประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิว เช่น SDS โดยจะฟอร์มตัวเป็นไมเซลล์ซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสคงที่เทียม [Terabe *et al.*; 1992, Altria *et al.*; 2000, Pappas *et al.*; 2005, Iadarola *et al.*; 2008, Terabe *et al.*; 1985] MEKC เป็นเทคนิคที่ใช้อย่างกว้างขวางสำหรับแยกสารที่ไม่มีประจุและสารที่มีประจุคังมีรายงานในงานวิจัยในปี 1999 [Quirino and Terabe; 1999], 2002 [Molina and Silva; 2002], 2003 [Welsch and Michalke; 2003], 2005 [Pappas *et al.*; 2005] สำหรับการแยกสารที่ไม่มีประจุจะใช้สารลดแรงตึงผิวที่มีประจุ [Terabe *et al.*; 1992, Pappas *et al.*; 2005, Iadarola *et al.*; 2008, Terabe *et al.*; 1985 Quirino and Terabe; 1999, Terabe; 2009, Riekkola *et al.*; 1997, Ehala *et al.*; 2007, Gong *et al.*; 2006, Dubber and Kanfer; 2006] ขณะที่ใช้สารลดแรงตึงผิวที่มีหรือไม่มีประจุสำหรับแยกสารที่มีประจุ [Terabe *et al.*; 1992, Pappas *et al.*; 2005, Iadarola *et al.*; 2008, Quirino and Terabe; 1999, Terabe; 2009, Riekkola *et al.*; 1997, Mallampati *et al.*; 2005, Cesla *et al.*; 2006, Damic and Nigovic; 2009] เนื่องจากความแตกต่างของการกระจายตัวของสารในไมเซลล์และความแตกต่างของความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าปรากฏของสารที่มีประจุ (effective electrophoretic mobility, $\Delta\mu$) จึงสามารถแยกสารใน MEKC ได้ [Altria *et al.*; 2000, Pappas *et al.*; 2005, Quirino and Terabe; 1999, Mallampati *et al.*; 2005, Iadarola *et al.*; 2005, Tellez *et al.*; 2007] โดยทั่วไปค่าการแยก (resolution, R_s) ของสารใน CE แสดงได้ดังสมการที่ 4.1 [Giddings; 1969, Jorgenson and Lukacs; 1981]

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{\Delta\mu}{\mu + \mu_{\infty}} \quad (4.1)$$

เมื่อ N คือ จำนวนเพลตทางทฤษฎีหรือประสิทธิภาพ, μ คือ ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าปรากฏของสาร, $\Delta\mu$ คือ ความแตกต่างของ μ หรือ $\mu_2 - \mu_1$ สำหรับสารสองตัว และ μ_{∞} คือ อิเล็กโทรออสโมซิส สำหรับสารสองตัวที่มีทิศทางของ μ ไปทางเดียวกัน สมการที่ 5.1 อาจจัดรูปไปให้มีความสัมพันธ์กับค่าการแยกหรือ R_s ในรูปของ efficiency term, selectivity term และ mobility term ดังแสดงในสมการที่ 4.2

$$R_s = \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left(\frac{\alpha_m - 1}{\alpha_m} \right) \left| \frac{\mu_2}{\mu + \mu_{eo}} \right| \quad (4.2)$$

งานวิจัยนี้ได้นำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ที่ ITP 2010 และ APCE 2010 และตีพิมพ์ใน Electrophoresis 34 (2011) ดังภาคผนวก

เมื่อ α_m คือ separation selectivity หรือ mobility selectivity ซึ่งนิยามเป็นอัตราส่วนของความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าปรากฏของสารสองตัว เช่น μ_2/μ_1 โดย $|\mu_2| > |\mu_1|$

ใน MEKC ที่ใช้ normal elution mode จะมีทิศทางของความเร็วอิเล็กโทรออสโมซิส (v_{eo}), ความเร็วของสารและความเร็วของไมเซลล์ (v_{mc}) โดย $|v_{eo}| > |v_{mc}|$ สมการค่าการแยกของสารที่ไม่มีประจุสามารถแสดงให้มีความสัมพันธ์กับ retention term ดังสมการที่ 4.3 [Nielsen and Foley; 1993, Pyell; 2006]

$$R_s = \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left(\frac{\alpha_k - 1}{\alpha_k} \right) \left(\frac{k_2}{1+k} \right) \left(\frac{1 - t_{co}/t_{mc}}{1 + (t_{co}/t_{mc})k} \right) \quad (4.3)$$

เมื่อ k คือ รีเทนชันแฟกเตอร์, α_k คือ retention selectivity นิยามเป็นอัตราส่วนของ k เช่น k_2/k_1 และ t_{co} กับ t_{mc} คือ ไมเกรชันไทม์ของ EOF marker และ micelle marker ตามลำดับ

การแยกสารที่มีประจุสมบูรณ์ใน MEKC โดยใช้ normal elution mode อาศัยความแตกต่างของการกระจายตัวของสารในไมเซลล์และความแตกต่างของความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร ค่าการแยกสามารถแสดงได้ดังสมการที่ 4.4 [Nielsen and Foley; 1993]

$$R_s = \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left(\frac{\alpha_k - 1}{\alpha_k} \right) \left(\frac{k_2}{1+k} \right) \left(\frac{1 + t_{co}/t_{ep} - t_{co}/t_{mc}}{1 + t_{co}/t_{ep} + (t_{co}/t_{mc})k} \right) \quad (4.4)$$

เมื่อ t_{ep} คือ ไมเกรชันไทม์ที่สัมพันธ์กับความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารที่มีประจุ, และในกรณีนี้ $t_{ep} = t_{ep2} = t_{ep1}$

จากสมการที่ 4.3 และ 4.4 จะแสดงให้เห็นว่า separation selectivity อาจหมายถึง retention selectivity ได้ ในกรณีสารที่วิเคราะห์มีความแตกต่างของความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า (μ_0) ภายใต้ภาวะที่ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวในบัฟเฟอร์มีค่าเท่ากับศูนย์หรือ CZE เมื่อทำการวิเคราะห์สารดังกล่าวใน MEKC การแยกของสารจะขึ้นอยู่กับทั้ง k และ μ_0 เมื่อเปรียบเทียบการแยก

สารที่มีประจุใน CZE กับ MEKC ที่มีการเติมสารลดแรงตึงผิวลงในบัฟเฟอร์พบว่า MEKC สามารถแยกสารบางชนิดได้ดีขึ้น แต่ก็สามารถทำให้การแยกของสารบางชนิดแยกลงได้เช่นกัน [Iadarola *et al.*; 2008, Riekkola *et al.*; 1997, Dubber and Kanfer; 2006, Mallampati *et al.*; 2005, Cesla *et al.*; 2006, Damic and Nigovic; 2009, Iadarola *et al.*; 2005, Huang *et al.*; 2005, Nhujak *et al.*; 2005, Huertas-Perez *et al.*; 2006, Huang *et al.*; 2003] ซึ่งผลดังกล่าวนี้สอดคล้องกับผลการทดลองในการแยกไครัลที่ใช้ dual cyclodextrins ซึ่งได้รายงานในงานวิจัยเราก่อนหน้านี้ [Nhujak *et al.*; 2005]

เพื่ออธิบาย separation selectivity และ electrophoretic mobility order ใน MEKC สำหรับสารที่มีประจุที่มี μ_0 แตกต่างกัน งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อสร้างแบบจำลองทางทฤษฎีของ separation selectivity ใน MEKC ที่สัมพันธ์กับตัวแปรที่ไม่มีหน่วยของ mobility selectivity ใน CZE และ retention selectivity ใน MEKC และเปรียบเทียบ separation selectivity ที่ได้จากการทดลองและที่ได้จากการทำนายใน MEKC โดยทำการทดลองด้วย normal elution mode และใช้บัฟเฟอร์เป็น 10 mM ไดโซเดียมบอเรต (pH 10.2) ที่มีการเติม SDS เป็นสารลดแรงตึงผิว โดยมีอัลทิลพาราเบนเป็นสารทดสอบ

4.2 การทดลอง

4.2.1 เครื่องมือ

- 1) เครื่องกะพินดารีอิลีก โทรฟริซิส ของบริษัท Beckman รุ่น MDQ
- 2) เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ของ Metrohm รุ่น 744
- 3) เครื่อง sonication ของ ultrasonic steri-cleaner
- 4) เครื่องผลิตน้ำ Milli Q

4.2.2 สารเคมี

- 1) อัลทิลพาราเบน (PB) ได้แก่ isoparaben (IP), ethylparaben (EP), propylparaben (PP) และ butylparaben (BP) ของบริษัท Sigma-Aldrich
- 2) โดเด็กซิลเบนซีน (DB) ของบริษัท Sigma-Aldrich
- 3) โซเดียมโดเด็กซิลซัลเฟต (SDS) ของบริษัท Sigma
- 4) ไดโซเดียมเตตระบอเรตดีไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Fluka
- 5) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Fluka

4.2.3 การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง CE

ภาวะของ CE ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ดังต่อไปนี้ คือ (ในกรณีที่แตกต่างกันนี้จะระบุ)

เครื่อง CE: Beckman รุ่น MDQ

กะพินดารี: uncoated fused silica capillary 50 μm i.d. \times 40.2 cm (30 cm ถึงเครื่องตรวจวัด)

การบรรจุสาร : อัดความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 3 วินาที

การตรวจวัด : photodiode array ช่วง 190-300 nm และตรวจวัดที่ 220 nm

Capillary rinse : ก่อนการทดลองแต่ละวัน ล้างภายในคัพพิลลารีด้วยเมทานอล, 0.1 M โซเดียมไฮดรอกไซด์และน้ำอย่างละ 15 นาที และบัฟเฟอร์ 15 นาที และก่อนการวิเคราะห์แต่ละครั้งล้างด้วย 0.1 M โซเดียมไฮดรอกไซด์และบัฟเฟอร์อย่างละ 2 นาที

อุณหภูมิของคัพพิลลารี : 25°C

ศักย์ไฟฟ้า : 15 kV

BGE : 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ที่ pH 10.2 ที่ประกอบด้วย SDS เป็นสารลดแรงตึงผิว

4.2.4 การเตรียมบัฟเฟอร์

บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดลองหาค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ของสารมี 2 ระบบ คือ

1) บัฟเฟอร์ใน CZE ประกอบด้วย 10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, ปรับ pH เป็น 10.2 ด้วย 1.0 M NaOH

2) บัฟเฟอร์ใน MEKC ประกอบด้วย 20-60 mM SDS ใน 10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, pH 10.2

บัฟเฟอร์ทั้งสองระบบเตรียมโดยใช้น้ำ Milli Q จากนั้นนำไป sonicate ประมาณ 30 นาที แล้ว

กรองบัฟเฟอร์ผ่าน 0.45 μm PTFE filter ก่อนการวิเคราะห์

4.2.5 การเตรียมสารทดสอบ

เตรียม stock solution ความเข้มข้น 1000 ppm ของสารทดสอบโดยละลายสารทดสอบแต่ละตัวแยกกันด้วยอะซิโตนไทรล์ จำนวน 5 mL จากนั้นเจือจางแต่ละสารละลายด้วยน้ำ Milli Q ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 mL สำหรับ stock solution ของ DB และ thiourea เตรียมโดยละลายสารแต่ละตัวแยกกันด้วยเอทานอลและเจือจางจนได้ความเข้มข้น 20000 ppm ด้วยน้ำ Milli Q ส่วน สารละลายมาตรฐานประกอบด้วย 20-60 ppm ของสารทดสอบ, 30 ppm thiourea และ 150 ppm DB เตรียมได้โดยเจือจาง stock solution ด้วย 1.0 mM บอเรตบัฟเฟอร์ หลังจากนั้นนำไปกรองผ่าน 0.45 μm PTFE filter ก่อนการวิเคราะห์

4.3 ผลและวิเคราะห์ผลการทดลอง

4.3.1 แบบจำลองทางทฤษฎี ของ separation selectivity ใน MEKC สำหรับสารที่มีประจุ

ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารที่มีประจุสองตัวใน MEKC (μ_{MEKC}) แสดงดังสมการที่ 4.5 และ 4.6 [Nielsen and Foley; 1993]

$$\mu_{(\text{MEKC},1)} = \left(\frac{\mu_{0,1} + k_1 \mu_{\text{mc}}}{1 + k_1} \right) \quad (4.5)$$

$$\mu_{(\text{MEKC},2)} = \left(\frac{\mu_{0,2} + k_2 \mu_{\text{mc}}}{1 + k_2} \right) \quad (4.6)$$

เมื่อ μ_0 คือความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารภายใต้ภาวะที่มีความเข้มข้นของ SDS เท่ากับ ศูนย์หรือ CZE และ μ_{mc} คือความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของไมเซลล์ marker ตัวห้อย 1 และ 2 หมายถึงสารตัวที่ 1 และ 2 ตามลำดับ separation selectivity ใน MEKC (α_{MEKC}) นิยามเป็นอัตราส่วนของ μ_{MEKC} เมื่อ $k_2 \geq k_1 > 0$ สามารถจัดรูปได้ดังสมการที่ 4.7

$$\alpha_{\text{MEKC}} = \alpha_{\text{CZE}} \left(\frac{\beta + \frac{\alpha_k}{\alpha_{\text{CZE}}} k_1}{\beta + k_1} \right) \left(\frac{(1 + k_1)}{1 + \alpha_k k_1} \right) \quad (4.7)$$

เมื่อ α_{CZE} คือ mobility selectivity ใน CZE หรืออัตราส่วนของ μ_0 , เช่น $\mu_{0,2}/\mu_{0,1}$, α_k คือ retention selectivity ของสารลดแรงตึงผิว SDS สำหรับสารที่มีประจุสองตัว หรืออัตราส่วนของ k , เช่น k_2/k_1 , และ β อัตราส่วนของ $\mu_{0,1}/\mu_{\text{mc}}$ โดยที่ $\alpha_k \geq 1.0$ เสมอ สำหรับค่า $\alpha_{\text{CZE}} > 1.0$ หมายถึงลำดับการเคลื่อนที่ของสารซึ่งมี $|\mu|$ ใน CZE และ k ใน MEKC เหมือนกัน เช่น $k_2 > k_1$ และ $|\mu_2| > |\mu_1|$, ในขณะที่ $\alpha_{\text{CZE}} < 1.0$ หมายถึงลำดับการเคลื่อนที่ของสารซึ่งมี $|\mu|$ ใน CZE และ k ใน MEKC สลับกัน เช่น $k_2 > k_1$ ในขณะที่ $|\mu_2| < |\mu_1|$

จากสมการที่ 4.7 และงานวิจัยที่ผ่านมาของกลุ่มเราเกี่ยวกับแบบจำลองทางทฤษฎีของ separation selectivity สำหรับการแยกโครมาตด้วย dual cyclodextrins [Nhujak *et al.*; 2005]

สามารถเสนอแบบจำลองทางทฤษฎี ของ α_{MEKC} สำหรับสารที่มีประจุสองตัวใน MEKC ได้ 4 แบบดังแสดงในตารางที่ 4.1 โดยอ้างอิงตามช่วงของค่า α_{CZE} , α_k , ρ และลำดับของค่า $|\mu|$ ใน CZE และ k ใน MEKC สำหรับการทำนายค่าของ α_{MEKC} สำหรับสารที่มีประจุสองตัว ค่า α ในสมการที่ 4.7 ประมาณให้ มีค่าเท่ากันเท่ากับ 0.5 รูปที่ 4.1 แสดงพล็อตของ α_{MEKC} model Types I–III กับ k_1 ซึ่งการเพิ่มค่า k สามารถทำได้โดยการเพิ่มความเข้มข้น SDS ([SDS]) ในบัฟเฟอร์ของ MEKC

จากแบบจำลอง α_{MEKC} แบบที่ 1 ในรูปที่ 4.1a สำหรับค่า ρ ที่แน่นอนใด ๆ ยกเว้น $\rho \approx 1.0$ พบว่าค่า α_{MEKC} มีค่าเพิ่มขึ้นจนถึงค่าสูงสุดเมื่อ k_1 มีค่าเพิ่มขึ้น จากนั้นมีค่าลดลงที่ค่า k_1 สูงขึ้น สำหรับค่า k_1 ค่าหนึ่ง ๆ เมื่อค่า α_k มีค่าเพิ่มขึ้นจะได้ค่า α_{MEKC} ที่สูงขึ้น สำหรับช่วงของค่า k_1 ที่สนใจพบว่าค่า α_{MEKC} สูงสุดจะลดลงเมื่อค่า α_k เพิ่มขึ้น ดังนั้นแบบจำลอง α_{MEKC} แบบที่ 1 แสดงลำดับเหมือนกันของค่า $|\mu|$ ใน

ตารางที่ 4.1 แสดง แบบจำลองทางทฤษฎี ของ separation selectivity ใน MEKC (α_{MEKC})

Type	Order of $ \mu $ in CZE and k in MEKC	α_{CZE}	α_k	ρ	Assumed values		
					α_{CZE}	α_k	α
I	Same	$\alpha_{\text{CZE}} \geq 1$	$\alpha_k > \alpha_{\text{CZE}} \geq 1$	$\rho > 1$	1.1	1.2–3.3	0.5
II	Same	$\alpha_{\text{CZE}} > 1$	$\alpha_{\text{CZE}} \geq \alpha_k \geq 1$	$\rho \leq 1$	1.5	1.0–1.5	0.5
III	Reversed	$\alpha_{\text{CZE}} < 1$	$\alpha_k \geq 1 > \alpha_{\text{CZE}}$	$\rho > 1$	0.8	1.0–6.4	0.5
IV	Co-migration	$\alpha_{\text{CZE}} = 1$	$\alpha_k = \alpha_{\text{CZE}} = 1$	$\rho = 1$	—	—	0.5

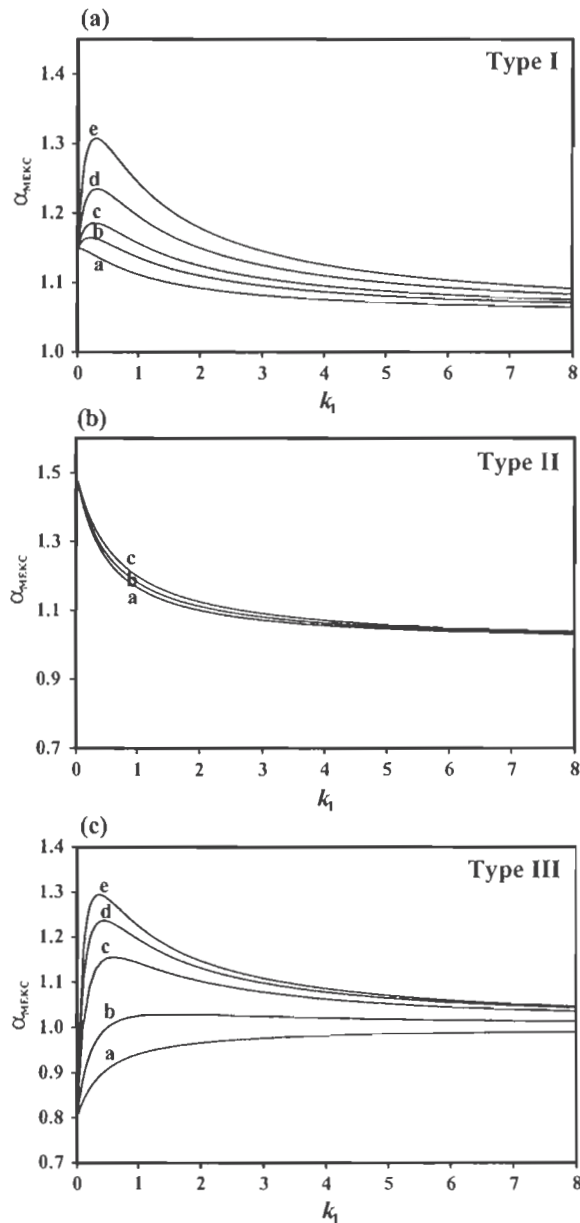
CZE และ k ใน MEKC ของสารที่มีประจุ และเมื่อค่า α_k สูงกว่าค่า α_{CZE} นั่นคือสามารถเพิ่ม α_{MEKC} สำหรับสารที่มีประจุสองตัวใน MEKC ได้ ในทางตรงกันข้ามกับ Types I พบว่าแบบจำลอง α_{MEKC} แบบที่ 2 ($\alpha_k \leq \alpha_{\text{CZE}}$) ในรูปที่ 4.1b แสดงค่า α_{MEKC} มีค่าลดลงเมื่อเพิ่มค่า k_1 แสดงให้เห็นการแยกที่แย่งของสารที่มีประจุสองตัว สำหรับลำดับที่สลับกันของค่า $|\mu|$ ใน CZE และ k ใน MEKC ของสารที่มีประจุ แสดงในรูปที่ 4.1c ในแบบจำลอง α_{MEKC} แบบที่ 3 ซึ่งแบบจำลองจะเริ่มจากค่า α_{MEKC} ที่น้อยกว่า 1.0 ($1/\alpha_{\text{MEKC}} > 1$) และเข้าใกล้ 1.0 (การแยกที่ไม่ดี) ที่ k_1 เพิ่มขึ้น จากนั้นมีค่ามากกว่า 1.0 (การแยกดีขึ้น) เมื่อเพิ่มค่า k_1 มากขึ้นที่ค่า α_{MEKC} เท่ากับ 1.0 ค่า k_1 มีค่าดังสมการที่ 4.8

$$k_1 = \frac{(1 - \alpha_{\text{CZE}})}{(\alpha_{\text{CZE}} - \alpha_k) + (\alpha_k - 1)/\beta} \quad (4.8)$$

เมื่อค่า α_k มีค่าน้อย ๆ ที่ค่า k_1 สูงขึ้นจะได้ค่า α_{MEKC} มีค่าเท่ากับ 1.0 ซึ่งสอดคล้องกับเส้นกราฟล่างสุดของแบบจำลอง α_{MEKC} แบบที่ 3 ซึ่งมีค่า α_{MEKC} เท่ากับ 0.99 ที่ค่า k_1 เพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.1c ข้อควรจำสำหรับค่าทางทฤษฎีของ α_{CZE} หรือ α_{MEKC} น้อยกว่า 1.0 ค่าในทางปฏิบัติจะมีค่าเท่ากับ $1/\alpha_{\text{CZE}}$ หรือ $1/\alpha_{\text{MEKC}}$ ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของค่า k_1 อาจทำให้เกิดการสลับลำดับของความสามารถในการเคลื่อนที่ของไฟฟ้าของสารที่มีประจุสองตัวได้ใน MEKC สำหรับแบบจำลอง α_{MEKC} แบบที่ 3 ($\alpha_k = 1.0$ และ $\alpha_{\text{CZE}} = 1.0$) หมายถึงไม่เกิดการแยกของสารสองที่มีประจุสองตัว

จากรูปที่ 4.1 แบบจำลองทางทฤษฎีของ α_{MEKC} สามารถอธิบายการแยกสารที่มีประจุสองตัว โดยเมื่อค่า α_{MEKC} เพิ่มขึ้นจะให้การแยกของสารดีขึ้น สำหรับแบบจำลอง α_{MEKC} แบบที่ 1 ($\alpha_k > \alpha_{\text{CZE}}$) หรือแบบจำลอง α_{MEKC} แบบที่ 2 ($\alpha_k \gg \alpha_{\text{CZE}}$, or $\alpha_k > 1/\alpha_{\text{CZE}}$) separation selectivity ใน MEKC จะมีค่ามากกว่าใน CZE ที่ค่า k_1 ที่เหมาะสม

ในทางทฤษฎีนั้นทิศทางของ EOF และความเร็วทั้งหมดจะไม่ส่งผลกระทบต่อความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารและไมเซลล์ รวมทั้งรีเทนชันแฟกเตอร์ของสารในไมเซลล์ จากการที่ค่า α_m และ α_k ไม่แปรตามทิศทางของความเร็วที่กล่าวข้างต้น ดังนั้นแบบจำลอง α_{MEKC} ในงานวิจัยนี้สามารถใช้สำหรับ MEKC ที่เป็น normal mode, reversed mode และ restricted mode ซึ่งแต่ละ mode นี้ได้แบ่งตามทิศทางของ EOF และความเร็วทั้งหมดโดยรายละเอียดได้กล่าวไว้ใน [Pyell; 2006]



รูปที่ 4.1 แบบจำลองทางทฤษฎี ของ α_{MEKC} ที่ได้จากการทำนายสำหรับสารที่มีประจุสองตัว คำนวณโดยใช้สมการที่ 4.7 และข้อมูลในตารางที่ 4.1 ตัวแปร a-e แทนค่าของ α_k สำหรับ (a) 1.2, 1.4, 1.7, 2.2 และ 3.3 ตามลำดับ (b) 1.0, 1.2 และ 1.5 ตามลำดับ และ (c) 1.0, 1.6, 3.2, 4.8 และ 6.4 ตามลำดับ

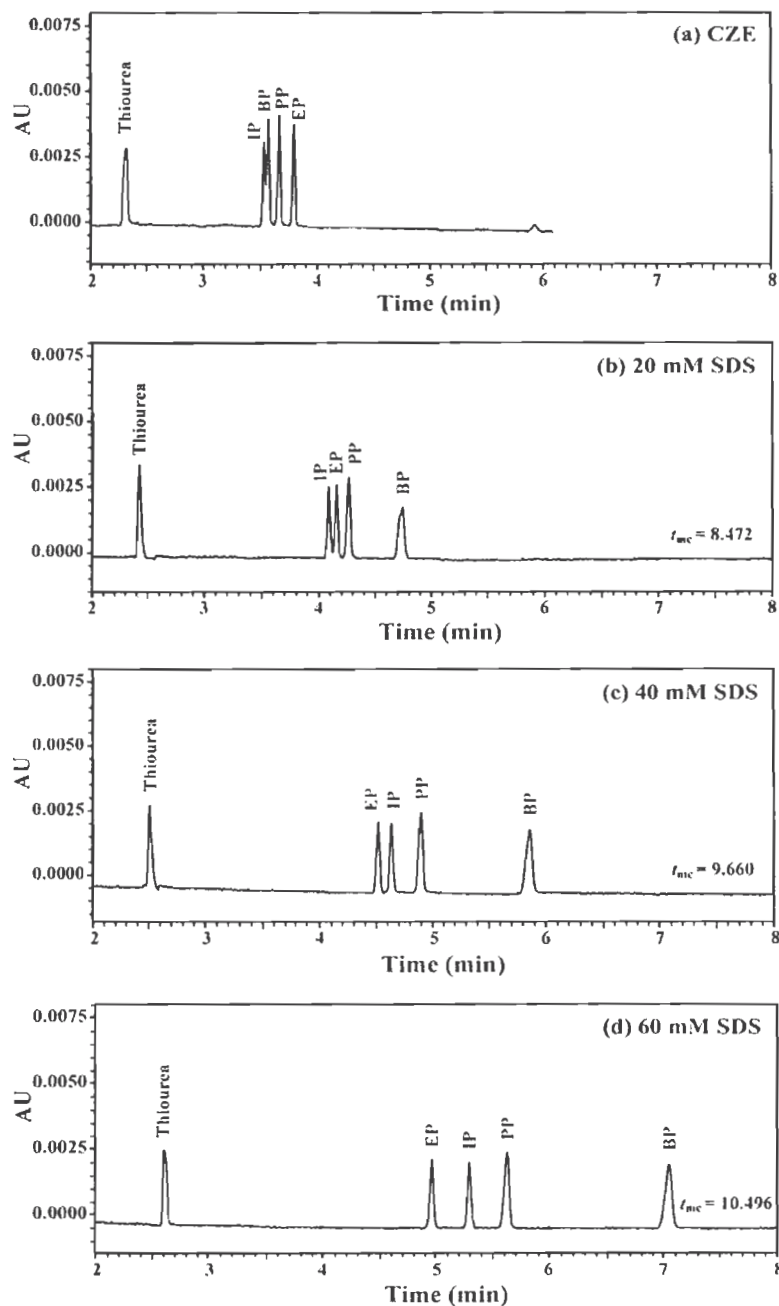
4.3.2 ค่า α_{MEKC} ที่ได้จากการทดลองและค่าที่ได้จากการทำนายสำหรับสารที่มีประจุลบใน MEKC ภายใต้ภาวะ normal elution mode โดยใช้สารลดแรงตึงผิวเป็น SDS ซึ่งมีประจุลบ

ในงานวิจัยนี้สารทดสอบเป็นสารประกอบพาราเบน ได้แก่ IP, BP, PP และ EP ซึ่งเป็นกรดอ่อนที่มี $\text{HO-C}_6\text{H}_4\text{COOR}$ ใน basic buffer ที่มี $\text{pH} > \text{p}K_a$ ของพาราเบน สารประกอบพาราเบนเหล่านี้จะสามารถแตกตัวได้ประจุลบ มีค่า $\text{p}K_a$ ปรากฏเท่ากับ 8.80, 7.98, 8.00 และ 7.97 ตามลำดับ (ค่าใน literature สำหรับ IP เท่ากับ 9.2 [Pirselova *et al.*; 1996] และสำหรับพาราเบนตัวอื่น ๆ เท่ากับ 8.4 [Wilson and Gisvold; 1998]) สำหรับค่า $\text{p}K_a$ ปรากฏนี้สามารถหาได้จากการวัดค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารปรากฏ (α_{eff}) ใน CZE ภายใต้บัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ที่ค่า pH ต่าง ๆ ตั้งแต่ 7.8 ถึง 10.2 จากนั้นเขียนกราฟเส้นตรงของความสัมพันธ์ระหว่าง $1/\alpha_{\text{eff}}$ และ 10^{pH} ($[\text{H}_3\text{O}^+]$) และหาค่า $\text{p}K_a$ จาก $\log(\text{slope}/Y\text{-intercept})$ [Jerez *et al.*; 2009] สำหรับบอเรตบัฟเฟอร์ pH 10.2 ที่ใช้เพื่อทำให้สารทดสอบแตกตัวเป็นประจุลบอย่างสมบูรณ์ด้วยวิธีการแตกตัวเท่ากับ 0.96 สำหรับ IP และ 0.99 สำหรับพาราเบนตัวอื่น ๆ ซึ่งวิธีการแตกตัวคำนวณโดยใช้พารามิเตอร์ต่าง ๆ ภายใต้ภาวะ CE ที่ใช้ทดลองและใช้สมการวิธีการแตกตัวซึ่งได้มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ [Nielsen and Foley; 1993]

เพื่อที่จะสามารถทำนายค่าของ α_{MEKC} สำหรับสารที่มีประจุสองตัวใน MEKC จะต้องรู้พารามิเตอร์ต่าง ๆ ก็คือค่า α_{CZE} ใน CZE และค่า α_k, k ใน MEKC รูปที่ 4.2 แสดงการแยกของพาราเบนโดยใช้ภาวะที่ไม่มี SDS หรือ CZE และภาวะที่มี SDS หรือ MEKC ซึ่งมีค่า [SDS] ต่าง ๆ (20-60 mM) จากรูปที่ 4.1a คือการแยกใน CZE ซึ่งมีเวกเตอร์ของความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของพาราเบนที่มีประจุลบมีทิศทางตรงข้ามกับเวกเตอร์ของ EOF มีลำดับการเคลื่อนที่ของสาร $\text{EP} > \text{PP} > \text{BP} > \text{IP}$ และมีค่า α_{eff} เท่ากับ -2.25, -2.13, -2.03 และ -1.97 $10^8 \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ตามลำดับ ดังนั้นลำดับของค่า $|\mu| \alpha$ ก็คือ $\text{EP} > \text{PP} > \text{BP} > \text{IP}$ ส่วนค่า $|\mu| \alpha$ ของ IP ที่มีค่าน้อยกว่าพาราเบนอื่น ๆ อาจเนื่องมาจากวิธีการแตกตัวที่น้อยกว่าและ/หรือขนาดของไฮโดรไดนามิกที่มีขนาดใหญ่กว่า

ในทางทฤษฎีสำหรับการแยกสารที่ไม่มีประจุใน MEKC ภายใต้ภาวะ normal elution mode โดยใช้สารลดแรงตึงผิวที่เป็นประจุลบ พฤติกรรมการเคลื่อนที่ของสารขึ้นอยู่กับค่า k ของสารเท่านั้น คือสารที่มีค่า k มากกว่าจะใช้เวลาในการวิเคราะห์นานกว่า อย่างไรก็ตามการแยกสารที่มีประจุใน MEKC ภายใต้ภาวะข้างต้นนั้น พฤติกรรมการเคลื่อนที่ของสารขึ้นอยู่กับค่า α และ k ของสารที่วิเคราะห์แต่ละตัว ทำให้ยากต่อการทำนายลำดับการเคลื่อนที่ของ migration time หรือ α_{eff} ของสารใน MEKC รีเทนชันแฟกเตอร์ (k) คำนวณจาก MEKC electropherograms และใช้สมการที่ 4.9 [Tellez *et al.*; 2007, Nielsen and Foley; 1993, Tellez *et al.*; 2007]

$$k = \frac{\mu_{\text{MEKC}} - \mu_0}{\mu_{\text{mc}} - \mu_{\text{MEKC}}} \quad (4.9)$$



รูปที่ 4.2 อิเล็กโทรโฟโกราฟีของพาราเบนภายใต้ภาวะ (a) 0 CZE, (b) 20, (c) 40, และ 60 mM SDS ใน 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ที่ปรับ pH ด้วย 1.0 NaOH ภาวะอื่น ๆ ของ CE: uncoated fused-silica capillary 50 μm i.d. \times 40.2 cm (30 cm ถึงเครื่องตรวจวัด) อุณหภูมิคอลัมน์ 25 $^{\circ}\text{C}$, ศักย์ไฟฟ้า 15 kV, ตรวจวัดที่ 220 nm การบรรจุสารแบบอัดความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 3 วินาที

พารามิเตอร์ต่าง ๆ ได้นิยามไว้แล้วก่อนหน้านี้ในสมการที่ 4.5 และ 4.6 จาก MEKC electropherograms ในรูปที่ 4.2b-d, ค่า k (ตารางที่ 4.2) สำหรับสารประกอบพาราเบนที่มีประจุลบซึ่งมีลำดับการออกคั้งนี้ BP > PP > IP > EP ซึ่งสอดคล้องกับลำดับของค่าคงที่การกระจายตัวของสารในออกทานอลและน้ำ BP > PP > EP [Poouthree *et al.*; 2007, Golden *et al.*; 2005, Tavares *et al.*; 2009]

จากรูปที่ 4.2d สำหรับการแยกใน MEKC ที่บัฟเฟอร์ประกอบด้วย 60 mM SDS พบว่าลำดับของ t_m หรือ $|\mu_{MEKC}|$ คือ BP > PP > IP > EP ซึ่งแตกต่างจากลำดับใน MEKC ที่บัฟเฟอร์ประกอบด้วย 20 mM SDS (รูปที่ 4.2b) BP > PP > EP > IP และใน CZE (รูปที่ 4.2a) EP > PP > BP > IP พฤติกรรมการเคลื่อนที่ที่ต่างกันนี้สามารถอธิบายด้วย separation selectivity models ในหัวข้อ 4.3.1

ตารางที่ 4.2 Mobility selectivity (α_{CZE}), retention selectivity (α_k), retention factor (k_1), selectivity ratio (ρ), และชนิดของแบบจำลอง α_{MEKC}

Pair	Solute 1	$k_1 = a[SDS]+b$	α_{CZE}	α_k	α	ρ	Types of model for α_{MEKC}
IP/EP	EP	0.00236[SDS]-0.013	0.888	k_{IP}/k_{EP}	0.575	$\rho > 1$	III
PP/IP	IP	0.00871[SDS]-0.028	1.066	k_{PP}/k_{IP}	0.511	$\rho > 1$	I
BP/PP	PP	0.01004[SDS]-0.035	0.953	k_{BP}/k_{PP}	0.544	$\rho > 1$	III
	BP	0.03068[SDS]-0.057	-	-	-	-	-

รูปที่ 4.3 แสดงค่า α_{MEKC} ที่ได้จากการทดลองและการทำนายสำหรับพาราเบนใน MEKC ภายใต้ภาวะที่มี [SDS] ต่าง ๆ (รูปที่ 4.3a) และค่า k_1 ต่าง ๆ (รูปที่ 4.3b) พบว่าความสัมพันธ์แรกใช้ในการพิจารณาหา [SDS] ที่สามารถแยกสารออกจากกันหรือทำให้ลำดับการเคลื่อนที่ของสารเกิดการสลับที่กัน ในขณะที่ความสัมพันธ์หลังใช้เปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทดลองและค่าที่ได้จากการทำนายเมื่อไม่ทราบ [SDS] ค่า α_{MEKC} ที่ได้การทำนายที่ [SDS] ต่าง ๆ (6.0-60 mM) คำนวณโดยใช้ข้อมูลในตารางที่ 4.2 และสมการที่ 4.7 ตารางที่ 4.2 แสดงค่า α_{CZE} , α_k , k , ρ และแบบจำลองของ α_{MEKC} ดังที่ได้อธิบายไว้ก่อนหน้านี้ สำหรับการแยกใน MEKC ของคู่สารหนึ่ง ๆ เช่น PP และ IP ค่า k_1 นิยามเป็น k ของสารที่มีค่า k น้อยกว่า เช่น k_{IP} เมื่อใช้ [SDS] (20-60 mM) และเขียนกราฟระหว่างค่า k_1 ที่ได้จากการทดลองกับ [SDS] จะได้กราฟเส้นตรง ซึ่งสามารถใช้ทำนายค่า k_1 ที่ [SDS] ต่าง ๆ ได้ เมื่อใช้ข้อมูลจากตารางที่ 4.2 และ

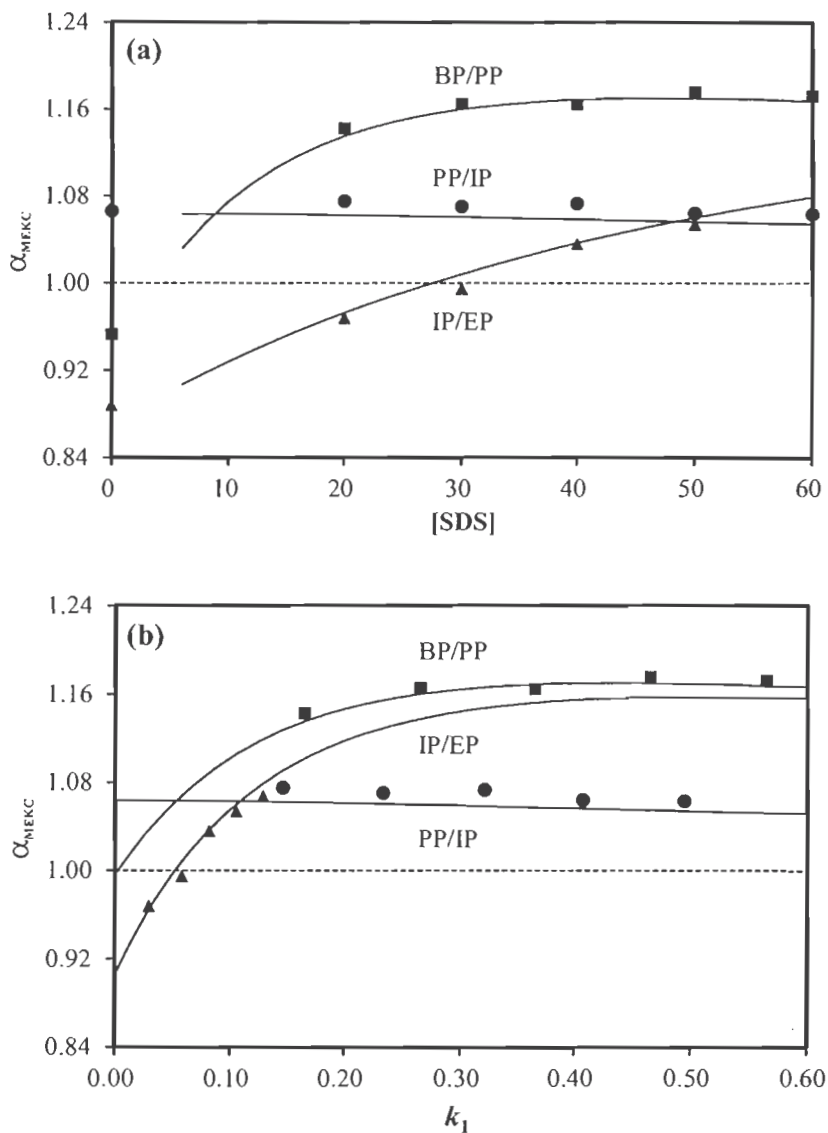
สมการที่ 4.7 พบว่าค่า α_{MEKC} ที่ได้จากการทดลองในรูปที่ 4.3 สอดคล้องกับค่าที่ได้จากการทำนาย แสดงให้เห็นว่าสมการที่ 4.7 สามารถใช้ในการทำนายค่า α_{MEKC} ในช่วงของ [SDS] และค่า k_1 ต่าง ๆ ได้

จาก electropherograms ในรูปที่ 4.2 และข้อมูลในตารางที่ 4.2 พบว่าค่า $|\mu|$ ใน CZE และค่า k ใน MEKC มีลำดับที่เหมือนกัน นั่นคือ $\alpha_{\text{CZE}} > 1.0$ และ $\alpha_{\text{MEKC}} > 1.0$ แม้ว่าค่า $\rho > 1.0$ แต่พบว่าค่า α_{MEKC} ที่ได้จากการทำนายและจากการทดลองลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเพิ่ม [SDS] และ k_1 เนื่องจากค่า ρ ที่ได้จากการคำนวณนั้นมีค่าเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยเท่ากับ 1.032 และ 1.072 สำหรับ 10-60 mM SDS ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของค่า α_{MEKC} ของคู่สาร PP/IP ใน MEKC สอดคล้องกับ แบบจำลอง α_{MEKC} แบบที่ 1 ซึ่งได้อธิบายก่อนหน้านี้นี้ในกรณีที่มีค่า ρ น้อย ๆ

เนื่องจากคู่สาร IP/EP และ BP/PP เกิดการสลับที่กันของค่า $|\mu|$ ใน CZE และค่า k ใน MEKC และค่า α_{CZE} มีค่าน้อยกว่า 1.0 ดังนั้นการสลับลำดับของค่า $|\mu|$ สำหรับคู่สาร IP/EP และ BP/PP ที่ [SDS] สูงและที่ [SDS] ต่ำ ๆ หรือเท่ากับศูนย์สอดคล้องกับแบบจำลอง α_{MEKC} แบบที่ 3 เมื่อค่า α_{MEKC} เท่ากับ 1.0 พบว่าค่า k_1 ที่ได้จากการทำนายในรูปที่ 4.3b มีค่าประมาณ 0.003 สำหรับ BP/PP ที่ [SDS] ต่ำ ๆ และเท่ากับ 0.052 สำหรับ IP/EP ซึ่งค่านี้สอดคล้องกับค่า k_1 ที่ได้จากการทดลองเท่ากับ 0.064 นอกจากนี้พบว่าเมื่อใช้สมการที่ 4.8 และใช้ค่า α_k เฉลี่ยเท่ากับ 3.831 สำหรับคู่สาร IP/EP ที่ 6.0-60 mM SDS ซึ่งให้ค่า α_{MEKC} เท่ากับ 1.0 ได้ค่า k_1 ที่ได้จากการทำนายเท่ากับ 0.057 ซึ่งสอดคล้องกับค่า k_1 ในรูปที่ 4.3b (0.052)

4.4 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของ separation selectivity ใน MEKC สำหรับสารที่มีประจุสองตัวในภาวะที่ความเข้มข้นของ SDS และค่า k ต่าง ๆ สามารถอธิบายและทำนายโดยใช้สมการและแบบจำลองทางทฤษฎีของ separation selectivity ใน MEKC ที่สัมพันธ์กับตัวแปรที่ไม่มีหน่วยของ mobility selectivity ใน CZE และ retention selectivity ใน MEKC เมื่อเปรียบเทียบกับ CZE พบว่า MEKC สามารถเพิ่มหรือลด separation selectivity ของสารที่มีประจุสองตัวได้ขึ้นอยู่กับแต่ละแบบจำลองทางทฤษฎี นอกจากนี้พบว่า separation selectivity ที่ได้จากการทดลองมีความสอดคล้องกับค่าที่ได้จากการทำนายโดยใช้แบบจำลองทางทฤษฎีของ MEKC ในภาวะที่ความเข้มข้นของ SDS และค่า k ต่าง ๆ



รูปที่ 4.3 α_{MEKC} ที่ได้จากการทดลอง (สัญลักษณ์) และจากการทำนาย (เส้นทึบ) สำหรับสารที่มีประจุสองตัวใน MEKC (a) ที่ [SDS] ต่าง ๆ (b) ที่ค่า k_1 ต่าง ๆ สำหรับค่าที่ได้จากการทำนายคำนวณโดยใช้สมการที่ 4.7 และข้อมูลในตารางที่ 4.2

4.5 เอกสารอ้างอิง

1. Terabe, S., Matsubara, N., Ishihama, Y., Okada, Y. "Microemulsion Electrokinetic Chromatography: Comparison with Micellar Electrokinetic Chromatography" *J. Chromatography*. **608** (1992) 23-29.

2. Altria, K. D., Clark, B. J., Mahuzier, P. E. "The Effect of Operating Variables in Microemulsion Electrokinetic Capillary Chromatography" *Chromatographia* **52** (2000) 758-768.
3. Pappas, T. J., Gayton-Ely, M., Holland, L. A. "Recent Advances in Micellar Electrokinetic Chromatography" *Electrophoresis* **26** (2005) 719-734.
4. Iadarola, P., Ferrari, F., Fumagalli, M., Viglio, S. "Determination of Amino Acids by Micellar EKC: Recent Advances in Method Development and Novel Applications to Different matrices" *Electrophoresis* **29** (2008) 224-236.
5. Terabe, S., Otsuka, K., Ando, T. "Electrokinetic Chromatography with Micellar Solution and Open-Tubular Capillary" *Analytical Chemistry*. **57** (1985) 834-841.
6. Quirino, J. P., Terabe, S. "Electrokinetic Chromatography" *Journal of Chromatography A* **856** (1999) 465-482.
7. Molina, M., Silva, M. "Micellar Electrokinetic Chromatography: Current Developments and Future" *Electrophoresis* **23** (2002) 3907-3921.
8. Welsch, T., Michalke, D. "(Micellar) Electrokinetic Chromatography: an Interesting Solution for the Liquid Phase Separation Dilemma" *Journal of Chromatography A* **1000** (2003) 935-951.
9. Terabe, S. "Capillary Separation: Micellar Electrokinetic Chromatography" *Annual Reviews of Analytical Chemistry* **2** (2009) 99-120.
10. Riekkola, M. -L., Wiedmer, S. K., Valkó, I. E., Sirén, H. "Selectivity in Capillary Electrophoresis in the Presence of Micelles, Chiral Selectors and Non-Aqueous Media" *Journal of Chromatography A* **792** (1997) 13-35.
11. Ehala, S., Vaher, M., Kaljurand, M. "Separation of Aromatic Hydrophobic Sulfonates by Micellar Electrokinetic Chromatography" *Journal of Chromatography A* **1161** (2007) 322-326.
12. Gong, S., Liu, F., Li, W., Gao, F., Gao, C., Liao, Y., Liu, H. "Separation of Hydrophobic Solutes by Organic-Solvent-Based Micellar Electrokinetic Chromatography Using Cation Surfactants" *Journal of Chromatography A* **1121** (2006) 274-279.
13. Dubber, M. J., Kanfer, I. "Application of Reverse-Flow Micellar Electrokinetic Chromatography for the Simultaneous Determination of Flavonols and Terpene Trilactones in Ginkgo Biloba Dosage Forms" *Journal of Chromatography A* **1122** (2006) 266-274.

14. Mallampati, S., Leonard, S., De Vulder, S., Hoogmartens, J., Van Schepdael, A. " Method Development and Validation for the Analysis of Didanosine Using Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography" *Electrophoresis* **26** (2005) 4079-4088.
15. Česla, P., Blomberg, L., Hamberg, M., Jandera, P. " Characterization of Anacardic Acids by Micellar Electrokinetic Chromatography and Mass Spectrometry" *Journal of Chromatography A* **1115** (2006) 253-259.
16. Damić, M., Nigović, B. " Fast Analysis of Statins in Pharmaceuticals by MEKC" *Chromatographia* **71** (2009) 233-240.
17. Iadarola, P., Cetta, G., Luisetti, M., Annovazzi, L., Casado, B., Baraniuk, J., Zalone, C., Viglio, S. " Micellar Electrokinetic Chromatographic and Capillary Zone Electrophoretic Methods for Screening Urinary Biomarkers of Human Disorders: A Critical Review of the State-of-the-Art" *Electrophoresis* **26** (2005) 752-766.
18. Téllez, A., Fuguet, E., Rosés, M. "Comparison of migration models for acidic solutes in micellar electrokinetic chromatography" *Journal of Chromatography A* **1139** (2007) 143-151.
19. Giddings, J. C. "Generation of Variance, Theoretical Plates, Resolution, and Peak Capacity in Electrophoresis and Sedimentation" *Journal of Separation Science* **4** (1969) 181-189.
20. Jorgenson, J. W., Lukacs, K. D. " Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries" *Analytical Chemistry* **53** (1981) 1298-1302.
21. Nielsen, K. R., Foley, J. P., in: Camilleri, P. (Eds.) "Capillary Electrophoresis: Theory and Practice" CRC Press, Inc., Boca Raton 1993, pp. 117-161.
22. Pyell, U. "Electrokinetic Chromatography: Theory, Instrumentation, and Application" John Wiley & Sons, West Sussex, 2006, pp. 4-10.
23. Huang, H. -Y., Chiu, C. -W., Chen, Y. -C., Yeh, J. -M. "Comparison of microemulsion Electrokinetic Chromatography and Micellar Electrokinetic Chromatography as Methods for the Analysis of Ten Benzophenones" *Electrophoresis* **26** (2005) 895-902.
24. Nhujak, T., Srisa-art, M., Kalampakorn, K., Tolieng, V., Petsom, A. " Determination of Gibberellic Acid in Fermentation Broth and Commercial Products by Micellar Electrokinetic Chromatography" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53** (2005) 1884-1889.
25. Huertas-Pérez, J. F., del Olmo Iruela, M., García-Campaña, A. M., González-Casado, A., Sánchez-Navarro, A. " Determination of the Herbicide Metribuzin and its Major Conversion

- Products in Soil by Micellar Electrokinetic Chromatography" *Journal of Chromatography A* **1102** (2006) 280-286.
26. Huang, H. -Y., Lai, Y. -C., Chiu, C. -W., Yeh, J. -M. "Comparing Micellar Electrokinetic Chromatography and Microemulsion Electrokinetic Chromatography for the Analysis of Preservatives in Pharmaceutical and Cosmetic Products" *Journal of Chromatography A* **993** (2003) 153-164.
 27. Nhujak, T., Sastravaha, C., Palanuvej, C., Petsom, A. " Chiral Separation in Capillary Electrophoresis Using Dual Neutral Cyclodextrins: Theoretical Models of Electrophoretic Mobility Difference and Separation Selectivity" *Electrophoresis* **26** (2005) 3814-3823.
 28. Norinder, U., Lidén, P., Boström, H. "Discrimination Between Modes of Toxic Action of Phenols Using Rule Based Methods" *Molecular Diversity* **10** (2006) 207-212.
 29. Boyce, M., Spickett, E." Separation and Quantification of Preservatives Using ion Pair HPLC and CZE: An Extended Investigation of Separation Mechanisms" *Journal of Chemistry Education*. **77** (2000) 740-742.
 30. Jerez, G., Kaufman, G., Prystai, M., Schenkeveld, S., Donkor, K. K." Determination of Thermodynamic pKa Values of Benzimidazole and Benzimidazole Derivatives by Capillary Electrophoresis" *Journal of Separation Science* **32** (2009) 32, 1087-1095.
 31. Kenndler, E., in: Khaledi, M. G. (Eds.), "High Performance Capillary Electrophoresis: Theory, Techniques, and Applications" John Wiley & Sons, Inc., New York 1998, pp. 25-76.
 32. Téllez, A., Fuguet, E., Rosés, M. "Optimization of the Separation of Ionizable Compounds in Micellar Electrokinetic Chromatography by Simultaneous Change of pH and SDS Concentration" *Electrophoresis* **28** (2007) 3712-3721.
 33. Poouthree, K., Leepipatiboon, N., Petsom, A., Nhujak, T. "Retention Factor and Retention Index of Homologous Series Compounds in Microemulsion Electrokinetic Chromatography Employing Suppressed Electroosmosis" *Electrophoresis* **28** (2007) 767-778.
 34. Golden, R., Gandy, J., Vollmer, G. "A Review of the Endocrine Activity of Parabens and Implications for Potential Risks to Human Health" *Critical Reviews in Toxicology* **35** (2005) 435-458.
 35. Tavares, R. S., Martins F. C., Oliveira, P. J., Ramalho-Santos, J., Peixoto, F. P."Parabens in Male Infertility-is There a Mitochondrial Connection?" *Reproductive Toxicology* **27** (2009) 1-7.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก โครงการส่งเสริมการทำงานวิจัยเชิงลึกในสาขา ที่มีศักยภาพสูง กองทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช หรือ CU-CLUSTER-FUND ภายใต้โครงการนำร่อง มหาวิทยาลัยวิจัย คลัสเตอร์อาหารและน้ำ (FW 003A) ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ สมศักดิ์ ปัญญา ประชานคลัสเตอร์ และอาจารย์ ดร.ปิโยรส ทองเกิด ที่ทำหน้าที่ประสานงาน และช่วยอำนวยความสะดวกในทุกด้าน ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ที่สนับสนุนพื้นที่และเครื่องมือวิจัย ที่ทำที่สุดขอขอบคุณนิสิตในหน่วยวิจัยโครมาโทกราฟีและการแยกทุกคนที่เป็นกำลังสนับสนุนให้งานวิจัยนี้ สำเร็จลงด้วยดี

ภาคผนวก

ผลงานตีพิมพ์ภายใต้ทุนวิจัยโครงการนำร่อง

- 1) Chayada ChiaoChan, Uairat Koesukwiwat, Soparat Yudthavorasit, Natchanun Leepipatpiboon, Efficient hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the multiclass analysis of veterinary drugs in chicken muscle. (2010) *Analytica Chimica Acta* 682(1-2), pp.117-129 Impact factor 3.757*
- 2) Soparat Yudthavorasit, Chayada ChiaoChan, Natchanun Leepipatpiboon, Simultaneous determination of multi-class antibiotic residues in water using carrier-mediated hollow-fiber liquid-phase microextraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. (2011) *Microchimica Acta* 172(1), pp. 39-49 impact factor 2.648*
- 3) Puangpila, C., Petsom, A., Nhujak, T. Theoretical models of separation selectivity for charged compounds in micellar electrokinetic chromatography (2011) *Electrophoresis*, 32 (2), pp. 203-209 impact factor 3.509*

*จากฐานข้อมูล ISI ปี ค.ศ. 2009

ประวัติผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

1. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางณัฐชนันท์ ลิพิพัฒน์ไพบูลย์
(ภาษาอังกฤษ) Mrs. Natchanun Leepipatpiboon
2. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
3. ที่อยู่(ที่ทำงาน) ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย วิทยาไทย
จังหวัด กรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10330
โทรศัพท์ 02-2187608 โทรสาร 02-2541309
4. ที่อยู่(บ้าน) 817 ซอยศรพิภย์ ถนนสาธุประดิษฐ์ ตำบลบางโพธิ์พอพง อำเภอยานนาวา
จังหวัด กรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10330
โทรศัพท์ 02-2940703 โทรสาร -
5. E-mail Address natchanun.l@chula.ac.th โทรศัพท์มือถือ 081-8759314
6. ประวัติการศึกษา

ปริญญา	สาขาวิชา	มหาวิทยาลัย	ปี พ.ศ. ที่ได้รับ
วท.บ.	เคมี	มหาวิทยาลัยมหิดล	2523
วท.ม.	เคมีวิเคราะห์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2526
Dr.rer.nat	Analytical Chemistry	University of Innsbruck, Austria	2530

7. ผลงานวิจัยย้อนหลังตั้งแต่ปี ค.ศ. 2005 ถึงปัจจุบัน

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ พร้อม impact factor ปี 2009

- 4) Chayada ChiaoChan, Urairat Koesukkiwat, Soparat Yudthavorasit, Natchanun Leepipatpiboon, "Efficient hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the multiclass analysis of veterinary drugs in chicken muscle." (2010) *Analytica Chimica Acta* 682(1-2), pp.117-129 (impact factor 3.757)
- 5) Soparat Yudthavorasit, Chayada ChiaoChan, Natchanun Leepipatpiboon, "Simultaneous determination of multi-class antibiotic residues in water using carrier-mediated hollow-fiber liquid-phase microextraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry." (2011) *Microchimica Acta* 172(1), pp. 39-49 (impact factor 2.648)
- 6) Ancharida Akaracharanya, Jutarat Kesornsit, Natchanun Leepipatpiboon, Teerapatr Srinorakutara, Vichien Kitpreechavanich and Vasana Tolieng, "Evaluation of the waste from carsava starch production as a substrate for ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*." (2011) *Annals of Microbiology* accepted (impact factor 0.358)

- 7) Didier Montet et.al, "Future topics of common interest for EU and SEA partners in food quality, safety and traceability." (2010) *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 2, pp 158-164.
- 8) Urairat Koesukkiwat, Steven J. Lehotay, Shui Miao, Natchanun Leepipatpiboon, "High throughput analysis of 150 pesticides in fruits and vegetables using QuEChERS and low-pressure gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry." (2010) *Journal of Chromatography A* 1217, 6692-6703. (impact factor 4.101)
- 9) Urairat Koesukkiwat, Steven J. Lehotay, Katerina Mastovska, Kelly J. Doweiler and **Natchanun Leepipatpiboon**, "Extension of the QuEChERS Method for Pesticide Residues in Cereals to Flaxseeds, Peanuts, and Doughs." (2010) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, pp. 5950-5958 (impact factor 2.469)
- 10) Lehotay, S.J., Son, K.A., Kwon, H., Koesukkiwat, U., Fu, W., Mastovska, K., Hoh, E., **Leepipatpiboon, N.**, "Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables." (2010) *Journal of Chromatography A*, 1217 (16), pp. 2548-2560. (impact factor 4.101)
- 11) Aurapan Sansukcharearnpon, Supason Wanichwecharungruang, **Natchanun Leepipatpiboon**, Teerakiat Kerdcharoen, Sunatda Arayachukeat. High loading fragrance encapsulation based on a polymer-blend: Preparation and release behavior. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010; 391: 267-273. (impact factor 2.962)
- 12) Nilubol, D., Pattanaseth, T., Boonsri, K., Pirarat, N., **Leepipatpiboon, N.**, "Melamine- and cyanuric acid-associated renal failure in pigs in Thailand." (2009) *Veterinary Pathology*, 46 (6), pp. 1156-1159. (impact factor 1.367)
- 13) Soonthorntantikul, W., **Leepipatpiboon, N.**, Ikegami, T., Tanaka, N., Nhujak, T., "Selectivity comparisons of monolithic silica capillary columns modified with poly(octadecyl methacrylate) and octadecyl moieties for halogenated compounds in reversed-phase liquid chromatography." (2009) *Journal of Chromatography A*, 1216 (31), pp. 5868-5874. (impact factor 4.101)
- 14) Ramakul, P., **Leepipatpiboon, N.**, Yamoum, C., Thubsuang, U., Bunnak, S., Pancharoen, U. "Reduction of concentration polarization at feeding interphase of a hollow fiber supported liquid membrane by using periodic operation." (2009) *Korean Journal of Chemical Engineering*, 26 (3), pp. 765-769. (impact factor 0.893)
- 15) Chitpirom K, Akaracharanya A, Tanasupawat S, **Leepipatpiboon N**, Kim, K-W., "Isolation and characterization of arsenic resistant bacteria from tannery wastes and agricultural soils in Thailand." (2009) *Annals of Microbiology*, 59(4) : 649-656. (impact factor 0.358)
- 16) Kinagam, S., Yingprasertchai, T., Tanasupawat, S., **Leepipatpiboon, N.**, Akaracharanya, A., Kim, K.-W., "Isolation and characterization of arsenite-oxidizing bacteria from arsenic-contaminated soils in Thailand." (2008) *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24 (12), pp. 3091-3096. (impact factor 1.082)

- 17) Koesukkiwat, U., Sanguankaew, K., **Leepipatpiboon, N.**, "Rapid determination of phenoxy acid residues in rice by modified QuEChERS extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry." (2008) *Analytica Chimica Acta*, 626 (1), pp. 10-20. (impact factor 3.757)
- 18) Sumphanwanich, J., **Leepipatpiboon, N.**, Srinorakutara, T., Akaracharanya, A., "Evaluation of dilute-acid pretreated bagasse, corn cob and rice straw for ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*." (2008) *Annals of Microbiology*, 58 (2), pp. 219-225. (impact factor 0.358)
- 19) Piriypittaya, M., Jayanta, S., Mitra, S., **Leepipatpiboon, N.**, "Micro-scale membrane extraction of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water followed by high-performance liquid chromatography and post-column derivatization with fluorescence detector." (2008) *Journal of Chromatography A*, 1189 (1-2), pp. 483-492. (impact factor 4.101)
- 20) Moontongchoon, P., Chadchawan, S., **Leepipatpiboon, N.**, Akaracharanya, A., Shinmyo, A., Sano, H., "Cadmium-tolerance of transgenic *Ipomoea aquatica* expressing serine acetyltransferase and cysteine synthase." (2008) *Plant Biotechnology*, 25 (2), pp. 201-203. (impact factor -)
- 21) Kieatsuda Poouthree, Warura Soonthorntantikul, **Natchanun Leepipatpiboon**, Amorn Petsom, Thumnoon Nhujak*, " Comparison of resolution in microemulsion electrokinetic chromatography and micellar electrokinetic chromatography employing suppressed electroosmosis: application to bisphenol-A-diglycidyl ether and its derivatives .", 2007, *Electrophoresis*, 28, 3705-3711 (impact factor 3.077)
- 22) Urairat Koesukkiwat, Siripastr Jayanta and **Natchanun Leepipatpiboon***, "Solid-Phase Extraction for Multi-Residue Determination of Sulfonamides, Tetracyclines, and Pyrimethamine in Bovine's Milk." *Journal of Chromatography A*, 1149(2007) 102-111 (impact factor 4.101)
- 23) Urairat Koesukkiwat, Siripastr Jayanta and **Natchanun Leepipatpiboon***, "Validation of a Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Multi-Residue Method for the Simultaneous Determination of Sulfonamides, Tetracyclines, and Pyrimethamine in Milk." *Journal of Chromatography A*, 1140 (2007) 147-156 (impact factor 4.101)
- 24) Kieatsuda Poouthree, **Natchanun Leepipatpiboon**, Amorn Petsom, Thumnoon Nhujak*, " Retention factor and retention index of homologous series compounds in microemulsion electrokinetic chromatography employing suppressed electroosmosis.",*Electrophoresis*, 2007, 28, 767-778 (impact factor 3.077)
- 25) Thaniyavarn J, Chongchin A, Wanitsuksombut N, Thaniyavarn S, Pinphanichakarn P, **Leepipatpiboon N**, Morikawa M, Kanaya S., "Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* A41 using palm oil as carbon source." *Journal of General and Applied Microbiology*.. 52(4): 215-22, 2006 (impact factor 0.957)
- 26) Jomkhwan Meerak, Ancharida Akaracharanya, **Natchanun Leepipatpiboon**, Supachitra Chadchawan, Pulla Kaothein-Nakayama, Atsuhiko Shinmyo, Hiroshi Sano, "Simultaneous expression of serine acetyltransferase and cysteine synthase results in enhanced sulfate uptake

and increased biomass in *Ipomaea aquatica*" *Plant Biotechnology* 23, 185-189 (2006) (impact factor -)

- 27) **N. Leepipatpiboon***, O. Sae-Khow and S. Jayanta "Simultaneous determination of bisphenol-A-diglycidyl ether, bisphenol-F-diglycidyl ether, and their derivatives in oil-in-water and aqueous-based canned foods by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection" *Journal of Chromatography A* 1073 (2005), 331-339. (impact factor 4.101)
- 28) N. Sakulkoo, A. Akaracharanya, S. Chareonpornwattana, **N. Leepipatpiboon**, T. Nakamura, Y. Yamaguchi, A. Shinmyo, H. Sano "Hyper assimilation of sulfate and tolerance to sulfide and cadmium in transgenic water spinach expressing an Arabidopsis adenosine phosphosulfate reductase" *Plant Biotechnology* 22 (2005) 27-32. (impact factor -)
- 29) G.Fortunato, **V.Leepipatpiboon**, Ch.Bissig, Ch.Moor and S.Wunderli, "Zinc and Tin as Primary Materials to Achieve Traceability of Calibration Standard to the SI." *Chimia*, 53(1999) N0 7/8 331. (impact factor 0.920)
- 30) Wunderli, S., Fortunato, G., Bissig, Ch. And **Leepipatpiboon, V.**, "From Pure Metals to Certified Isotopic Reference Materials." *Journal of Chinese Mass Spectrometry Soc.*, special 20 (1999) 3-4.
- 31) **V. Leepipatpiboon** "Trace Enrichment by Solid-Phase Extraction for the Analysis of Heavy Metals in Water" *Journal of Chromatography A*, 697 (1995), 137-143. (impact factor 4.101)

8. สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ (ตอบได้มากกว่า 1 สาขา)

เครื่องมือวิเคราะห์ การวิเคราะห์สารปริมาณน้อย สารกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ ยาสัตว์ตกค้าง เทคนิคโครมาโทกราฟี

9. รางวัลวิจัยที่เคยได้รับ (ด้านวิชาการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย)

- รางวัลผลงานวิจัยดีมาก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปี 2553
- รางวัลผลงานวิจัยที่ได้รับการอ้างอิงสูงสุด ประจำปี 2553 ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาฯ
- รางวัลผลงานวิจัยที่ได้รับการอ้างอิงสูงสุด ประจำปี 2551 ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาฯ
- รางวัลผลงานวิจัยดีเด่น ประจำปี 2551 ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาฯ

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล: (ภาษาไทย) นายธรรมนุญ หนูจักร
(ภาษาอังกฤษ) Mr. Thumnoon Nhujak
2. ตำแหน่งทางวิชาการ: รองศาสตราจารย์
3. ที่อยู่(ที่ทำงาน): ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์ 02-2187609 โทรสาร 02-2187598
4. ที่อยู่ (บ้าน): 25/238 ซอยอินทามระ 2 ถนนสุขุมวิทวินิจฉัย แขวงสามเสนใน เขตพญาไท กทม.
10400
5. Email: thumnoon.n@chula.ac.th โทรศัพท์มือถือ 089-6670845
6. ประวัติการศึกษา

ปริญญา	สาขาวิชา	มหาวิทยาลัย	ปี พ.ศ. ที่ได้รับ
วท.บ.	เคมี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2535
วท.ม.	ปิโตรเคมี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2538
Ph.D.	Analytical Chemistry	University of York, UK	2544

7. สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ

เคมีวิเคราะห์ เน้น

- เทคนิคการแยกสาร เช่น Capillary electrophoresis และ High-performance liquid chromatography
- การวิเคราะห์อาหาร ยาและพืชสมุนไพร

8. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

- 1) Puangpila, C.; Petsom A., and Nhujak T. "Theoretical models of separation selectivity for charged compounds in micellar electrokinetic chromatography" *Electrophoresis* 2011, 32, 203-209. IF = 3.077
- 2) Angkanasiriporn, S.; Singsung, W.; Petsom, A. and Nhujak, T. "Comparison and prediction of the retention in micellar electrokinetic chromatography and microemulsion electrokinetic chromatography for disubstituted benzenes" *Electrophoresis* 2010, 31, 695-701. IF = 3.077, Cited = 1
- 3) Soonthorntantikul, W.; Leepipatpiboon, N.; Ikegami, T.; Tanaka, N. and Nhujak, T.

- “Selectivity Comparisons of Monolithic Silica Capillary Columns Modified with Poly(octadecyl methacrylate) and Octadecyl Moieties for Halogenated Compounds in Reversed-Phase Liquid Chromatography” *Journal of Chromatography A* **2009**, 1216, 5868-5874. IF = 4.101, Cited = 1
- 4) Muensritharam, L.; Tolieng, V.; Chaichantipyuth, C.; Petsom, A. and **Nhujak, T.** “Capillary zone electrophoresis for separation and analysis of hydroxycitric acid, hydroxycitric acid lactone: application to herbal products of *Garcinia atroviridis* Griff” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2008**, 46, 577-582. IF = 2.453, Cited = 2
 - 5) Poouthree, K.; Soonthorntantikul, W.; Leepipatpiboon, N.; Petsom, A. and **Nhujak, T.** “Comparison of resolution in Microemulsion EKC and MEKC employing suppressed electroosmosis” *Electrophoresis* **2007**, 28, 3705-3711. IF = 3.077, Cited = 9
 - 6) Poouthree, K.; Leepipatpiboon, N.; Petsom, A. and **Nhujak, T.** “Retention factor and retention index of homologous series compounds in microemulsion electrokinetic chromatography employing suppressed electroosmosis” *Electrophoresis* **2007**, 28, 767-778. IF = 3.077, Cited = 9
 - 7) Seelanan, P.; Srisa-art, M.; Petsom, A. and **Nhujak, T.** “Determination of avermectins in commercial formulations using microemulsion electrokinetic chromatography” *Analytica Chimica Acta* **2006**, 570, 8-14. IF = 3.757, Cited = 12
 - 8) **Nhujak, T.**; Saisuwan, W.; Srisa-art, M. and Petsom, A. “Microemulsion electrokinetic chromatography for separation and analysis of curcuminoids in turmeric samples” *Journal of Separation Science* **2006**, 29, 666-676. IF = 2.551, Cited = 19
 - 9) **Nhujak, T.**; Sastravaha, C.; Palanuvej, C. and Petsom, A. “Chiral separation in capillary electrophoresis using dual cyclodextrins: Theoretical models of electrophoretic mobility difference and separation selectivity” *Electrophoresis* **2005**, 26, 3814-3823. IF = 3.077, Cited = 11
 - 10) **Nhujak, T.**, Srisa-art, M.; Kalampakorn, K.; Tolieng, V. and Petsom, A. “Determination of gibberellic acid in fermentation broth and commercial products by micellar electrokinetic chromatography” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, 53, 1884-1889. IF = 2.469, Cited = 3
 - 11) Suwanprasop, S.; **Nhujak, T.**; Roengsumran, S. and Petsom, A. “Petroleum marker synthesized from cardanol and aniline derivatives” *Industrial & Engineering Chemistry*

- Research* **2004**, 43, 4973-4978. IF = 1.758, Cited = 27
- 12) Roengsumran, S.; Pompakakul, S.; Muangsin, N.; Sangvanich, P.; **Nhujak, T.**; Singtothong, P.; Chaichit, N.; Puthong, S. and Petsom, A. "New halimane diterpenoids from *Croton oblongifolius*" *Planta Medica* **2004**, 70, 87-89. IF = 2.037, Cited = 5
- 13) S. Suwanprasop, S. Suksom, **T. Nhujak**, S. Roengsumran and A. Petsom "Petroleum markers synthesized from *n*-alkylbenzene and aniline derivatives" *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **42** (2003) 5054-5059. IF = 1.518, Cited = 4
- 14) S. Suwanprasop, P. Khamnuansiri, **T. Nhujak**, S. Roengsumran and A. Petsom "Continuous Process for the Production of Aromatic Hydrocarbons from *n*-Hexane and C5+ Natural Gas Liquid over Pd-Loaded ZSM-5 Zeolite" *Organic Process Research & Development*, **7** (2003) 577-582. IF = 2.004, Cited = 0
- 15) **T. Nhujak** and D.M. Goodall "Comparison of binding of tetraphenylphosphate and tetraphenylborate ions to cyclodextrins studies by capillary electrophoresis" *Electrophoresis*. **22** (2001) 313-320. IF = 3.077, Cited = 9
- 16) **T. Nhujak** and D.M. Goodall "Trace analysis of γ -cyclodextrin in a sample of β -cyclodextrin by capillary electrophoresis" *Journal of Chromatography A*. **970** (2001) 313-320. IF = 4.101, Cited = 2

9. รางวัลที่เคยได้รับ

9.1 รางวัลผลงานวิจัย

- 1) รางวัลผลงานวิจัยดีมาก เรื่อง "Microemulsion electrokinetic chromatography for separation and analysis of hydrophobic compounds: Theory of retention and resolution, and application to real samples จากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีการศึกษา 2551
- 2) รางวัลนำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ระดับนานาชาติ: The 4th Prize in Best Poster Award at HPLC2008 Kyoto for "Selectivity comparison of monolithic silica capillary columns modified with poly(octadecyl methacrylate) and octyldecyl moiety for halogenated compounds in reversed-phase HPLC, The 33rd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques" Kyoto, Japan, 2-6 December 2008. **T. Nhujak***, W. Soonthorntantikul, T. Ikegami, N. Tanaka.
- 3) รางวัลผลงานวิจัยดีมาก เรื่อง "Chiral separation in capillary electrophoresis using dual

neutral cyclodextrins: Theoretical models of electrophoretic mobility difference and separation selectivity” จากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีการศึกษา 2548

- 4) รางวัลนักวิจัยรุ่นเยาว์ดีเด่น จากคณะวิทยาศาสตร์ ประจำปี 2549

9.2 ทุนอบรมเพิ่มพูนความรู้

- 1) The JSPS Postdoctoral Fellowship เรื่อง “Ultrahigh efficiency monolithic columns in multidimensional separations of biological substances by μ HPLC and μ HPLC-MS” ที่ Department of Biomolecular Engineering, Kyoto Institute of Technology เมืองเกียวโต ประเทศญี่ปุ่น เป็นเวลา 1 ปี ระหว่าง 29 พฤศจิกายน 2550 ถึง 28 พฤศจิกายน 2551
- 2) The Hitachi Research Fellowship เรื่อง “High Efficiency Monolithic Columns in Capillary Electrochromatography (CEC) and Capillary High Performance Liquid Chromatography (capillary HPLC)” ที่ Department of Biomolecular Engineering, Kyoto Institute of Technology เมืองเกียวโต ประเทศญี่ปุ่น เป็นเวลา 3 เดือน ระหว่าง 17 สิงหาคม ถึง 14 พฤศจิกายน 2550
- 3) The PIDC Research Fellowship เรื่อง “Biosensor with Microchip Capillary Electrophoresis Technology” ที่ Precision Instrument Development Center (PIDC) เมือง Hsinchu ประเทศไต้หวัน เป็นเวลา 4 เดือน ระหว่าง 11 มิถุนายน ถึง 8 ตุลาคม 2547

ประวัติผู้วิจัย

ผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล: (ภาษาไทย) ม.ล. ศิริพัศตร์ ไชยันต์
(ภาษาอังกฤษ) M.L. Siripastr Jayanta
2. ตำแหน่งทางวิชาการ: ผู้ช่วยศาสตราจารย์
3. ที่อยู่ทำงาน: ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ โทรศัพท์ 02-2187610 โทรสาร: 02-2187598
4. ที่อยู่ปัจจุบัน: 1176/1 ถ.พระราม 4 เขตคลองเตย กท. 10110
5. Email: siripastr.ja@chula.ac.th โทรศัพท์มือถือ: 081-6463126
6. ประวัติการศึกษา

ปริญญา	สาขาวิชา	มหาวิทยาลัย	ปี พ.ศ. ที่ได้รับ
วท.บ.	(เคมี)	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2526
วท.ม.	(Analytical Chemistry)	California Polytechnic State University at San Obispo	2529
	(Physical Chemistry)	State University of New York At Stony Brook, USA	2534
Ph.D.		จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	กำลังศึกษาต่อ

7. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ ปี 2004-ปัจจุบัน (6 เรื่อง)

- 1) M. Piriypittaya, S. Jayanta, S. Mitra, N. Leepipatpiboon “Micro-scale membrane extraction of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water followed by high-performance liquid chromatography and post-column derivatization with fluorescence detector” *Journal of Chromatography A*, 1189 (2008), 483-492. IF = 3.756,
- 2) P. Sirikulchayanont, S. Jayanta, P. Pradipasena, O. Miyawaki, “Characteristics of Microparticulated Particles from Mung Bean Protein” *International Journal of Food Properties*, 10 (2007), 621-630. IF = 1.020,
- 3) U. Koesukwiwat, S. Jayanta, N. Leepipatpiboon, “Validation of a liquid chromatography-mass spectrometry multi-residue method for the simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in milk”, *Journal of Chromatography A*, 1140, (2007), 147-156. IF = 3.756,

- 4) U. Koesukwiwat, **S. Jayanta**, N. Leepipatpiboon, “Solid-phase extraction for multiresidue determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in Bovine's milk” *Journal of Chromatography A*, 1149 (2007), 102-111. IF = 3.756,
- 5) N. Leepipatpiboon, O. Sae-Khow, and **S. Jayanta** “Simultaneous determination of bisphenol-A-diglycidyl ether, bisphenol-F-diglycidyl ether, and their derivatives in oil-in-water and aqueous-based canned foods by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection” *Journal of Chromatography A*, 1073 (2005), 331-339. IF = 3.756,
- 6) A. Klaikherd, **S. Jayanta**, J. Boonjawat, S. Aiba, and M. Sukwattanasinitt “Depolymerization of b-chitin to mono- and disaccharides by the serum fraction from the *para* rubber tree *Hevea brasiliensis*” *Carbohydrate Research*, 339 (2004) 2799-2804. IF = 1.960,

10. สาขาที่เชี่ยวชาญ

เคมีวิเคราะห์ เน้น

- เทคนิคการแยกสาร เช่น high-performance liquid chromatography

- การวิเคราะห์อาหารและสิ่งแวดล้อม

11. รางวัลที่เคยได้รับ

11.1 รางวัลผลงานวิจัย

11.2 ทุนอบรมเพิ่มพูนความรู้

ประวัติผู้วิจัย

ผู้ร่วมวิจัย

- ชื่อ-นามสกุล: (ภาษาไทย) นางลักษณา ดูบาส (นามสกุลเดิม ลิมสวรรค์)
(ภาษาอังกฤษ) Mrs. Luxsana Dubas (Limsavarn)
- ตำแหน่งทางวิชาการ: อาจารย์
- ที่อยู่ทำงาน: ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ โทรศัพท์ 02-2187611 โทรสาร: 02-2187598
- ที่อยู่ปัจจุบัน: 464 ตรอกอิสรานุภาพ จักรวรรดิ แขวงทรงวาด เขตสัมพันธวงศ์ กทม.
- Email: luxsana.l@chula.ac.th โทรศัพท์มือถือ: 080-5811648

6. ประวัติการศึกษา

ปริญญา	สาขาวิชา	มหาวิทยาลัย	ปี พ.ศ. ที่ได้รับ
วท.บ.	(เคมี)	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2538
Ph.D.	(Analytical Chemistry)	Florida State University, USA	2546

7. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารนานาชาติ (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่ตีพิมพ์)

4 เรื่องเป็นผู้วิจัยหลักหรือชื่อแรก (ขีดเส้นใต้ตัวเข้ม) ส่วนอีก 2 เรื่อง เป็นผู้วิจัยร่วม (ตัวเข้มอย่างเดียว)

- Poltue, T.; Rangkupan, R.; Dubas, S.T.; **Dubas, L.** Nickel (II) Ions Sensing Properties of dimethylglyoxime/Poly(caprolactone) Electrospun Fibers, *Materials Letters*, 2011 *In press*.
- Limsavarn L.**; Kulsiriwivat, T.; Samneingjam, K.; Sritaveesinsub, V.; Dubas, S.T. Formation of Silver-Nanoparticles Composite Thin Films, Formation of Silver-nano particles composite thin film, *Acta Metallurgica Slovaca*, 2007 Vol.12 No.3 pp.147-155.
- Limsavarn L.**; Sritaveesinsub, V.; Dubas, S.T. Polyelectrolyte Assisted Silver Nanoparticles Synthesis and Thin Film Formation, *Materials letters*, 2007 Vol.61 (14-15) pp. 3048-3051. IF = 1.748, Cited = 2
- Kumlangdudsana, P.; Dubas S.T.; **Dubas, L.** Surface Modification of Microfluidics Devices, *Journal of Metals, Materials and Minerals*, 2007 Vol. 17 No.2 pp. 67-74.
- S.T. Dubas, **L. Limsavarn**, C. Iamsamai, and P. Potiyaraj "Assembly of polyelectrolyte multilayers on nylon fibers" *Journal of Applied Polymer Science*, 101 (2006), 3286-3290. IF = 1.187, Cited = 2
- Limsavarn, L.**; Panithipongwut, C.; Thongkorn, P.; Dubas S. T. pH sensitive PEM coatings for microfluidics devices, *Journal of Metals, Materials and Minerals*, 2006 Vol. 16 No 2 pp. 47-52.

7. **Limsavarn, L.**; Dorsey, J.G. Influence of stationary phase solvation on shape selectivity and retention in reversed-phase liquid chromatography, Journal of chromatography. A. 2006 Vol. 1102(1-2) pp.143-53. IF = 3.756, Cited = 4

10. สาขาที่เชี่ยวชาญ

เคมีวิเคราะห์ โดยมีทิศทางการวิจัย แบ่งออกเป็น 3 ทิศทางได้แก่ การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารปนเปื้อนในอาหาร ในสิ่งแวดล้อม และ ในสารตัวอย่างทางชีวภาพ โดยใช้เทคโนโลยีระดับนาโน และไมโคร การพัฒนาวิธีการเตรียมสารตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการแยก และการศึกษากลไกการแยก ของเทคนิคการแยก

11. รางวัลที่เคยได้รับ -

11.1 รางวัลผลงานวิจัย -

11.2 ทุนอบรมเพิ่มพูนความรู้ -

ประวัติผู้วิจัย

ผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล: (ภาษาไทย) นางสาวมนพิชา ศรีสะอาด
(ภาษาอังกฤษ) Miss Mopichar Srisa-Art
2. ตำแหน่งทางวิชาการ: อาจารย์
3. ที่อยู่ทำงาน: ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ โทรศัพท์ 02-2187610 โทรสาร: 02-2187598
4. ที่อยู่ปัจจุบัน: 69/1 Grand Living Place ซ. เจริญศักดิ์ ถ. สุทธิสารวินิจฉัย เขตห้วยขวาง กทม 10310
5. Email: monpichar.s@chula.ac.th โทรศัพท์มือถือ: 089-604-1518
6. ประวัติการศึกษา

ปริญญา	สาขาวิชา	มหาวิทยาลัย	ปี พ.ศ. ที่ได้รับ
วท.บ.	เคมี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2543
วท.ม.	เคมี (วิเคราะห์)	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2546
Ph.D.	Chemistry	Imperial College London	2553

7. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่ (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่ตีพิมพ์)

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ (13 เรื่อง)

7 เรื่องเป็นชื่อแรก (ตัวเข้มชื่อแรก) ส่วนอีก 6 เรื่อง เป็นผู้วิจัยร่วม (ตัวเข้ม)

- 1) **Srisa-Art, M.**; deMello, A.J.; Edel, J. B., High-Efficiency Single-Molecule Detection within Trapped Aqueous Microdroplets. *Journal of Physical Chemistry B* **2010**, 114, 15766-15772. IF = 3.471, Cited = 0
- 2) Casadevall, S.X.; **Srisa-Art, M.**; deMello, A.J. and Edel, J.B. "Mapping of fluidic mixing in microdroplets with 1 μ s time resolution using fluorescence lifetime imaging" *Analytical Chemistry* **2010**, 82(9), 3950-3956. IF = 5.214, Cited = 1
- 3) **Srisa-Art, M.**; deMello, A.J. and Edel, J.B. "High-throughput confinement and detection of single DNA molecules in aqueous microdroplets" *Chemical Communications* **2009**, 21(43), 6548-6550. IF = 5.504, Cited = 4
- 4) **Srisa-Art, M.**; Bonzani, I.C.; Williams, A.; Stevens, M.M.; deMello, A.J. and Edel, J.B. "Identification of rare progenitor cells from human periosteal tissue using droplet microfluidics" *Analyst* **2009**, 134(11), 2239-2245. IF = 3.272, Cited = 6

- 5) **Srisa-Art, M.**; Kang, D. K.; Hong, J.; Park, H.; Leatherbarrow, R. J.; Edel, J. B.; Chang, S. I.; deMello, A. J., Analysis of Protein-Protein Interactions by Using Droplet-Based Microfluidics. *ChemBioChem* **2009**, 10, (10), 1605-1611. IF = 3.332, Cited = 6
- 6) **M. Srisa-Art**, E.C. Dyson, A.J. DeMello, J.B. Edel, "Monitoring of real-time streptavidin-biotin binding kinetics using droplet microfluidics" *Analytical Chemistry* **2008**, 80, 7063-7067. IF = 5.214, Cited = 15
- 7) **M. Srisa-Art**, A.J. Demello, J.B. Edel, "Fluorescence lifetime imaging of mixing dynamics in continuous-flow microdroplet reactors" *Physical Review Letters* **2008**, 101, 014502. IF = 6.944, Cited = 11
- 8) A. Huebner, S. Sharma, **M. Srisa-Art**, F. Hollfelder, J.B. Edel, A.J. DeMello, "Microdroplets: A sea of applications? *Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology* **2008**, 8, 1244-1254. IF = 5.821, Cited = 115
- 9) **M. Srisa-Art**, A.J. DeMello, J.B. Edel, "High-throughput DNA droplet assays using picoliter reactor volumes" *Analytical Chemistry* **2007**, 79, 6682-6689. IF = 5.214, Cited = 43
- 10) A. Huebner, **M. Srisa-Art**, D. Holt, C. Abell, F. Hollfelder, A.J. DeMello, J.B. Edel, "Quantitative detection of protein expression in single cells using droplet microfluidics" *Chemical Communications* **2007**, 12, 1218-1220. IF = 5.34, Cited = 96
- 11) P. Seelanan, **M. Srisa-art**, A. Petsom, and T. Nhujak "Determination of avermectins in commercial formulations by microemulsion electrokinetic chromatography" *Analytica Chimica Acta*, **2006**, 570, 8-14. IF = 3.146, Cited = 12
- 12) T. Nhujak, W. Saisuwan, **M. Srisa-art**, and A. Petsom "Microemulsion electrokinetic chromatography for separation and analysis of curcuminoids in turmeric samples" *Journal of Separation Science* **2006**, 29666-676. IF = 2.746, Cited = 18
- 13) T. Nhujak, **M. Srisa-art**, K. Kalampakorn, V. Tolieng, and A. Petsom "Determination of gibberellic acid in fermentation broth and commercial products by micellar electrokinetic chromatography" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, 53, 1884-1889. IF = 2.562, Cited = 3

8. สาขาที่เกี่ยวข้อง

เคมีวิเคราะห์ เน้น

- เทคนิคการแยกสาร เช่น Capillary Electrophoresis (CE), HPLC

- Microfluidic systems

9. รางวัลที่เคยได้รับ

-

9.1 รางวัลผลงานวิจัย

-

9.2 ทุนอบรมเพิ่มพูนความรู้

-

ผลงานตีพิมพ์ฉบับที่ 1

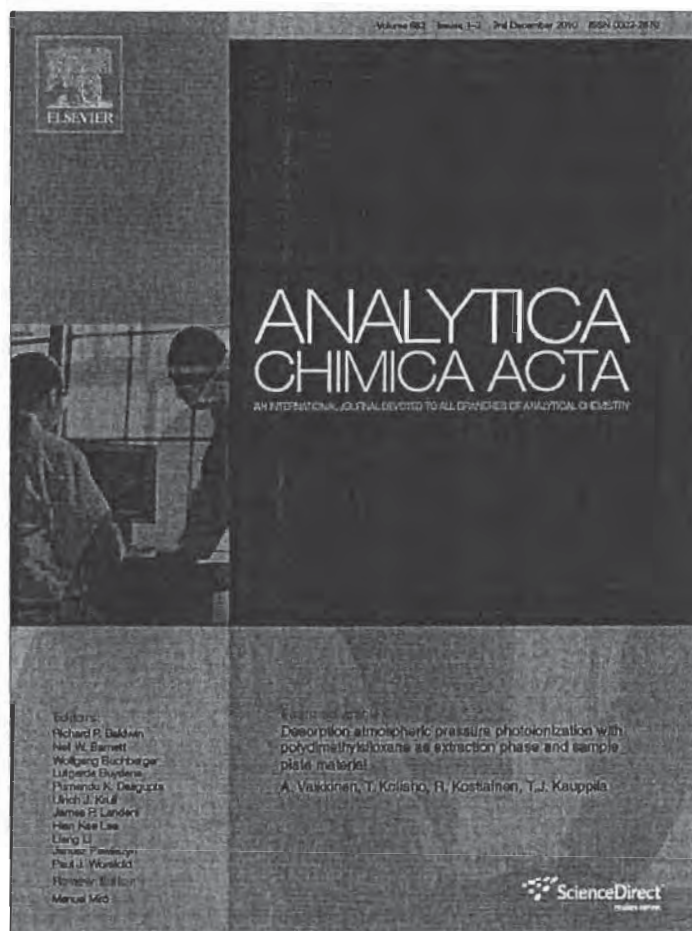
ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสาร

Analytica Chimica Acta (2010), 682(1-2), pp.117-129

การวิเคราะห์สารกลุ่มยาสัตว์ตกค้างหลายชนิดพร้อมกันในเนื้อไก่ด้วยอंत्र
กิริยาแบบไฮโดรฟิลิกลิควิดโครมาโทกราฟี
เชื่อมกับแทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี

**Efficient hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass
spectrometry for the multiclass analysis of veterinary drugs
in chicken muscle**

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Efficient hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the multiclass analysis of veterinary drugs in chicken muscle

Chayada ChiaoChan, Urairat Koesukkiwat, Soparat Yudthavorasit, Natchanun Leepipatpiboon*

Chromatography and Separation Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai, Bangkok 10330, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 August 2010
Accepted 29 September 2010
Available online 7 October 2010

Keywords:

Veterinary drugs
Residue analysis
Chicken muscle
Hydrophilic interaction liquid chromatography
Tandem mass spectrometry

ABSTRACT

A simple and sensitive method has been developed for multiresidue analysis of 24 important veterinary drugs (including 3 aminoglycosides, 3 β -lactams, 2 lincosamides, 4 macrolides, 4 quinolones, 4 sulfonamides, 3 tetracyclines, and amprolium) in chicken muscle. The method involved a simple extraction using (1:1, v/v) of 2% trichloroacetic acid in water–acetonitrile, followed by removing fat with hexane, dilution of sample extract, and filtration prior to liquid chromatography–tandem mass spectrometric (LC–MS/MS) analysis. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) proved to be very effective for separation of a wide range of polar and hydrophilic compounds (providing high sensitivity and good peak shape) compared to reversed phase and ion-pair separation. The method was successfully validated according to the European Decision 2002/657/EC. Average recoveries were 53–99% at 0.5-MRL, MRL, and 1.5-MRL spiking levels, with satisfactory precision $\leq 15\%$ RSD. The limit of detection of the method was 0.1–10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for 22 analytes and 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for aminoglycosides. These values were lower than the maximum residue limits (MRLs) established by the European Union. The evaluated method provides reliable screening, quantification, and identification of 24 veterinary drug residues in foods of animal origin. It has been successfully tested in real samples (such as chicken muscle, shrimp, and egg).

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Many classes of veterinary drugs, such as aminoglycosides, β -lactams, coccidiostats, lincosamides, macrolides, quinolones, sulfonamides, and tetracyclines, are widely applied in current veterinary practice. The chemical structures of the studied analytes in this work are shown in Fig. 1. They are commonly used for therapeutic, prophylactic, and/or as feed additives to promote growth in livestock [1]. Thus, the inappropriate or over-use of these drugs can result in the presence of harmful drug residues in animal tissues. These can give potential adverse side effects in hypersensitive individuals or long-term health effects, including microbial antibiotic resistance. As a consequence, monitoring of veterinary drug residues is an important issue to ensure the safety of food. To limit human exposure, the European Union (EU) set maximum residue limits (MRLs) of these drugs in foodstuffs of animal origin [2].

Due to the lack of sensitivity and selectivity of typical microbial assays [3–5], liquid chromatography (LC) coupled with tandem-mass spectrometry (MS–MS) has become the predominant technique for monitoring of chemical residues in foods. LC–MS/MS provides high selectivity, sensitivity, and precision, which fulfills

the requirements demanded by the EU 657/2002 legislation. In the literature, several LC and LC–MS(/MS) methods have been described for single-drug class residue analysis such as sulfonamides [6], quinolones [7], β -lactams and cephalosporins [8], and aminoglycosides [9,10]. These methods are varied in methodological approaches suitable for a variety of drugs and food matrices. A small number of published methods were reported for the simultaneous analysis of multiple drug classes. Liquid (modified with acid)-based or organic solvent-based (MeOH, MeCN) extraction [11–13], solid-phase extraction (SPE) [14,15], QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) approach [16] and pressurized liquid extraction (PLE) [17] were also employed for sample preparation of multiple drug residues. Yamada et al. [18] highlighted an extensive method for the determination of 130 drugs from multiple classes, except aminoglycosides and tetracyclines. In 2008, a multiclass method published by Kaufmann et al. [19] for the determination of about 100 drugs (not including aminoglycosides) in various kinds of meat using ultra performance liquid chromatography (UPLC)–time-of-flight mass spectrometry (TOF MS).

Generally, multiresidue method requires not only an efficient sample preparation, but also a suitable analytical method to maximize the method performance over a wide range of analyte polarities. Most of previously reviewed methods (Table 1) are mainly based on reversed phase separation due to its applicability for a wide range of neutral compounds of different polarities. However, the main drawbacks encountered when using reversed phase

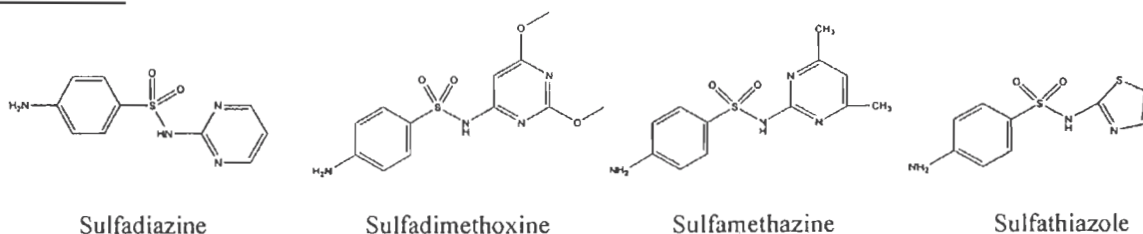
* Corresponding author. Tel.: +66 2 2187608; fax: +66 2 2541309.
E-mail address: natchanun.l@chula.ac.th (N. Leepipatpiboon).

for the most highly polar compounds are poorly retained and poor peak shapes. Hammel et al. [13] proposed ion-pair chromatography for multiresidue antibiotics analysis in honey, including aminoglycosides (high polar). The detection limits of this method were between 27 and 80 $\mu\text{g kg}^{-1}$. However, ion-pair separation requires ion-pair reagent (mainly trifluoroacetic acid, heptafluorobutyric acid, phosphoric acid, etc.) in the mobile phase composition to regulate the retention of polar compounds on the stationary phase. But these ion-pair reagents are rarely volatile acids and can seriously affect the performance of MS in ionization suppression of analytes and contaminate in ion source. The technique has evolved for improved analysis of high polar compounds by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC). Unlike reversed-phase, HILIC employs a polar stationary phase and a mixture of water and organic solvents (mainly MeCN) as the mobile phase, which allows polar compounds to be successfully retained on the sta-

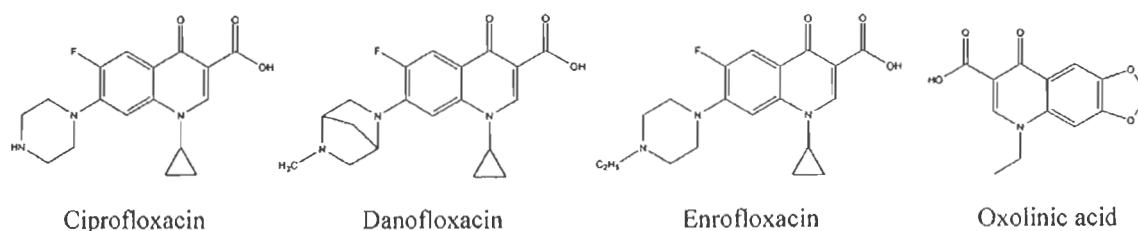
tionary phase and eluted by increasing the percent of the aqueous portion in the mobile phase [20–22]. Many buffers or acid modifiers can be used as mobile phase additives to improve the chromatographic behavior of the analytes. Moreover, another advantage of HILIC is the compatibility of using a volatile mobile phase to help electrospray ionization (ESI)–MS performance, which is commonly used for analyzing wide range of compound polarities. Consequently, HILIC makes the separation of highly polar compounds easier and increases the chances for simultaneous analysis from less-polar to high polar compounds. Many applications of HILIC have been reported for the analysis of polar compounds including amino acids, peptides and carbohydrates [23–25], toxins [26], sugars [27], counter-ions [28] and veterinary drugs [29,30].

However, the methods mentioned above did not also include the analysis of aminoglycosides with other drugs. This is due to the differences in chemical properties of individual drug classes,

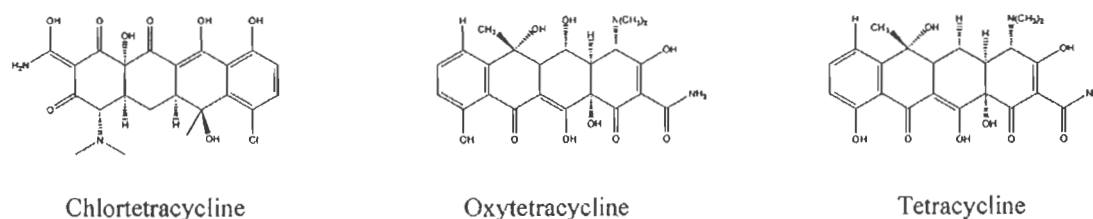
Sulfonamides



Quinolones



Tetracyclines



Penicillins

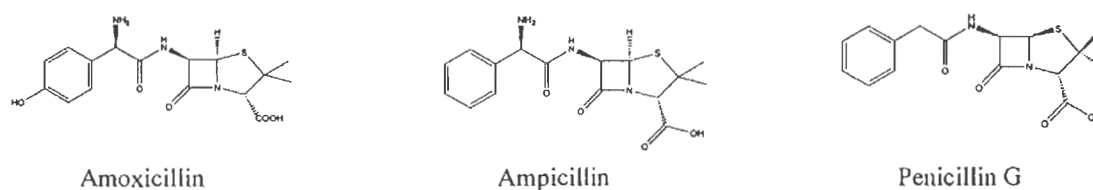
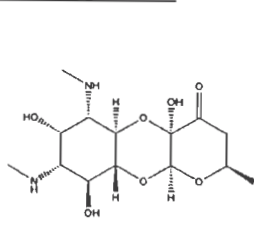
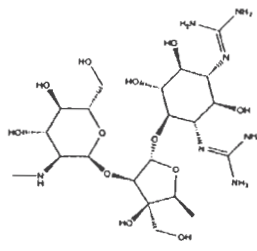


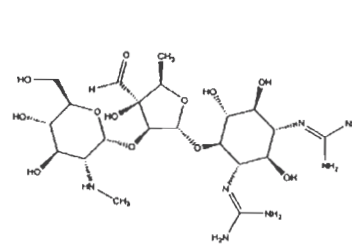
Fig. 1. Chemical structures of the 24 veterinary drugs in this study.

Aminoglycosides

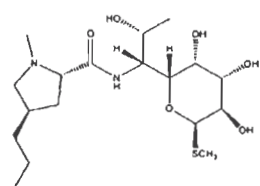
Spectinomycin



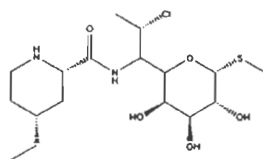
Dihydrostreptomycin



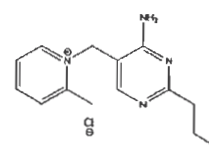
Streptomycin

Lincosamides

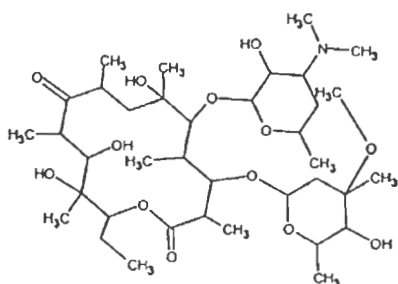
Lincomycin



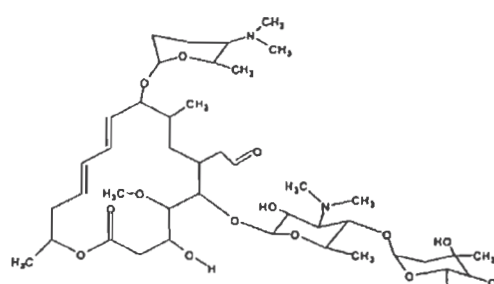
Pirlimycin

Cocciostats

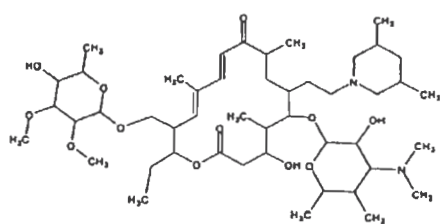
Amprolium

Macrolides

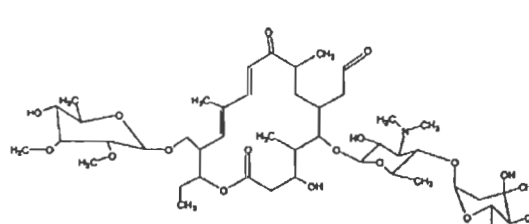
Erythromycin



Spiramycin



Tilmicosin



Tylosin

Fig. 1. (Continued).

especially aminoglycosides which are extremely polar (containing many amino and hydroxyl groups in their structures), that make both of sample preparation and separation more difficult for the simultaneous analysis of aminoglycosides and other drugs in a single method.

To address this issue, we sought to devise and validate a simple and effective method for the multiresidue analysis of 24 important veterinary drugs classified in 8 different classes in chicken muscle. We strived to optimize HILIC-ESI-MS/MS conditions to accommodate a variety of analyte polarities and provide acceptable

Table 1
Recent HPLC methods for multiclass veterinary drugs analysis.

Analyte	Matrix	LC mode	Column	Mobile phase	Detection	Sensitivity ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Reference
Quinolones (6), sulfonamides (5), tetracyclines (1), other veterinary drug (6)	Shrimp	RP	Water YMC phenyl 4 mm \times 50 mm, 3 μm	A: 95:5 (v/v) 0.1% formic acid in water–MeCN B: 15:85 (v/v) 0.05% formic acid in water–MeCN	APCI–MS	LOD = 10–200	[10]
Sulfonamides (4) β -Lactams (3), macrolides (4), quinolones (4), tetracyclines (4)	Muscle Kidney	RP	Genesis C18 2.1 mm \times 50 mm, 4 μm	A: MeCN B: 0.2% formic acid in water containing 0.1 mM oxalic acid	ESI–MS/MS	LOD = 2–15	[11]
β -Lactams (7), macrolides (4), quinolones (9), sulfonamides (14), tetracyclines (4), other veterinary drugs (1)	Chicken	RP	C18 Acquity UPLC BEH, 2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm	A: 0.2% formic acid in water containing 1 mM oxalic acid B: 0.1% formic acid in MeCN	ESI–MS/MS	CC β = 6.9–337.2	[12]
Quinolones (12), sulfonamides (16), other veterinary drugs (13)	Chicken	RP	Synergi fusion 2 mm \times 100 mm, 2.5 μm	A: 0.1% formic acid in water B: 0.1% formic acid in MeCN C: 0.1% formic acid in MeOH	ESI–MS/MS	CC β = 0.45–487	[15]
Aminoglycosides (3), β -lactams (8), macrolides (7), sulfonamides (17), tetracyclines (5), amphenicols (2)	Honey	Ion-pair	Zorbax SB-C18 2.1 mm \times 50 mm, 1.8 μm	A: 1 mM NFPA in 0.5% formic acid in water B: 0.5% formic in (50:50, v/v) of MeCN–methanol	ESI–MS/MS	LOD = 27–80	[16]
β -Lactams (2), lincosamide (1), macrolides (4), quinolones (7), sulfonamides (10), tetracyclines (3), other veterinary drugs (4)	Meat	RP	Xterra MS C18 2.1 mm \times 100 mm, 3.5 μm	A: 10 mM formic acid in MeOH B: 10 mM formic acid in water	ESI–MS/MS	LOD = 3–15	[17]
Lincosamides (3), macrolides (10), quinolones (14), sulfonamides (12), tetracyclines (7), other veterinary drug (1)	Milk	RP	C18 Aqua 2.1 mm \times 150 mm, 3 μm	A: 0.2% formic acid in water B: 0.2% formic acid in MeCN	ESI–MS/MS	CC β = 7.9–325	[18]
Aminoglycosides (3), amprolium, β -lactams (3), lincosamides (2), macrolides (4), quinolones (4), sulfonamides (4), tetracyclines (3)	Chicken muscle	HILIC	ZIC–HILIC 2.1 mm \times 100 mm, 3.5 μm	A: 50 mM ammonium formate in water at pH 2.5 B: MeCN	ESI(+)-MS/MS	LOD = 0.1–10, except STR and DSTR = 20	This work

(x) = number of veterinary drugs.

performance criteria for the application, and we chose to use the EU 2002/657/EC legislation [2] for validation criteria, which included selectivity, linearity, recovery, precision (repeatability and reproducibility), decision limits ($CC\alpha$), and detection capability ($CC\beta$).

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

All veterinary drug standards used in this study were 95% or available highest purity. Ampicillin (AMP), amprolium (AMPR), chlortetracycline (CTC), ciprofloxacin (CIP), enrofloxacin (ENR), erythromycin (ERY), lincomycin (LIN), oxolinic acid (OXO), oxytetracycline (OTC), penicillin G (PEN G), spectinomycin (SPEC), spiramycin (SPI), sulfadimethoxine (SDMX), tetracycline (TC), tilimicosin (TIL), and tylosin (TYL) were obtained from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Dihydrostreptomycin (DSTR) and streptomycin (STR) were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Amoxicillin (AMOX), sulfadiazine (SDZ) and sulfathiazole (STZ) were supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Danofloxacin (DAN) was obtained from Riedel-de Haën (Seelze, Germany). Sulfamethazine (SMZ) was obtained from Wako Chemicals (VA, USA). Pirlimycin (PIR) was obtained from Pfizer (NY, USA).

Methanol (MeOH) was HPLC grade and acetonitrile (MeCN) were both of HPLC grade for sample preparation and LC/MS grade for analysis from J.T. Baker (Deventer, The Netherlands). Ammonium formate, ammonium acetate, formic acid, and acetic acid (HOAc) were analytical grade from Fluka. Trichloroacetic acid (TCA) and heptafluorobutyric acid (HFBA) were analytical grade from Fisher Scientific (Leicestershire, UK). Hexane was analytical grade obtained from Kanto Chemical (Tokyo, Japan). Water was purified from Milli-Q purification system (Millipore, Billerica, MA, USA) at $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ resistivity.

Ultra high purity (99%) of nitrogen (N_2) and argon (Ar) used in LC-MS/MS interface were supplied from Chatakorn lab center (Bangkok, Thailand).

2.2. Standard solution preparations

Stock standard solutions of individual analyte at about 0.1 g L^{-1} were prepared in appropriate solvents; aminoglycosides and β -lactams were prepared in Milli-Q water; SAs, MCs, ENR, and OXO were prepared in MeCN; and TCs, LAs, AMPR, CIP, and DAN were prepared in MeOH. All stock standard solutions were stored in polypropylene tubes at -20°C (β -lactams and cephalosporins and aminoglycosides were kept at 4°C). For the optimization of MS/MS parameters (tuning), individual standard solution was prepared at 10 mg L^{-1} in MeCN–water (1:1, v/v). For the standard calibration curves, a mixture of standards solution at highest concentration (1 mg L^{-1}) was prepared in MeCN–water (1:1, v/v) and this solution was appropriately diluted to lower concentrations. For the recovery and validation studies, a mixture of spiking standard solution containing 24 analytes at $1\text{--}10 \text{ mg L}^{-1}$ (corresponding to 20 times the MRL of each analyte) was prepared in MeCN–water (1:1, v/v).

2.3. Instrumentation

The LC-MS/MS was a Waters Acquity Ultra Performance Liquid Chromatography System coupled with a Micromass Quattro Premier™ XE triple quadrupole mass spectrometer (Waters, MA, USA). LC separation was performed on a zwitterionic ZIC-HILIC column ($2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$; $3.5 \mu\text{m}$ particle size) from SeQuant (Umea, Sweden), which was maintained at 40°C . The flow rate of mobile phase was 0.2 mL min^{-1} . The injection volume was $10 \mu\text{L}$. The optimized mobile phase composition was 50 mM ammonium formate in water at pH 2.5 (mobile phase A) and MeCN (mobile

phase B). A mobile phase gradient program was started at 90% B (held for 1.5 min), 40% B at 4 min, and then 10% B at 6 min (held for 4 min). The column was re-equilibrated at the initial chromatographic conditions for 5 min before the next injection.

The MS instrument was performed by electrospray ionization in positive mode (ESI⁺). The MS conditions used in this study were as followed: capillary voltage of 1.0 kV, source temperature of 120°C , desolvation temperature of 350°C , extractor voltage of 3 V, cone gas (N_2) flow of 50 L h^{-1} , desolvation gas (N_2) flow of 1000 L h^{-1} , and collision gas (Ar) of $3.5 \times 10^{-3} \text{ mbar}$. MassLynx software version 4.1 (Waters) was used for the instrument control and data acquisition/processing. For analyte specific MS/MS parameters, the optimizations were carried out by directly injecting each of tuning standard solutions into the MS/MS system for automatic tuning. The precursor ions of all analyte were $[\text{M}+\text{H}]^+$, which were used in ESI⁺ mode, except AMPR and SPEC were $[\text{M}-\text{Cl}+\text{H}]^+$ and $[\text{M}+\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$, respectively. The two most abundant product ions produced from each precursor ion were chosen as ion transitions. The instrument software was used to set up retention time and collection time segments for each transition (which can be overlapped), and automatically calculated the optimal dwell time for each transition. Two MRM transitions of each analyte were used with dwell time in the range of 0.02–0.5 s for each transition. The inter-scan delay was set at 0.02 s. The MS acquisition was divided into 5 time windows (0.50–2.60 min, 2.60–5.30 min, 3.20–5.20, 4.10–5.45, and 5.55–10.00 min) to provide maximum number of data points across peaks and improve sensitivity and selectivity of analytes. The retention times and optimized MS/MS conditions obtained for each analyte are shown in Table 2.

2.4. Sample preparation

For validation experiments, chicken muscle sample was purchased from a local market. All of chicken skin and bones were removed before mincing and also checked to ensure samples were free of analytes using HILIC-ESI-MS/MS. Minced samples were kept at -20°C prior to analysis.

A 5 g minced chicken muscle sample was weighed into a 50 mL polypropylene centrifuge tube (Corning, Lowell, MA, USA). A 10 mL extraction solution (consisting of 2% TCA aqueous solution–MeCN (1:1, v/v) was added and vortexed briefly for 30 s. The mixture was mechanically shaken for 10 min and then centrifuged at 3400 rpm ($\approx 945 \text{ rcf}$) for 5 min. An aliquot of supernatant was decanted into a disposable polypropylene centrifuge tube, then 5 mL hexane was added to remove fat. The mixture was vortexed for 1 min and centrifuged again at 3400 rpm for 5 min. The hexane layer was discarded. A $200 \mu\text{L}$ of sample extract was transferred to a graduated centrifuge tube and diluted with $800 \mu\text{L}$ of 10% formic acid in water–MeCN (1:9, v/v). The extract was filtered through a $0.2 \mu\text{m}$ nylon syringe filter (Whatman, Florham Park, NJ, USA) prior to HILIC-ESI-MS/MS analysis.

2.5. Method validation

In this study, method validation was performed following the 2002/657/EC guidelines [2], covering identification, specificity, linearity, recovery, precision, and analytical limits.

Identification was carried out by retention times, identification points of each analyte as required by the EU validation criteria, and relative ion ratio of selected MRM transitions. Specificity of the method was verified by analyzing 20 blank chicken muscle samples obtained from different sources and checking the existing of target analytes and other interferences. Linearity was performed by spiking standard solutions in blank sample extracts at 10 calibration points in the range of $0.5\text{--}100 \mu\text{g L}^{-1}$ that covered the MRL of the analytes. Recovery and precision were estimated from spiking

Table 2Molecular weights, retention times, t_R (acceptable ranges, ± 3 SD), ion transitions, optimized MS/MS parameters, and ion ratios (acceptable ranges, ± 3 SD) vs. concentrations of the 24 veterinary drugs in HILIC-UPLC-ESI(+)-MS/MS.

Analyte	M.W.	t_R (min)	Cone voltage (V)	Quantification transition (m/z)	CE (eV)	Confirmation transition (m/z)	CE (eV)	Ion ratio			
								0.5-MRL	MRL	1.5-MRL	
Sulfadimethoxine	SDMX	310.3	1.42 \pm 0.03	40	311.08 > 156.16	25	311.08 > 108.16	35	0.34 \pm 0.03	0.34 \pm 0.03	0.35 \pm 0.01
Sulfamethazine	SMZ	278.3	1.47 \pm 0.02	35	279.09 > 186.02	20	279.09 > 124.07	30	0.56 \pm 0.06	0.55 \pm 0.03	0.56 \pm 0.03
Penicillin G	PEN G	334.4	1.50 \pm 0.01	45	335.32 > 217.24	15	335.32 > 90.91	35	0.83 \pm 0.18	0.80 \pm 0.06	0.82 \pm 0.02
Oxolinic acid	OXO	261.2	1.50 \pm 0.02	32	262.10 > 244.13	20	262.10 > 216.02	35	0.07 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01
Sulfadiazine	SDZ	250.3	1.55 \pm 0.02	25	251.10 > 155.91	15	251.10 > 107.84	25	0.48 \pm 0.03	0.48 \pm 0.03	0.48 \pm 0.01
Sulfathiazole	STZ	255.3	1.76 \pm 0.02	30	256.09 > 107.87	25	256.09 > 155.93	15	0.40 \pm 0.03	0.41 \pm 0.02	0.41 \pm 0.02
Tylosin	TYL	916.1	4.37 \pm 0.03	57	916.48 > 174.19	40	916.48 > 772.94	35	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01
Erythromycin	ERY	733.9	4.44 \pm 0.06	25	734.57 > 576.38	25	734.57 > 522.34	25	0.30 \pm 0.09	0.29 \pm 0.10	0.29 \pm 0.08
Enrofloxacin	ENR	359.4	4.55 \pm 0.06	30	360.14 > 245.09	35	360.14 > 316.00	26	0.68 \pm 0.17	0.69 \pm 0.18	0.65 \pm 0.09
Chlortetracycline	CTC	478.9	4.62 \pm 0.03	30	479.11 > 462.07	18	479.11 > 444.16	20	0.91 \pm 0.23	0.91 \pm 0.09	0.90 \pm 0.09
Danofloxacin	DAN	357.3	4.65 \pm 0.03	35	358.15 > 82.22	45	358.15 > 340.00	35	0.31 \pm 0.10	0.30 \pm 0.10	0.29 \pm 0.06
Ciprofloxacin	CIP	331.3	4.69 \pm 0.02	37	332.22 > 314.22	23	332.22 > 245.22	25	0.58 \pm 0.16	0.55 \pm 0.14	0.62 \pm 0.13
Pirlimycin	PIR	410.1	4.71 \pm 0.02	35	411.17 > 111.82	27	411.17 > 363.15	18	0.25 \pm 0.05	0.24 \pm 0.02	0.24 \pm 0.02
Ampicillin	AMP	349.4	4.75 \pm 0.02	25	350.23 > 105.90	20	350.23 > 192.10	15	0.31 \pm 0.08	0.34 \pm 0.12	0.36 \pm 0.13
Amoxicillin	AMOX	365.4	4.81 \pm 0.06	20	366.25 > 208.15	13	366.25 > 349.20	10	0.57 \pm 0.13	0.58 \pm 0.19	0.56 \pm 0.06
Tetracycline	TC	444.4	4.82 \pm 0.03	25	445.25 > 410.45	20	445.25 > 154.15	25	0.72 \pm 0.16	0.69 \pm 0.09	0.71 \pm 0.07
Lincomycin	LIN	406.5	4.85 \pm 0.02	40	407.16 > 126.09	30	407.16 > 359.21	20	0.07 \pm 0.04	0.08 \pm 0.02	0.07 \pm 0.03
Tilcomycin	TIL	869.1	4.88 \pm 0.03	55	869.53 > 174.39	55	869.53 > 696.51	50	0.53 \pm 0.14	0.52 \pm 0.09	0.56 \pm 0.18
Oxytetracycline	OTC	460.4	4.89 \pm 0.04	27	461.19 > 426.18	20	461.19 > 443.21	13	0.52 \pm 0.12	0.46 \pm 0.11	0.50 \pm 0.08
Spiramycin	SPI	843.1	4.97 \pm 0.04	30	843.51 > 174.10	45	843.51 > 101.07	58	0.22 \pm 0.12	0.24 \pm 0.11	0.24 \pm 0.05
Amprolium	AMPR	278.8	5.41 \pm 0.05	20	243.11 > 150.05	15	243.11 > 122.03	25	0.14 \pm 0.08	0.12 \pm 0.01	0.12 \pm 0.03
Spectinomycin	SPEC	332.3	6.33 \pm 0.03	35	351.21 > 333.27	20	351.21 > 97.75	30	0.76 \pm 0.15	0.80 \pm 0.14	0.79 \pm 0.16
Dihydrostreptomycin	DSTR	583.6	7.57 \pm 0.04	60	584.14 > 263.18	30	584.14 > 246.15	40	0.35 \pm 0.10	0.37 \pm 0.08	0.37 \pm 0.07
Streptomycin	STR	581.6	7.65 \pm 0.03	65	582.14 > 263.27	30	582.14 > 246.14	40	0.54 \pm 0.27	0.53 \pm 0.13	0.51 \pm 0.21

blank chicken muscle samples at three different levels (0.5, 1.0, and 1.5 times the MRL) in ten replicates at each level for three consecutive days. However, precision of the method was categorized in term of repeatability and within-laboratory reproducibility. Repeatability was calculated as the relative standard deviation (RSD) of results obtained for each analyte after the replicate ($n = 10$) analyses under the same conditions, the same operator, and during the same day. Within-laboratory reproducibility was calculated as the %RSD of analysis at two concentration levels (0.5-MRL and MRL) on three separate days ($n = 30$ each level overall).

For analytical limits of the method, limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) of each analyte were estimated from spiked blank sample at the lowest calibration level and measured the signal-to-noise ratios at 3 and 10, respectively. To estimate the decision limit ($CC\alpha$) and the detection capability ($CC\beta$), 20 blank chicken muscle samples spiked with 24 analytes standard at MRL levels were determined and standard deviations were calculated. The $CC\alpha$ is the concentration at the permitted limit plus 1.64 times the corresponding standard deviation. The $CC\beta$ is the concentration at $CC\alpha$ values plus 1.64 times the corresponding standard deviation.

According to the requirements for substances which MRLs are expressed in form of sum-MRLs [31], spiking levels of sulfonamides at 0.1, 0.2, and 0.4 times the MRL levels and ENR and CIP at 0.2, 0.5, and 1.0 times the MRL levels were used throughout the quantitative method-validation study.

3. Results and discussion

3.1. HILIC-ESI-MS/MS optimization

As mentioned in Section 1, highly polar compounds are not retained and elute in the void volume of column when using reversed-phase separation. Ion-pair chromatography can be employed to solve this problem, however, low signal intensity, poor peak shape, and ion suppression (causing from ion-pairing agent) can also occur. For these reasons, we believed that HILIC would be more suitable for the analysis of polar analytes in our work rather than other modes. Polar analytes can be more strongly retained in the HILIC mode and are eluted by increasing the percentage of aqueous portion in the mobile phase. A wide variety of HILIC columns are commercially available with different functionalities of stationary phase and other features. In this study, we initially compared the efficiency of two different HILIC columns (ZIC-HILIC and Acquity UPLC BEH HILIC) for the analysis of the selected analytes. We found that ZIC-HILIC column provided the best peak shape and chromatographic separation, shortest retention time, and highest intensity for all tested analytes. ZIC-HILIC is a zwitterionic stationary phase, which has sulfoalkylbetaine functional groups chemically bonded to the porous silica [32]. This phase can retain not only polar and charge compounds, but it also interacts with neutrally charge analyte (containing either positive or negative charges), increasing selectivity in the analysis of a wide range of compounds.

Mobile phase composition is an additional important consideration in LC-ESI-MS(/MS), especially for trace analysis, in order to achieve high ionization and sufficient separation with minimum interference from matrix. Ammonium formate buffer (mobile phase A) was chosen because of it provides high ionization efficiency and high solubility in the presence of MeCN (mobile phase B) compared to ammonium acetate buffer. Mobile phase buffer at pH 2.5, 3, and 4 and ionic strength at 10, 50, and 100 mM were evaluated and optimized on analyte responses and retention times. We found that retention times were not affected by varying pH of mobile phase, indicating the high selectivity and pH-independence of overall neutral zwitterionic stationary phase. Overall highest responses and shortest retention times were obtained with 50 mM ammonium formate buffer at pH 2.5, especially the late eluting

analytes (aminoglycosides) which clearly provided high maximum sensitivities and good symmetric peaks at this condition.

Furthermore, mobile phase gradient conditions were also optimized in order to obtain the best chromatographic results with minimum analysis time. The total run time was 15 min. The last eluting analyte was detected at 7.65 min at 90% A but this condition was further held until 10 min to prevent carry-over and/or contaminants from sample matrices, and then gradually reduced to 10% A for equilibration of the column for 5 min. The optimal HILIC-ESI-MS/MS conditions were detailed in Section 2.

In order to investigate the efficiency of ZIC-HILIC, we also designed experiments comparing the chromatographic responses of 24 analytes obtained from reversed-phase and ion-pair mode. Chromatographic conditions of reversed-phase and ion-pair mode were also optimized separately for achieving the best sensitivities and ensuring the results were fairly comparable to HILIC mode. As seen in Fig. 2, HILIC improved peak shapes of analytes (reduced tailing) and also gave good sensitivities at about 1690–1700 times for AMPR and 100–270 times for SPI higher than reversed-phase and ion-pair mode (calculated at the same concentration 0.1 mg kg^{-1}). These led to higher S/N ratios and lower detection limits in this study.

3.2. Optimization of sample preparation

As described in Section 1, most of antibiotic residue analyses rely on single drug class or simultaneous analysis for a few groups of common drugs due to their chemical properties. Animal tissues are known as rich in protein components [33], which can be bound with antibiotics, specifically, polar compounds. Therefore, an appropriate sample treatment is essential for obtaining reliable results in multiclass antibiotics analysis.

Organic solvents (MeCN, MeOH, ethanol, etc.) are commonly employed in the precipitation of protein in biological matrices. MeCN typically provides high extraction efficiency, often minimizes co-extraction of lipids from animal tissues. Similar to organic solvents, TCA has been used as a protein precipitation-inducing agent in tissue extractions. TCA is a strong acid and leads to a large decrease in pH, resulting in denaturation and precipitation of protein, and releasing of bound analytes into solution. However, acid treatment not only liberates bound residues from the matrix, but also helps to stabilize some analytes in their neutral forms, such as basic aminoglycosides. Kaufmann and Maden [9] previously reported optimal recovery of a number of antibiotics using 5% TCA for extraction. The precipitation of proteins partially depended on the pH, ionic strength, temperature of solution, and concentration and physicochemical properties of protein as well. Therefore, by taking the advantages both of MeCN and TCA, we chose to use the mixture of TCA in water–MeCN, 1:1 (v/v) to provide a potential protein precipitation and achieve reasonable recovery of all analytes. Fig. 3 shows effect of TCA concentrations on recovery of all analytes obtained from our experiments. At 1% TCA, PEN G, DSTR and STR showed low recoveries, which is probably due to their many amino groups in their structures. Using this condition may not be sufficient in manipulating the charged species in the extracts. The improvement in recovery of aminoglycosides was greatly improved by increasing TCA concentrations. However, the other analytes showed low recoveries and/or strong signal suppressions at high %TCA, especially ERY which had dramatically reduced in recoveries of <20%. The analyte might be degraded at high acid concentrations during the extraction, resulting in low recoveries. Thus, 2% TCA in water–MeCN, 1:1 (v/v) provided overall compromised recoveries for analytes with minimizing in signal suppression and degradation of analytes.

Not only high extraction efficiencies, but chromatographic peak results are also an important consideration in multi-residue anal-

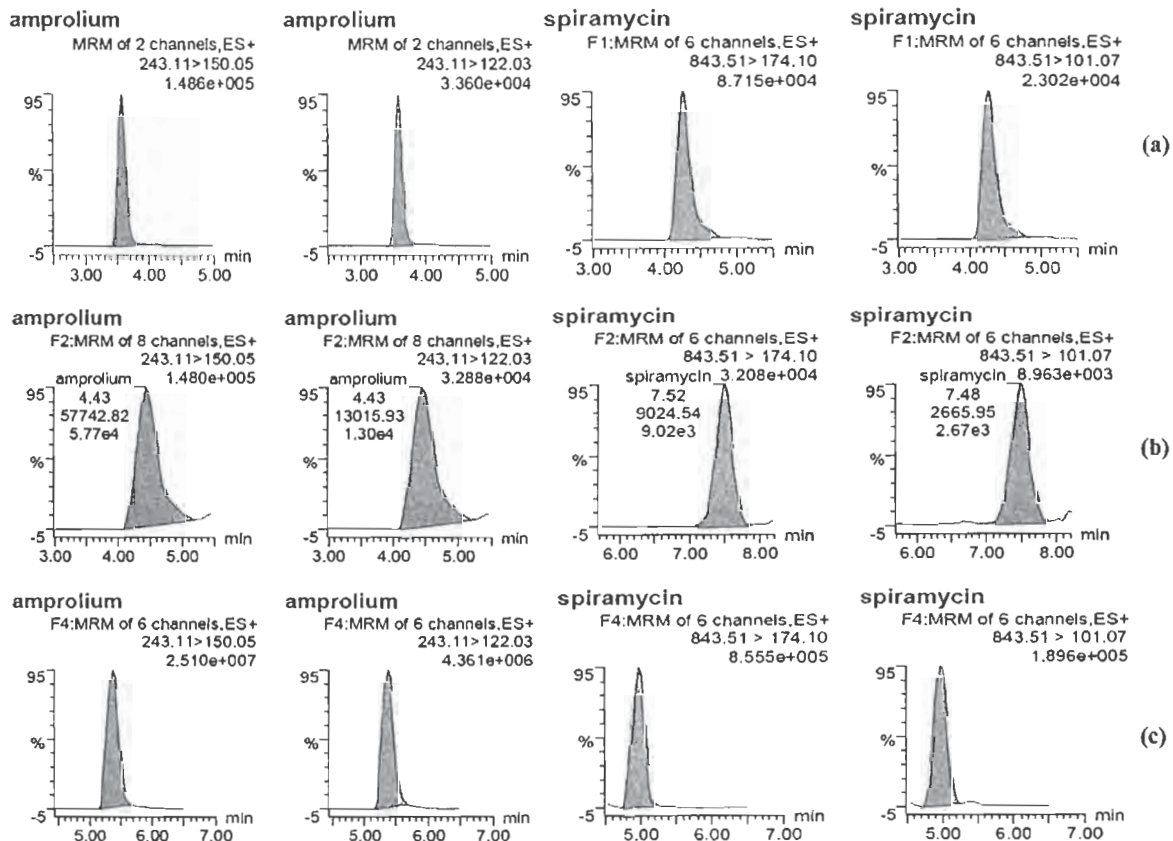


Fig. 2. Comparison of sensitivity and peak shape of amprolium (AMPR) and spiramycin (SPI) obtained from optimal conditions of each separation mode (a) standards 0.1 mg kg^{-1} using reversed-phase separation (Waters ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 (2.1 mm \times 100 mm; 1.7 μm), mobile phase A: 0.3% HOAc in 10 mM ammonium acetate, and mobile phase B: 0.3% HOAc in MeOH–MeCN (1:1, v/v), (b) standard 0.1 mg kg^{-1} using ion-pair separation (Waters ACQUITY UPLC BEH RP18 (2.1 mm \times 100 mm; 1.7 μm), mobile phase A: 0.01 M HFBA in MeCN–water (5:95, v/v), and mobile phase B: 0.01 M HFBA in MeCN–water (1:1, v/v), and (c) standard 0.01 mg kg^{-1} using HILIC separation. (conditions are described in Section 2)

ysis. Sulfonamides, PEN G, and OXO eluted at 1.42–1.76 min from HILIC column by the high amount of MeCN in the mobile phase. They were less affected from interfering peaks and provided high signal responses and good peak shapes. In contrast, SPEC, DSTR and STR, which are very polar compounds, were strongly retained on the stationary phase and eluted in the last part of chromatogram (6.33–7.65 min). Signal responses of these late eluters were very low at these conditions. From TYL to AMPR, which eluted in the middle part of chromatogram, were significantly affected from matrix co-interferences eluted close to the analyte peaks. Peak splitting was also found in the case of PIR and LIN. We assumed that resulting from the sample solvent incompatibility with mobile phase, leading in two discrete chromatographic mechanisms occurring simultaneously in the column and depending on the relative solubility of analytes in the injection solvent and mobile phase. Thus, the latter case thought to be the major factor that can generate this chromatographic artifact. Therefore, in order to reduce this solvent effect for PIR and LIN, dilution of sample extract with acid solution (10% formic acid in water–MeCN (1:9, v/v)) is a method of choice commonly used in LC–MS(/MS) analysis. Fig. 4 shows the optimization of sample dilution ratios on chromatographic signals obtained for PIR and LIN. Both analytes were split into double peaks with increasing ratio of sample extract. The sample dilution ratio of 3:7 (v/v) provided maximum responses and good peak shapes as compared to 2:8 (v/v), but was found to be unsuitable due to some compounds showed small peak areas, signal suppressions, and non-linear calibration curves at this condition. Therefore,

sample dilution ratio at 2:8 (v/v) was found to give reasonable signal response of all analytes, eliminate the need of reconstitution step, and reduce the solvent effect (which can be induced non-reproducibility of peak areas and retention times of analytes).

3.3. Method validation

In this work, we performed an in-house validation study for the analysis of 24 veterinary drug residues in chicken muscle according to the 2002/657/EC requirements [2,31]. The validation parameters included identification characteristics, selectivity, measurement of matrix effects, linearity, recovery, precision (repeatability and within-laboratory reproducibility), and analytical limits (LCLs, LODs, LOQs, CC α , and CC β).

3.3.1. Identification

According to the validation criteria, the confirmatory criterion for Group B substances in foodstuffs as target analytes requires a minimum 3 identification points (IPs). In our experiment, all 24 analytes were measured in MRM mode. We monitored one precursor ion and two product ions for each analyte (see Table 2), providing 4 IPs (1 point for the precursor ion and two times 1.5 points for each product ion), which fulfilled the EU identification points requirement. The acceptable chromatographic t_R within ± 3 SD ranges, peak shapes, and asymmetry factors were used to provide further information to help make an identification. Moreover, the variability of the ion ratios between two MRM transitions with

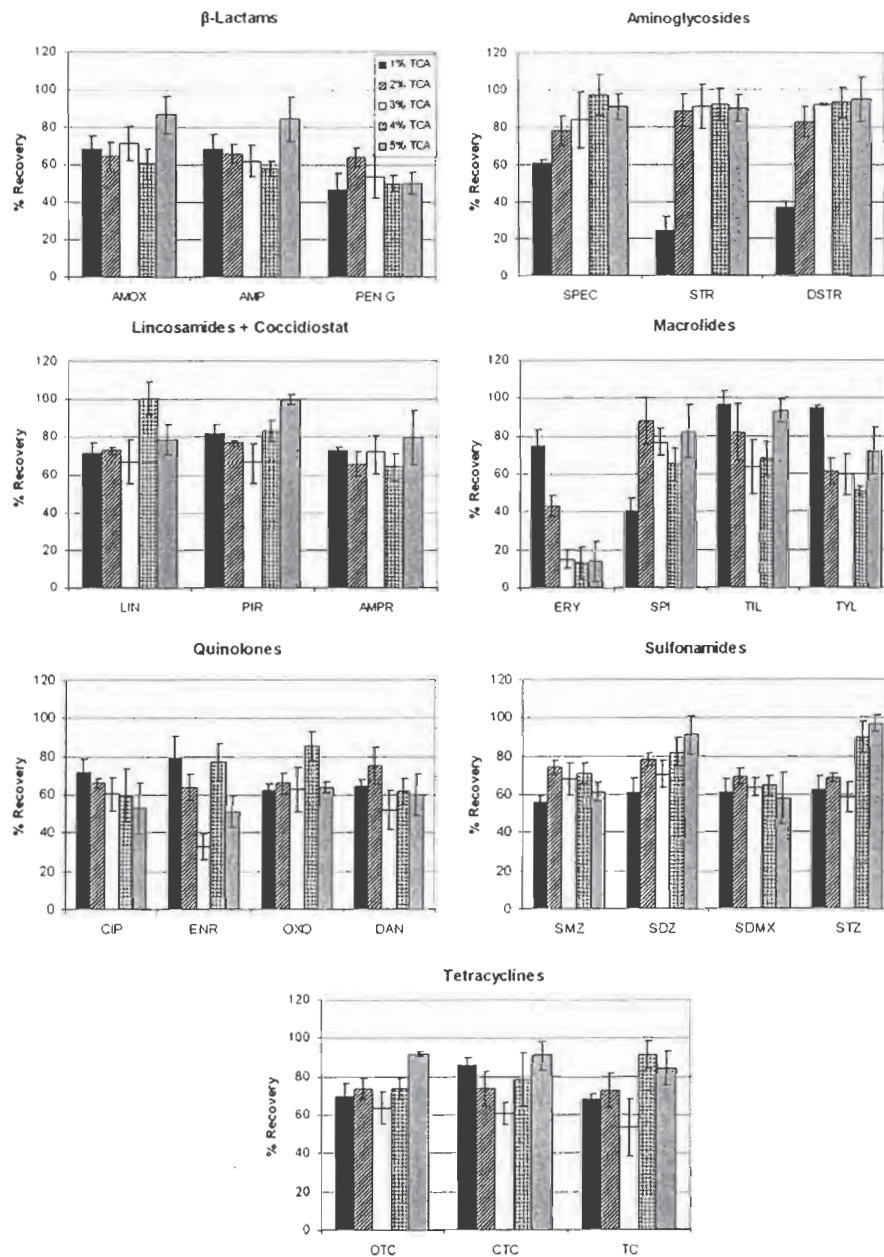


Fig. 3. Effect of the TCA concentration on recoveries of 24 veterinary drugs spiked at MRL levels ($n = 3$). Optimal HILIC-ESI-MS/MS conditions are described in Section 2.

respect to concentration and ion ratio windows (± 3 SD) were also used for identification of the occurrences of residues in samples.

3.3.2. Selectivity

The selectivity of the method is important for discrimination between the existing analytes and other compounds. In this experiment, the selectivity was demonstrated by the analysis of 20 blank chicken muscle samples from different origins in order to verify the absence of endogenous interferences. The results showed no interfering peaks co-eluted at the same retention time of interest for analytes in any sample extracts. Individual analyte standards spiked in blank sample extracts were injected and identified by their retention times and ion ratios. The acceptable ion ratios

of MRM transitions of each analyte were able clearly distinguish between co-eluters.

3.3.3. Matrix effects

As previously described, biological samples are known to be rich in protein and lipid components [33], which can greatly affect the analyte responses and performance of the method, especially in ESI-MS analysis which signal suppression and enhancement normally occurs [8,34]. Matrix effects derive from various physical and chemical processes and may be difficult or impossible to eliminate. Moreover, matrix effects also relate to the concentrations and protonation levels of co-extracted components and can be variable and unpredictable in occurrence.

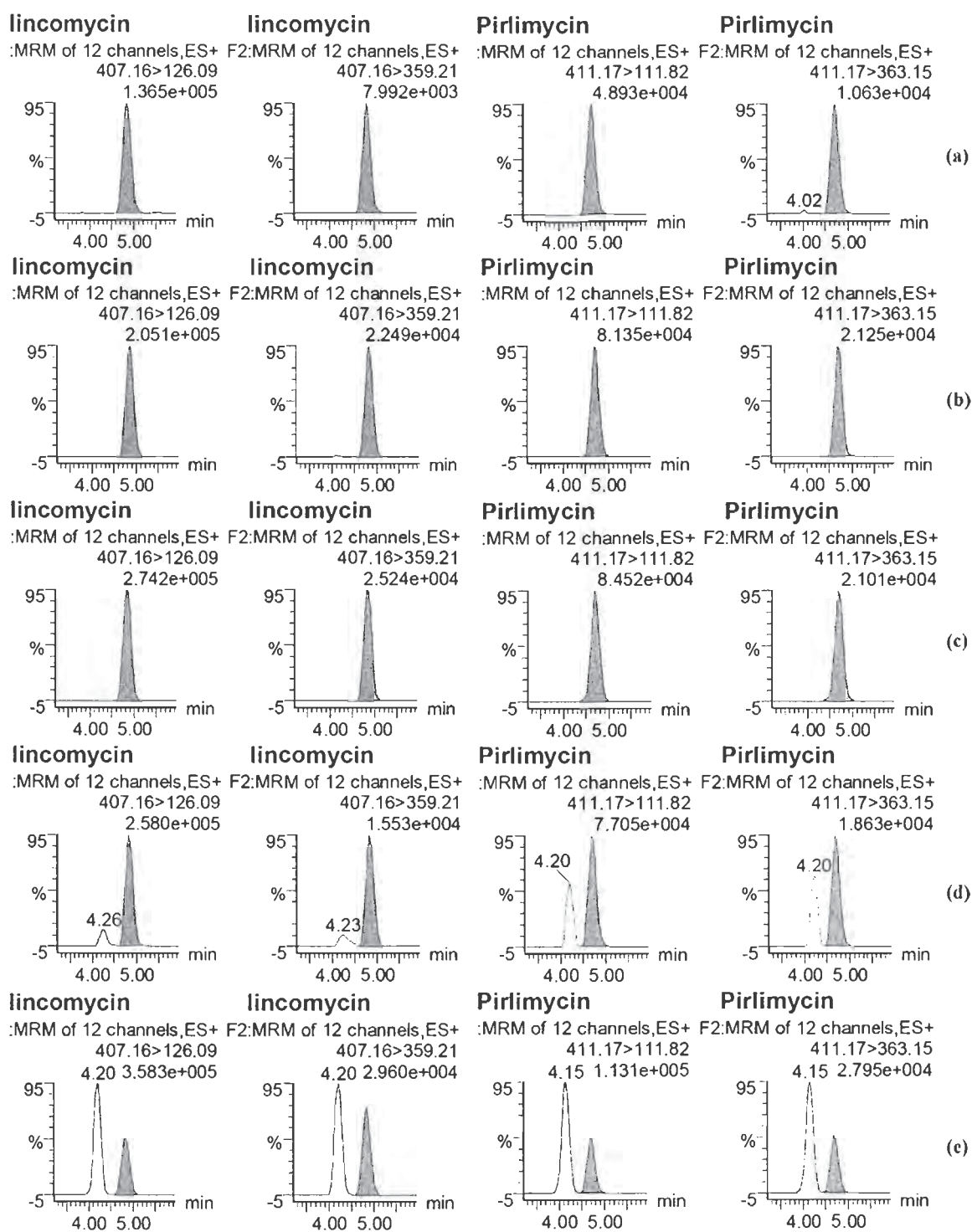


Fig. 4. Comparison of different sample dilution ratios on signal responses of lincomycin (LIN) and pirlimycin (PIR) at MRL levels. Sample dilution ratio of sample extract–dilution solvent (10% formic acid in water–MeCN (1:9, v/v)): (a) 1:9, (b) 2:8, (c) 3:7, (d) 4:6, and (e) 5:5.

To assess the matrix effects, peak area responses of each analyte obtained from the solvent-only standards were compared with those obtained from the matrix-matched standards at the same concentration levels. As shown in Fig. 5, all analytes gave signal suppressions ranging from 79 to 99%, except

DSTR and STR which showed 53% and 4% of signal enhancements, respectively. For these reasons, we chose to use matrix-matched standards to compensate for indirect matrix effects in quantitative analysis of 24 veterinary drug residues throughout the study.

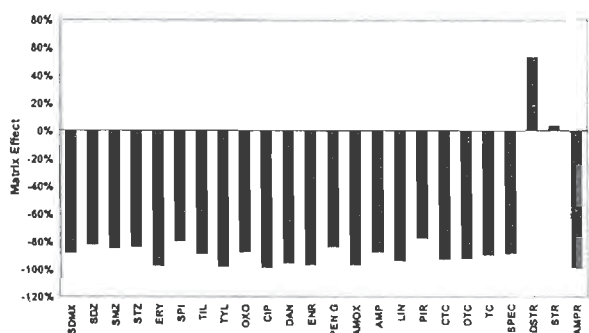


Fig. 5. LC-MS/MS matrix effects of the method as measured by the %differences of analyte responses obtained from matrix-matching vs. those from standards in solvent-only at MRL levels.

3.3.4. Linearity

The linearity of the method was demonstrated using matrix-matched calibration standards. In this experiment, matrix-matched calibration curves were prepared at 10-points in the range of 0.5–10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for sulfonamides and 1–100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for the rest of the selected analytes. All analytes gave good linear regression R^2 values greater than 0.99 over the concentration ranges as shown in Table 3.

3.3.5. Recovery

The accuracy of the method was demonstrated in term of average recoveries of each analyte at 0.5, 1, and 1.5 times the MRL spiking levels [31]. The analysis was performed in 10 replicates at each level. The results of recovery study are given in Table 4. The majority of analytes gave recoveries of 70–99% at all three spiking levels, which were in the acceptable range of EU requirement with recovery values of 70–120%. However, a small number of analytes, such as sulfonamides, ERY, and SPI, showed slightly lower recoveries (probably due to their degradations). All sulfonamide analytes provided 60–73% recoveries with $\leq 11\%$ RSDs in all cases. For ERY, its recovery was in the range 53–57% with small variations between the three spiking levels, indicating that some loss

occurred during sample preparation. This is probably due to the ERY ($\text{p}K_a \approx 8.8$) was in ionized form at acidic extraction condition, which could be bound with matrix and a showed strong matrix effect of 98%. Similarly, these can be used to explain in case of high variable recovery results of SPI (65–75%). Although the low recovery of sulfonamides, ERY and SPI were observed in this study, the repeatability $\leq 15\%$ RSDs were also achieved in all cases, indicating acceptable precision of the method.

3.3.6. Precision

The precision of this method was demonstrated in term of repeatability (intra-day precision) and within-laboratory reproducibility (inter-day precision), which were expressed as the RSD values of set of replicate analyses at 0.5-MRL and MRL spiking levels. However, precision of the method is generally dependent on analyte concentrations, thus the RSD values should be compared to the values approximated by the Horwitz equation [35]. The precision results are included in Table 4. All analytes gave satisfactory repeatability with $\leq 15\%$ RSD for both of 0.5-MRL and MRL levels on each day, except for AMOX (18% RSD at 0.5-MRL) and SDZ (16% RSD at 0.1-MRL). For the within-laboratory reproducibility, all analytes showed acceptable RSD values $\leq 15\%$ in all cases. Nevertheless, the obtained RSD values at the stated concentration levels did not exceed the acceptable values calculated from the Horwitz equation, indicating the reliability of the proposed method.

3.3.7. Analytical limits

For the validation of substances in which sum-MRLs are established, it is recommended to have information about the lowest calibrated level (LCL) detectable of the method. LCL values were achieved from the lowest calibration level of matrix-matched calibration standards. LODs and LOQs were estimated by analyzing spiked blank sample at LCLs and determining the concentration of each analyte which provided signals with S/N equal to 3 and 10, respectively. We chose the transition ion of each analyte which provided the highest signal sensitivity for the calculation. The LOD values lied in the range of 0.1–20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and the LOQ values were 0.3–60 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for all analytes. Aminoglycosides and AMPR gave slightly elevated LODs and LOQs rather than other analytes due

Table 3
Established maximum residue limit (MRL) for 24 veterinary drugs in chicken muscle and analytical limits of 24 analytes in chicken muscle extracts.

Analyte	MRL (EU) ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Typical R^2	LCL ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CC α ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CC β ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
SDMX	100 ^a	0.9938	0.5	0.1	0.3	108	115
SDZ	100 ^a	0.9987	0.5	0.1	0.3	110	117
SMZ	100 ^a	0.9970	0.5	0.1	0.3	107	117
STZ	100 ^a	0.9971	0.5	0.1	0.3	108	117
CIP	100 ^b	0.9940	1.0	1.5	5.0	112	136
DAN	200	0.9953	5.0	0.2	0.7	213	232
ENR	100 ^b	0.9945	1.0	0.5	1.7	110	124
OXO	100	0.9986	2.0	3.0	10	108	116
CTC	100	0.9973	2.0	1.0	3.0	106	120
OTC	100	0.9972	2.0	3.0	10	108	120
TC	100	0.9985	2.0	1.0	3.0	109	125
AMOX	50	0.9942	1.0	2.5	8.5	68	81
AMP	50	0.9973	1.0	1.5	5.0	58	73
PEN G	50	0.9989	1.0	1.5	5.0	58	65
LIN	100	0.9989	2.0	0.5	1.8	106	125
PIR	100	0.9988	2.0	0.2	0.7	105	120
ERY	200	0.9955	5.0	1.5	5.0	205	211
SPI	200	0.9970	5.0	4.0	13	213	226
TIL	50	0.9973	1.0	0.5	1.7	67	84
TYL	100	0.9991	2.0	1.5	5.0	105	109
AMPR	200	0.9956	5.0	8.0	25	215	233
DSTR	500	0.9988	10	20	60	509	522
SPEC	300	0.9974	5.0	10	30	307	320
STR	500	0.9979	10	20	60	510	525

^a Expressed in form of sum-MRLs of all sulfonamides.

^b Expressed in form of sum-MRLs of ENR and its metabolite (CIP).

Table 4
Recovery, repeatability, within-laboratory reproducibility, and acceptable RSD values for chicken muscle at different spiking levels.

Analyte	% Recovery (%RSD) ^a			Repeatability ^b						Within-laboratory reproducibility ^c		Acceptable RSD value ^d	
	0.5-MRL	MRL	1.5-MRL	0.5-MRL			MRL			0.5-MRL	MRL	0.5-MRL	MRL
				Day 1	Day 2	Day 3	Day 1	Day 2	Day 3				
SMZ ^e	61 (11)	66 (3)	68 (8)	11	11	8	3	8	5	10	6	19	17
SDZ ^e	65 (8)	70 (4)	72 (7)	8	16	5	4	12	4	12	8	19	17
SDMX ^e	60 (11)	66 (4)	66 (6)	11	12	5	4	10	5	10	7	19	17
STZ ^e	68 (10)	73 (6)	66 (7)	8	11	4	6	7	4	9	7	19	17
CIP ^f	85 (6)	84 (10)	84 (5)	10	15	11	10	5	11	12	10	19	17
DAN	82 (8)	86 (9)	93 (6)	8	8	6	9	12	9	9	10	15	13
ENR ^f	77 (6)	93 (6)	92 (10)	6	13	12	6	7	7	11	7	19	17
OXO	72 (6)	68 (5)	99 (4)	6	12	5	5	9	4	8	6	17	15
CTC	79 (12)	80 (4)	89 (6)	12	15	10	4	4	9	14	7	17	15
OTC	70 (14)	73 (6)	93 (4)	14	9	8	6	6	5	13	6	17	15
TC	83 (10)	83 (4)	83 (5)	10	10	9	4	9	10	10	9	17	15
AMOX	68 (14)	76 (14)	68 (14)	14	18	13	14	14	12	15	13	19	17
AMP	73 (15)	71 (7)	79 (7)	15	4	9	7	6	8	13	8	19	17
PEN G	64 (6)	70 (5)	87 (5)	6	8	7	5	4	7	7	7	19	17
LIN	75 (4)	71 (2)	98 (3)	4	2	6	2	7	9	5	8	17	15
PIR	71 (3)	73 (5)	90 (4)	3	6	6	5	2	7	6	5	17	15
ERY	53 (6)	57 (4)	55 (7)	6	12	10	4	4	6	11	6	15	13
SPI	75 (7)	67 (7)	65 (7)	7	11	8	7	9	8	10	10	15	13
TIL	85 (10)	81 (6)	84 (5)	10	15	12	6	14	9	13	11	19	17
TYL	80 (4)	75 (4)	80 (7)	4	11	4	4	3	3	8	4	17	15
AMPR	77 (7)	85 (9)	91 (4)	7	8	8	9	9	9	8	11	15	13
DSTR	82 (12)	72 (8)	84 (9)	12	10	5	8	8	9	9	9	13	12
SPEC	83 (6)	77 (6)	88 (6)	6	8	8	6	5	7	7	6	15	13
STR	83 (12)	74 (9)	84 (3)	12	11	9	9	5	9	11	9	13	12

^a Recovery results of spiked samples for 10 replicates of 3 days at each spiking level.

^b Repeatability results of spiked samples for 10 replicates at each spiking level.

^c Within-laboratory reproducibility results for 3 days ($n = 30$) at each spiking level.

^d Acceptable RSD values calculated from Horwitz equation at each concentration level.

^e All sulfonamides spiked at 0.1-, 0.2-, and 0.4-MRL.

^f ENR and CIP spiked at 0.2-, 0.5- and 1.0-MRL.

to their low signal sensitivities (late eluters) and matrix effects. However, these values were well below the MRLs regulated by the EU [2], despite the small amount of samples were diluted (dilution ratio 2:8 (v/v)) before the injections, showing the excellent sensitivity of the proposed method.

The decision limit ($CC\alpha$) is the lowest concentration at which a method able to determine with an error probability of 5% (false positive). The detection capability ($CC\beta$) is the concentration of substance at which a method is able to detect, identify, and/or quantify in a sample with an error probability of 5% (false negative). For substance with an established MRL, $CC\alpha$ and $CC\beta$ values can be calculated using calibration curve or analyzing at least 20 representative blank samples per matrix spiked at the MRL levels prior to extraction. In this study, we chose to use the latter method. The $CC\alpha$ values were observed from the concentration at MRLs plus 1.64 times the calculated standard deviation. Also, the $CC\beta$ values were calculated from the $CC\alpha$ values plus 1.64 times the calculated standard deviation.

Table 3 summarizes the analytical limit results for 24 veterinary drugs obtained in this study.

3.4. Application in real samples

In our attempt to improve the simple method and make it more applicable, we also tested the proposed method in 30 chicken muscle samples obtained from different sources in Bangkok, Thailand. Matrix-matched calibration curves were used for quantification of the analytes in these samples, whereas retention times (± 3 SD), other chromatographic factors, and specific ion ratios (± 3 SD) were also used for identification. None of the 24 analytes were detected in any of tested samples, except ENR which was found in just one sample at $6.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ and met all of the acceptable identification

ranges. However, this value did not exceed the MRL ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$). This method has been further extended for the determination of residues in other matrices such as shrimp and egg.

4. Conclusion

A sensitive method has been developed and validated for the determination of 24 multi-class veterinary drugs in chicken muscle. The method is based on simple liquid extraction and analyse by LC-MS/MS. The use of HILIC separation in combination with UPLC-MS/MS provides a more definitive method, including the improvement of chromatographic separations, peak shapes, and sensitivities, for detecting and quantifying a wide scope of analyte polarities, especially polar compounds. This method was validated and fulfilled the requirements of the European Communities decision 2002/657/EC. Good quality of results including recovery, precision (repeatability and within-laboratory reproducibility), linearity, and analytical limits (LCLs, LODs, LOQs, $CC\alpha$, and $CC\beta$) were satisfactorily achieved. The proposed method is fast, easy to perform, and can analyse a wide polarity range of veterinary drugs in a single method, providing high sample throughput with 30–40 analysed samples per day.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr. Steven J. Lehotay for his critical review of the manuscript. His constructive comments have greatly improved the manuscript. This research was supported by the Thailand Research Fund and Commission on Higher Education, Research Grant for Mid-Career University Faculty (TRF-CHE-RES-MR) (RMU518009); TRF Master Research Grants (TRF-MAG-WI51S00132); CU Graduate School Thesis Grant; the

Thai Government Stimulus Package 2 (TKK 2555), under the project for establishment of comprehensive centre for innovation food, health products and agriculture, the National Research University Project of CHE and Rachadaphiseksomphot Endowment Fund (FW 003A) and the Center for Petroleum, Petrochemicals, and Advanced Materials at Chulalongkorn University.

References

- [1] A.A.M. Stolker, U.A.T. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 15–53.
- [2] Commission of the European Communities, Decision of 12 August 2002 (2002/657/EC). *Off. J. Eur. Commun.* 221 (2002) 8–36.
- [3] A. Strasser, R. Dietrich, E. Usleber, E. Martlbauer, *Anal. Chim. Acta* 495 (2003) 11–19.
- [4] S. Sachetelli, C. Beaulac, J. Lagace, *Biochim. Biophys. Acta* 1379 (1998) 35–41.
- [5] T.F.H. Bovee, M.G. Pikkemaat, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 8035–8050.
- [6] A. Posyniak, J. Zmudzki, K. Mitrowska, *J. Chromatogr. A* 1087 (2005) 259–264.
- [7] S. Herranz, M.C. Moreno-Bondi, M.D. Marazuela, *J. Chromatogr. A* 1140 (2007) 63–70.
- [8] M. Becker, E. Zittlau, M. Petz, *Anal. Chim. Acta* 520 (2004) 19–32.
- [9] A. Kaufmann, K. Maden, *JAOAC Int.* 88 (2005) 1118–1125.
- [10] W. Zhu, J. Yang, W. Wei, Y. Liu, S. Zhang, *J. Chromatogr. A* 1207 (2008) 29–37.
- [11] K. Granelli, C. Branzell, *Anal. Chim. Acta* 586 (2007) 289–295.
- [12] J. Chico, A. Rúbies, F. Centrich, R. Companyó, M.D. Prat, M. Granados, *J. Chromatogr. A* 1213 (2008) 189–199.
- [13] Y.A. Hammel, R. Mohamed, E. Gremaud, M.H. LeBreton, P.A. Guy, *J. Chromatogr. A* 1177 (2008) 58–76.
- [14] H. Li, P.J. Kijak, S.B. Turnipseed, W. Cui, *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* 836 (2006) 22–38.
- [15] D.A. Bohm, C.S. Stachel, P. Gowik, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 8217–8223.
- [16] G. Stubbings, T. Bigwood, *Anal. Chim. Acta* 637 (2009) 68–78.
- [17] V. Carretero, C. Blasco, Y. Pico, *J. Chromatogr. A* 1209 (2008) 162–173.
- [18] R. Yamada, M. Kozono, T. Ohmori, F. Morimatsu, M. Kitayama, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70 (2006) 54–65.
- [19] A. Kaufmann, P. Butcher, K. Maden, M. Widmer, *J. Chromatogr. A* 1194 (2008) 66–79.
- [20] A.J. Alpert, *J. Chromatogr.* 499 (1990) 177–196.
- [21] T. Ikegami, K. Tomomatsu, H. Takubo, K. Horie, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A* 1184 (2008) 474–503.
- [22] E.S. Grumbach, D.M. Wagrowski-Diehl, J.R. Mazzeo, B. Alden, P.C. Iraneta, *LC–GC N. Am.* 22 (2004) 1010–1023.
- [23] A.R. Oyler, B.L. Armstrong, J.Y. Cha, M.X. Zhou, Q. Yang, R.I. Robinson, R. Dunphy, D.J. Burinsky, *J. Chromatogr. A* 734 (1996) 378–383.
- [24] W. Jiang, C. Fischer, Y. Girmay, K. Irgum, *J. Chromatogr. A* 1127 (2006) 82–91.
- [25] A.J. Alpert, M. Shukla, A.K. Shukla, L.R. Zieske, S.W. Yuen, M.A.J. Ferguson, A. Mehlert, M. Pauly, R. Orlando, *J. Chromatogr. A* 676 (1994) 191–202.
- [26] C.P. Dell'Aversano, P. Hess, M.A. Quilliam, *J. Chromatogr. A* 1081 (2005) 190–201.
- [27] G. Karlsson, S. Winge, H. Sandberg, *J. Chromatogr. A* 1092 (2005) 246–249.
- [28] Z. Huang, M.A. Richards, Y. Zha, R. Francis, R. Lozano, J. Ruan, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 50 (2009) 809–814.
- [29] R. Oertel, V. Neumeister, W. Kirch, *J. Chromatogr. A* 1058 (2004) 197–201.
- [30] R. Oertel, U. Renner, W. Kirch, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35 (2004) 633–638.
- [31] European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General, Guidelines for the Implementation of Decision 2002/657/EC, SANCO/2004/2726 rev. 4, 2008.
- [32] SeQuant, A Practical Guide to HILIC, SeQuant, Umeå, Sweden, 2008.
- [33] U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 22, 2009, Nutrient Data Laboratory Home Page: www.ars.usda.gov/ba/bhncr/nd/.
- [34] U. Koesukwiwat, S. Jayanta, N. Leepipatpiboon, *J. Chromatogr. A* 1140 (2007) 147–156.
- [35] W. Horwitz, R. Albert, *J. AOAC Int.* 89 (2006) 1095–1109.

ผลงานตีพิมพ์ฉบับที่ 2

ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสาร

Microchimica Acta (2011), 172(1), pp. 39-49

การวิเคราะห์แบบพร้อมกันของสารปฏิชีวนะหลายกลุ่มที่ตกค้างในน้ำด้วยการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพาและตรวจวัดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูงมาก-แทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี

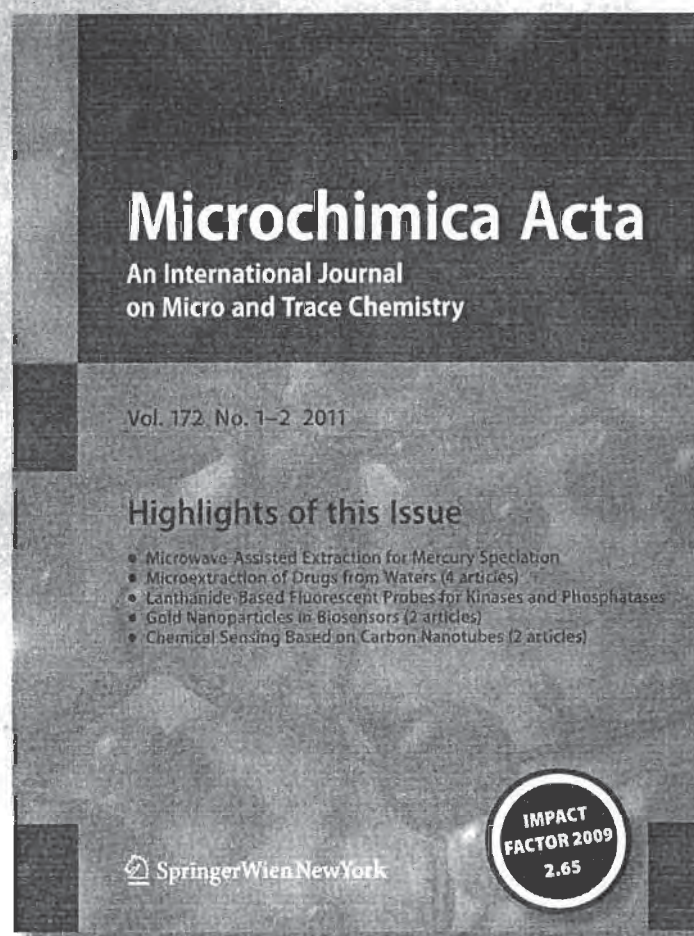
Simultaneous determination of multi-class antibiotic residues in water using carrier-mediated hollow-fiber liquid-phase microextraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

Simultaneous determination of multi-class antibiotic residues in water using carrier-mediated hollow-fiber liquid-phase microextraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

Microchimica Acta
An International Journal on
Micro and Trace Chemistry

ISSN 0026-3672
Volume 172
Combined 1-2

Microchim Acta (2010)
172:39-49
DOI 10.1007/
s00604-010-0454-6



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your work, please use the accepted author's version for posting to your own website or your institution's repository. You may further deposit the accepted author's version on a funder's repository at a funder's request, provided it is not made publicly available until 12 months after publication.

Simultaneous determination of multi-class antibiotic residues in water using carrier-mediated hollow-fiber liquid-phase microextraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

Soparat Yudthavorasit · Chayada Chiaoachan ·
Natchanun Leepipatpiboon

Received: 6 May 2010 / Accepted: 3 September 2010 / Published online: 24 September 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract A method has been developed for carrier-mediated hollow-fiber liquid-phase microextraction (HF-LPME) and enrichment of multiple classes of antibiotics in water samples. Eleven compounds (erythromycin, spiramycin, tilmicosin, sulfathiazole, sulfamethazine, sulfamerazine, oxytetracycline, tetracycline, ciprofloxacin, danofloxacin and enrofloxacin) from four important classes of antibiotics (of the macrolide, sulfonamide, tetracycline and quinolone type) have been simultaneously preconcentrated with one set of HF-LPME conditions, followed by determination by ultra-HPLC combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). Antibiotics can be determined at ng L^{-1} levels using this highly sensitive and selective method. Parameters including immersion time, liquid membrane composition, sample pH, acceptor composition and extraction time were optimized to finally give detection limits in the 10–250 ng L^{-1} range. Good linearity was achieved, with up to 156 times enrichment over the four classes of antibiotics. This multi-residue method enabled the simultaneous enrichment of all 11 multi-class antibiotics from spiked river water samples, with relative recovery between 79 and 118%.

Keywords Antibiotic · Residues · Carrier-mediated · Hollow fiber · Liquid-phase microextraction · Sample preparation

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00604-010-0454-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

S. Yudthavorasit · C. Chiaoachan · N. Leepipatpiboon (✉)
Chromatography and Separation Research Unit,
Department of Chemistry, Chulalongkorn University,
Bangkok 10330, Thailand
e-mail: natchanun.l@chula.ac.th

Introduction

Environmental problems are attracting worldwide interest regarding their long-term and adverse effects. Increasing population and industrialization strongly influence the fate and occurrence of global pollution, especially in aquatic environments. Large amount of wastes and runoffs are overloaded the capacity of the ecological systems. Concerns have been raised about the environmental affects and public health implications of contaminants such as antibiotic residues in the aquatic environment especially in their effects on the development of bacterial resistance [1–4]. Antibiotics are commonly applied for the treatment and the prevention of bacterial infections. These drugs are also illicitly applied as growth promoters in cattle farms. The four predominant classes of antibiotics that often contaminate the water resources are macrolide, sulfonamide, tetracycline, and quinolone [5]. Macrolides are widely used in veterinary practice to treat respiratory diseases; sulfonamides were used for prophylactic and therapeutic purposes in farm animal and aquaculture. Tetracyclines are famous human and cattle medicine against gram-positive and gram-negative bacterias, while quinolones were applied in the treatment for human and veterinary diseases of urinary tract infections. Several antibiotics are synergistically applied for broad-spectrum efficacy and their wide applications constitute the important source of pollutants commonly detected in water resources by contamination in many pathways [6]. Recently, the investigations of these antibiotics occurrence level in water have been summarized and reviewed [5, 7]. The wide variety of antibiotics from multi-class possessed various physico-chemical properties in combination with the low level of antibiotic presence in water (ng L^{-1} to $\mu\text{g L}^{-1}$) complicates

the analysis of residue mixtures in water samples. Therefore, highly sensitive and selective analytical determination techniques are required.

Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) is widely used method for antibiotic analysis due to its ability to separate and detect components in mixtures belonging to the same, or different, classes. Recently, ultra-high performance liquid chromatography-MS was also utilized. Higher separation efficiency and improved sensitivity over conventional LC-MS/MS were reported [8, 9]. LLE and SPE are commonly sample preparation techniques conducted in water analysis [4, 8–12]. These classical techniques are well accepted but incurred large expenses on organic solvents and expensive cartridges. Hollow-fiber liquid-phase microextraction (HF-LPME), developed by Pedersen-Bjergaard et al. [13] is superior extraction technique that offers very high selectivity and enrichment. The hollow fiber configuration shares the same principle to a larger membrane module. Due to its smaller size, carry-over effect commonly observed in membrane module can be eliminated because the fiber is inexpensive enough for a single use. The miniature size has many added benefits such as simple configuration that requires no high pressure pump and expensive membrane module, uses very small amount of organic solvent, and offering excellent clean-up efficiency. A piece of porous hollow fiber impregnated with an organic solvent in its pores is utilized as a supported liquid membrane. Analytes are extracted from the sample (donor) solution through the organic solvent, and further back-extracted into the aqueous extracting solution (acceptor) inside the lumen. In the so-called three-phase HF-LPME system, acidic or basic analytes with ionizable functionalities can be extracted [14–16]. HF-LPME has been reported in the successful pre-concentration of compounds in water samples from diverse sources including drinking water [17], tap water [18], river water [19] and wastewater [20].

Carrier-mediated HF-LPME is a method utilizing the principle of ion-pairing to extend the limit of HF-LPME extraction. This mode was developed by Ho et al. [21] to enhance the extraction of hydrophilic compounds by forming neutral complexes of the analytes with carrier (ion-pairing agent) dissolved in the liquid membrane. Various carriers have been investigated as ion-pairing agents, such as Aliquat 336 (tricaprylmethylammonium chloride) [22–25], D2EHPA (bis(2-ethylhexyl) monohydrogenphosphoric acid) [22, 24, 26, 27], 2-ethylhexyl phosphonic acid [24], and sodium octanoate [21, 28]. A carrier-mediated LPME was attempted on tetracyclines in biological samples. The procedure could enrich three compounds of similar physicochemical structures for HPLC-UV analysis at sub- $\mu\text{g L}^{-1}$ detection level [25]. For the extraction of members of diverse antibiotic classes from

water, the four different sets of HF-LPME were all utilized to pre-concentrate four antibiotics from four different classes and the result showed only three compounds were succeed in enrichment with three separate sets [29]. In addition, the enrichment efficiency of HF-LPME depends on several critical factors such as acid dissociation constant (pK_a), type of carrier, and extracting conditions. Different compounds exhibited different unique enrichment trends depend on the governed physicochemical properties. To the best of our knowledge, there is no existing report on simultaneous determination of multi-class antibiotics using carrier-mediated HF-LPME in a single run. In this work, a pre-concentration method was developed for simultaneous enrichment of eleven antibiotics from four different classes in the same run using carrier-mediated HF-LPME. A piece of hollow fiber was impregnated with an organic solvent added with carrier and the related extraction parameters were optimized to maximize the enrichment of targeted antibiotics in water media. The samples were subsequently subjected for UHPLC-MS/MS analyses.

Experimental

Reagents and materials

Commercial antibiotic standard erythromycin (ERY), spiramycin (SPI), tilmicosin (TIL), ciprofloxacin (CFC), and enrofloxacin (EFC) were obtained from Dr. Ehrenstorfer GmbH. (Augsburg, Germany, www.ehrenstorfer.com); danofloxacin (DFC) was from Riedel-de Haen (Seelze, Germany, www.riedeldehaen.com); and sulfathiazole (STZ), sulfamethazine (SMZ), sulfamerazine (SMR), oxy-tetracycline hydrochloride (OTC), and tetracycline hydrochloride (TC) were from Sigma (St. Louis, MO, USA, www.sigmaaldrich.com). The structure and pK_a of these multi-class antibiotics are shown in Table 1.

Tricaprylmethylammonium chloride (Aliquat 336), bis(2-ethylhexyl) monohydrogenphosphoric acid (D2EHPA), dihexyl ether (DHE), ammonium acetate and ammonium formate were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland, www.sigmaaldrich.com). 2-Hydroxy-5-nonylaceto-phenone oxime (LIX 84) was obtained from Henkel (Tucson, AZ, USA, www.henkel.com). Disodium tetraborate decahydrate was purchased from BDH (Poole, England, www.bdh.com).

HPLC (gradient-grade) acetonitrile, acetic acid, hydrochloric acid, formic acid and sodium hydroxide were supplied by Merck (Darmstadt, Germany, www.merck.com); HPLC gradient-grade methanol was purchased from J.T. Baker (Deventer, The Netherlands, www.jtbaker.nl). High purity water was prepared using a Milli-Q water purification system (Millipore, Billerica, MA, USA, www.millipore.com).

Table 1 Physico-chemical properties of the target antibiotics

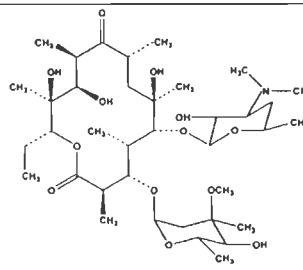
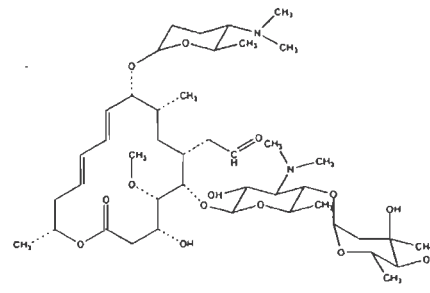
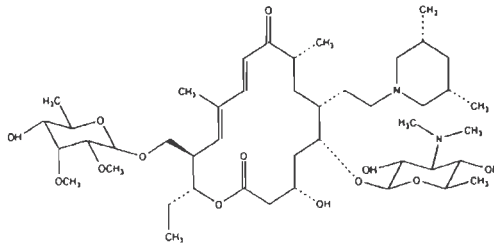
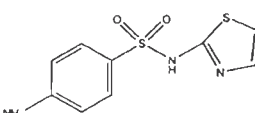
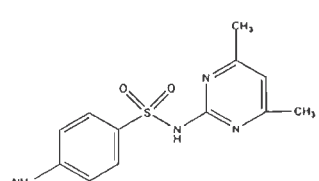
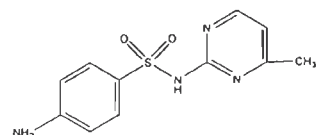
Class	Analyte	Chemical structure	Molecular mass	pKa [31,33]
Macrolide	Erythromycin (ERY)		733.93	8.9
	Spiramycin (SPI)		843.05	7.9
	Tilmicosin (TIL)		855.11	7.4 8.5
Sulfonamide	Sulfathiazole (STZ)		255.32	2.0 7.1
	Sulfamethazine (SMZ)		278.33	2.1 7.5
	Sulfamerazine (SMR)		264.30	2.1 7.0

Table 1 (continued)

Class	Analyte	Chemical structure	Molecular mass	pKa [31,33]
Tetracycline	Oxytetracycline (OTC)		460.43	3.2 7.5 8.9
	Tetracycline (TC)		444.43	3.3 7.9 9.6
Quinolone	Ciprofloxacin (CFC)		331.34	3.0 6.1 8.7 10.6
	Danofloxacin (DFC)		357.38	3.9 6.1 8.6 9.9
	Enrofloxacin (EFC)		359.39	3.9 6.2 7.6 9.9

Standards

Stock standard solutions of the eleven antibiotic analytes ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) were prepared individually by dissolving each compound in acetonitrile (ERY, SPI, TIL, STZ, SMZ, SMR, DFC and EFC), methanol (OTC and TC), or 0.1 M formic acid (CFC). The standards were stored at 4°C in a refrigerator until use. Mixed working standard solutions ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) were prepared daily by diluting the original stock solutions with high purity water.

LC-MS²

Acquity UPLC system (Waters, Milford, MA, USA, www.waters.com) connected to a Micromass Quattro PremierTM XE benchtop quadrupole MS/MS system was employed for the analysis in positive electrospray ionization (ESI+) mode. Chromatographic separation was achieved with a binary mobile phase in gradient elution mode on a C₁₈ Acquity UPLC BEH (100 mm × 2.1 mm I.D., 1.7 μm) column from Waters. The flow rate was set at 0.2 mL min^{-1}

at column temperature of 40°C. Mobile phase A was an aqueous solution of 10 mM ammonium acetate and 0.3% (v/v) acetic acid, while mobile phase B was methanol: acetonitrile (50:50 v/v) with 0.3% (v/v) acetic acid. The injection volume was 10 µL. The separation of antibiotics was achieved within 5.5 min using the following gradient program: initial 95:5 (v/v) A:B maintained for 1.5 min; then changed to 35:65 (A:B) at 3.0 min, and maintained at this ratio for 2.0 min; then, 100% B was held at 5.5 min for 4.5 min, and then returned to 5% B at 10.5 min.

Optimum MS parameters were as followed: capillary voltage 1 kV, extractor voltage 3 V, source temperature 120°C, desolvation temperature 350°C, cone gas (nitrogen) flow 50 L h⁻¹, desolvation gas (nitrogen) flow 1000 L h⁻¹, and collision gas (argon) 0.22 mL min⁻¹ at a cell pressure of 0.35 Pa. Multiple reactions monitoring mode was employed by selecting two most sensitive transitions for both quantification and identification purposes. Table 2 shows the selected MS/MS transitions together with the optimized cone voltages and collision energy values for individual compounds. Instrumentation control and data acquisition and evaluation were performed with the MassLynx 4.1 software package provided by Micromass™.

HF-LPME procedure

A microporous polypropylene HF membrane Accurel® PP Q3/2 (Membrana, Wuppertal, Germany, www.membrana.com) with 600 µm i.d., 200 µm wall thickness and 0.2 µm pore size (75% porosity) was used for the extraction. A 12-cm length piece of HF was first sonicated with acetone to remove any contaminants and air-dried. Each fiber was utilized only once in order to eliminate carry-over effect. The HF was impregnated with 20%

(w/v) Aliquat 336 by direct immersion in DHE for 60 min to fill the pores with solvent. The fiber lumen was then flushed a few times with air to remove excess organic solvent. A 100-µL Hamilton gastight syringe (Bonaduz, Switzerland, www.hamiltoncompany.com) was employed to introduce the acceptor solution into the lumen. The two ends of the HF were held on the septum of a 24-mL glass vial cap with two medical syringe needles in a U-shape. This U-shape HF-LPME configuration was adopted from the description of Pedersen-Bjergaard and Rasmussen [13].

The extraction employed 20 mL of sample (donor) solution which was adjusted to the desired pH using sodium tetraborate in a 24-mL glass vial. A U-shaped piece of hollow fiber containing the acceptor solution (20 µL) inside the lumen was then dipped into the sample solution. The sample vial was placed on an IKA multi-station magnetic stirrer (Staufen, Germany, www.ika.net) and the extraction was performed at room temperature. After 60 min, the acceptor solution was flushed into a 200-µL HPLC insert vial. The vial was kept in a refrigerator at 4°C until analyzed by UHPLC-MS/MS. The enrichment factor (EF) used to evaluate the effectiveness of the method was calculated using the following equation [23]:

$$\text{Enrichment factor (EF)} = \frac{c_a}{c_d} = \frac{n_a V_d}{n_d V_a} \quad (1)$$

where c_d and c_a are the concentrations of the analyte in the donor (d) and acceptor (a) solutions, respectively, whilst n_d and n_a represent the molar quantity of analyte, and V_d and V_a indicate the volume of the donor and acceptor solutions, respectively.

Table 2 Optimized multiple reaction monitoring (MRM) parameters used in the MS/MS analysis

Analyte	Retention time (min)	Dwell time (s)	Cone voltage (V)	Quantification transition	Collision energy (ev)	Confirmation transition	Collision energy (ev)
Erythromycin	4.76	0.03	40	734.45>158.28	30	734.45>576.26	30
Spiramycin	4.22	0.02	30	843.51>174.10	45	843.51>101.07	58
Tilmicosin	4.49	0.03	55	869.53>696.51	55	869.53>174.39	50
Sulfathiazole	3.99	0.03	30	256.09>155.93	15	256.09>107.87	25
Sulfamethazine	4.40	0.03	35	279.09>186.02	20	279.09>124.07	30
Sulfamerazine	4.18	0.02	30	265.08>171.99	20	265.08>155.96	25
Oxytetracycline	4.18	0.1	27	461.10>426.14	25	461.10>443.07	15
Tetracycline	4.12	0.1	30	445.08>410.11	20	445.08>153.88	27
Ciprofloxacin	4.12	0.04	35	332.05>314.09	25	332.05>245.04	30
Danofloxacin	4.07	0.05	35	358.15>340.00	45	358.15>82.22	35
Enrofloxacin	4.17	0.05	30	360.14>245.09	35	360.14>316.00	35

Results and discussion

Effect of immersion time on enrichment ability

Prior to the extraction process, the HF wall pores were impregnated with the selected organic solvent by direct immersion. The effect of immersion time (5, 15, 30, 60 and 120 min) on enrichment was investigated (Fig. S1, see Supplementary material). The level of enrichment obtained (as the EF) increased with longer immersion times up to 60 min; after that there was no significant enhancement. For short immersion periods, the 75% porosity microporous HF membrane was incompletely impregnated, leading to poor repeatability. Therefore, 60 min was selected as the optimum immersion time. Several pieces of HF can be simultaneously impregnated for 60 min with organic solvent of choice and subsequently used for all further optimization experiments.

Effect of carrier and organic solvent selection

In carrier-mediated HF-LPME, the immobilized organic solvent is a critical parameter affecting the extraction efficiency. Selected solvents used to promote the diffusion of analytes from the donor to the acceptor solution must be immiscible with water and compatible with the HF type. In order to efficiently extract a wide range of multi-class antibiotics with diverse physico-chemical properties, preliminary experiments were performed to study the effects of polar and non-polar solvents in the absence of a carrier. These solvents included 1-octanol, 1-decanol, DHE, undecane, dodecane and toluene. The results obtained from non-carrier HF-LPME, showed EFs of eleven analytes in the very low range of 1–12 times (Fig. S2, see Supplementary material). DHE provided the highest level of enrichment due to its polarity and was selected as the most suitable solvent into which the carrier was to be added for HF-LPME. The driving force of non-carrier approach is based on passive diffusion of analytes in the donor and acceptor solutions [30].

There are several mechanisms controlling the extraction process in carrier-mediated HF-LPME, including diffusion, ion-pairing effects, and the pH gradient employed. The pK_a values in Table 1 were used to predict the extraction pH required for the eleven antibiotics. Macrolide antibiotics contain a basic dimethylamine [-N(CH₃)₂] structure with pK_a values around 8 [31]. Their basic characteristics offered the potential for neutral and cationic formation in basic donor solution. For sulfonamides, basic amine [-NH₂] and acidic amide [-NH-] groups are presented. The pK_a s in the ranges of 2.0–2.1 and 7.0–7.5 correspond to the protonation of the aniline and deprotonation of the amide, respectively; meaning that these compounds tend to exist as

anionic forms in alkaline solution [32, 33]. There are three pK_a values for tetracycline analytes, which are approximately 3.3, 7.7 and 9.3 for the tricarbonyl, dimethylamine and beta-diketone groups, respectively [25, 31–33]. Hence, anionic and neutral species may exist in alkaline solution. The quinolone class has amphoteric properties arising from carboxylic and amino groups attached to the heterocyclic ring. From their pK_a values (3.0–3.9, 6.1–6.2, 7.6–8.7 and 9.9–10.6), multiple species (cationic, anionic, zwitterionic and neutral) could be expected in basic donor solutions [31, 32].

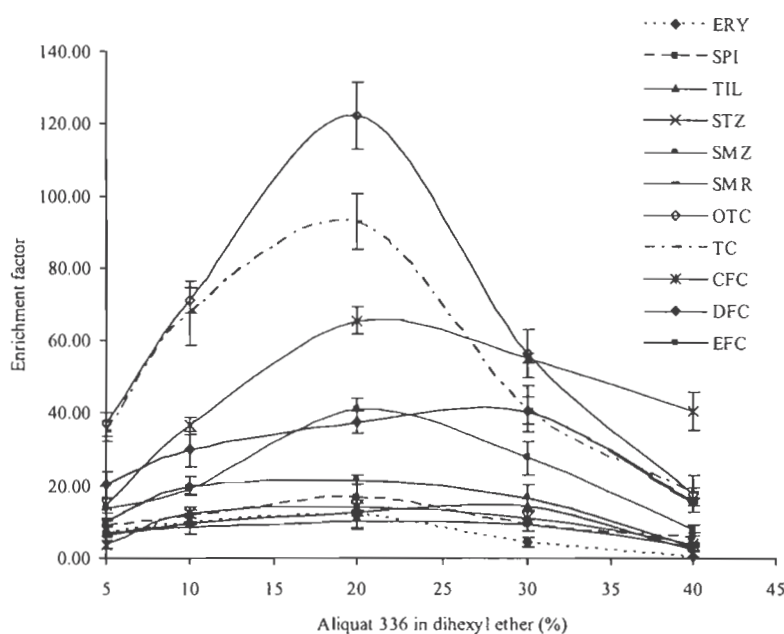
Three types of carrier—Aliquat 336 (cationic carrier), D2EHPA (anionic carrier) and LIX 84 (neutral carrier)—were evaluated in DHE. The experimental results (Table 3) revealed that Aliquat 336 enriched all eleven antibiotic analytes at higher levels than the other two carriers. This enrichment trend can be related to strong ion-pair formation between the cation carrier and analyte species under the selected pH conditions.

The effects of different organic solvent type dissolving Aliquat 336 have been previously studied by Yamini et al. [22]. The enrichment was investigated from the use of Aliquat336 in two organic solvents (DHE and 2-heptanone) and the obviously greater EF was obtained from the use of Aliquat 336 in DHE. In this work, the effect of Aliquat 336 concentration (5–40% w/v) in DHE was evaluated. It was discovered that when the carrier concentration was too low (5 and 10% w/v), poor enrichment was observed due to insufficient ion-pair formation. At relatively high proportion of carrier (30 and 40% w/v), the supported-liquid membrane became too viscous and deterred the flux of the ion-pair complexes through the membrane. The optimum concentration was selected at 20% (w/v) Aliquat 336 in DHE according to data in Fig. 1.

Table 3 Effect of three carrier types at 10% (w/v) on the enrichment factor in carrier-mediated HF-LPME using DHE as the organic phase carrier solvent and a 60 min immersion time

Analyte	Enrichment factor ($n=3$)		
	Aliquat 336	D2EHPA	LIX 84
Erythromycin	3.1±1.6	1.5±0.7	1.9±0.9
Spiramycin	6.1±1.9	0.9±0.3	2.7±1.3
Tilmicosin	14.0±4.5	1.8±0.5	3.5±1.3
Sulfathiazole	5.9±2.0	0.9±0.2	2.9±1.6
Sulfamethazine	10.7±2.5	0.7±0.3	1.6±0.4
Sulfamerazine	9.5±1.8	1.1±0.3	2.3±1.7
Oxytetracycline	74.4±9.5	3.7±1.5	5.5±3.1
Tetracycline	49.5±7.6	2.1±0.9	11.7±3.9
Ciprofloxacin	25.9±3.8	1.9±1.0	4.8±1.4
Danofloxacin	15.6±2.5	2.6±0.9	5.6±2.6
Enrofloxacin	13.0±2.9	2.6±1.8	8.1±4.1

Fig. 1 Effect of carrier concentration on HF-LPME enrichment. Eleven antibiotics from four major classes were enriched with Aliquat 336 in DHE as the supported liquid membrane. Sample solution: $100 \mu\text{g L}^{-1}$ antibiotics spiked in 20 mL aqueous solution (pH 8.0), acceptor phase: 20 μL of acetic acid (pH 4.0), extraction time 60 min. Data are shown as the mean \pm 1 S.D. and are derived from three replicates



Effect of donor and acceptor phase

The transportation of analytes from the sample to the acceptor solution also requires a pH adjustment between the two aqueous phases to improve the enrichment efficiency and target analyte recoveries. The sample pH should be adjusted to a value to ensure that the analyte exists in the correct form that will allow for the most efficient extraction by the organic phase. To maximize ion-pair formation, pH of the donor solution was adjusted by adding sodium tetraborate to pH 7.0–12.0. Optimum enrichment was obtained at pH 8.0. These experimental results are in agreement with the respective pK_a values, which indicate that the most favorable antibiotic extraction for carrier-mediated HF-LPME should occur at this value to generate suitable forms of the analytes in the donor solution.

The acceptor solution pH must be suitable for trapping the analytes and preventing analyte back-extraction to sample by ion-pair formation, as well as to ensure that sufficient protons are available in the acceptor solution to act as exchanged counter-ions. Additionally, the acceptor should not be at an extremely low pH, so as to be compatible with LC-MS/MS. Two types of potential acceptor solution—acetic acid and formic acid—were evaluated within the pH range of 3.0–6.0. These weak acid acceptor solutions chosen can be directly injected into the UHPLC-MS/MS system without additional dilution steps. Enrichment data of eleven antibiotics using both acceptors were compared in Table S1 (see supplementary material). It was observed from the EF using acetic acid as acceptor at

pH 4.0 (10.9–153) were better than the values obtained at pH 5.0 (8.9–105) due to greater availability of protons. The high pH may not provide sufficient gradient concentration of counter-ions to create a high diffusion rate between donor and acceptor solutions. Thus, acetic acid at pH 4.0 was chosen as acceptor solution in the carrier-mediated mode to enrich multi-class antibiotics.

Effect of extraction time

Generally, carrier-mediated HF-LPME is an equilibrium-based extraction method, while mass transfer is a time-dependent process. Therefore, the extraction time is a parameter that needs to be optimized to measure the equilibrium time of the extraction process. At the equilibrium point, analytes in the acceptor phase are stable and exist at their highest concentration, leading to the highest EF. The effect of the extraction time (between 5–90 min) on the simultaneous multi-class antibiotic enrichment was studied. The results obtained revealed similar trends to those reported in other works [18–20, 23, 25] showing that EFs increased with extraction time, and that the pre-concentration of analytes was highest at the equilibrium point. Longer times gave no significant increase in EF. The highest EF in this process was obtained at 60 min. Although the entire procedure appears to have a relatively long time, this can be compensated by the high-throughput performance of method because several pieces of hollow fiber can be simultaneously impregnated with organic solvent.

Due to the small amount of sample used (20 mL) and a miniature size of HF-LPME configuration, several extractions can be performed simultaneously. In this work, 1–17 samples were extracted simultaneously using IKA multi-stirrer device. Higher throughput can be obtained in a similar way.

Evaluation of the method performance

Linearity, detection limits, enrichment factor and precision

To evaluate the performance of carrier-mediated HF-LPME, the optimized conditions (immersion time 60 min, 20% (w/v) Aliquat 336 in DHE, donor solution pH 8.0 20 ml containing $100 \mu\text{g L}^{-1}$ of each analyte, acceptor solution (acetic acid) pH 4.0 20 μL , extraction time 60 min, stirring rate 200 rpm) were employed. The figures of merit, linearity, detection limits and precision were validated under these conditions, and the results summarized in Table 4.

The linearity of the carrier-mediated HF-LPME was evaluated over a concentration range of $0.5\text{--}100 \mu\text{g L}^{-1}$, with three replicate extractions at each level. The UHPLC-MS/MS peak areas were plotted against the analyte concentrations ($\mu\text{g L}^{-1}$) to create a calibration curve for all eleven analytes. All antibiotics exhibited linearity, with correlation coefficients (r) between 0.9823 (STZ) and

0.9974 (CFC); this implies that the method could be applied for the simultaneous quantification of multi-class antibiotic compounds. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ)—which are the lowest concentrations of analytes that provide chromatographic signals 3 and 10 times higher than background noise under MS/MS conditions, respectively—were calculated for each analyte from the respective calibration curves. The evaluated LODs and LOQs for the eleven antibiotic analytes were in the range of $10\text{--}250 \text{ ng L}^{-1}$ and $40\text{--}850 \text{ ng L}^{-1}$, respectively (Table 4). Due to diverse pKa value of eleven analytes, the EFs observed were in the wide range of 12.5 (ERY) up to 156 (OTC). Intra-day and inter-day precision was investigated by extracting 10 replicate samples spiked at $30 \mu\text{g L}^{-1}$ within one and two days, respectively; and the RSD values for these measurements ranged between 3.27% and 11.0% (intra-day precision), and between 6.50% and 11.4% (inter-day precision). There is no official guideline for the regulation of antibiotics in natural water resources. The criteria set for this work was evaluated from several review articles [5, 7] which published survey data of antibiotics in real world waters (mostly reported at ng L^{-1} to $\mu\text{g L}^{-1}$ level). The European Union's criteria for antibiotic residue in foodstuffs of animal origin [34] have been also considered to extend the usefulness of the method to different types of samples (Table S2, see Supplementary material). The validation data (LODs and LOQs) implied

Table 4 Analytical performance of the carrier-mediated HF-LPME method for the simultaneous enrichment of 11 multi-class antibiotic analytes in water samples. The HF-LPME was performed using acetic

acid pH 4.0 as the acceptor solution, 20% (w/v) Aliquat 336 in DHE as the carrier and organic phase, with analytes in pH 8.0 sample solution, 200 rpm stirring rate, and 60 min enrichment time

Analyte	Linearity		LOD ^a ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ^a ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Enrichment factor	Precision (%RSD)		Recovery ^d (%)
	Linear range ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Correlation coefficient (r)				Intra-day ^b	Inter-day ^c	
Erythromycin	0.5–50	0.9966	0.02	0.07	12.5±2.2	11.0	10.8	110
Spiramycin	0.5–50	0.9886	0.08	0.27	19.2±2.6	7.98	11.4	79.2
Tilmicosin	0.5–50	0.9936	0.03	0.09	14.4±1.9	3.27	6.50	94.5
Sulfathiazole	0.5–50	0.9823	0.07	0.22	12.7±3.0	10.1	7.99	118
Sulfamethazine	0.5–50	0.9935	0.01	0.04	20.0±3.4	5.65	8.92	94.9
Sulfamerazine	0.5–50	0.9916	0.06	0.21	12.7±2.3	6.49	9.64	105
Oxytetracycline	0.5–50	0.9929	0.25	0.85	156±11	8.91	7.81	98.7
Tetracycline	0.5–50	0.9950	0.13	0.43	113±12	9.56	9.64	99.3
Ciprofloxacin	0.5–50	0.9974	0.06	0.20	68.9±8.7	7.66	7.19	84.2
Danofloxacin	0.5–50	0.9878	0.06	0.18	31.3±3.6	5.80	6.67	90.2
Enrofloxacin	0.5–50	0.9931	0.04	0.14	50.4±5.9	8.11	10.2	83.5

Data are shown as the mean±1 S.D., and are derived from 10 replicates

^a LODs and LOQs at spiked level of $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$

^b Intra-day precision was calculated by extracting analyte samples spiked at $30 \mu\text{g L}^{-1}$ within the same day

^c Inter-day precision was calculated by extracting analyte samples spiked at $30 \mu\text{g L}^{-1}$ over a period of two working days

^d Recovery performed at $2 \mu\text{g L}^{-1}$ spiking level

that the proposed method is sufficiently sensitive for the detection of these eleven antibiotics in waters and in foodstuffs at ng L^{-1} level.

Application of carrier-mediated HF-LPME in spiked real water samples

The proposed carrier-mediated HF-LPME method for the simultaneous multi-class antibiotic determination was applied to river water samples collected from random sites along the river banks of Bangkok, Thailand. The water samples were first filtered to remove sediments, and then stored in 100 mL amber glass vials before analysis. Since

none of these eleven antibiotics were detected in the collected real waters, samples were spiked with the mixed standard solutions and analyzed at two concentration levels: 2 and $8 \mu\text{g L}^{-1}$. The pH of samples (donor solution) was adjusted to 8.0. As can be seen in Table 4, under optimized experimental conditions the recoveries for multi-class antibiotic compounds in real water samples ranged from 79.2% (SPI) up to 119% (STZ) by calculating the observed concentration (the calculation of obtained peak area in the regression equation from standard calibration of each analyte) compared with the spiked concentration. Figure 2 shows the UHPLC-MS/MS chromatogram obtained under these optimized experimental conditions at a spiked analyte

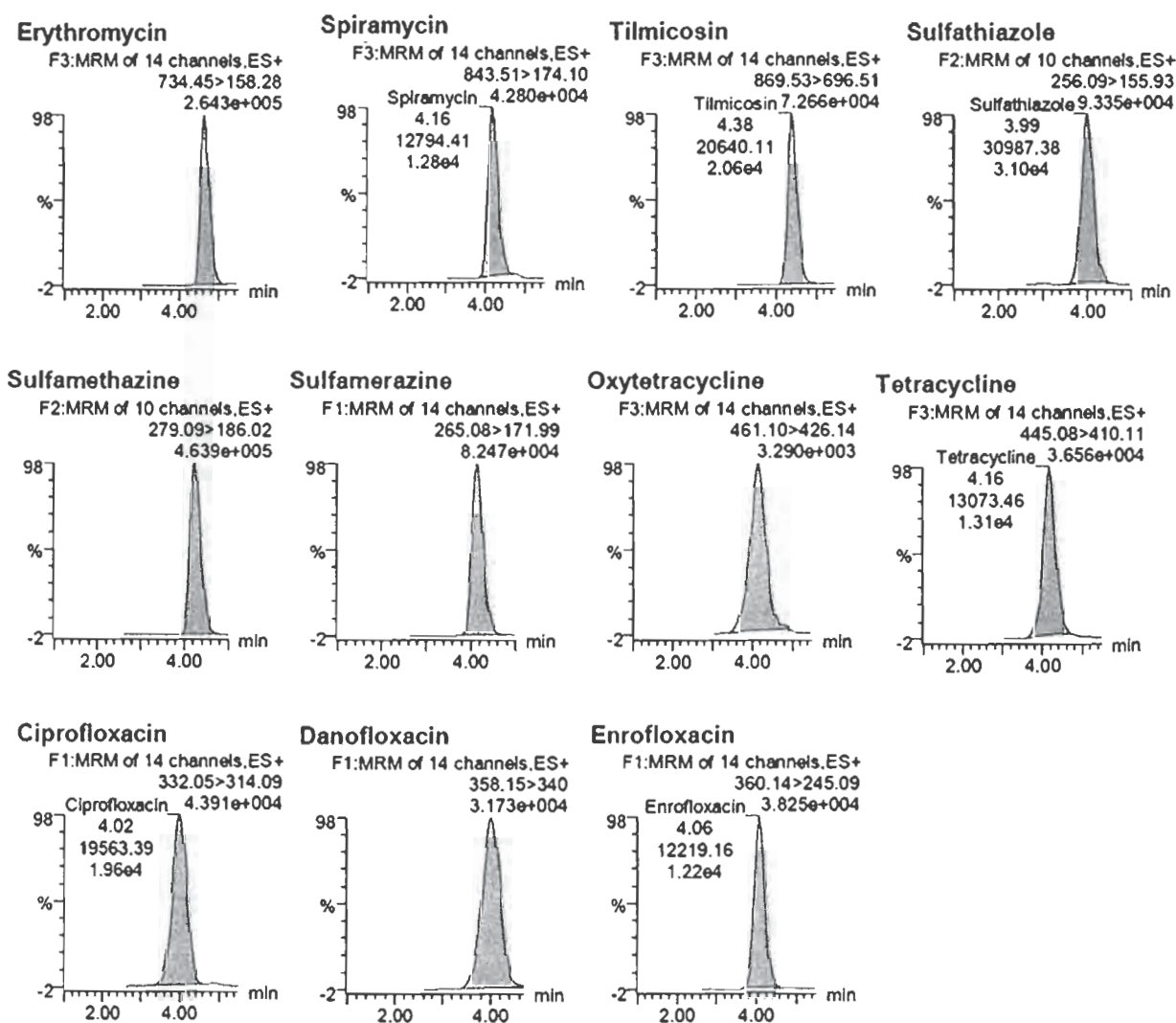


Fig. 2 LC-MS/MS chromatograms at quantification levels of eleven antibiotics. Each of the eleven antibiotics was spiked at $2 \mu\text{g L}^{-1}$ in river water sample and enriched and evaluated by HF-LPME under the optimized conditions (sample pH 8.0, 20% (w/v) Aliquat 336

carrier in DHE as the organic phase, acetic acid pH 4.0 as the acceptor solution, a stirring rate of 200 rpm, and an extraction time of 60 min, three replicates

level of $2 \mu\text{g L}^{-1}$. No matrix effect was observed when compares the data of mixed standard solutions to spiked river samples. This implies to the added benefit of HF-LPME that includes sample clean-up capability and analyte enrichment together making it attractive for water analysis purposes.

Conclusions

Carrier-mediated HF-LPME for the simultaneous pre-concentration of multiple classes of antibiotics was successfully developed for the trace analysis of water samples with a simple, inexpensive and selective sample preparation step offering a high potential in enrichment and clean-up efficiency. This allowed subsequent direct injection into the UHPLC-MS/MS without dilution. The developed carrier-mediated HF-LPME method provided enrichment factors ranging between 12.5- up to 156-fold enhancement, and good limits of detection ranging from $10\text{--}250 \text{ ng L}^{-1}$, with quantification limits in the range of $40\text{--}850 \text{ ng L}^{-1}$. The validation data imply that the method is suitable for water quality control purposes in Thailand and elsewhere. Using this method, the levels of eleven antibiotic analytes were successfully and simultaneously determined in river water samples with acceptable recoveries between 79.2% and 119%. This work demonstrates an alternative, and environmentally friendly, way to simultaneously enrich and identify a large variety of drug residue compounds in water, which may be found at very low levels in aquatic samples.

Acknowledgements The authors would like to thank Assistant Professor M.L. Siripastry Jayanta for her critical review of the manuscript. Her constructive comments have greatly improved the manuscript. This research was supported by the 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund); the Thailand Research Fund and Commission on Higher Education; a Research Grant for Mid-Career University Faculty (RMU 5180009); the Thai Government Stimulus Package 2 (TKK 2555) under the project for establishment of a comprehensive centre for innovation on food, health products and agriculture; the national research university project of CHE and Rachadaphiseksomphot Endowment Fund (FW 003A); and the Center for Petroleum, Petrochemicals, and Advanced Materials at Chulalongkorn University.

References

- Richardson SD (2009) Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Anal Chem* 81:4645
- Hernández F, Sancho JV, Ibáñez M, Guerrero C (2007) Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. *Trends Anal Chem* 26:466
- Kümmerer K (2003) Significance of antibiotics in the environment. *J Antimicrob Chemother* 52:5
- Kostopoulou M, Nikolaou A (2008) Analytical problems and the need for sample preparation in the determination of pharmaceuticals and their metabolites in aqueous environmental matrices. *Trends Anal Chem* 27:1023
- Kemper N (2008) Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecol Indic* 2:1
- Stolker AAM, Brinkman UAT (2005) Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals—A review. *J Chromatogr A* 1067:15
- Kümmerer K (2009) Antibiotics in the aquatic environment—A review-Part I. *Chemosphere* 75:417
- Li B, Zhang T, Xua Z, Fang HHP (2009) Rapid analysis of 21 antibiotics of multiple classes in municipal wastewater using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 645:64
- Chico J, Rúbies A, Centrich F, Companyó R, Prat MD, Granados M (2008) High-throughput multiclass method for antibiotic residue analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1213:189
- Babić S, Ašperger D, Mutavdžić D, Horvat AJM, Kaštelan-Macan M (2006) Solid phase extraction and HPLC determination of veterinary pharmaceuticals in wastewater. *Talanta* 70:732
- Reverté S, Borrull F, Pocurull E, Marcé RM (2003) Determination of antibiotic compounds in water by solid-phase extraction-high performance liquid chromatography-(electrospray) mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1010:225
- Gros M, Petrović M, Barceló D (2006) Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta* 70:678
- Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE (1999) Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. *Anal Chem* 71:2650
- Psillakis E, Kalogerakis N (2003) Developments in liquid-phase microextraction. *Trends Anal Chem* 22:565
- Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S (2004) Developments in hollow fibrebased, liquid-phase microextraction. *Trends Anal Chem* 23:1
- Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE (2008) Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction. *J Chromatogr A* 1184:132
- Kou D, Wang X, Mitra S (2004) Supported liquid membrane microextraction with high-performance liquid chromatography—UV detection for monitoring trace haloacetic acids in water. *J Chromatogr A* 1055:63
- Esfarili A, Yamini Y, Shariati S (2007) Hollow fiber-based liquid phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for extraction and determination of some antidepressant drugs in biological fluids. *Anal Chim Acta* 604:127
- Berhanu T, Liu J, Romero R, Megersa N, Jönsson JÅ (2006) Determination of trace levels of dinitrophenolic compounds in environmental water samples using hollow fiber supported liquid membrane extraction and high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1103:1
- Quintana JB, Rodil R, Reemtsma T (2004) Suitability of hollow fibre liquid-phase microextraction for the determination of acidic pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry without matrix effects. *J Chromatogr A* 1061:19
- Ho TS, Halvorsen TG, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE (2003) Liquid-phase microextraction of hydrophilic drugs by carrier-mediated transport. *J Chromatogr A* 998:61

22. Yamini Y, Reimann CT, Vatanara A, Jönsson JÅ (2006) Extraction and preconcentration of salbutamol and terbutaline from aqueous samples using hollow fiber supported liquid membrane containing anionic carrier. *J Chromatogr A* 1124:57
23. Piriyaipittaya M, Jayanta S, Mitra S, Leepipatpiboon N (2008) Micro-scale membrane extraction of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water followed by high-performance liquid chromatography and post-column derivatization with fluorescence detector. *J Chromatogr A* 1189:483
24. Zhang Z, Zhang C, Su X, Ma M, Chen B, Yao S (2008) Carrier-mediated liquid phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography for determination of illicit drugs in human urine. *Anal Chim Acta* 621:185
25. Shariati S, Yamini Y, Esrafil A (2009) Carrier mediated hollow fiber liquid phase microextraction combined with HPLC–UV for preconcentration and determination of some tetracycline antibiotics. *J Chromatogr B* 877:393
26. Mulugeta M, Megersa N (2004) Carrier-mediated extraction of bipyridilium herbicides across the hydrophobic liquid membrane. *Talanta* 64:101
27. Drapata A, Wiczorek P (2004) Facilitated SLM extraction of peptides with D2EHPA as a carrier. *Desalination* 163:47
28. Ho TS, Reubsæet JLE, Anthonsen HS, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE (2005) Liquid-phase microextraction based on carrier mediated transport combined with liquid chromatography–mass spectrometry New concept for the determination of polar drugs in a single drop of human plasma. *J Chromatogr A* 1072:29
29. Hylton K, Sangwan M, Mitra S (2009) Microscale membrane extraction of diverse antibiotics from water. *Anal Chim Acta* 653:116
30. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE (2005) Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques. *J Chromatogr B* 817:3
31. Qiang Z, Adams C (2004) Potentiometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics. *Water Res* 38:2874
32. Seifrtová M, Nováková L, Lino C, Pena A, Solich P (2009) An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters. *Anal Chim Acta* 649:158
33. Babić S, Horvat AJM, Pavlović DM, Kaštelan-Macan M (2007) Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients. *Trends Anal Chem* 26:1043
34. Commission Decision 2377/90/EEC (1990) Laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Off J Eur Commun L* 224:1

ผลงานตีพิมพ์ฉบับที่ 3

ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสาร

Electrophoresis, (2011), 32 (2), pp. 203-209

แบบจำลองเชิงทฤษฎีของการแยกแบบจำเพาะสำหรับสารประกอบที่มีประจุ
ในไมเซลล์าร์อีเล็กโตรโคโนติกโครมาโทกราฟี

**Theoretical models of separation selectivity for charged compounds in
micellar electrokinetic chromatography**

Chanida Puangpila¹
Amorn Petsom²
Thumnoon Nhujak¹

¹Chromatography and Separation Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

²Research Center for Bioorganic Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Received March 8, 2010

Revised October 18, 2010

Accepted October 18, 2010

Research Article

Theoretical models of separation selectivity for charged compounds in micellar electrokinetic chromatography

Equations and theoretical models for MEKC separation selectivity (α_{MEKC}) were established to explain a change in separation and electrophoretic mobility order of fully charged analytes, in which α_{MEKC} is related to the dimensionless values of mobility selectivity in CZE (α_{CZE}) and retention selectivity (α_k) in MEKC, and where α_{CZE} and α_k are defined as the ratio of electrophoretic mobility in CZE and the ratio of retention factor (k) in MEKC for two charged analytes, respectively. Using four alkylparabens as test analytes, excellent agreement was found between the observed α_{MEKC} and the proposed α_{MEKC} models of test analytes in MEKC over a wide range of SDS concentrations and values of k . For example, in comparison with CZE separation of charged analytes, MEKC separation can enhance separation selectivity up to the maximum value when the selectivity ratio (ρ) is greater than 1.0 ($\rho = \alpha_k/\alpha_{\text{CZE}}$), while lower separation selectivity is obtained with $\rho < 1.0$ ($\alpha_{\text{CZE}} > \alpha_k > 1$).

Keywords:

Charged compounds / MEKC / Mobility selectivity / Retention selectivity / Separation selectivity
DOI 10.1002/elps.201000405

1 Introduction

MEKC is one of the modes in CE in which the MEKC buffer contains a surfactant, such as SDS, to form micelles acting as a pseudo-stationary phase [1–5]. MEKC is widely used for separation of neutral and charged compounds as reported in reviews covering the literature up to 1999 [6], 2002 [7], 2003 [8], 2005 [3], and 2009 [9]. The MEKC separation of neutral analytes is performed using ionic surfactants [1, 3–6, 9–13], while charged analytes are separated using ionic, or non-ionic surfactants [1, 3, 4, 6, 9, 10, 14–16]. With different partitioning of analytes in the micelle, neutral as well as charged analytes show differences in effective electrophoretic mobility ($\Delta\mu$), and therefore these can be separated in MEKC [2, 3, 6, 14, 17, 18]. Typically, the resolution, R_s , of two analytes in CE is given by [19, 20]:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left| \frac{\Delta\mu}{\bar{\mu} + \mu_{\text{eo}}} \right| \quad (1)$$

Correspondence: Associate Professor Thumnoon Nhujak, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand
E-mail: thumnoon.n@chula.ac.th
Fax: +66-2-218-7598.

Abbreviations: BP, butyl *p*-hydroxybenzoate; EP, ethyl *p*-hydroxybenzoate; IP, methyl *m*-hydroxybenzoate; PP, propyl *p*-hydroxybenzoate

where N is the number of theoretical plates or efficiency, μ is the effective electrophoretic mobility, $\Delta\mu$ is the difference in μ , $\mu_2 - \mu_1$, for two analytes, and μ_{eo} is the electroosmotic mobility. For two analytes with same direction of μ , Eq. (1) may be rearranged to relate to the resolution R_s to the efficiency term, the selectivity term, and the mobility term as expressed in the following equation:

$$R_s = \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left(\frac{\alpha_m - 1}{\alpha_m} \right) \left| \frac{\mu_2}{\bar{\mu} + \mu_{\text{eo}}} \right| \quad (2)$$

where α_m is the separation selectivity or mobility selectivity, which is defined as the ratio of effective electrophoretic mobilities for two analytes such as μ_2/μ_1 for $|\mu_2| > |\mu_1|$.

In MEKC with normal elution mode, the same direction of electroosmotic velocity (v_{eo}), the observed velocity of analytes and observed velocity of micelles (v_{mc}), and $|v_{\text{eo}}| > |v_{\text{mc}}|$, the resolution equation for neutral analytes can be expressed to relate to the retention term as follows [21, 22]:

$$R_s = \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left(\frac{\alpha_k - 1}{\alpha_k} \right) \left(\frac{k_2}{1+k} \right) \left(\frac{1 - t_{\text{eo}}/t_{\text{mc}}}{1 + (t_{\text{eo}}/t_{\text{mc}})k} \right) \quad (3)$$

where k is the retention factor, α_k is the retention selectivity defined as the ratio of k such as k_2/k_1 , and t_{eo} and t_{mc} are the migration times of an EOF marker and a micelle marker, respectively.

With the normal elution mode of the MEKC separation of fully charged analytes due only to the difference in micellar partitioning and not in their electrophoretic

mobilities, the resolution equation is given as follows [21]:

$$R_s = \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left(\frac{\alpha_k - 1}{\alpha_k} \right) \left(\frac{k_2}{1+k_2} \right) \times \left(\frac{1+t_{eo}/t_{ep} - t_{eo}/t_{mc}}{1+t_{eo}/t_{ep} + (t_{eo}/t_{mc})k} \right) \quad (4)$$

where t_{ep} is the migration time corresponding to the electrophoretic mobility of the charged analyte, and $t_{ep} = t_{ep2} = t_{ep1}$ for this case.

It can be seen in Eqs. (3) and (4) that the separation selectivity may be now referred to the retention selectivity. In the case of analytes with a difference in their electrophoretic mobility (μ_0) at zero concentration of surfactant or CZE, the MEKC separation is based on the differences in both k and μ_0 . In comparison with the CZE separation of charged analytes, the addition of surfactant to the MEKC buffer may result in improved separation for some analytes, but lowered degree of separation for other analytes [4, 10, 13–17, 23–26]. These dual effects are similar to those seen in chiral separation using dual cyclodextrins as reported in our previous work [27].

In order to explain the separation selectivity and electrophoretic mobility order in MEKC for charged analytes with differences in μ_0 , the aims of this work are to establish theoretical models of MEKC separation selectivity which is related to the dimensionless values of mobility selectivity in CZE and retention selectivity in MEKC, and to compare the observed and predicted separation selectivity in MEKC. The MEKC separation with normal elution mode was carried out using SDS surfactant in a 10-mM disodium tetraborate buffer at pH 10.2, and the test analytes used were alkylparabens.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals

All the test analytes were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany): isomethylparaben (methyl *m*-hydroxybenzoate; IP), ethylparaben (ethyl *p*-hydroxybenzoate; EP), propylparaben (propyl *p*-hydroxybenzoate; PP), and butylparaben (butyl *p*-hydroxybenzoate; BP). Sodium hydroxide and disodium tetraborate decahydrate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) were supplied by Fluka (Buchs, Switzerland), SDS from Sigma (St. Louis, MO, USA), all organic solvents obtained from Merck (Dramstadt, Germany), and dodecylbenzene/micellar marker (M) from Sigma-Aldrich.

2.2 CE conditions

CE experiments were carried out with a Beckman Coulter MDQ-CE system equipped with a photo-DAD scanning from 190 to 300 nm and monitoring at 220 nm. The data-

handling system comprised an IBM PC and 32 Karat Software. The uncoated fused-silica capillary, 40.2 cm in length (30 cm to detector) \times 50 μm id (Polymicro Technologies, AZ), was used for CZE and MEKC separations, thermostated at 25°C. Voltage was set at 15 kV. A sample solution was introduced by 0.5 psi pressure injection for 3 s. Prior to each daily analysis, the capillary was rinsed sequentially for 15 min with methanol, 0.1 M NaOH, water, and a running buffer. Between consecutive runs, the capillary was flushed with 0.1 M NaOH and then with a running buffer, each for 2 min. All experiment runs were performed in duplicate.

2.3 Buffering electrolytes

The electrophoretic mobilities were determined in two buffer systems: (1) CZE with 10 mM disodium tetraborate buffer, adjusted to pH 10.2 with 1.0 M NaOH, and (2) MEKC with 20 to 60 mM SDS in a pH 10.2 10 mM disodium tetraborate buffer. All buffers were prepared using Milli-Q water, sonicated for 30 min, and then filtered through 0.45 μm PTFE filters prior to use.

2.4 Stock and standard solutions

Each test analyte was separately dissolved in 5 mL of ACN, and then each analyte solution was diluted with Milli-Q water in a 10 mL volumetric flask to give 1000 ppm stock solutions. Stock solutions of DB and thiourea were also separately dissolved in ethanol, and then diluted to 20 000 ppm with Milli-Q water. A working standard solution containing 20–60 ppm of each test analyte, 30 ppm thiourea, and 150 ppm DB was prepared by diluting each of the stock solutions with a 1.0 mM borate buffer. All solutions were filtered through 0.45 μm PTFE filters prior to analysis.

3 Results and discussion

3.1 Theoretical models of separation selectivity in MEKC for charged compounds

In MEKC, effective electrophoretic mobilities of two fully charged analytes, μ_{MEKC} , are given by [21]

$$\mu_{(\text{MEKC},1)} = \left(\frac{\mu_{0,1} + k_1 \mu_{\text{mc}}}{1 + k_1} \right) \quad (5)$$

$$\mu_{(\text{MEKC},2)} = \left(\frac{\mu_{0,2} + k_2 \mu_{\text{mc}}}{1 + k_2} \right) \quad (6)$$

where μ_0 is the electrophoretic mobility at zero concentration of SDS or under CZE conditions, and μ_{mc} is the electrophoretic mobility of the micelle marker. Subscripts 1

and 2 refer to the analytes 1 and 2, respectively. The separation selectivity in MEKC (α_{MEKC}), the ratio of μ_{MEKC} with $k_2 \geq k_1 > 0$, may be rearranged to relate to the dimensionless values as follows:

$$\alpha_{\text{MEKC}} = \alpha_{\text{CZE}} \left(\frac{\beta + \frac{\alpha_k}{\alpha_{\text{CZE}}} k_1}{\beta + k_1} \right) \left(\frac{(1 + k_1)}{1 + \alpha_k k_1} \right) \quad (7)$$

where α_{CZE} is the mobility selectivity in CZE or the ratio of μ_0 , e.g. $\mu_{0,2}/\mu_{0,1}$, α_k is the retention selectivity of the SDS surfactant for two analytes or the ratio of k , e.g. k_2/k_1 , and β is the ratio for $\mu_{0,1}/\mu_{\text{mc}}$. It should be noted that α_k is always ≥ 1.0 . The value of $\alpha_{\text{CZE}} > 1.0$ refers to the same order of $|\mu|$ in CZE and k in MEKC, e.g. $k_2 > k_1$ and $|\mu_2| > |\mu_1|$, whereas $\alpha_{\text{CZE}} < 1.0$ refers to the reversed order of $|\mu|$ in CZE and k in MEKC, e.g. $k_2 > k_1$ and $|\mu_2| < |\mu_1|$.

According to Eq. (7) and our previous work on theoretical models of separation selectivity of chiral separation using dual cyclodextrins [27], the proposed theoretical models of α_{MEKC} for two charged analytes in MEKC can be classified into four types as listed in Table 1, based on the ranges of α_{CZE} , α_k , ρ , and the order of $|\mu|$ in CZE and k in MEKC. In order to predict the value of α_{MEKC} for two charged analytes, the value of β in Eq. (7) is assumed to be equal to 0.5. Figure 1 shows plots of the α_{MEKC} model of Types I–III over a wide range of k_1 . Practically, an increase in k may be obtained by an increase in the concentration of SDS ([SDS]) in an MEKC buffer.

According to the α_{MEKC} model for Type I in Fig. 1A, at a fixed value of ρ except in the case $\rho \approx 1.0$, the value of α_{MEKC} increases with an increase in k_1 to a maximum value, and then decreases at higher values of k_1 . At a fixed value of k_1 , the higher the value of α_k , the greater the value of α_{MEKC} . The k_1 giving the maximum α_{MEKC} value decreases as the value of α_k increases. Therefore, the α_{MEKC} model of Type I shows that, with the same order of $|\mu|$ in CZE and k in MEKC for charged analytes, higher α_k than α_{CZE} can improve α_{MEKC} of two solutes in MEKC. In contrast to Type I, the α_{MEKC} model for Type II ($\alpha_k \leq \alpha_{\text{CZE}}$) in Fig. 1B shows that the value of α_{MEKC} decreases with an increase in k_1 , implying poorer separation for two charged analytes. For the reversed order of $|\mu|$ in CZE and k in MEKC for charged analytes as shown in Fig. 1C, the theoretical α_{MEKC} for the Type III model starts from less than 1.0 ($1/\alpha_{\text{MEKC}} > 1$) to near 1.0 (poorer separation) with increasing k_1 and then higher than 1.0 (better separation) at higher k_1 values. At an

α_{MEKC} of 1.0, the value of k_1 is given by:

$$k_1 = \frac{(1 - \alpha_{\text{CZE}})}{(\alpha_{\text{CZE}} - \alpha_k) + (\alpha_k - 1)/\beta} \quad (8)$$

The small value of α_k gives a higher k_1 at α_{MEKC} 1.0, which is consistent with the bottom line for α_{MEKC} of 0.99 in Fig. 1C. It should be noted that for a theoretical value of α_{CZE} or $\alpha_{\text{MEKC}} < 1.0$, the practical separation selectivity is equal to $1/\alpha_{\text{CZE}}$ or $1/\alpha_{\text{MEKC}}$. Therefore, an increase in k_1 may result in a reversed order of electrophoretic mobility for two charged analytes in MEKC. The model Type IV ($\alpha_k = 1.0$ and $\alpha_{\text{CZE}} = 1.0$) indicates that no resolution is obtained for two solutes (plot not shown).

As can be seen in Fig. 1, the theoretical model of α_{MEKC} can be employed to describe the separation of two charged analytes. The greater the α_{MEKC} value ($\alpha_k > 1.0$), the greater the resolution. Better separation selectivity in MEKC over CZE can be obtained for the α_{MEKC} Type I ($\alpha_k > \alpha_{\text{CZE}}$), or Type III models ($\alpha_k \gg \alpha_{\text{CZE}}$, or $\alpha_k > 1/\alpha_{\text{CZE}}$) at appropriate values of k_1 .

It should be noted that the direction of EOF velocity and total velocity does not affect the electrophoretic mobility of analytes and micelles, and the retention factor of analytes in MEKC. Owing to independence of the values of α_m and α_k with the direction of these velocities, our proposed selectivity models can be used for MEKC with normal, reversed, and restricted modes classified by the direction of EOF and total velocity as details given in [22].

3.2 Observed and predicted α_{MEKC} for negatively charged compounds in MEKC with normal elution mode and anionic SDS surfactant

In this work, parabens such as IP, BP, PP, and EP, a weak acid with $\text{HO-C}_6\text{H}_4\text{COOR}$, were chosen as test analytes. In a basic buffer with $\text{pH} > \text{p}K_a$ of parabens, these parabens can carry a negative charge. The apparent $\text{p}K_a$ values were found to be 8.80, 7.98, 8.00, and 7.97, respectively (literature values of 9.2 for IP [28] and 8.4 for other parabens [29]). It should be noted that the apparent $\text{p}K_a$ values were determined by measuring effective mobility (μ_{eff}) in CZE with a 10-mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ buffer at various pH values of 7.8–10.2, and plotting $1/\mu_{\text{eff}}$ versus $10^{-\text{pH}}$ ($[\text{H}_3\text{O}^+]$) to obtain $\text{p}K_a$ from log (slope/ Y -intercept) [30]. A pH 10.2 borate buffer was used to

Table 1. Types of theoretical models for α_{MEKC}

Type	Order of $ \mu $ in CZE and k in MEKC	α_{CZE}	α_k	ρ	Assumed values		
					α_{CZE}	α_k	β
I	Same	$\alpha_{\text{CZE}} \geq 1$	$\alpha_k > \alpha_{\text{CZE}} \geq 1$	$\rho > 1$	1.1	1.2–3.3	0.5
II	Same	$\alpha_{\text{CZE}} > 1$	$\alpha_{\text{CZE}} \geq \alpha_k \geq 1$	$\rho \leq 1$	1.5	1.0–1.5	0.5
III	Reversed	$\alpha_{\text{CZE}} < 1$	$\alpha_k \geq 1 > \alpha_{\text{CZE}}$	$\rho > 1$	0.8	1.0–6.4	0.5
IV	Co-migration	$\alpha_{\text{CZE}} = 1$	$\alpha_k = \alpha_{\text{CZE}} = 1$	$\rho = 1$	—	—	0.5

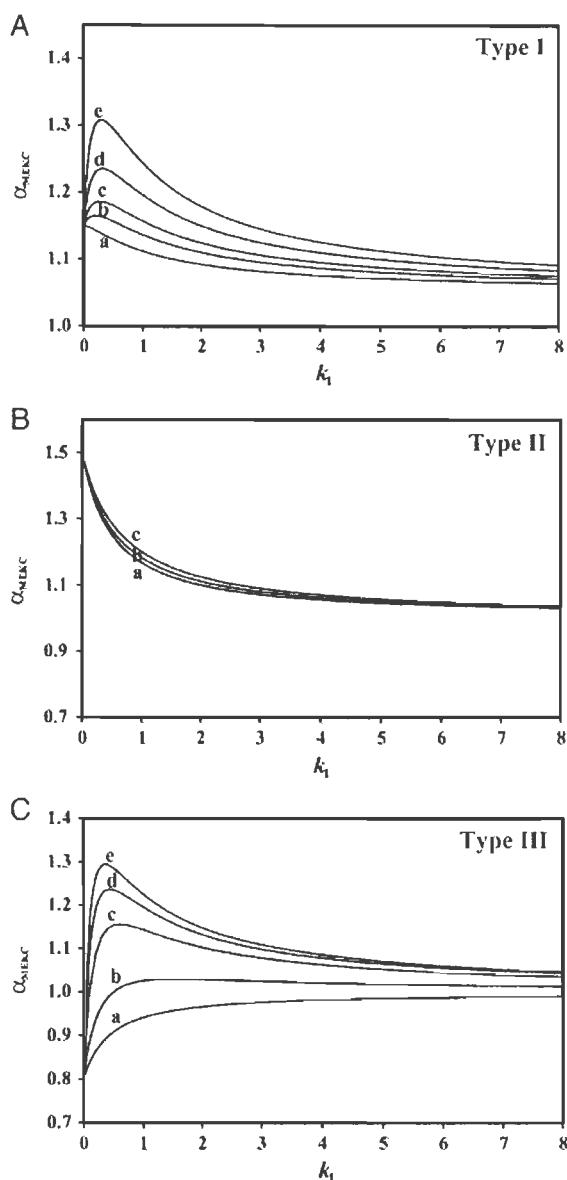


Figure 1. Predicted models of the separation selectivity (α_{MEKC}) for two charged analytes in MEKC. Calculation using Eq. (7) and data as listed in Table 1. a–e refer to the values of α_k , for (A) 1.2, 1.4, 1.7, 2.2 and 3.3, respectively, (B) 1.0, 1.2 and 1.5, respectively, and (C) 1.0, 1.6, 3.2, 4.8 and 6.4, respectively.

afford almost fully negatively charged analytes with degrees of ionization of 0.96 for IP and 0.99 for other parabens, calculated using apparent pK_a determined under our CE conditions and the equation for degrees of ionization reported in the textbook [31].

In order to obtain the predicted value of α_{MEKC} for two charged analytes in MEKC, the following parameters must be known: the mobility selectivity in CZE, the retention selectivity in MEKC, and the retention factor in MEKC. Figure 2 shows the separations of parabens using an SDS-

free system (or a CZE system) and an MEKC system with various SDS concentrations (20–60 mM). From CZE separation (Fig. 2A), in which the electrophoretic mobility vectors of negatively charged parabens are opposite to an EOF vector, the migration time order EP>PP>BP>IP with the effective electrophoretic mobilities μ of -2.25 , -2.13 , -2.03 and $-1.97 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectively, indicates the $|\mu|$ order EP>PP>BP>IP, in line with the charge-to-size ratio for homologous series EP>PP>BP. The smaller $|\mu|$ for IP than other parabens may be due to the smaller degree of ionization, and/or larger hydrodynamic size of IP.

Theoretically, for MEKC separation of neutral analytes with normal elution mode in ionic surfactant, the migration behavior depends only on the retention factors of the analytes. The higher the retention factor, the longer the migration time. However, for the MEKC separation of charged analytes with the above conditions, the migration behavior depends on the electrophoretic mobility and retention factor of each analyte, and therefore it is difficult to predict the order of the migration time or the effective electrophoretic mobility in MEKC.

The retention factor k is calculated from MEKC electropherograms using the following equation [18, 21, 32]:

$$k = \frac{\mu_{\text{MEKC}} - \mu_0}{\mu_{\text{mc}} - \mu_{\text{MEKC}}} \quad (9)$$

where all parameters are previously defined in Eqs. (5) and (6). From the MEKC electropherograms in Fig. 2B–D, the retention factors (Table 2) for negatively charged parabens were obtained in the order BP>PP>IP>EP, which are consistent with the magnitude order of octanol–water distribution constants in this series BP>PP>EP [33–35].

As seen in Fig. 2D for MEKC separation with 60 mM SDS, the order of t_m or $|\mu_{\text{MEKC}}|$ is obtained to be BP>PP>IP>EP, whereas different orders are obtained in MEKC at 20 mM SDS (Fig. 2B): BP>PP>EP>IP, and in CZE (Fig. 2A), EP>PP>BP>IP. These differences in migration behavior can be explained using the separation selectivity models in Section 3.1.

Figure 3 shows the observed and predicted values of α_{MEKC} for parabens in MEKC over a wide range of [SDS] (Fig. 3A) and k_1 values (Fig. 3B). The former is useful to consider the SDS concentration giving the achieve resolution of all solutes and the reversed migration, whereas the latter is useful to compare the observed and the predicted model without known [SDS]. The predicted values of α_{MEKC} at different [SDS] (6.0–60 mM) were calculated using data in Table 2 and Eq. (7). Table 2 also lists the mobility selectivity, retention selectivity, retention factor, selectivity ratio, and predicted models of α_{MEKC} . As previously mentioned, for MEKC separation of a particular analyte pair, such as PP and IP, k_1 refers to the retention factor for the solute with smaller k , such as k_{IP} . Using a wide range of [SDS] (20–60 mM), the observed k_1 can be plotted against [SDS] to derive a linear calibration plot, allowing predicted values of k_1 at various [SDS] to be obtained. Using data in Table 2 and Eq. (7), the observed values of α_{MEKC} in Fig. 3 were found to

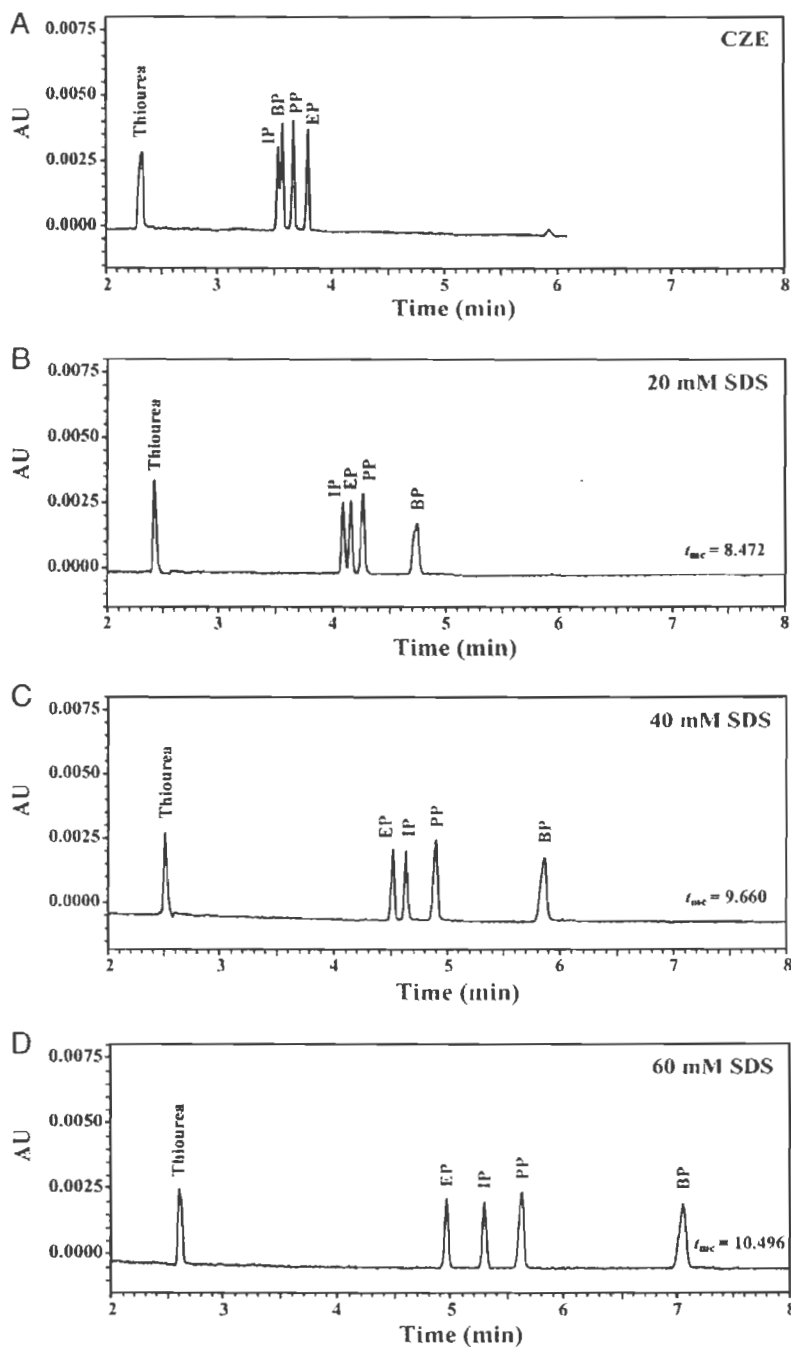


Figure 2. Electropherograms of parabens using (A) 0 (CZE), (B) 20, (C) 40, and (D) 60 mM SDS in a 10-mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ buffer adjusted to pH 10.2 with 1.0 M NaOH. Other CE conditions: uncoated fused-silica capillary, 50 μm id \times 40.2 cm (30 cm to the detector), a temperature of 25°C, an applied voltage of 15 kV, UV detection at 220 nm, and 0.5 psi pressure injection for 3 s.

Table 2. Mobility selectivity (α_{CZE}), retention selectivity (α_k), retention factor (k_1), selectivity ratio (ρ), and types of α_{MEKC} model

Pair	Solute 1	$k_1 = a[\text{SDS}] + b$	α_{CZE}	α_k	β	ρ	Types of model for α_{MEKC} in MEKC
IP/EP	EP	$0.00236[\text{SDS}] - 0.013$	0.888	$k_{\text{IP}}/k_{\text{EP}}$	0.575	$\rho > 1$	III
PP/IP	IP	$0.00871[\text{SDS}] - 0.028$	1.066	$k_{\text{PP}}/k_{\text{IP}}$	0.511	$\rho > 1$	I
BP/PP	PP	$0.01004[\text{SDS}] - 0.035$	0.953	$k_{\text{BP}}/k_{\text{PP}}$	0.544	$\rho > 1$	III
	BP	$0.03068[\text{SDS}] - 0.057$	—	—	—	—	—

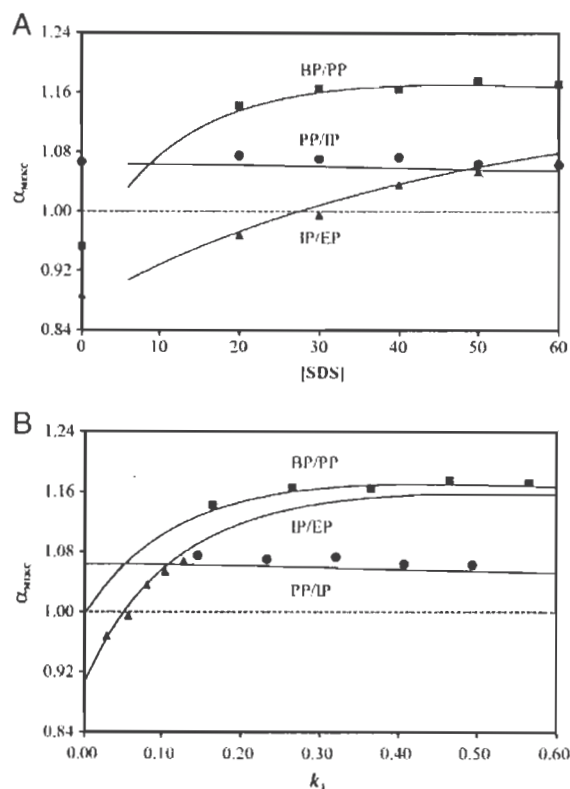


Figure 3. Observed (symbols) and predicted (solid lines) α_{MEKC} for two charged analytes in MEKC. (A) Various concentrations of SDS and (B) various values of k_1 . Predicted values are obtained using Eq. (7) and data as listed in Table 2.

be in good agreement with the predicted values, indicating that Eq. (7) can be used for prediction of the α_{MEKC} values over a wide range of [SDS] and k_1 .

According to electropherograms in Fig. 2 and data in Table 2, the same order of $|\mu|$ in CZE and k in MEKC was obtained, and therefore $\alpha_{\text{CZE}} > 1.0$ and $\alpha_{\text{MEKC}} > 1.0$. Although the ρ value is greater than 1.0, a slight decrease in the observed and predicted values of α_{MEKC} with an increase in [SDS] and k_1 is due to small calculated values of ρ between 1.032 and 1.072 for 10–60 mM SDS. Therefore, a change in α_{MEKC} for PP/IP in MEKC is consistent with the α_{MEKC} model of Type I described earlier with small values of ρ .

Owing to the reversed order of $|\mu|$ in CZE and k in MEKC for IP/EP and BP/PP, and the theoretical value of α_{CZE} being less than 1.0, the reversed $|\mu|$ order for IP/EP and BP/PP at high [SDS] and at low or zero [SDS] is consistent with the α_{MEKC} Type III model. At an α_{MEKC} value of 1.0, the predicted values of k_1 in Fig. 3B are estimated to be 0.003 for BP/PP at very low [SDS], and 0.052 for IP/EP which is in good agreement with the observed k_1 of 0.064. It should be noted that, employing Eq. (8) with an average α_k of 3.831 for IP/EP at 6.0–60 mM SDS, the predicted values of k_1 of 0.057 giving α_{MEKC} of 1.0 are found to be in good agreement with k_1 in Fig. 3B (0.052).

4 Concluding remarks

We have shown that a change in MEKC separation selectivity for two charged analytes over a wide range of [SDS] and k values can be explained and predicted using our proposed equations and theoretical models of separation selectivity, where the separation selectivity is related to the dimensionless values of the mobility selectivity in CZE and retention selectivity in MEKC. In comparison with CZE, the ability of MEKC to improve or reduce separation selectivity for two charged analytes depends on the model of separation selectivity. In addition, excellent agreement was found between the observed α_{MEKC} and the proposed α_{MEKC} models of test analytes in MEKC over a wide range of [SDS] and k values.

The financial support from the following sources is gratefully acknowledged: the Thailand Research Fund (RMU5080054) to T. N., and the Ratchaphisek Somphot Endowment Fund, under the National Research University Project, under the 90th Anniversary of Chulalongkorn University (CU) Fund to C. P. and under the Research Unit Fund to ChSRU. We also acknowledge the Institute for the Promotion of the Teaching Science and Technology for studentship to C. P., the Center for Petroleum, Petrochemicals and Advanced Materials, CU, for partial support, and the Thai Government Stimulus Package 2 (TKK255), under the Project for Establishment of Comprehensive Center for Innovative Food, Health Products and Agriculture (PERFECTA), for CE instrument support.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Terabe, S., Matsubara, N., Ishihama, Y., Okada, Y., *J. Chromatogr.* 1992, **608**, 23–29.
- [2] Altria, K. D., Clark, B. J., Mahuzier, P. E., *Chromatographia* 2000, **52**, 758–768.
- [3] Pappas, T. J., Gayton-Ely, M., Holland, L. A., *Electrophoresis* 2005, **26**, 719–734.
- [4] Iadarola, P., Ferrari, F., Fumagalli, M., Viglio, S., *Electrophoresis* 2008, **29**, 224–236.
- [5] Terabe, S., Otsuka, K., Ando, T., *Anal. Chem.* 1985, **57**, 834–841.
- [6] Quirino, J. P., Terabe, S., *J. Chromatogr. A* 1999, **856**, 465–482.
- [7] Molina, M., Silva, M., *Electrophoresis* 2002, **23**, 3907–3921.
- [8] Welsch, T., Michalke, D., *J. Chromatogr. A* 2003, **1000**, 935–951.
- [9] Terabe, S., *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2009, **2**, 99–120.
- [10] Riekkola, M.-L., Wiedmer, S. K., Valkó, I. E., Sirén, H., *J. Chromatogr. A* 1997, **792**, 13–35.
- [11] Ehala, S., Vaher, M., Kaljurand, M., *J. Chromatogr. A* 2007, **1161**, 322–326.

- [12] Gong, S., Liu, F., Li, W., Gao, F., Gao, C., Liao, Y., Liu, H., *J. Chromatogr. A* 2006, 1121, 274–279.
- [13] Dubber, M. J., Kanfer, I., *J. Chromatogr. A* 2006, 1122, 266–274.
- [14] Mallampati, S., Leonard, S., De Vulder, S., Hoogmartens, J., Van Schepdael, A., *Electrophoresis* 2005, 26, 4079–4088.
- [15] Česla, P., Blomberg, L., Hamberg, M., Jandera, P., *J. Chromatogr. A* 2006, 1115, 253–259.
- [16] Damić, M., Nigović, B., *Chromatographia* 2009, 71, 233–240.
- [17] Iadarola, P., Cetta, G., Luisetti, M., Annovazzi, L., Casado, B., Baraniuk, J., Zanone, C., Viglio, S., *Electrophoresis* 2005, 26, 752–766.
- [18] Téllez, A., Fuguet, E., Rosés, M., *J. Chromatogr. A* 2007, 1139, 143–151.
- [19] Giddings, J. C., *Sep. Sci.* 1969, 4, 181–189.
- [20] Jorgenson, J. W., Lukacs, K. D., *Anal. Chem.* 1981, 53, 1298–1302.
- [21] Nielsen, K. R., Foley, J. P., in: Camilleri, P. (Ed.), *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*, CRC Press, Inc., Boca Raton 1993, pp. 117–161.
- [22] Pyell, U., *Electrokinetic Chromatography: Theory, Instrumentation, and Application*, John Wiley & Sons, UK 2006, pp. 4–10.
- [23] Huang, H.-Y., Chiu, C.-W., Chen, Y.-C., Yeh, J.-M., *Electrophoresis* 2005, 26, 895–902.
- [24] Nhujak, T., Srisart, M., Kalampakorn, K., Tolieng, V., Petsom, A., *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 1884–1889.
- [25] Huertas-Pérez, J. F., del Olmo Iruela, M., García-Campaña, A. M., González-Casado, A., Sánchez-Navarro, A., *J. Chromatogr. A* 2006, 1102, 280–286.
- [26] Huang, H.-Y., Lai, Y.-C., Chiu, C.-W., Yeh, J.-M., *J. Chromatogr. A* 2003, 993, 153–164.
- [27] Nhujak, T., Sastravaha, C., Palanuvej, C., Petsom, A., *Electrophoresis* 2005, 26, 3814–3823.
- [28] Piršelová, K., Baláž, Š., Schultz, T. W., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1996, 30, 170–177.
- [29] Wilson, C. O., Gisvold, O., *Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, Lippincott-Raven, Philadelphia 1998, pp 915–918.
- [30] Jerez, G., Kaufman, G., Prystai, M., Schenkeveld, S., Donkor, K. K., *J. Sep. Sci.* 2009, 32, 1087–1095.
- [31] Kenndler, E., in: Khaledi, M. G. (Ed.), *High Performance Capillary Electrophoresis: Theory, Techniques, and Applications*, John Wiley & Sons, New York 1998, pp. 29–30.
- [32] Téllez, A., Fuguet, E., Rosés, M., *Electrophoresis* 2007, 28, 3712–3721.
- [33] Poouthree, K., Leepipatpiboon, N., Petsom, A., Nhujak, T., *Electrophoresis* 2007, 28, 767–778.
- [34] Golden, R., Gandy, J., Vollmer, G., *Crit. Rev. Toxicol.* 2005, 35, 435–458.
- [35] Tavares, R. S., Martins, F. C., Oliveira, P. J., Ramalho-Santos, J., Peixoto, F. P., *Reprod. Toxicol.* 2009, 27, 1–7.