



E47242

การลดระดับอุปสงค์ภายในประเทศของสหรัฐอเมริกาเป็นผลรวมของการลดภาษีเงินได้
กลุ่มบุคคลธรรมดาที่หักค่าเงินบำนาญเพื่อซื้อหุ้น

นางสาวโสภารัตน์ บุคควรศิษย์

วิทยาลัยนานาชาติ มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

UNIVERSITY 2552

คณะกรรมาธิการการต่างประเทศ

b09254120



E47242

การสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงเพื่อการตรวจวัดสารปฏิชีวนะ
กลุ่มแมกโครไลด์ตกค้างในน้ำและเนื้อสัตว์ปีก



นางสาว ไสภารัตน์ ยุทธวรศิษย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



5 0 7 2 5 4 4 3 2 3

**HOLLOW-FIBER LIQUID-PHASE MICROEXTRACTION FOR
DETERMINATION OF MACROLIDE ANTIBIOTIC RESIDUES IN
WATER AND POULTRY MUSCLE**

21728

Miss Soparat Yudthavorasit

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Chemistry**

Department of Chemistry

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

Thesis Title Hollow-fiber liquid-phase microextraction for determination
of macrolide antibiotic residues in water and poultry muscle
By Miss Soparat Yudthavorasit
Field of Study Chemistry
Advisor Assistant Professor Natchanun Leepipatpiboon, Dr.,rer.nat

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

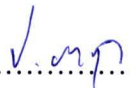
 Dean of the Faculty of Science
(Professor Supot Hannongbua, Dr.,rer.nat)

THESIS COMMITTEE

 Chairman
(Associate Professor Sirirat Kokpol, Ph.D.)

 Thesis Advisor
(Assistant Professor Natchanun Leepipatpiboon, Dr.,rer.nat)

 Examiner
(Assistant Professor Pakorn Varanusupakul, Ph.D.)

 External Examiner
(Prakorn Ramakul, Ph.D.)

โสภารัตน์ ยุทธวรศิษย์ : การสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงเพื่อการ
ตรวจวัดสารปฏิชีวนะกลุ่มแมโครไลด์ตกค้างในน้ำและเนื้อสัตว์ปีก. (HOLLOW-
FIBER LIQUID-PHASE MICROEXTRACTION FOR DETERMINATION
OF MACROLIDE ANTIBIOTIC RESIDUES IN WATER AND POULTRY
MUSCLE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ดร.ณัฐชนน ลิขิตพัฒน์ไพบลีย์, 116หน้า.
E47242

การสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงเป็นเทคนิคในการเพิ่มความเข้มข้น
ของสารปฏิชีวนะกลุ่มแมโครไลด์ตกค้างในน้ำและเนื้อสัตว์ปีก โดยนำเส้นใยกลวงซึ่งมีรูพรุน
ขนาดเล็กและมีราคาถูกมาใช้ในการเพิ่มความเข้มข้นด้วยรูปแบบอย่างง่าย งานวิจัยนี้ศึกษาถึงตัว
แปรที่มีผลต่อการเพิ่มความเข้มข้น อาทิเช่น เวลาในการแช่เส้นใยกลวงในตัวอย่างละลายอินทรีย์
ชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ สารละลายตัวให้ สารละลายตัวรับ และเวลาในการสกัด พบว่าเมื่อใช้
สารละลาย 20% Aliquat 336 ในไดเอทิลอีเทอร์บรรจุในรูพรุนของเส้นใยกลวงจุ่มอยู่ใน
สารละลายภายนอกหรือสารละลายตัวให้ที่มีพีเอช 8.0 จะเกิดการสกัดและเพิ่มความเข้มข้นของ
สารปฏิชีวนะกลุ่มแมโครไลด์ทั้งสี่ชนิดเข้าสู่สารละลายภายในเส้นใยกลวงหรือสารละลายตัวรับที่
มีพีเอช 4.0 ใช้เวลาในการสกัด 60 นาที ทำการตรวจวัดชนิดและปริมาณด้วยเทคนิคลิควิดโคร
มาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี จากการศึกษาในสภาวะที่เหมาะสม เทคนิคนี้สามารถ
เพิ่มความเข้มข้นได้ในช่วง 12.38 ถึง 36.14 เท่า ที่ความเข้มข้นของสาร 50.0 ไมโครกรัมต่อลิตร
โดยมีขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดเท่ากับ 0.07 ถึง 2.28 ไมโครกรัมต่อลิตร ค่าสัมประสิทธิ์
สหสัมพันธ์ในช่วงความเข้มข้น 0.50 ถึง 5.00 ไมโครกรัมต่อลิตร เท่ากับ 0.97 ถึง 0.99 ค่าร้อยละ
การคืนกลับสูงในช่วง 89.90 ถึง 102.99 และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในเกณฑ์ดี
(น้อยกว่า1.35) เมื่อเทียบกับค่าที่คำนวณได้จาก Horwitz equation และเมื่อนำสภาวะดังกล่าว
วิเคราะห์สารในน้ำตัวอย่างและเนื้อสัตว์ปีก พบว่า สามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะกลุ่ม
แมโครไลด์ทั้งสี่ชนิดได้ 14.15 ถึง 35.81 เท่า และ 3.94 ถึง 7.31 เท่า ตามลำดับ โดยให้ร้อยละ
ของการคืนกลับสูงในช่วง 82.93 ถึง 97.20 และ 71.78 ถึง 90.23 แสดงถึงความเหมาะสมของ
การนำเทคนิคนี้ไปใช้วิเคราะห์สารในตัวอย่างจริงได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ภาควิชา.....เคมี.....	ลายมือชื่อนิติศ.....โสภารัตน์ ยุทธวรศิษย์.....
สาขาวิชา.....เคมี.....	ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษา.....ณัฐชนน ลิขิตพัฒน์ไพบลีย์.....
ปีการศึกษา.....2552.....	

507 25443 23 : MAJOR CHEMISTRY

KEYWORDS : LIQUID-PHASE MICROEXTRACTION / HOLLOW-FIBER /
MACROLIDE ANTIBIOTIC

SOPARAT YUDTHAVORASIT : HOLLOW-FIBER LIQUID-PHASE
MICROEXTRACTION FOR DETERMINATION OF MACROLIDE
ANTIBIOTIC RESIDUES IN WATER AND POULTRY MUSCLE.
THESIS ADVISOR : ASST. PROF.NATCHANUN LEEPIPATPIBOON,
Dr.,rer.nat, 116 pp.

E 47242

Hollow-fiber liquid-phase microextraction (HF-LPME) has been developed for preconcentration of macrolide antibiotic residues in water and poultry muscle. A low-cost microporous hollow fiber was employed with simple configuration for enrichment process. HF-LPME parameters affecting enrichment factor such as immersion time, organic solvent composition, donor solution, acceptor solution and extraction time were investigated. A few microliters of 20% Aliquat 336 in dihexylether immersed in the hollow fiber pores have induced the extraction and preconcentration of four macrolide antibiotics from outside (donor solution pH 8.0) to inside (acceptor solution pH 4.0) fiber membrane within 60 minutes of extraction time, qualitative and quantitative detection with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. In selected HF-LPME condition, macrolide antibiotics can be preconcentrated with enrichment factor between 12.38 to 36.14 at concentration 50.00 µg/L. Limit of detection ranged from 0.07 to 2.28 µg/L with correlation coefficient between 0.97 to 0.99 in concentration range of 0.50-5.00 µg/L, the high value of % recovery ranged from 89.90 to 102.99 and the relative standard deviations were in acceptable range (<1.35) when compared with the value from Horwitz equation. This method was effectively applied in real sample with enrichment factor of four macrolides ranged from 14.15 to 35.81 for water sample and 3.94 to 7.31 for poultry sample. The % recoveries of macrolides from water and poultry sample were high in range of 82.93 to 97.20 and 71.78 to 90.23, respectively.

Department : Chemistry Student's Signature Soparat Yudthavorasit
Field of Study : Chemistry Advisor's Signature Natchanun Leepipatpiboon
Academic Year : 2009

ACKNOWLEDGEMENTS

First of all, I would like to express my deepest gratitude to my thesis advisor, Assistant Professor Natchanun Leepipatpiboon, for her professionalism, generosity, plentiful guidance, continuous assistance, sincere encouragements, kind patience for my mistake, and critical proofreading throughout this research. I would like to extend my thanks to Assistant Professor Siripastr Jayanta, for her recommendations and critical reading. My appreciation also extends to all thesis committees for their insightful comments and suggestions.

This research was financially supported by the 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund) and Center for Petroleum, Petrochemicals, and Advanced Materials. I would like to thank Miss Chayada Chiaochoan for LC-MS/MS support and information in this work. Further thank should also go to Mr. Thorsten Hueffer, for his language assistance.

In addition, warm thanks to all members of the Chromatography and Separation Research Unit (ChSRU) for their helpfulness and suggestions. I would like to thank my friends at Chulalongkorn University for valuable time and supports. Particularly, many thanks go to all my friends from Mahidol University, for their cheerful perspectives and friendship.

Finally, I must thank my beloved parent, my three sisters and brother for their unlimited support, love and understanding.

CONTENTS

	PAGE
ABSTRACT (IN THAI).....	iv
ABSTRACT (IN ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	xi
LIST OF FIGURES.....	xiii
LIST OF SYMBOLS AND ABBREVIATIONS.....	xv
CHAPTER I: INTRODUCTION.....	1
1.1 Problem Definition.....	1
1.2 Macrolide Antibiotics.....	3
1.2.1 Structure and chemistry.....	4
1.2.2 Mechanism of action.....	5
1.2.3 Mechanism of resistance.....	8
1.2.4 Growth promoters.....	8
1.3 Literature review.....	9
1.4 Purpose of the study.....	13
CHAPTER II: THEORY.....	16
2.1 Membrane extraction.....	17
2.2 Liquid-Phase Microextraction (LPME).....	18
2.2.1 Hollow-Fiber Liquid-Phase Microextraction (HF-LPME).....	18
2.2.1.1 Two-phase HF-LPME.....	20
2.2.1.2 Three-phase HF-LPME.....	22
2.2.1.3 Carrier-mediated HF-LPME.....	26
2.2.1.4 Parameters affecting HF-LPME procedure.....	29
2.2.1.4.1 Hollow fiber membrane.....	29
2.2.1.4.2 Organic solvent.....	29
2.2.1.4.3 Extraction kinetics.....	30
2.2.1.4.4 Donor solutions.....	31
2.2.1.4.5 Acceptor solutions.....	31
2.2.1.4.6 Extraction time.....	32
2.2.1.4.7 HF-LPME configuration.....	32
2.3 Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS).....	35

	PAGE
3.5.6 The procedure of acceptor type optimization.....	58
3.5.7 The procedure of acceptor pH optimization.....	59
3.5.8 The procedure of extraction time optimization.....	60
3.6 Method Validation.....	61
3.6.1 Standard calibration curve.....	61
3.6.2 Linearity.....	61
3.6.3 Limit of detections (LODs) and limit of quantifications(LOQs)	61
3.6.4 Enrichment factor.....	62
3.6.5 Accuracy.....	62
3.6.6 Precision.....	62
3.7 The application of optimized HF-LPME method in water and poultry sample.....	63
3.7.1 Water sample.....	64
3.7.2 Poultry muscle sample.....	65
3.7.2.1 Method I: Donor solution.....	65
3.7.2.2 Method II: Meta-phosphoric acid-methanol.....	67
3.7.2.3 Method III: McIlvaine buffer.....	68
3.7.2.4 Method IV: Trichloroacetic acid (TCA).....	69
3.7.2.5 Method V: KH_2PO_4 -ACN.....	70
3.7.3 Method performance in water and poultry sample application...	71
3.7.3.1 Water sample application.....	72
3.7.3.1.1 Recovery.....	72
3.7.3.1.2 Limit of detections (LODs).....	72
3.7.3.2 Poultry sample application.....	72
3.7.3.2.1 Recovery.....	72
3.7.3.2.2 Limit of detections (LODs).....	73
CHAPTER IV: RESULTS AND DISCUSSION.....	74
4.1 HF-LPME optimization.....	74
4.1.1 The optimization of immersion time.....	75
4.1.2 The optimization of organic solvent type.....	76
4.1.3 The optimization of organic solvent composition.....	78
4.1.4 The optimization of donor type.....	81
4.1.5 The optimization of donor pH.....	82
4.1.6 The optimization of acceptor type.....	83

	PAGE
4.1.7 The optimization of acceptor pH.....	84
4.1.8 The optimization of extraction time.....	86
4.2 Method Validation.....	88
4.2.1 Standard calibration curve.....	88
4.2.2 Linearity.....	90
4.2.3 Limit of detections (LODs) and limit of quantifications(LOQs)	91
4.2.4 Enrichment factor.....	91
4.2.5 Accuracy.....	92
4.2.6 Precision.....	93
4.3 The application of optimized HF-LPME method in water and poultry sample.....	94
4.3.1 Water sample.....	94
4.3.2 Poultry muscle sample.....	96
4.3.2.1 Method I: Donor solution.....	96
4.3.2.2 Method II: Meta-phosphoric acid-methanol.....	97
4.3.2.3 Method III: McIlvaine buffer.....	98
4.3.2.4 Method IV: Trichloroacetic acid (TCA).....	99
4.3.2.5 Method V: KH_2PO_4 -ACN.....	100
4.3.3 Method performance in water and poultry sample application...	101
4.3.3.1 Water sample application.....	101
4.3.3.2 Poultry sample application.....	102
CHAPTER V: CONCLUSIONS AND SUGGESTIONS FOR FURTHER STUDY.....	103
REFERENCES.....	109
VITA.....	116

LIST OF TABLES

TABLES	PAGE
1.1 Maximum Residue Limits (MRLs) of macrolide antibiotics in food-producing animal.....	2
1.2 Macrolide antibiotic compounds classification.....	4
1.3 The studied macrolide antibiotics properties.....	15
3.1 Multiple Reaction Monitoring (MRM) used in MS/MS analysis.....	51
4.1 Effect of different immersion time on the enrichment factor of ERY, SPI, TIL, and TYL.....	75
4.2 Effect of different organic solvents on enrichment factor of ERY, SPI, TIL, and TYL.....	77
4.3 Effect of different carriers on enrichment factor of ERY, SPI, TIL, and TYL.....	78
4.4 Effect of Aliquat 336 content on enrichment factor of ERY, SPI, TIL, and TYL.....	80
4.5 Effect of donor type on enrichment factor of ERY, SPI, TIL, and TYL.....	81
4.6 Effect of donor pH on enrichment factor of ERY, SPI, TIL, and TYL.....	82
4.7 Effect of acceptor type on enrichment factor of ERY, SPI, TIL, and TYL.....	84
4.8 Effect of acceptor pH on enrichment factor of ERY, SPI, TIL, and TYL.....	85
4.9 Effect of extraction time on enrichment factor of ERY, SPI, TIL, and TYL.....	86
4.10 The optimum conditions of HF-LPME.....	87
4.11 Slope, y-intercept, and correlation coefficient from standard calibration curve of ERY, SPI, TIL and TYL in HF-LPME.....	90
4.12 The limit of detections and limit of quantifications of ERY, SPI, TIL, and TYL in HF-LPME (n=8).....	91
4.13 The enrichment ability of ERY, SPI, TIL and TYL in HF-LPME (n=8).....	92
4.14 Recovery (%) of ERY, SPI, TIL, and TYL in HF-LPME (n=8).....	92
4.15 Relative standard deviation (%R.S.D.) and F-value of ERY, SPI, TIL, and TYL in HF-LPME (n=8).....	93
4.16 Enrichment factors of HF-LPME application in real water analysis.....	95
4.17 Effect of Method I extraction on enrichment factor of ERY, SPI, TIL, and TYL.....	97

TABLES	PAGE
4.18 Effect of Method II extraction on enrichment factor of ERY, SPI, TIL, and TYL.....	98
4.19 Effect of Method III extraction on enrichment factor of ERY, SPI, TIL, and TYL.....	99
4.20 Effect of Method IV extraction on enrichment factor of ERY, SPI, TIL, and TYL.....	100
4.21 Effect of Method V extraction on enrichment factor of ERY, SPI, TIL, and TYL.....	101
4.22 Method performance of ERY, SPI, TIL, and TYL after HF-LPME application in water sample. (n=8).....	102
4.23 Method performance of ERY, SPI, TIL, and TYL after HF-LPME application in poultry sample. (n=8).....	102
5.1 LC-MS/MS condition for the analysis of ERY, SPI, TIL, and TYL.....	103
5.2 Method performance of HF-LPME with LC-MS/MS detection for ERY, SPI, TIL, and TYL.....	105
5.3 Comparison of limits of detection of this work and other publications determining antibiotics in water.....	106

LIST OF FIGURES

FIGURES	PAGE
1.1 Some macrolide antibiotic chemical structures.....	6
1.2 Diagram of macrolide inhibition of protein synthesis within the bacterial ribosome.....	7
2.1 Hollow fiber membrane.....	19
2.2 Diagram of basic HF-LPME principle.....	19
2.3 Two-phase cross-section diagram of HF-LPME in the aqueous sample....	20
2.4 Three-phase cross-section diagram of HF-LPME in the aqueous sample..	23
2.5 Three-phase extraction mechanism in HF-LPME for basic analyte.....	25
2.6 Some carriers in carrier-mediated HF-LPME.....	27
2.7 Carrier-mediated HF-LPME mechanism.....	27
2.8 HF-LPME technical set-up in U-shaped configuration.....	33
2.9 Alternative HF-LPME technical set-up in U-shaped configuration.....	34
2.10 HF-LPME technical set-up in rod-like configuration.....	34
2.11 Schematic diagram of a typical HPLC instrument.....	35
2.12 Acquity TM UPLC column.....	39
2.13 Schematic diagram of MS system.....	40
2.14 Atmospheric pressure electrospray ionization process.....	41
2.15 Atmospheric pressure chemical ionization process.....	42
2.16 Quadrupole mass analyzer.....	44
2.17 Time-of-flight mass analyzer.....	44
2.18 Electron multiplier tube.....	45
2.19 Photo multiplier tube.....	45
2.20 Triple quadrupole mass analyzer (QqQ).....	46
3.1 The studied HF-LPME configuration.....	52
4.1 The influence of immersion time on enrichment factor.....	76
4.2 The influence of organic solvent type on enrichment factor.....	77
4.3 The influence of carrier type on enrichment factor.....	79
4.4 Mechanism of carrier-mediated mode in this work.....	79
4.5 The influence of Aliquat 336 content on enrichment factor.....	80
4.6 The influence of donor type on enrichment factor.....	81
4.7 The influence of donor pH on enrichment factor.....	83
4.8 The influence of acceptor type on enrichment factor.....	84

FIGURES	PAGE
4.9 The influence of acceptor pH on enrichment factor.....	85
4.10 The influence of extraction time on enrichment factor.....	87
4.11 Standard calibration curve of erythromycin (ERY) in HF-LPME analysis	88
4.12 Standard calibration curve of spiramycin (SPI) in HF-LPME analysis.....	89
4.13 Standard calibration curve of tilimicosin (TIL) in HF-LPME analysis.....	89
4.14 Standard calibration curve of tylosin (TYL) in HF-LPME analysis.....	90
4.15 Example LC-ESI-MS/MS chromatogram of ERY, SPI, TIL and TYL spiking 20 µg/L in water sample after HF-LPME method at MS quantification and conformation transition.	95
5.1 Schematic diagram of HF-LPME procedure with optimized condition.....	104

LIST OF SYMBOLS AND ABBREVIATIONS

%	percentage
°C	degree Celsius
ACN	acetonitrile
Aliquat 336	tricaprylmethylammonium chloride
AP-ESI	atmospheric pressure electrospray ionization
APCI	atmospheric pressure chemical ionization
ASE	accelerated liquid extraction
cm	centimeter
CE	capillary electrophoresis
D2EHPA	di(2-ethylhexyl)phosphoric acid
DAD	diode array detector
DC	direct current
DHE	di-n-hexyl ether
EE	extraction efficiency
EF	enrichment factor
ERY	erythromycin
EU	The European Union
eV	electron volt
g	gram
GC	gas chromatography
HF-LPME	hollow-fiber liquid-phase microextraction
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
I.D.	internal diameter
K	partition coefficient
K _{ow}	octanol-water partition coefficient

kV	kilovolt
L/h	liter per hour
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LIX 84	2-hydroxy-5-nonylacetophenone oxime
LLE	liquid-liquid extraction
LODs	limit of detections
LOQs	limit of quantifications
LPME	liquid-phase microextraction
M	molar
m/z	mass per charge ratio
mg/L	milligram per liter
min	minute
mL	milliliter
mL/min	milliliter per minute
mm	millimeter
MMLLE	microporous membrane liquid-liquid extraction
MRLs	maximum residue limits
MRM	multiple reaction monitoring
MS	mass spectrometry
MS/MS	tandem mass spectrometry
Pa	Pascal
pKa	power of acid dissociation constant
PLE	pressurized liquid extraction
psi	pound per square inch
PTFE	polytetrafluoro ethylene
QqQ	triple quadrupole mass analyzer
R.S.D.	relative standard deviation

R^2	correlation coefficient
RF	radio frequency
S.D.	standard deviation
S/N	signal to noise ratio
SDME	single-drop microextraction
SIM	selected ion monitoring
SLM	supported liquid membrane
SPE	solid-phase extraction
SPI	spiramycin
TCA	trichloroacetic acid
TIL	tilmicosin
TOF	time-of-flight mass analyzer
TYL	tylosin
UPLC	ultra performance liquid chromatography
UV	ultraviolet
v/v	volume by volume
$\mu\text{g/kg}$	microgram per kilogram
$\mu\text{g/L}$	microgram per liter
μL	microliter
μm	micrometer