# ไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีร่วมกับการตรวจวัดด้วยเทคนิคพัลส์แอมเพอโรเมทริก สำหรับการหาปริมาณยาปฏิชีวนะกลุ่มเททระไซคลินในกุ้ง

นางสาว ธีระภรณ์ เจริญรักษ์





วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-53-1359-9

# HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH PULSED AMPEROMETRIC DETECTION FOR THE DETERMINATION OF TETRACYCLINE ANTIBIOTICS IN SHRIMPS

Miss Thiraporn Charoenraks



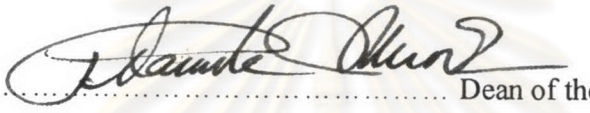
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Chemistry
Department of Chemistry
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2004

ISBN 974-53-1359-9

| | |
|---|---|
| Thesis Title | High performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection for the determination of tetracycline antibiotics in shrimps |
| By | Miss Thiraporn Charoenraks |
| Field of Study | Chemistry |
| Thesis Advisor | Associate Professor Orawon Chailapakul, Ph.D. |

---

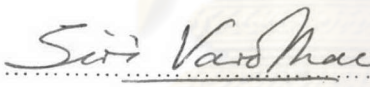
Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree



..... Dean of the Faculty of Science

(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE



.....Chairman

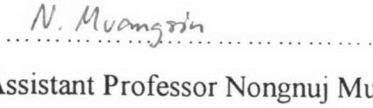
(Associate Professor Siri Varothai, Ph.D.)

.....Thesis Advisor

(Associate Professor Orawon Chailapakul, Ph.D.)

.....Member

(Assistant Professor Kanyarat Kalampakorn, M.Sc.)



.....Member

(Assistant Professor Nongnuj Muangsin, Ph.D.)

ธีระภรณ์ เจริญรักษ์ : ไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีร่วมกับการตรวจวัดด้วยเทคนิคพัลส์แอมเพอโรเมทริกสำหรับการหาปริมาณยาปฏิชีวนะกลุ่มเททระไซคลินในกุ้ง (HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH PULSED AMPEROMETRIC DETECTION FOR THE DETERMINATION OF TETRACYCLINE ANTIBIOTICS IN SHRIMPS) อาจารย์ที่ปรึกษา: รศ. ดร. อรวรรณ ชัยลภากุล; 83 หน้า. ISBN 974-53-1359-9

ในงานวิจัยทำการศึกษาปฏิกิริยาออกซิเดชันของเททระไซคลิน ออกซิเททระไซคลิน คลอเททระไซคลินและดอกซิไซคลินโดยใช้ขั้วไฟฟ้าทองและขั้วไฟฟ้าแอโนไดซ์โบรอนโดปไดมอนด์ โดยใช้การตรวจวัดแบบไซคลิกโวลแทมเมทรี พบว่าขั้วไฟฟ้าทั้งสองชนิดให้ผลของไซคลิกโวลแทมโมแกรมที่ชัดเจน ได้ทำการศึกษาตัวแปรที่เหมาะสมของเทคนิค PAD เมื่อใช้ขั้วไฟฟ้าทั้งสองชนิดโดยใช้ระบบ HPLC สภาวะของระบบ HPLC คือ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ pH 2.5 และอะซิโทไนไตรล์ ในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 โดยปริมาตรและคอลัมน์ที่ใช้คือ $C_{18}$ ที่อัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที ณ อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการศึกษาเทคนิค HPLC-PAD สำหรับวิเคราะห์สารกลุ่มเททระไซคลินโดยใช้ขั้วไฟฟ้าทั้งสองชนิด พบว่าขั้วไฟฟ้าแอโนไดซ์โบรอนโดปไดมอนด์ให้ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดที่ต่ำกว่า ให้ช่วงการตรวจวัดที่เป็นเส้นตรงกว้างกว่า และให้ความไวสูงกว่าขั้วไฟฟ้าทอง ตัวแปร PAD ที่เหมาะสมเมื่อใช้ขั้วไฟฟ้าแอโนไดซ์โบรอนโดปไดมอนด์ได้แก่ ศักย์ไฟฟ้าที่ตรวจวัด 1.5 โวลต์เป็นเวลา 290 มิลลิวินาทีศักย์ไฟฟ้าที่ออกซิเดชัน 2 โวลต์ เป็นเวลา 200 มิลลิวินาที และศักย์ไฟฟ้ารีดักชัน 0.4 โวลต์ เป็นเวลา 200 มิลลิวินาที เทคนิค HPLC-PAD สามารถวิเคราะห์หาปริมาณยาปฏิชีวนะกลุ่มเททระไซคลินในกุ้งได้ ความเข้มข้นในการตรวจวัดที่เป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.1-100 พีพีเอ็ม ที่ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด 0.01-0.05 พีพีเอ็ม ค่าการคืนกลับอยู่ในช่วง 75.0 ถึง 98.4 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการประยุกต์ใช้กับตัวอย่างกุ้งโดยผลที่ได้จากวิธีที่เสนอให้ค่าการคืนกลับสูงกว่ากับวิธีที่วัดตามมาตรฐานเอโอเอซี



ภาควิชา .....เคมี..... ลายมือชื่อนิสิต.....ธีระภรณ์ เจริญรักษ์.....
สาขาวิชา..... เคมี..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....อรวรรณ ชัยลภากุล.....
ปีการศึกษา.....2547..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

## 457 23260 23 : MAJOR CHEMISTRY

KEY WORD: TETRACYCLINES / PULSED AMPEROMETRIC DETECTION / HPLC / SHRIMP

THIRAPORN CHAROENRAKS: HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH PULSED AMPEROMETRIC DETECTION FOR THE DETERMINATION OF TETRACYCLINE ANTIBIOTICS IN SHRIMPS. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. ORAWON CHAILAPAKUL, Ph. D., 83 pp.

ISBN 974-53-1359-9

The oxidation of tetracyclines; i.e. tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline and doxycycline was investigated at Au and anodized BDD electrodes using cyclic voltammetry. It was found that tetracyclines provided well-defined cyclic voltammogram at both electrodes. The PAD waveform parameters were optimized at both Au and anodized BDD electrodes by HPLC system. The HPLC conditions were carried out using the mobile phase of phosphate buffer (0.01M, pH 2.5) - acetonitrile (80:20; v/v) on a $C_{18}$ column at a flow rate of 1.0 mL/min at room temperature. The analytical performance of the Au and anodized BDD electrodes was examined by HPLC-PAD. It was found that the anodized BDD electrode provided lower detection limit, wider linear range and higher sensitivity than the Au electrode. The optimal PAD waveform parameters at the anodized BDD were 1.5 V detection potential ($E_{det}$) for 290 ms (200 ms delay time and 90 ms integration time), 2.0 V oxidation potential ($E_{oxd}$) for 200 ms oxidation time ($t_{oxd}$) and 0.4 V reduction potential ($E_{red}$) for 200 ms reduction time ($t_{red}$). HPLC-PAD with the anodized BDD electrode has been successfully applied to determine tetracycline antibiotics in shrimps. The linear concentration range of tetracyclines was 0.1 to 100 ppm with the detection limit of 0.01-0.05 ppm. The recovery was in the range of 75.0 - 98.4% with RSD < 10%. The proposed method was applied to analyse tetracyclines in shrimp samples. The results from proposed method gave higher % recovery than those obtained by AOAC official method.

Department.....Chemistry.....Student's signature.....Thiraporn Charoenraks.....

Field of study.....Chemistry..... Advisor's signature.....Orawon Chailapakul.....

Academic year ..... 2004..... Co-advisor's signature .....

# ACKNOWLEDGEMENT

I wish to express my deep gratitude and appreciation to my advisor, Associate Professor Dr. Orawon Chailapakul for her suggestions, encouragement and warmly supervision throughout the course of this research. My grateful acknowledgement is sincerely made to the thesis committee who gave their valuable comments, advice and corrections of this thesis.

I would like to thank Ms. Ornthida Kow for her help in using HPLC agilent HP1100 and her useful suggestion.

I am impressed as my memory and thankfulness to all members of the Electrochemical Research Group for their wonderful friendship, suggestion and encouragement.

Finally, I would like to dedicate my successful graduation to my parents and also express my sincerest gratitude to them for their encouragement and understanding. Thanks are also extended to my friends who give me tremendous moral and social support.

# CONTENTS

PAGE

PAGE

# LIST OF TABLES

**TABLE** **PAGE**

# LIST OF FIGURES

**FIGURE** **PAGE**



**APPENDICES**

**FIGURE** **PAGE**

# LIST OF ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

| | |
|---|---|
| TCs | Tetracyclines |
| TC | Tetracycline |
| OTC | Oxytetracycline |
| CTC | Chlortetracycline |
| DC | Doxycycline |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |
| PAD | Pulsed Amperometric Detection |
| GC | Gas Chromatography |
| TLC | Thin-Layer Chromatography |
| CE | Capillary Electrophoresis |
| FIA | Flow injection analysis |
| AOAC | Association of Official Analytical Method |
| BDD | Boron-Doped Diamond Electrode |
| SPE | Solid-phase extraction |
| Au | Gold |
| mg | milligram |
| mL | milliliter |
| kg | kilogram |
| µm | micrometer |
| µg | microgram |
| i.d. | Internal diameter |
| $R^2$ | Correlation coefficient |
| LOD | Limit of Detection |
| LOQ | Limit of Quantitation |
| i | current (A) |
| $i_{pa}$ | anodic peak current (A) |
| $i_{pc}$ | cathodic peak current (A) |
| $E_{pa}$ | anodic peak potential (V) |
| $E_{pc}$ | cathodic peak potential (V) |
| $E_{det}$ | Detection potential (V) |
| $E_{oxd}$ | Oxidation potential (V) |

| | |
|---|---|
| $E_{red}$ | Reduction potential (V) |
| $t_{int}$ | Integration time (sec) |
| $t_{del}$ | Delay time (sec) |
| $t_{oxd}$ | Oxidation time (sec) |
| $t_{red}$ | Reduction time (sec) |
| LCFA | Laboratory Center for Food and Agricultural Products Co., Ltd. |
| r.p.m. | revolution per minute |