

ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิดควิดโครมาโทกราฟีร่วมกับการตรวจวัดด้วยเทคนิคพัลส์แอมเพอโรเมตริก
สำหรับการหาปริมาณยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตระไซคลินในกุ้ง

นางสาว อีระภรณ์ เจริญรักษ์



ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-53-1359-9

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Miss Thiraporn Charoenraks



ศูนย์วิทยทรัพยากร

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

ธีระภรณ์ เจริญรักษ์ : ไฮเพอร์ฟอร์มาแมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีร่วมกับการตรวจวัดด้วย
เทคนิคพัลส์แอมเพอโรเมตริกสำหรับการหาปริมาณยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตระไซคลินในกุ้ง
(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

ในงานวิจัยทำการศึกษาปฏิกิริยาออกซิเดชันของเตตระไซคลิน ออกซิเตตระไซคลิน คลอเตตระไซคลินและดอกซิไซคลินโดยใช้ขั้วไฟฟ้าทองและขั้วไฟฟ้าแอนโนไดซ์โบรอนโดปโดมอนด์ โดยใช้การตรวจวัดแบบไซคลิกโวลแทมเมตรี พบว่าขั้วไฟฟ้าทั้งสองชนิดให้ผลของไซคลิกโวลแทมโมแกรมที่ชัดเจน ได้ทำการศึกษาดัชนีที่เหมาะสมของเทคนิค PAD เมื่อใช้ขั้วไฟฟ้าทั้งสองชนิดโดยใช้ระบบ HPLC สภาพของระบบ HPLC คือ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ pH 2.5 และอะซิโตนไนไตรล์ ในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 โดยปริมาตรและคอลัมน์ที่ใช้คือ C₁₈ ที่อัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที ณ อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการศึกษาเทคนิค HPLC-PAD สำหรับวิเคราะห์สารกลุ่มเตตระไซคลินโดยใช้ขั้วไฟฟ้าทั้งสองชนิด พบว่าขั้วไฟฟ้าแอนโนไดซ์โบรอนโดปโดมอนด์ให้ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดที่ต่ำกว่า ให้ช่วงการตรวจวัดที่เป็นเส้นตรงกว้างกว่า และให้ความไวสูงกว่าขั้วไฟฟ้าทอง ตัวแปร PAD ที่เหมาะสมเมื่อใช้ขั้วไฟฟ้าแอนโนไดซ์โบรอนโดปโดมอนด์ได้แก่ ศักย์ไฟฟ้าที่ตรวจวัด 1.5 โวลต์เป็นเวลา 290 มิลลิวินาที ศักย์ไฟฟ้าที่ออกซิเดชัน 2 โวลต์ เป็นเวลา 200 มิลลิวินาที และศักย์ไฟฟ้ารีดักชัน 0.4 โวลต์ เป็นเวลา 200 มิลลิวินาที เทคนิค HPLC-PAD สามารถวิเคราะห์หาปริมาณยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตระไซคลินในกุ้งได้ ความเข้มข้นในการตรวจวัดที่เป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.1-100 พีพีเอ็ม ที่ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด 0.01-0.05 พีพีเอ็ม ค่าการคืนกลับอยู่ในช่วง 75.0 ถึง 98.4 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการประยุกต์ใช้กับตัวอย่างกุ้งโดยผลที่ได้จากวิธีที่เสนอให้ค่าการคืนกลับสูงกว่ากับวิธีที่วัดตามมาตรฐานเอไอเอซี

ภาควิชาเคมี..... ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา.....เคมี..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
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 C₁₈ 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.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

	PAGE
ABSTRACT (IN THAI).....	iv
ABSTRACT (IN ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENT.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	x
LIST OF FIGURES.....	xii
LIST OF ABBREVIATIONS AND SYMBOLS.....	xv
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
1.1 Introduction.....	1
1.2 Literature reviews.....	3
1.3 The Objective of The Study.....	6
CHAPTER II THEORY.....	7
2.1 Tetracyclines.....	7
2.1.1 Applications of Tetracyclines.....	7
2.1.1.1 Human Therapy.....	7
2.1.1.2 Veterinary Medicine.....	7
2.1.1.3 Animal Growth Promoter.....	8
2.2 Shrimp farming.....	8
2.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	10
2.3.1 The HPLC Instrument.....	10
2.3.1.1 Mobile phase reservoirs.....	10
2.3.1.2 Pump.....	10
2.3.1.3 Sample injector.....	11
2.3.1.4 Column.....	11
2.3.1.5 Detector.....	11
2.4 Electroanalytical Chemistry.....	11
2.4.1 Potentiometry.....	11
2.4.2 Voltammetry.....	12
2.4.3 Cyclic Voltammetry.....	12

	PAGE
2.4.4 Amperometry.....	13
2.4.5 Pulsed Amperometric Detection (PAD).....	14
2.5 Solid-Phase Extraction (SPE).....	15
2.5.1 Mechanisms of SPE.....	16
2.5.1.1 Reversed Phase SPE.....	16
2.5.1.2 Normal Phase SPE.....	16
2.5.1.3 Ion Exchange SPE.....	16
2.5.2 Steps of SPE.....	18
CHAPTER III EXPERIMENTAL.....	20
3.1 Chemical Reagents.....	20
3.2 Instruments and Equipments.....	20
3.3 Preparation of chemical solutions.....	22
3.3.1 Stock Standard Solutions.....	22
3.3.2 Working Standard Solutions.....	22
3.3.3 Preparation of Mobile Phase.....	22
3.3.4 Preparation of Na ₂ EDTA-McIlvaine Buffer.....	23
3.3.5 Sample Preparation.....	23
3.4 Preparation of Anodized BDD Electrode.....	23
3.5 Cyclic Voltammetric Study.....	24
3.5.1 Cyclic Voltammetry at Au Electrode.....	24
3.5.2 Cyclic Voltammetry at Anodized BDD Electrode.....	24
3.6 PAD Optimization.....	24
3.7 HPLC Optimization.....	25
3.8 Calibration and Linearity.....	25
3.9 Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantitation (LOQ).....	25
3.10 Precision and Accuracy.....	26
3.11 Applications.....	26
3.12 AOAC Official Method (995.09).....	26
3.12.1 Preparation of Chemical Solutions.....	26
3.12.1.1 Preparation of Mobile Phase.....	26

	PAGE
3.12.1.2 Preparation of McIlvaine buffer-EDTA solution.....	27
3.12.1.3 Preparation of Methanolic acid.....	27
3.12.2 sample Preparation.....	27
CHAPTER IV RESULTS AND DISCUSSION.....	28
4.1 Cyclic Voltammetric Study.....	28
4.2 PAD Optimization.....	30
4.3 Optimal HPLC Conditions.....	38
4.4 Calibration and Linearity.....	40
4.5 Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantitation (LOQ).....	44
4.6 Accuracy and Precision.....	44
4.7 Applications.....	49
4.7.1 Comparison of Using the Au and Anodized BDD Electrode.....	49
4.7.2 Comparison of Methods between the HPLC-PAD and the AOAC Official Method.....	50
4.7.3 Determination of TCs in commercial shrimps.....	54
CHAPTER V CONCLUSIONS AND FUTURE WORK.....	55
5.1 Conclusions.....	55
5.2 Future Work.....	56
REFERENCES.....	57
APPENDICES.....	63
APPENDIX A.....	64
APPENDIX B.....	67
APPENDIX C.....	71
APPENDIX D.....	81
BIOGRAPHY.....	83

LIST OF TABLES

TABLE	PAGE
CHAPTER VI RESULTS AND DISCUSSION	
4.1 Optimal PAD waveform parameters for the developed method at the Au electrode and the anodized BDD electrode.....	31
4.2 The HPLC conditions for the detection of 4 tetracyclines.....	38
4.3 Retention time and resolution of 4 tetracyclines under HPLC conditions in Table 4.2.....	38
4.4 Calibration characteristics of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline by the HPLC conditions and the optimal PAD waveform parameters in Table 4.1 at the Au electrode.....	40
4.5 Calibration characteristics of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline by the HPLC conditions and the optimal PAD waveform parameters in Table 4.1 at the anodized BDD electrode.....	41
4.6 The limit of detection and limit of quantitation of OTC, TC, CTC and DC.....	44
4.7 % Recovery of OTC, TC, CTC and DC at the spiking level 0.5, 1.0, 5.0 and 10 mg/kg in shrimp sample in the first day (n=3)	45
4.8 % Recovery of OTC, TC, CTC and DC at the spiking level of 0.5, 1.0, 5.0 and 10 mg/kg in shrimp sample in the second day (n=3).....	46
4.9 % Recovery of OTC, TC, CTC and DC at the spiking level of 0.5, 1.0, 5.0 and 10 mg/kg in shrimp sample in the third day (n=3).....	47
4.10 % Recovery of OTC, TC, CTC and DC at the spiking level of 0.5, 1.0, 5.0 and 10 mg/kg in shrimp sample for 3 days (inter-day precision, n=3).....	48
4.11 Accuracy of the developed method at the spiking level of 0.5, 1.0, 5.0 and 10 mg/kg.....	49
4.12 The results of determination of TCs by the developed method using the Au and the anodized BDD electrodes.....	49
4.13 Comparison of %recovery of spiked sample between the HPLC-PAD method and the AOAC Official method for shrimp ^a	52

TABLE	PAGE
4.14 Comparison of %recovery of spiked sample between the HPLC-PAD and the AOAC Official method for shrimp ^a	53
4.15 The comparison of TCs in the farming shrimp.....	54
4.16 The comparison of TCs in the sea shrimp.....	54



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
CHAPTER I INTRODUCTION	
1.1 Structures of 4 tetracyclines.....	2
CHAPTER II THEORY	
2.1 Thailand's exports of frozen shrimp in terms of quantity (Metric ton) and values (million baht).....	9
2.2 Major export markets for Thai frozen shrimp in 2001.....	9
2.3 Potential-time waveforms are used in various electroanalytical techniques. Waveforms based on (a) square, (b) linear, and (c) triangular potential-time patterns are used in square wave, linear sweep, and cyclic voltammetry, respectively.....	12
2.4 The current-potential (i-E) plot is called a cyclic voltammogram.....	13
2.5 Amperometry (E-t) waveform.....	14
2.6 Typical PAD waveform.....	15
2.7 Three formats of SPE.....	15
2.8 Mechanisms of SPE systems; (a) Reversed-phase, (b) Normal-phase and (c) Ion-exchange SPE.....	17
2.9 Steps of solid-phase extraction.....	19
CHAPTER IV RESULTS AND DISCUSSION	
4.1 Cyclic voltammograms for 1 mM tetracycline (line b) in 0.01 M phosphate buffer (pH 2.5) – acetonitrile (80:20, v/v) at (A) Au electrode and (B) anodized BDD electrode. The sweep rate was 50 mV/s. Background voltammograms are also shown in the figure (line a).....	29
4.2 HPLC-PAD response as a function of (a) E_{det} , (b) t_{del} and (c) t_{int} for 5 ppm of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline at the Au electrode.....	32
4.3 HPLC-PAD response as a function of E_{oxd} , and t_{oxd} for 5 mg/kg of (a) oxytetracycline (OTC), (b) tetracycline (TC), (c) chlortetracycline (CTC) and (d) doxycycline (DC) at the Au electrode.....	33

FIGURE	PAGE
4.4 HPLC-PAD response as a function of E_{red} and t_{red} for 5 ppm of (a) oxytetracycline (OTC), (b) tetracycline (TC), (c) chlortetracycline (CTC) and (d) doxycycline (DC) at the Au electrode.....	34
4.5 HPLC-PAD response as a function of (a) E_{det} , (b) t_{del} and (c) t_{int} for 5 ppm of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline at the anodized BDD electrode.....	35
4.6 HPLC-PAD response as a function of E_{oxd} and t_{oxd} for 5 ppm of (a) oxytetracycline (OTC), (b) tetracycline (TC), (c) chlortetracycline (CTC) and (d) doxycycline (DC) at the anodized BDD electrode.....	36
4.7 HPLC-PAD response as a function of E_{red} and t_{red} for 5 ppm of (a) oxytetracycline (OTC), (b) tetracycline (TC), (c) chlortetracycline (CTC) and (d) doxycycline (DC) at the anodized BDD electrode.....	37
4.8 HPLC-PAD chromatograms of a standard mixture containing 10 $\mu\text{g/mL}$ concentrations of OTC, TC, CTC and DTC (a) and a shrimp sample spiked with 10 $\mu\text{g/mL}$ of OTC, TC, CTC and DTC (b).....	39
4.9 The calibration curve of mixed standard solutions by HPLC-PAD using the Au electrode (a) OTC, (b) TC, (c) CTC and (d) DC.....	42
4.10 The calibration curve of mixed standard solutions by HPLC-PAD using the anodized BDD electrode (a) OTC, (b) TC, (c) CTC and (d) DC.....	43
4.11 HPLC chromatogram of shrimp sample spiked with mixed standard 0.5 mg/kg using HPLC-PAD method.....	51
4.12 HPLC chromatogram of shrimp sample spiked with mixed standard 0.5 mg/kg using AOAC official method.....	51
APPENDICES	
A-1 Cyclic voltammograms for 1 mM oxytetracycline (line b) in 0.01 M phosphate buffer (pH 2.5) – acetonitrile (80:20, v/v) at (A) Au electrode and (B) anodized BDD electrode. The sweep rate was 100 mV/s. Background voltammograms are also shown in the figure (line a).....	64
A-2 Cyclic voltammograms for 1 mM chlortetracycline (line b) in 0.01 M phosphate buffer (pH 2.5) – acetonitrile (80:20, v/v) at (A) Au electrode and (B) anodized BDD electrode. The sweep rate was 100 mV/s. Background voltammograms are also shown in the figure (line a).....	65

FIGURE	PAGE
A-3 Cyclic voltammograms for 1 mM doxycycline (line b) in 0.01 M phosphate buffer (pH 2.5) – acetonitrile (80:20, v/v) at (A) Au electrode and (B) anodized BDD electrode. The sweep rate was 100 mV/s. Background voltammograms are also shown in the figure (line a).....	66
B-1 HPLC chromatogram of blank sample (farming shrimp) using AOAC official method.....	67
B-2 HPLC chromatogram of blank sample (farming shrimp) using AOAC official method.....	68
B-3 HPLC chromatogram of sample spiked with mixed standard 0.5 mg/kg using AOAC official method.....	69
B-4 HPLC chromatogram of sample spiked with mixed standard 1.0 mg/kg using AOAC official method.....	70
C-1 HPLC chromatograms of Shrimp Sample 1(February 17, 2005, farming shrimp) (a) oxytetracycline, (b) tetracycline and (c) chlortetracycline.....	72
C-2 HPLC chromatograms of Shrimp Sample 1(February 28, 2005, sea shrimp) of oxyteraycline ($t_R = 3.635$ min).....	73
C-3 HPLC chromatograms of Shrimp Sample 1(February 28, 2005, sea shrimp) of chlorteraycline ($t_R = 6.361$ min); Found chlortetracycline = 0.07 mg/kg.....	74
C-4 HPLC chromatograms of Shrimp Sample 1(February 28, 2005, sea shrimp) of tetracycline ($t_R = 3.401$ min).....	75
C-5 HPLC chromatograms of Shrimp Sample 1(February 28, 2005, sea shrimp) spiking oxytetracycline at the level 0.06 mg/kg ($t_R = 4.429$ min). %Recovery = 75%.....	76
C-6 HPLC chromatograms of Shrimp Sample 1(February 28, 2005, sea shrimp) spiking tetracycline at the level 0.08 mg/kg ($t_R = 3.386$ min). %Recovery = 74%.....	77
C-7 HPLC chromatograms of Shrimp Sample 1(February 28, 2005, sea shrimp) spiking chlortetracycline at the level 0.1 mg/kg ($t_R = 6.365$ min). %Recovery = 72%.....	78

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



ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย