เกศรา อายานอก : การสกัดแบบใช้สารน้อยด้วยของแข็งโมโนลิธในปิเปตทิปร่วมกับโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงสำหรับการหาปริมาณแรคโตพามีนและเคลนบูเทอรอลในตัวอย่างปัสสาวะและเนื้อสัตว์ (IN-PIPETTE TIP MONOLITHIC MICRO SOLID PHASE EXTRACTION COUPLED WITH HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF RACTOPAMINE AND CLENBUTEROL IN ANIMAL URINE AND MEAT SAMPLES) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พัชรินทร์ ชัยสุวรรณ, 82 หน้า

แรคโตพามีนและเคลนบูเทอรอลเป็นสารกลุ่มเบตาอะโกนิสท์ ซึ่งถูกจัดเป็นสารพิษที่มีการลักลอบใช้งานอย่างผิดกฎหมายโดยเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ในประเทศไทย เพื่อลดปริมาณไขมันและเพิ่มปริมาณเนื้อแดงในสัตว์ เนื่องจากความเป็นพิษของสารกลุ่มนี้ทำให้วิธีวิเคราะห์เพื่อควบคุมคุณภาพของอาหารและป้องกันการลักลอบใช้งานของแรคโตพามีนและเคลนบูเทอรอลในการปศุสัตว์มีความจำเป็นอย่างยิ่ง ในงานวิจัยนี้พัฒนาการสกัดแบบใช้สารน้อยด้วยของแข็งโมโนลิธในปิเปตทิปร่วมกับโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงสำหรับการหาปริมาณแรคโตพามีนและเคลนบูเทอรอลในตัวอย่างปัสสาวะและเนื้อสัตว์ โดยทำการแยกบนซิลิกาคอลัมน์ที่ดัดแปลงให้มีหมู่ฟังก์ชันเป็น C_8 และเฟสเคลื่อนที่เป็น 25% (v/v) อะซิโตรไนไทรล์ในอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์พีเอช 4.0 ที่มีไตรเอทิลอะมีนความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ที่สภาวะการแยกดังกล่าวสารทั้งสองสามารถแยกจากกันได้ในเวลา 7 นาที ตัวดูดซับโมโนลิธสำหรับการสกัดสังเคราะห์จากกรดเมทาอคริลิก (Methacrylic acid) ซึ่งทำหน้าที่กำหนดคุณสมบัติทางเคมี และเอทิลีน ไกลคอล ไดเมทาคริเลท (Ethylene glycol dimethacrylate) ที่เป็นตัวเชื่อมโยงโครงสร้างโมโนลิธในออโตปิเปตทิป โดยการสังเคราะห์มีองค์ประกอบและสภาวะที่เหมาะสมคือ อัตราส่วนมอนอเมอร์ต่อตัวทำละลายเท่ากับ 18:82 และทำการพอลิเมอร์ไรด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง 10 นาที โมโนลิธในปิเปตทิปนี้ได้ถูกเชื่อมต่อเข้ากับวาล์แบบสามทางและกระบอกฉีดยาเพื่อใช้สำหรับการสกัด จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมพบว่า 10% (v/v) อะซิโตรไนไทรล์ในน้ำ (ปริมาตร 800 ไมโครลิตร) และ 30% (v/v) อะซิโตรไนไทรล์ในอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์พีเอช 4.0 (ปริมาตร 150 ไมโครลิตร) เป็นสารละลายที่เหมาะสมสำหรับขั้นตอนการล้างและชะสารตามลำดับ ความเที่ยงของการเตรียมโมโนลิธในปิเปตทิปเปรียบเทียบระหว่างการเตรียมในชุดเดียวกันและระหว่างชุด จากประสิทธิภาพการสกัดพบว่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์มีค่าน้อยกว่า 3.18 และความเที่ยงในการวิเคราะห์ที่คำนวณจากพื้นที่ใต้พีคของสารภายในวันเดียวกันและระหว่างวันมีค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

น้อยกว่า 3.26 ความจุของวัสดุโมโนลิธสำหรับแรคโตพามีนและเคลนบูเทอรอลมีค่ามากกว่า 10 และ 20 ไมโครกรัมตามลำดับ การสกัดแบบใช้สารน้อยด้วยของแข็งโมโนลิธในปิเปตทิปสามารถใช้งานซ้ำได้อย่างน้อย 10 ครั้ง โดยยังคงมีประสิทธิภาพการสกัดที่ดีและสามารถเก็บได้ที่อุณหภูมิห้องนานกว่า 6 เดือน สำหรับการโหลดตัวอย่างปริมาตร 2.00 มิลลิลิตรและใช้สารละลายสำหรับชะปริมาตร 150 ไมโครลิตร สามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารทั้งสองได้ถึง 12 และ 13 เท่า มีประสิทธิภาพการสกัดร้อยละ 92 และ 100 และมีขีดจำกัดการตรวจวัดเท่ากับ 1.3 และ 0.2 ไมโครกรัมต่อลิตรสำหรับแรคโตพามีนและเคลนบูเทอรอลตามลำดับ การสกัดแบบใช้สารน้อยด้วยของแข็งโมโนลิธในปิเปตทิปร่วมกับโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงได้ประยุกต์ใช้สำหรับการหาปริมาณแรคโตพามีนและเคลนบูเทอรอลที่เติมลงในตัวอย่างปัสสาวะและเนื้อสัตว์ พบว่ามีค่าร้อยละการคืนกลับที่ดีในช่วง 84-114 สำหรับตัวอย่างปัสสาวะสัตว์และ 89-112 สำหรับตัวอย่างเนื้อสัตว์ วิธีการสกัดแบบใช้สารน้อยด้วยของแข็งร่วมกับโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงนี้ใช้เวลาในการวิเคราะห์เพียง 12 นาทีต่อตัวอย่าง ตัวสกัดแบบใช้สารน้อยด้วยของแข็งโมโนลิธช่วยลดเวลา ปริมาตรตัวอย่างและสารละลายในกระบวนการสกัดอย่างมีนัยสำคัญ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเคมี ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ปีการศึกษา 2561 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

KESARA AR-SANORK : IN-PIPETTE TIP MONOLITHIC MICRO SOLID PHASE EXTRACTION COUPLED WITH HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF RACTOPAMINE AND CLENBUTEROL IN ANIMAL URINE AND MEAT SAMPLES. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. PATCHARIN CHAISUWAN, Ph.D. 82 PP.

MICRO SOLID PHASE EXTRACTION/MONOLITH/BETA-AGONISTS/ RACTOPAMINE/CLENBUTEROL

Ractopamine (RAC) and clenbuterol (CLEN) are two common β-agonists illegally used by Thai farmers to reduce fat and increase muscle mass in animal producing. As the residues of these compounds can cause the serious problems in human health, the analytical method for determination of these compounds is thus necessary for controlling food quality and preventing the use of the β-agonists in livestock. In this research, in-pipette tip monolithic micro-solid phase extraction (μ-SPE) off-line coupled with high performance liquid chromatography (HPLC) was developed for determination of RAC and CLEN in animal urine and meat samples. Rapid separation was carried out on silica-based C_8 column with optimum mobile phase of 25% (v/v) acetonitrile (ACN) in 20 mM acetate buffer pH 4.0 containing 2 mM triethylamine. RAC and CLEN could be separated within 7 min. Monolithic sorbent for the extraction, was *in-situ* synthesized from methacrylic acid as a functional monomer and ethylene glycol dimethacrylate as a crosslinker in auto-pipette tip. Monolithic composition of 18:82 (monomer:porogen) with thermal polymerization at 75°C for 1 hr and 10 min was the optimum condition for the synthesis of monolith. The monolith in-pipette tip was assembled with T-way valve

and syringes to perform the extraction. From the optimization, 10% (v/v) ACN in water (800 µL) and 30% (v/v) ACN in 200 mM acetate buffer pH 4.0 (150 µL) were the optimum solvents for washing and elution steps, respectively. The precision (%RSD) for the extraction efficiency from tip-to-tip and batch-to-batch preparations were less than 3.18% and inter-day and intra-day precisions of the analysis (calculated from peak area) were less than 3.26%. Capacities of the monolithic material were higher than 10 and 20 µg for RAC and CLEN, respectively. The in-pipette tip monolithic µ-SPE could be reused at least 10 times without loss of the extraction performance and stored at room temperature for at least 6 months. The sample loading of 2.00 mL with eluting volume of 150 µL provided pre-concentration factor of 12 and 13 with extraction efficiency of 92% and 100% and limits of detection of 1.3 and 0.2 µg L^{-1} for RAC and CLEN, respectively. The in-pipette tip monolithic µ-SPE was off-line coupled with HPLC for the determination of RAC and CLEN in spiked animal urine and meat samples. Good recovery was achieved in the range of 84-114% for urine samples and 89-112% for meat samples. Total analysis time for our µ-SPE-HPLC method was 12 minutes/sample. The µ-SPE in pipette tip significantly reduced the time, sample and solvent consumption in the process of extraction.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Chemistry Student's Signature _____

Academic Year 2018 Advisor's Signature _____