



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาวิธีเตรียมตัวอย่างและเพิ่มความเข้มข้นด้วยสารลดแรงตึงผิว
ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
สำหรับการวิเคราะห์ยารักษาสัตว์ตกค้างในอาหาร

ดร.ญาณวรรณ แสนตลาดชัยกิตติ์ และคณะ

มิถุนายน 2556

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การพัฒนาวิธีเตรียมตัวอย่างและเพิ่มความเข้มข้นด้วยสารลดแรงตึงผิว
ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงสำหรับ
การวิเคราะห์ยารักษาสัตว์ตกค้างในอาหาร

คณะผู้วิจัย สังกัด

ดร.ญาณวรรณ แสนตลาดชัยกิตติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน

รศ.ดร. ศุภลักษณ์ ศรีจารนัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการ
การอุดมศึกษา และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. และ สกอ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5480135

ชื่อโครงการ: การพัฒนาวิธีเตรียมตัวอย่างและเพิ่มความเข้มข้นด้วยสารลดแรงตึงผิวร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงสำหรับการวิเคราะห์ยา
รักษาสัตว์ตกค้างในอาหาร

ชื่อนักวิจัย: ดร.ญานวรรณ แสนตลาดชัยกิตติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน
รศ.ดร.ศุภลักษณ์ ศรีจรรย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

อีเมล: sanyanawa@yahoo.com; sanyanawa@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี (15 มิถุนายน 2554 ถึง 15 มิถุนายน 2556)

โครงการวิจัยนี้ ได้พัฒนาวิธีการสกัดแบบจุดขึ้นด้วยอัลตราซาวด์ (UA-CPE) และเทคนิคการสกัดระดับไมโครด้วยอัลตราซาวด์ และสารลดแรงตึงผิวช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเกิดอิมัลชัน (UASEME) สำหรับการเพิ่มความเข้มข้น และวิเคราะห์ยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมาโซลจำนวน 5 ชนิด (ได้แก่ ไทอะเบนดาโซล ออกเฟนดาโซล มีเบนดาโซล อัลเบนดาโซล และเฟนเบนดาโซล) ในตัวอย่างนม ศึกษาและหาสภาวะที่เหมาะสมของพารามิเตอร์ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดของวิธีการสกัด และเพิ่มความเข้มข้นทั้งสองวิธี โดยศึกษาภายใต้การแยกสารเป้าหมายโดยใช้การชะแบบเกรเดียนต์ของกรดอะซิติกเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และเมทานอล ใช้อัตราการไหลเป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และการตรวจวัดแบบโฟโตไดโอดอาร์เรย์ที่ความยาวคลื่น 296 นาโนเมตร ภายใต้สภาวะการแยกนี้ สามารถแยกสารเป้าหมายได้สมบูรณ์ภายใน 14 นาที ซึ่งสภาวะการสกัดที่เหมาะสมและผลการวิเคราะห์ที่ได้จากวิธี UA-CPE และ UASEME แสดงดังรายละเอียดต่อไปนี้

สภาวะที่เหมาะสมของวิธี UA-CPE คือ ไทรทอนเอกซ์-114 เข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โซเดียมอะซิเตทเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และเวลาการอัลตราโซนิก 2 นาที ภายใต้สภาวะดังกล่าวนี้ ความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 10 – 200 ไมโครกรัมต่อลิตร และให้สัมประสิทธิ์การกำหนด (Coefficient of determination หรือ R^2) มากกว่า 0.995 แพลตฟอร์มเพิ่มความเข้มข้นได้สูงถึง 164 เท่า และสอดคล้องกับค่าขีดจำกัดการตรวจวัดในช่วง 1 – 5 ไมโครกรัมต่อลิตร ความเที่ยงของการวิเคราะห์ในวันเดียวกัน ($n=5$) และหลายวัน ($n=3 \times 3$) โดยให้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์สำหรับเวลาการคงที่ของสาร และพื้นที่ใต้พีค ต่ำกว่า 2.0 และ 7.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนค่าการกลับคืนของสารเป้าหมายที่ความเข้มข้นต่างๆ (นั่นคือ 20 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร) ในตัวอย่างนม ซึ่งพบว่าอยู่ในช่วง 75.3 – 111.4 เปอร์เซ็นต์

ส่วนในเทคนิคการสกัดและเพิ่มความเข้มข้นแบบ UASEME ได้ใช้ไดคลอโรมีเทน (เป็นตัวสกัด) และไทรทอนเอกซ์-114 (อิมัลซิฟายเออร์) สำหรับการสกัดสารเป้าหมาย ซึ่งสภาวะการสกัดเป็น

ดังนี้ ไทรทอนเอกซ์-114 เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร กลีโอะโซเดียมอะซิเตทเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ไดคลอโรมีเทน 100 ไมโครลิตร และเวลาการอัลตราโซนิก 4 นาที ภายใต้สภาวะดังกล่าวนี้ ได้ความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 10 – 150 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งให้ค่า R^2 ที่ดีมากกว่า 0.994 แพลกเตอร์การเพิ่มความเข้มข้นอยู่ในช่วง 45 – 60 เท่า และสอดคล้องกับค่า LODs อยู่ในช่วง 1.8 – 3.6 ไมโครกรัมต่อลิตร ความเที่ยงของการวิเคราะห์ในวันเดียว ($n=5$) และหลายวัน ($n=4 \times 3$) ให้ร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของค่าเวลาการคงอยู่ของสาร และพื้นที่ใต้พีคต่ำกว่า 0.8 และ 9.2 ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังให้ร้อยละการกลับคืนที่ดีสำหรับการวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (20 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร) ในตัวอย่างนม อยู่ในช่วง 72.5 – 113.5

กล่าวโดยสรุป วิธีที่นำเสนอนี้ทั้งวิธีการสกัดแบบ UA-CPE และ UASEME ควบคู่กับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และการตรวจวัดแบบโฟโตไดโอดแอร์เรย์ ได้แสดงให้เห็นว่า เป็นวิธีที่ง่าย มีประสิทธิภาพ และเชื่อถือได้สำหรับการสกัดและเพิ่มความเข้มข้น และวิเคราะห์พร้อมกันของสารยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซลในตัวอย่างนมชนิดต่างๆ

คำสำคัญ: ยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซล วิธีการเพิ่มความเข้มข้น โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ตัวอย่างนม

Abstract

Project Code: MRG5480135

Project Title: Development of sample preparation and preconcentration method using surfactants coupled to high performance liquid chromatography for veterinary drug residue analysis in foods

Investigators: 1) Dr. Yanawath Santaladchaiyakit, Rajamangala University of Technology Isan
2) Assoc. Prof. Dr. Supalax Srijaranai, Khon Kaen University

E-mail Address: sanyanawa@yahoo.com; sanyanawa@gmail.com

Project Period: 2 years (15 June 2011 to 15 June 2013)

In this research project, ultrasound-assisted cloud-point extraction (UA-CPE) and ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction (UASEME) coupled with high performance liquid chromatography-photodiode array detection (HPLC-PDA) have been developed for the preconcentration and analysis of five benzimidazole anthelmintics (i.e., thiabendazole, oxfendazole, mebendazole, albendazole, and fenbendazole) in milk samples. Parameters affecting on the extraction performance of both extraction methods were also investigated and optimized. The separation of target analytes was carried out using gradient condition of 1% (v/v) acetic acid and methanol, a flow rate of 1.0 mL/min, and photodiode array detection at 296 nm. Under this separation conditions, the target benzimidazoles was completely separated within 14 min. The optimum conditions and analytical results obtained from UA-CPE and UASEME are described follow.

The optimum conditions of UA-CPE were 0.75% (w/v) Triton X-114, 7% (w/v) sodium acetate, and 2-min ultrasonication. Under these conditions, linearity was obtained in the range of 10 – 200 µg/L with the determination coefficients (R^2) higher than 0.995. A high preconcentration factor of up to 164 was obtained, corresponding to limits of detection (LODs) in the range of 1 – 5 µg/L. Intra-day (n=5) and inter-day (n=3×3) precisions were obtained with relative standard deviation (RSD) for retention time and peak area lower than 2.0 and 7.0%, respectively. The recoveries for the spiked target anthelmintics at different concentrations (i.e., 20, 50 and 100 µg/L) in milk samples were in the range of 75.3 – 111.4%.

In UASEME, dichloromethane (extraction solvent) and Triton X-114 (emulsifier) were used for extraction of the target analytes. The extraction conditions were 0.5% (w/v) Triton X-114, 6% (w/v) sodium acetate, 100 µL of dichloromethane and 4-min ultrasonication. Under the optimum conditions, linearity was in the range from 10 to 150 µg/L with good R^2 higher than 0.994. Pre-

concentration factors were obtained in the range of 45 – 60, corresponding to LODs in the range of 1.8 – 3.6 µg/L. Intra-day (n=5) and inter-day (n=4×3) precisions were obtained with RSD of retention time and peak area below 0.8 and 9.2%, respectively. Good recoveries for the spiked target anthelmintics at various concentrations (i.e., 20, 50, and 100 µg/L) milk samples were obtained in the 72.5 – 113.5%.

In summary, the proposed UA-CPE and UASEME coupled with HPLC-PDA method have been demonstrated to be simple, effective, and reliable for the preconcentration and simultaneous analysis of target benzimidazole anthelmintics in the milk samples studied.

Keywords: Benzimidazole anthelmintic, preconcentration method, high-performance liquid chromatography, milk sample

Executive Summary

การพัฒนาวิธีเตรียมตัวอย่างและเพิ่มความเข้มข้นด้วยสารลดแรงตึงผิวร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงสำหรับการวิเคราะห์ยารักษาสัตว์ตกค้างในอาหาร

ยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซลสามารถใช้เป็นยารักษาและป้องกันการติดเชื้อพยาธิที่พบในทางเกษตรกรรม การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และการปศุสัตว์ ตัวอย่างสารออกฤทธิ์ของยาถ่ายพยาธิกลุ่มนี้ เช่น ไทอะเบนดาโซล (Thiabendazole หรือ TBZ) ออกเฟนดาโซล (Oxfendazole หรือ OFZ) มีเบนดาโซล (Mebendazole หรือ MBZ) อัลเบนดาโซล (Albendazole หรือ ABZ) และเฟนเบนดาโซล (Fenbendazole หรือ FBZ) เนื่องจากมีการใช้อย่างแพร่หลาย และหากใช้ไม่ถูกวิธี เช่น การใช้ในปริมาณที่มากเกินไป โดยเฉพาะการใช้ยาถ่ายพยาธิกับวัวในช่วงให้นม อาจจะทำให้เกิดการตกค้างของยาถ่ายพยาธิเหล่านี้ในนม และผลิตภัณฑ์จากนมได้ นอกจากนี้ อาจตกค้างในเนื้อเยื่อส่วนหนึ่งส่วนใด ซึ่งหากมีการรับประทานเข้าไป อาจจะทำให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ ดังนั้น จึงจำเป็นต้องพัฒนาวิธีที่ให้ความไวสูง มีประสิทธิภาพ และให้ความเชื่อถือได้สำหรับการตรวจวิเคราะห์ยาถ่ายพยาธิกลุ่มดังกล่าวที่ตกค้างในตัวอย่างอาหารเพื่อความมั่นใจในความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

เทคนิคที่นิยมใช้วิเคราะห์ยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซลในตัวอย่างประเภทต่างๆ จะใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวร่วมกับดีเทคเตอร์แบบอัลตราไวโอเลต ฟลูออเรสเซนซ์ และแมสสเปกโตรเมทรี ไม่ว่าจะใช้รูปแบบการตรวจวัดใดก็ตาม จำเป็นต้องมีวิธีการเตรียมตัวอย่าง และเพิ่มความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย ซึ่งจะช่วยลดเมทริกซ์ที่มีอยู่ในตัวอย่างที่อาจจะรบกวนการวิเคราะห์สารเป้าหมาย และยังช่วยเพิ่มความเข้มข้นของสารเป้าหมายได้ด้วยในขณะเดียวกัน ในแวดวงวิธีการเตรียมตัวอย่างที่หลากหลาย พบว่า วิธีการที่มีการใช้สำหรับสารกลุ่มเบนซิมิดาโซล ได้แก่ การสกัดด้วยเฟสของแข็ง (Solid-phase extraction หรือ SPE) การสกัดด้วยตัวทำละลายแบบใช้ความดัน (Pressurized liquid extraction หรือ PLE) การสกัดแบบแคชเชอร์ (QuEChERS) และการสกัดแบบของไหลวิกฤตยิ่งยวด (Supercritical fluid extraction หรือ SFE) แต่อย่างไรก็ตาม วิธีการดังกล่าวข้างต้น อาจจะใช้เวลานานในการสกัด ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณมาก และอุปกรณ์ที่ใช้ราคาแพงในบางเทคนิค

งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสม และสามารถเพิ่มความเข้มข้น (preconcentration) ของสารเป้าหมายด้วยวิธีการสกัดโดยใช้สารลดแรงตึงผิว (surfactants) ที่ใช้เป็นตัวสกัดสาร (Extraction solvent) หรือใช้เป็นอิมัลซิฟายเออร์ในระบบการสกัดระดับไมโครแบบการกระจายในเฟสของเหลว เพื่อให้ได้วิธีการที่มีประสิทธิภาพสูง ทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ตลอดจนสามารถใช้เป็นเทคนิคคู่ควบร่วมกับเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง สำหรับการวิเคราะห์สารเป้าหมายในตัวอย่างอาหารที่มีองค์ประกอบหลากหลายได้

โครงการวิจัยนี้ จึงได้นำเสนอวิธีการสกัดแบบจุดขุ่นด้วยอัลตราซาวด์ (Ultrasound-assisted cloud-point extraction หรือ UA-CPE) และเทคนิคการสกัดระดับไมโครด้วยอัลตราซาวด์ และสารลดแรงตึงผิวช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเกิดอิมัลชัน (Ultrasound-assisted surfactant-enhanced

emulsification microextraction หรือ UASEME) สำหรับการเพิ่มความเข้มข้น และวิเคราะห์ยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซลจำนวน 5 ชนิด (ได้แก่ ไทอะเบนดาโซล ออกเฟนดาโซล มีเบนดาโซล อัลเบนดาโซล และเฟนเบนดาโซล) ในตัวอย่างนมชนิดต่างๆ ศึกษาและหาสภาวะที่เหมาะสมของพารามิเตอร์ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดของวิธีการสกัดและเพิ่มความเข้มข้นทั้งสองวิธี โดยศึกษาภายใต้การแยกสารเป้าหมายโดยใช้การชะแบบเกรเดียนท์ ของกรดอะซิติกเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และเมทานอล ใช้อัตราการไหลเป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และการตรวจวัดแบบโฟโตไดโอดแออร์เรย์ที่ความยาวคลื่น 296 นาโนเมตร ภายใต้สภาวะการแยกนี้ สามารถแยกสารเป้าหมายได้สมบูรณ์ภายใน 14 นาที ซึ่งสภาวะการสกัดที่เหมาะสมและผลการวิเคราะห์ที่ได้จากวิธี UA-CPE และ UASEME ดังรายละเอียดต่อไปนี้

สภาวะที่เหมาะสมของวิธี UA-CPE คือ ไทรทอนเอกซ์-114 เข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โซเดียมอะซิเตทเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และเวลาการอัลตราโซนิก 2 นาที ภายใต้สภาวะดังกล่าวนี้ ความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 10 – 200 ไมโครกรัมต่อลิตร และให้สัมประสิทธิ์การกำหนด (Coefficient of determination หรือ R^2) มากกว่า 0.995 แพลตฟอร์มการเพิ่มความเข้มข้นได้สูงถึง 164 เท่า และสอดคล้องกับค่าขีดจำกัดการตรวจวัดในช่วง 1 – 5 ไมโครกรัมต่อลิตร ความเที่ยงของการวิเคราะห์ในวันเดียวกัน ($n=5$) และหลายวัน ($n=3 \times 3$) โดยให้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์สำหรับเวลาการคงที่ของสาร และพื้นที่ใต้พีค ต่ำกว่า 2.0 และ 7.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนค่าการกลับคืนของสารเป้าหมายที่ความเข้มข้นต่างๆ (นั่นคือ 20 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร) ในตัวอย่างนม ซึ่งพบว่าอยู่ในช่วง 75.3 – 111.4 เปอร์เซ็นต์

ส่วนในเทคนิคการสกัดและเพิ่มความเข้มข้นแบบ UASEME ได้ใช้ไดคลอโรมีเทน (เป็นตัวสกัด) และไทรทอนเอกซ์-114 (อิมัลซิฟายเออร์) สำหรับการสกัดสารเป้าหมาย ซึ่งสภาวะการสกัดเป็นดังนี้ ไทรทอนเอกซ์-114 เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เกลือโซเดียมอะซิเตทเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ไดคลอโรมีเทน 100 ไมโครลิตร และเวลาการอัลตราโซนิก 4 นาที ภายใต้สภาวะดังกล่าวนี้ ได้ความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 10 – 150 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งให้ค่า R^2 ที่ดีมากกว่า 0.994 แพลตฟอร์มการเพิ่มความเข้มข้นอยู่ในช่วง 45 – 60 เท่า และสอดคล้องกับค่า LODs อยู่ในช่วง 1.8 – 3.6 ไมโครกรัมต่อลิตร ความเที่ยงของการวิเคราะห์ในวันเดียว ($n=5$) และหลายวัน ($n=4 \times 3$) ให้ร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของค่าเวลาการคงอยู่ของสาร และพื้นที่ใต้พีคต่ำกว่า 0.8 และ 9.2 ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังให้ร้อยละการกลับคืนที่ดีสำหรับการวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (20 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร) ในตัวอย่างนม อยู่ในช่วง 72.5 – 113.5

โดยสรุป จะเห็นว่าวิธีที่นำเสนอทั้งวิธีการสกัดแบบ UA-CPE และ UASEME ควบคุมกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และการตรวจวัดแบบโฟโตไดโอดแออร์เรย์เป็นวิธีที่ง่าย มีประสิทธิภาพ และให้ข้อมูลการวิเคราะห์ที่เชื่อถือได้สำหรับการสกัดและเพิ่มความเข้มข้น และวิเคราะห์พร้อมกันของสารยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซลในตัวอย่างนมชนิดต่างๆ

ผลงานตีพิมพ์

1) **Yanawath Santaladchaiyakit*** and Supalax Srijaranai. A simplified ultrasound-assisted cloud-point extraction method coupled with high performance liquid chromatography for residue analysis of benzimidazole anthelmintics in water and milk samples. *Analytical Methods*, 2012, 4: 3864 – 3873. Impact Factor (2011) =1.547

2) **Yanawath Santaladchaiyakit*** and Supalax Srijaranai. Preconcentration and simultaneous analysis of benzimidazole anthelmintics in milk samples by ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction and high-performance liquid chromatography. *Food Analytical Methods*, 2013, In Press, doi: 10.1007/s12161-0139569-9. Impact Factor (2011) =1.943

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน (มทร. อีสาน) ที่สนับสนุนเงินทุนวิจัยแบบไตรภาคี สำหรับทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ ภายใต้สัญญาเลขที่ MRG5480135 เป็นระยะเวลา 2 ปี (มิถุนายน 2554 – มิถุนายน 2556) จนการทำวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์ นอกเหนือจากนี้ ขอขอบพระคุณ สาขาวิชาเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตขอนแก่น ที่สนับสนุนเครื่องมือ อุปกรณ์ และอำนวยความสะดวกในสถานที่สำหรับทำวิจัย และขอขอบพระคุณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่สนับสนุนน้ำปราศจากไอออนให้ใช้ตลอดช่วงเวลาทำวิจัยดังกล่าว

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ศุภลักษณ์ ศรีจรรย์ (ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น) ที่ได้กรุณาเป็นนักวิจัยที่ปรึกษา และให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ต่อการทำวิจัย และการตีพิมพ์ผลงานวิจัย ตลอดจนอำนวยความสะดวกในระหว่างช่วงทำวิจัยจนงานวิจัยได้เสร็จสมบูรณ์

ดร.ญาณวรรณ แสนตลาดชัยกิตต์
หัวหน้าโครงการวิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	i
Abstract	iii
Executive Summary	v
กิตติกรรมประกาศ	viii
สารบัญตาราง	x
สารบัญรูป	xi
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การเพิ่มความเข้มข้นสารเป้าหมายด้วยวิธีการสกัดแบบจุดชุ่ม และ วิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	5
บทที่ 3 การเพิ่มความเข้มข้นสารเป้าหมายด้วยวิธีการสกัดระดับไมโคร แบบการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ และสารลดแรงตึงผิวช่วยเพิ่ม ประสิทธิภาพการเกิดอิมัลชัน และวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี ของเหลวสมรรถนะสูง	22
บทที่ 4 บทสรุป	39
เอกสารอ้างอิง	41
Output ที่ได้จากโครงการ	49
ภาคผนวก: ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่	50

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 2.1	โครงสร้างทางเคมีและสมบัติทางเคมี-กายภาพของสารเป้าหมายกลุ่มเบนซิมิดาโซล	11
ตารางที่ 2.2	ข้อมูลกราฟมาตรฐานของยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซลในตัวอย่างนมชนิดต่างๆ (n=3)	18
ตารางที่ 2.3	ร้อยละการกลับคืน (%Recovery) ของยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซลที่ระดับการเติมที่ความเข้มข้นต่างๆ ในตัวอย่างนมชนิดที่ศึกษา (n=3)	20
ตารางที่ 3.1	แสดงอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ในระบบเกรเดียนท์สำหรับการแยกสารเป้าหมาย	25
ตารางที่ 3.2	ข้อมูลสำหรับการทำปริมาณวิเคราะห์ของสารมาตรฐานที่ได้จากวิธีการเพิ่มความเข้มข้นแบบ UASEME	35
ตารางที่ 3.3	กราฟมาตรฐานของสารเป้าหมายในตัวอย่างนมที่ศึกษา (n=3)	37
ตารางที่ 3.4	ร้อยละการกลับคืน (Recovery) ของสารเป้าหมายที่เติมในตัวอย่างนมที่ศึกษา ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (n=3)	38

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 2.1 ผลของพารามิเตอร์ต่างๆ ที่มีต่อประสิทธิภาพการสกัดสารเป้าหมายจาก พยาธิกลุ่มเบนซิมีดาโซล เมื่อ (a) ชนิดของเกลือ (b) ปริมาณของเกลือ โซเดียมอะซิเตท (c) ความเข้มข้นของ Triton X-114 (d) สภาวะอุณหภูมิของ การสกัดแบบจุดขุ่น (e) เวลาในการอัลตราโซนิก และ (f) เวลาในการปั่น เหวี่ยง	10
รูปที่ 2.2 แสดงโครมาโทแกรมที่ได้จากการสกัดสารเป้าหมายสองครั้ง เมื่อ (a) สกัดครั้งแรก และ (b) สกัดต่อเนื่องครั้งที่สอง	14
รูปที่ 2.3 โครมาโทแกรมของสารเป้าหมายที่ได้จาก (a) การวิเคราะห์โดยตรง และ (b) การสกัดแบบจุดขุ่น	15
รูปที่ 2.4 วิธีการตกตะกอนโปรตีนและไขมันด้วยกระบวนการต่างๆ ก่อนการสกัดด้วยวิธีแบบจุดขุ่นของสารเป้าหมายเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อลิตร	16
รูปที่ 2.5 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารเป้าหมายกลุ่มเบนซิมีดาโซลในตัวอย่างนมโคสดยูเอชทีที่ไม่เติมสารมาตรฐาน (Sample blank) และเติมสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	19
รูปที่ 3.1 ผลของ (A) ชนิดตัวทำละลายที่ใช้สกัดสารเป้าหมาย และ (B) ชนิดของสารลดแรงตึงผิวที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดสารเป้าหมายกลุ่มเบนซิมีดาโซล (ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อลิตร)	27
รูปที่ 3.2 ผลของ (A) ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมอะซิเตท และ (B) เวลาในการอัลตราโซนิกที่มีต่อประสิทธิภาพการสกัดสารเป้าหมายกลุ่มเบนซิมีดาโซล	30
รูปที่ 3.3 ผลของ (A) ปริมาตรไดคลอโรมีเทน และ (B) ความเข้มข้นของสาร Triton X-114 ที่มีต่อประสิทธิภาพการสกัดสารเป้าหมายกลุ่มเบนซิมีดาโซล	31
รูปที่ 3.4 โครมาโทแกรมของ (A) สารมาตรฐานเบนซิมีดาโซลทั้ง 5 ชนิดที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี UASEME และไม่ผ่านการเพิ่มความเข้มข้น และ (B) โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างนมยูเอชทีรสจืด (UHT plain milk) ที่เติมและไม่เติมสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	34

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

การทำปศุสัตว์ได้มีการใช้ยารักษาสัตว์ (Veterinary drugs) ประเภทต่างๆ ในปริมาณที่ค่อนข้างมาก เพื่อการป้องกัน และบำบัดรักษาการติดเชื้อโรคต่างๆ ของสัตว์ ยารักษาสัตว์ที่มีการใช้อย่างแพร่หลาย ส่วนใหญ่จะเป็นสารปฏิชีวนะ เช่น กลุ่มเตตราเซัยคลิน (tetracyclines) ควิโนโลน (quinolones) ซัลโฟนาไมด์ (sulfonamides) มาโครไลด์ (macrolides) และยาถ่ายพยาธิ (anthelmintics) สำหรับยาถ่ายพยาธิเป็นยาที่ใช้สำหรับป้องกันและกำจัดพยาธิที่เกิดจากพยาธิตัวกลมในช่องทางเดินอาหาร พยาธิในปอด และพยาธิใบไม้ตับ ซึ่งในกลุ่มของชนิดยาถ่ายพยาธิ (เช่น เบนซิมาดาโซล ไดฟินิลซัลไฟด์ อิมิดาโซไทโอะโซล เป็นต้น) ยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมาดาโซลเป็นกลุ่มที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการรักษาและกำจัดพยาธิในสัตว์เลี้ยง (Horvat et al. 2012)

ยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมาดาโซลสามารถใช้เป็นยารักษาและป้องกันการติดเชื้อพยาธิที่พบในทางเกษตรกรรม การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และการปศุสัตว์ (Danaher et al. 2007; Xia et al. 2010) ตัวอย่างสารออกฤทธิ์ของยาถ่ายพยาธิกลุ่มนี้ เช่น ไทอะเบนดาโซล (Thiabendazole หรือ TBZ) ออกเฟนดาโซล (Oxfendazole หรือ OFZ) มีเบนดาโซล (Mebendazole หรือ MBZ) อัลเบนดาโซล (Albendazole หรือ ABZ) และเฟนเบนดาโซล (Fenbendazole หรือ FBZ) โดยที่ไทอะเบนดาโซลเป็นสารชนิดแรกที่นำเข้ามาใช้อย่างแพร่หลายสำหรับการควบคุมพยาธิตัวกลมในช่องทางเดินอาหาร และพยาธิในปอด (Danaher et al. 2007) นอกเหนือจากนี้ ไทอะเบนดาโซลยังใช้เป็นสารกำจัดเชื้อรา (Fungicide) ในไร้อัญพืช ผักและผลไม้แห้ง (Danaher et al. 2007) ส่วนอัลเบนดาโซล เฟนเบนดาโซล และออกเฟนดาโซล ใช้สำหรับการรักษาและกำจัดพยาธิได้ทุกช่วงวงจรชีวิตของพยาธิตัวกลม พยาธิในปอด และพยาธิใบไม้ตับ (Danaher et al. 2007; Msagati and Nindi 2001) เนื่องจากมีการใช้อย่างแพร่หลาย และหากใช้ไม่ถูกวิธี เช่น การใช้ในปริมาณที่มากเกินไป โดยเฉพาะการใช้ยาถ่ายพยาธิกับวัวในช่วงให้นม อาจจะทำให้เกิดการตกค้างของยาถ่ายพยาธิเหล่านี้ในนม และผลิตภัณฑ์จากนมได้ นอกจากนี้ อาจตกค้างในเนื้อเยื่อส่วนหนึ่งส่วนใด ซึ่งหากมีการรับประทานเข้าไป อาจจะทำให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ (Xia et al. 2010; Chen et al. 2010) ดังนั้น จึงจำเป็นต้องพัฒนาวิธีที่ให้ความไวสูง มีประสิทธิภาพ และให้ความเชื่อถือได้สำหรับการตรวจวิเคราะห์ยาถ่ายพยาธิกลุ่มดังกล่าวที่ตกค้างในตัวอย่างอาหารเพื่อความมั่นใจในความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

เทคนิคที่นิยมใช้วิเคราะห์ยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมาดาโซลในตัวอย่างประเภทต่างๆ จะใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวร่วมกับดีเทคเตอร์แบบอัลตราไวโอเลต (Chen et al. 2010; Mottier et al. 2003; Danaher et al. 2003) ฟลูออเรสเซนซ์ (Wu et al. 2009; Halko et al. 2004) แมสสเปกโตรเมทรี (Xia et al. 2010; Chen et al. 2011; Whelan et al. 2010; Guo et al. 2010) และใช้ทั้งแบบอัลตราไวโอเลตและแมสสเปกโตรเมทรี (Msagati and Nindi 2001) ไม่ว่าจะเป็นใช้รูปแบบการตรวจวัดใดก็ตาม จำเป็นต้องมีวิธีการเตรียมตัวอย่าง และเพิ่มความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย

ซึ่งจะช่วยลดเมทริกซ์ที่มีอยู่ในตัวอย่างที่อาจจะรบกวนการวิเคราะห์สารเป้าหมาย และยังช่วยเพิ่มความเข้มข้นของสารเป้าหมายได้ด้วยในขณะเดียวกัน ในแวดวงวิธีการเตรียมตัวอย่างที่หลากหลายพบว่า วิธีการที่มีการใช้สำหรับสารกลุ่มเบนซิมิดาโซล ได้แก่ การสกัดด้วยเฟสของแข็ง (Solid-phase extraction หรือ SPE) (Xia et al. 2010; Chen et al. 2010) การสกัดด้วยตัวทำละลายแบบใช้ความดัน (Pressurized liquid extraction หรือ PLE) (Chen et al. 2011) การสกัดแบบแคชเชอร์ (QuEChERS) (Whelan et al. 2010) และการสกัดแบบของไหลวิกฤตยิ่งยวด (Supercritical fluid extraction หรือ SFE) (Danaher et al. 2003) แต่อย่างไรก็ตาม วิธีการดังกล่าวข้างต้น อาจจะใช้เวลานานในการสกัด ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณมาก และอุปกรณ์ที่ใช้ราคาแพงในบางเทคนิค ดังนั้น วิธีการทางเลือกที่น่าสนใจ ควรจะเข้าข่ายลักษณะที่เป็นเคมีสีเขียว (Green chemistry) ดังต่อไปนี้ เช่น

รูปแบบที่ 1 การใช้สารหรือรีเอเจนต์อื่นเป็นตัวสกัด (Extraction solvent) แทนการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น การใช้สารลดแรงตึงผิว (Surfactant) ไอออนิกลิควิด (Ionic liquids) เป็นต้น

รูปแบบที่ 2 การลดปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ และ/หรือใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีพิษต่ำกว่า

รูปแบบที่ 3 อาจเป็นแบบผสมของรูปแบบที่ 1 และ 2 ก็ได้

เทคนิคที่จัดอยู่ในรูปแบบที่ 1 คือ เทคนิคการสกัดแบบจุดขุ่น (Cloud-point extraction หรือ CPE) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีการใช้สารลดแรงตึงผิวเป็นตัวสกัด โดยระบบทั่วไปของการสกัดแบบจุดขุ่น มักจะนิยมใช้สารลดแรงตึงผิวแบบไม่มีประจุ (Non-ionic surfactant) และทำการสกัดสารเป้าหมายในระบบที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิจุดขุ่น (Critical cloud-point temperature) ซึ่งจะทำให้สารละลายมีลักษณะขุ่น และเกิดกระบวนการสกัดสารเป้าหมายเข้าไปในกลุ่มก้อนไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวในขั้นตอนนี้ หลังจากเกิดการแยกเฟสเป็นสองเฟสที่สมบูรณ์แล้ว จะได้ชั้นสารลดแรงตึงผิวเข้มข้น (Surfactant-rich phase หรือ SRP) และชั้นสารละลายน้ำ (Aqueous phase หรือ AQ) ซึ่งชั้นสารลดแรงตึงผิวเข้มข้นจะมีปริมาตรน้อยมาก (ในระดับไมโครลิตร) เมื่อเทียบกับปริมาตรของสารละลายเริ่มต้น ดังนั้น จึงสามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารเป้าหมายได้ดี (ขึ้นกับชนิดของสารลดแรงตึงผิวที่ใช้เป็นตัวสกัดด้วย) เทคนิคการสกัดแบบจุดขุ่นนี้ มีข้อดีหลายประการ เช่น เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ขั้นตอนง่ายไม่ยุ่งยาก ให้ประสิทธิภาพสูงในการสกัดสารเป้าหมายหลากหลายกลุ่ม และเข้ากันได้กับระบบโมบายเฟสของเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) แต่อย่างไรก็ตาม การประยุกต์ใช้เทคนิคดังกล่าวสำหรับการสกัดและเพิ่มความเข้มข้นของยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซลในตัวอย่างชนิดต่างๆ ยังไม่พบรายงานมากนัก มีเพียงการนำไปประยุกต์ใช้ในการสกัดสารกลุ่มเบนซิมิดาโซลบางชนิด และกลุ่มที่จัดเป็นสารกำจัดเชื้อรา (fungicide) ในตัวอย่างดิน (Halko et al. 2006) และตัวอย่างน้ำ (Halko et al. 2004) เท่านั้น ดังนั้น จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษา และนำเทคนิคการสกัดแบบจุดขุ่นไปพัฒนาพร้อมกับประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์ยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซลในตัวอย่างที่หลากหลายมากขึ้น

ส่วนในรูปแบบที่ 2 และ 3 นั้น ในปัจจุบันนี้ ได้มีการพัฒนาเทคนิคในกลุ่มการสกัดระดับไมโคร (Microextraction) ที่น่าสนใจ คือ เทคนิคการสกัดระดับไมโครแบบเฟสของเหลว (Liquid-phase microextraction หรือ LPME) โดยเทคนิค LPME นี้ เป็นเทคนิคการเตรียมตัวอย่างและเพิ่มความ

เข้มข้นแบบย่อส่วน (Miniaturized) ด้วยการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณน้อย (ระดับไมโครลิตร) เป็นตัวสกัดสาร ซึ่งวิธีนี้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งเพื่อทดแทนวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายแบบดั้งเดิม (Liquid-liquid extraction หรือ LLE) ที่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ค่อนข้างมาก เทคนิคที่จัดอยู่ในแบบ LPME ที่น่าสนใจ คือ เทคนิคการสกัดระดับไมโครแบบกระจายในเฟสของเหลว (Dispersive liquid-liquid extraction หรือ DLLME) (Wu et al. 2009) เป็นวิธีที่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำเป็นตัวสกัด (Extraction solvent) เช่น คลอโรฟอร์ม คาร์บอนเตตระคลอไรด์ ไดคลอโรมีเทน เป็นต้น และในสารละลายตัวอย่างที่มีตัวทำละลายกระจายเฟส (Disperser solvent) ผสมอยู่ด้วย เช่น เมทานอล อะซิโตน ไตรเอทานอล เป็นต้น หลังจากที่มีการฉีดสารตัวทำละลายที่ใช้เป็นตัวสกัดลงไปอย่างรวดเร็วสารละลายที่ได้จะมีลักษณะขุ่น และมีลักษณะเป็นหยดเล็กๆ (microdroplets) สารเป้าหมายจะถูกสกัดเข้าไปในหยดเล็กๆ นี้ ข้อดีของเทคนิคดังกล่าวนี้ เช่น ทำการสกัดได้รวดเร็ว (ในหน่วยวินาที) ทำได้ง่าย ให้ประสิทธิภาพที่ดี และแพคเกจการสกัดสูง ด้วยข้อดีของการสกัดแบบ DLLME ทำให้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง และมีการนำเสนอวิธีแบบใหม่ ได้แก่ เทคนิคการสกัดระดับไมโครแบบใช้อัลตราซาวด์ช่วยการเกิดอิมัลชัน (Ultrasound-assisted emulsification microextraction หรือ UAEME) เทคนิคการใช้สารลดแรงตึงผิวช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเกิดอิมัลชัน (Surfactant-assisted emulsification microextraction หรือ SAEME) และเทคนิคการสกัดระดับไมโครแบบใช้อัลตราซาวด์และสารลดแรงตึงผิวช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเกิดอิมัลชัน (Ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction หรือ UASEME) เพื่อเป็นเทคนิคทางเลือกทดแทนวิธี DLLME ซึ่งเทคนิค UASEME เป็นเทคนิคที่รวมเอาข้อดีของ DLLME UAEME SAEME และ CPE เข้าไว้ด้วยกัน ทำให้มีการนำเทคนิค UASEME ไปประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลายสำหรับการวิเคราะห์สารเป้าหมายหลากหลายประเภท (Wu et al. 2010a; Wu et al. 2010b; Cheng et al. 2011a; Cheng et al. 2011b; Xia et al. 2012) โดยบทบาทของสารลดแรงตึงผิวจะใช้เป็นสารอิมัลซิฟายเออร์ (Emulsifier) สำหรับการกระจายเฟสของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำที่ใช้เป็นตัวสกัด ตัวอย่างสารลดแรงตึงผิวที่นิยมใช้เป็นตัวอิมัลซิฟายเออร์ เช่น ไทรทอน เอกซ์-114 (Triton X-114) โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต (SDS) ซิทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (CTAB) เป็นต้น การใช้สารลดแรงตึงผิว ร่วมกับการทำให้คลื่นอัลตราโซนิคเข้าช่วยในการสกัดสามารถช่วยเร่งการเกิดหยดขนาดเล็ก (Fine droplets) ของตัวทำละลายที่ใช้สกัดสารในสารละลายน้ำ (Aqueous solution) และช่วยเพิ่มการกระจายตัวของเฟสที่ไม่ละลายน้ำให้เข้าไปละลายได้ในชั้นน้ำโดยอาศัยสมบัติความชอบและไม่ชอบน้ำของสารลดแรงตึงผิวนั่นเอง (Cheng et al. 2011a; Cheng et al. 2011b; Saraji et al. 2010) ดังนั้น จึงทำให้ประสิทธิภาพการสกัดสารเป้าหมายสูงขึ้น (Xia et al. 2012) อย่างไรก็ตาม การพัฒนาและประยุกต์ใช้เทคนิคการสกัดและเพิ่มความเข้มข้นแบบ UASEME ในตัวอย่างหลากหลายยังมีไม่มากนัก โดยเฉพาะการนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์สารกลุ่มเบนซิมิดาโซลในตัวอย่างอาหาร ดังนั้น จึงเป็นประเด็นสำคัญที่จะศึกษา และพัฒนาวิธีการดังกล่าวต่อไป

งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสม และสามารถเพิ่มความเข้มข้น (preconcentration) ของสารเป้าหมายด้วยวิธีการสกัดโดยใช้สารลดแรงตึงผิว (surfactants) ที่ใช้เป็นตัวสกัดสาร (Extraction solvent) และ/หรือเป็นตัวอิมัลซิฟายเออร์ในระบบการสกัดระดับไมโคร

แบบการกระจายในเฟสของเหลว เพื่อให้ได้วิธีการที่มีประสิทธิภาพสูง ทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ตลอดจนสามารถใช้เป็นเทคนิคคู่ควบร่วมกับเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง สำหรับการวิเคราะห์สารเป้าหมายในตัวอย่างอาหารที่มีองค์ประกอบหลากหลายได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1) ศึกษาวิธีการแยก และวิเคราะห์สารยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซลพร้อมกันด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
- 2) ศึกษาและพัฒนาวิธีการสกัดและเพิ่มความเข้มข้นของสารเป้าหมายด้วยวิธีการสกัดแบบจุดขุ่น และวิธีการสกัดระดับไมโครแบบการกระจายในเฟสของเหลวด้วยการใช้สารลดแรงตึงผิว และอัลตราซาวด์ในการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด
- 3) ประยุกต์วิธีที่พัฒนาขึ้นสำหรับการวิเคราะห์สารตกค้างของยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซลในตัวอย่างนมชนิดต่างๆ

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

- 1) ยาถ่ายพยาธิที่นำมาศึกษาในการทดลองนี้ จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ ไทอะเบนดาโซล (TBZ) ออกเฟนดาโซล (OFZ) มีเบนดาโซล (MBZ) แอลเบนดาโซล (ABZ) และเฟนเบนดาโซล (FBZ)
- 2) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกและวิเคราะห์สารมาตรฐานเป้าหมายพร้อมกันด้วยเทคนิค HPLC
- 3) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดยาถ่ายพยาธิ ด้วยเทคนิคการสกัดแบบจุดขุ่นโดยศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิว และความเข้มข้นของปริมาณเกลือ อุณหภูมิ เวลาที่ใช้ในการสกัด และเวลาที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยง
- 4) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดโดยเทคนิคการสกัดระดับไมโครโดยใช้อัลตราซาวด์ และสารลดแรงตึงผิวเพิ่มประสิทธิภาพการเกิดอิมัลชัน ได้แก่ ศึกษาชนิดสารลดแรงตึงผิว ชนิดของเกลือ ตัวทำละลายอินทรีย์ เวลาในการทำอัลตราโซนิกเคชัน และเวลาในการปั่นเหวี่ยง
- 5) นำวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์สารตกค้างของยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซลในตัวอย่างนมชนิดต่างๆ

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ได้สภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดยาถ่ายพยาธิทุกชนิดพร้อมกัน ด้วยเทคนิค HPLC
- 2) ได้วิธีการสกัดและเพิ่มความเข้มข้นที่สะดวก ง่าย และให้ประสิทธิภาพที่ดี และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์การตกค้างของยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซลในตัวอย่างอาหารได้
- 3) สามารถตีพิมพ์ผลงานวิจัยในระดับนานาชาติได้อย่างน้อย 2 เรื่อง

บทที่ 2

การเพิ่มความเข้มข้นสารเป้าหมายด้วยวิธีการสกัดแบบจุดขุ่น และวิเคราะห์ด้วย เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

2.1 บทนำ

เทคนิคที่นิยมการวิเคราะห์ยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซล คือ เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ควบคู่กับการตรวจวัดแบบอัลตราไวโอเลต (Chen et al. 2010; Mottier et al. 2003; Danaher et al. 2003) การตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ (Halko et al. 2006; 2004) และแมสสเปกโตรเมตรี (Xia et al. 2010; Chen et al. 2011; Whelan et al. 2010; Guo et al. 2010) แม้ว่าการตรวจวัดแบบแมสสเปกโตรเมตรีจะให้ความไวและความจำเพาะในการวิเคราะห์สารเป้าหมายดีกว่าการตรวจวัดแบบอัลตราไวโอเลต แต่ราคาค่อนข้างแพง และองค์ประกอบเครื่องมือซับซ้อน ดังนั้น วิธีทางเลือกคือการใช้การตรวจวัดแบบอัลตราไวโอเลต ควบคู่กับเทคนิคการสกัดและเพิ่มความเข้มข้นที่เหมาะสมซึ่งจะเป็นวิธีการที่ง่าย รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพสูงขึ้น เทคนิคการสกัดและเพิ่มความเข้มข้นที่มีการประยุกต์ใช้กับสารเป้าหมายกลุ่มเบนซิมิดาโซล ได้แก่ การสกัดด้วยเฟสของแข็ง (Solid-phase extraction หรือ SPE) (Xia et al. 2010; Oyama et al. 2010) การสกัดด้วยตัวทำละลายแบบใช้ความดัน (Pressurized liquid extraction หรือ PLE) (Chen et al. 2011) การสกัดแบบแคชเชอร์ (QuEChERS) (Whelan et al. 2010) การสกัดระดับไมโครแบบกระจายในเฟสของเหลว (Dispersive liquid-liquid extraction หรือ DLLME) (Wu et al. 2009) และการสกัดแบบของไหลวิกฤตยิ่งยวด (Supercritical fluid extraction หรือ SFE) (Danaher et al. 2003) แต่อย่างไรก็ตาม เทคนิคดังกล่าวอาจมีข้อจำกัดบางประการ เช่น ใช้เวลานานในการสกัด และใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นพิษ ดังนั้น การที่จะลดการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์นั้น จะต้องหันมาใช้สารหรือรีเอเจนต์อื่นทดแทน เช่น การใช้สารลดแรงตึงผิวเป็นตัวสกัดในเทคนิคการสกัดแบบจุดขุ่น (Cloud-point extraction หรือ CPE) ซึ่งเทคนิคการสกัดแบบจุดขุ่น มีข้อดีหลายประการ เช่น เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ขั้นตอนง่ายไม่ยุ่งยาก ให้ประสิทธิภาพสูงในการสกัดสารเป้าหมายหลากหลายกลุ่ม และเข้ากันได้กับระบบโมบายเฟสของ HPLC เมื่อเร็วๆ นี้ ได้มีการพัฒนาและนำเสนอวิธีการสกัดแบบจุดขุ่นในรูปแบบต่างๆ เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการสกัดสารเป้าหมายได้สูงขึ้น เช่น สารลดแรงตึงผิวผสมระหว่างแบบไม่มีประจุกับประจุบวก (Pourreza et al. 2011) แบบไม่มีประจุผสมกับประจุลบ (Wu et al. 2010) และประจุบวกผสมกับประจุลบ (Seebunrueng et al. 2011, 2012)

ในระบบการสกัดแบบจุดขุ่นด้วยการใช้สารลดแรงตึงผิวแบบไม่มีประจุ โดยปกติจะทำการสกัดที่อุณหภูมิที่สูงกว่าอุณหภูมิจุดขุ่น (Critical cloud-point temperature) เพื่อทำให้เกิดสารละลายขุ่น (เกิดกระบวนการสกัดสารเป้าหมายขึ้น) และเกิดการแยกเฟสเป็นสองเฟส ซึ่งเฟสที่สารเป้าหมายถูกสกัดเข้าไป จะเรียกว่า ชั้นสารลดแรงตึงผิวเข้มข้น (Surfactant-rich phase หรือ SRP) และชั้นสารละลายน้ำ (Aqueous phase หรือ AQ) ชั้นสารลดแรงตึงผิวเข้มข้นจะมีปริมาณน้อยมาก

(ในระดับไมโครลิตร) เมื่อเทียบกับปริมาตรสารละลายเริ่มต้น ดังนั้น ถ้าเกิดการสกัดอย่างสมบูรณ์และสารเป้าหมายถูกสกัดเข้าไปในชั้นสารลดแรงตึงผิว จะทำให้ได้แฟกเตอร์การเพิ่มความเข้มข้นที่สูงด้วย นอกเหนือจากการสกัดแบบจุดชุ่นด้วยวิธีดั้งเดิมแล้ว ยังมีการประยุกต์ใช้คลื่นอัลตราซาวด์ช่วยในการสกัดด้วย ซึ่งเทคนิคนี้เรียกใหม่ว่า เทคนิคคลื่นอัลตราซาวด์ช่วยเพิ่มการสกัดแบบจุดชุ่น (Ultrasound-assisted CPE หรือ UA-CPE) (Qin et al. 2012; Zou et al. 2012; Yao et al. 2007) ในกระบวนการสกัดนี้ คลื่นอัลตราซาวด์จะช่วยให้เกิดการรวมกันของชั้นสารลดแรงตึงผิวเข้มข้น และช่วยให้เกิดการแยกเฟสได้เร็วขึ้น เมื่อเทียบกับการสกัดแบบใช้ความร้อนช่วยเพียงอย่างเดียว หรือเทียบกับการสกัดแบบดั้งเดิมที่มีการใช้การปั่นเหวี่ยงช่วยในการแยกเฟส (Yao et al. 2007) นอกจากนี้แล้ว เทคนิค UA-CPE ได้มีรายงานว่าสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดและแฟกเตอร์การเพิ่มความเข้มข้นได้ แต่อย่างไรก็ตาม แม้เทคนิคการสกัดแบบจุดชุ่นในรูปแบบต่างๆ นั้น จะสามารถให้ประสิทธิภาพในการสกัดที่ดี การประยุกต์ใช้เทคนิคดังกล่าวสำหรับการสกัดและเพิ่มความเข้มข้นของยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซลในตัวอย่างชนิดต่างๆ ยังไม่พบรายงานมากนัก มีเพียงการนำไปประยุกต์ใช้ในตัวอย่างดิน (Halko et al. 2006) และตัวอย่างน้ำ (Halko et al. 2004) เท่านั้น ดังนั้น จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษา และนำเทคนิคการสกัดแบบจุดชุ่นไปพัฒนาพร้อมกับการประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์ยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซลในตัวอย่างที่หลากหลายมากขึ้น

วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้ เพื่อนำเสนอวิธีการสกัดแบบจุดชุ่นที่ง่าย และมีประสิทธิภาพสำหรับการสกัดและเพิ่มความเข้มข้นของยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซลจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ ไทอะเบนดาโซล ออกเฟนดาโซล มีเบนดาโซล อัลเบนดาโซล และเฟนเบนดาโซล ในตัวอย่างนม ซึ่งในครั้งนี้จะใช้สารลดแรงตึงผิว Triton X-114 เป็นตัวสกัดสารเป้าหมาย ภายใต้สภาวะการเดิมเกลือ และการใช้คลื่นอัลตราโซนิก ในการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแบบจุดชุ่นนี้ ได้ศึกษาพารามิเตอร์ต่างๆ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดก่อนจะนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์สารตกค้างของยาถ่ายพยาธิเป้าหมายในตัวอย่างนมด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงต่อไป

2.2 วิธีการทดลอง

2.2.1 สารเคมีและรีเอเจนต์

1) สารมาตรฐานยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซล ผลิตภัณฑ์บริษัท Sigma-Aldrich ประกอบด้วย ไทอะเบนดาโซล (Thiabendazole หรือ TBZ) (Italy) ออกเฟนดาโซล (Oxfendazole หรือ OFZ) (Germany) มีเบนดาโซล (Mebendazole หรือ MBZ) (USA) อัลเบนดาโซล (Albendazole หรือ ABZ)(China) และเฟนเบนดาโซล (Fenbendazole หรือ FBZ)(China) ซึ่งสารมาตรฐานเหล่านี้ ให้เตรียมเป็นสารละลายสต็อกที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยการละลายสารมาตรฐานในปริมาณที่แน่นอน (ตามการคำนวณ) ด้วยกรดฟอร์มิกในเมทานอล (5%, v/v)

2) สารลดแรงตึงผิว Triton X-114 (Sigma-Aldrich, USA) ให้เตรียมที่ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (% w/v) โดยใช้ น้ำเป็นตัวทำละลาย

3) สารและตัวทำละลายอื่นๆ ได้แก่ acetic acid (glacial), formic acid, methanol, and acetonitrile (Merck, Germany), NaCl (Ajax Finechem, New Zealand),

anhydrous Na_2SO_4 (Carlo Erba, France), Na_2CO_3 (RFCL Limited, India) and anhydrous sodium acetate (Carlo Erba, France)

4) น้ำปราศจากไอออน (Deionized water): Resistivity of $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ from RiO_5^{TM} Type I Simplicity 185 (Millipore water, USA)

2.2.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1) เครื่อง HPLC: Shimadzu LC-20A System 2009 (Japan) ใช้ซอฟต์แวร์ รุ่น LC Solution ในการควบคุมการทำงานและประมวลผล

- ปั๊ม (Pump): Binary รุ่น LC-20AD

- ดีเทคเตอร์ (Detector): PDA รุ่น SPD-20A Lamp D_2

- คอลัมน์ (Column): Waters Atlantis C_{18} Column (4.6 มิลลิเมตร x 150 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร) (Ireland)

2) เครื่องอัลตราโซนิก (Ultrasonic cleaner): 40 kHz, 500 W, Power sonic 410 Hwashin Technology (Korea)

3) เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge): Bench Top Centrifuge NF 200 (12 x 15 มิลลิเมตร) (Turkey)

2.2.3 สภาพในการแยกสารเป้าหมายด้วยเทคนิค HPLC

การแยกสารเป้าหมายยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซล จะใช้ระบบของรีเวิร์สเฟสโครมาโทกราฟีของเหลวโครมาโทกราฟี และระบบการชะแบบเกรเดียนท์ของสารละลาย กรดอะซิติกเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (% v/v) และเมทานอล ที่อัตราการไหลของโมบายเฟสเป็น 1.0 มิลลิเมตรต่อนาที และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 296 นาโนเมตร

รูปแบบการชะแบบเกรเดียนท์ (Gradient elution profile) ของโมบายเฟส เป็นดังนี้

เวลา (นาที)	ร้อยละของเมทานอล
0 – 3	40%
3 – 5	Ramp to 75%
5 – 10	75%
10 – 12	Ramp to 85%
12 – 15	85%
15 – 20	100% (to wash column before next run)

2.2.4 ขั้นตอนการสกัดแบบจุดชุ่ม (UA-CPE)

1) นำสารละลายมาตรฐาน (หรือสารละลายตัวอย่าง) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมกับเกลือโซเดียมอะซิเตท (7%, w/v) และเขย่าจนเกลือละลายหมด จากนั้นเติมสารลดแรงตึงผิว Triton X-114 เข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (% w/v) จะได้สารละลายมีลักษณะขุ่น

2) นำสารละลายดังกล่าวนี้ ไปแช่ในอ่างอัลตราโซนิก (40 kHz, 500 W, 25 ± 5 °C) เป็นเวลา 2 นาที

3) ปั่นเหวี่ยงสารละลายนี้ ด้วยความเร็ว 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้การแยกเฟสได้สมบูรณ์ขึ้น ซึ่งจะสังเกตเห็นเฟสของชั้นสารลดแรงตึงผิวเข้มข้น (SRP) อยู่ชั้นล่างของสารละลาย

4) แยกชั้นสารละลายน้ำ (Aqueous phase) ออกจากชั้นสารลดแรงตึงผิวเข้มข้น

5) ละลายชั้นสารลดแรงตึงผิวเข้มข้นที่ได้ด้วยสารละลายน้ำผสมเมทานอล (50%, v/v) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วฉีด (20 ไมโครลิตร) เข้าระบบของ HPLC เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

2.2.5 การวิเคราะห์ตัวอย่างนม

ตัวอย่างนมที่นำมาวิเคราะห์เป็นนมที่มีจำหน่ายทั่วไปในจังหวัดขอนแก่น เช่น นมยูเอชทีไขมันต่ำ (UHT low fat) นมยูเอชทีรสจืด (UHT plain) นมโคสดยูเอชที (UHT fresh) และนมพาสเจอร์ไรส์รสจืด (Pasteurized plain) ซึ่งขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างนม และตกตะกอนโปรตีนก่อนการวิเคราะห์ ทำได้ดังนี้

1) นำตัวอย่างนมปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมกับเกลือโซเดียมซัลเฟต (0.5 กรัม) เขย่าด้วยมือจนผสมเข้ากันดี

2) เติมสารละลาย 1% (v/v) กรดอะซิติกในอะซิโตนไตรล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเขย่าด้วยมืออย่างรวดเร็วเป็นเวลาประมาณ 1 นาที

3) ปั่นเหวี่ยงสารละลายตัวอย่างนี้ที่ 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ในขั้นตอนนี้จะสังเกตเห็นการแยกชั้นของไขมันและโปรตีนนม (จับกันเป็นก้อน)

4) กรองสารละลายใส่งานกระดาษกรอง Whatman no. 1 แล้วเจือจางสารละลายที่กรองได้ด้วยน้ำให้ได้ปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร

5) เติมกรดอะซิติกเข้มข้น ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงเช่นเดียวกับในข้อ 3) เพื่อทำให้การตกตะกอนโปรตีนและไขมันสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

6) สารละลายใสที่ได้นำไปสกัดและเพิ่มความเข้มข้นด้วยการสกัดแบบจุดชุ่ม ตามระเบียบวิธีในหัวข้อ 1.2.4 ข้างต้น

หมายเหตุ: สำหรับการศึกษาร้อยละการกลับคืน จะทำการเติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่างนมที่ศึกษา ในขั้นตอนก่อนการตกตะกอนโปรตีนและไขมัน โดยเติมที่ระดับความเข้มข้น 20 และ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร

2.3 ผลการทดลองและอภิปรายผล

2.3.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดแบบจุดขุ่น

ศึกษาพารามิเตอร์ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดแบบจุดขุ่น ได้แก่ ชนิด และ ปริมาณของเกลือ ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว อุณหภูมิและเวลาในการสกัด สภาวะการทำอัลตราโซนิก และเวลาในการปั่นเหวี่ยง ซึ่งในการประเมินประสิทธิภาพการสกัดและหาสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละพารามิเตอร์นั้นจะใช้พื้นที่ใต้พีคของสารเป้าหมายพล็อตเทียบกับพารามิเตอร์ดังกล่าว ซึ่งรายละเอียดการศึกษาแต่ละพารามิเตอร์ ได้อธิบายไว้ในแต่ละหัวข้อต่อไปนี้

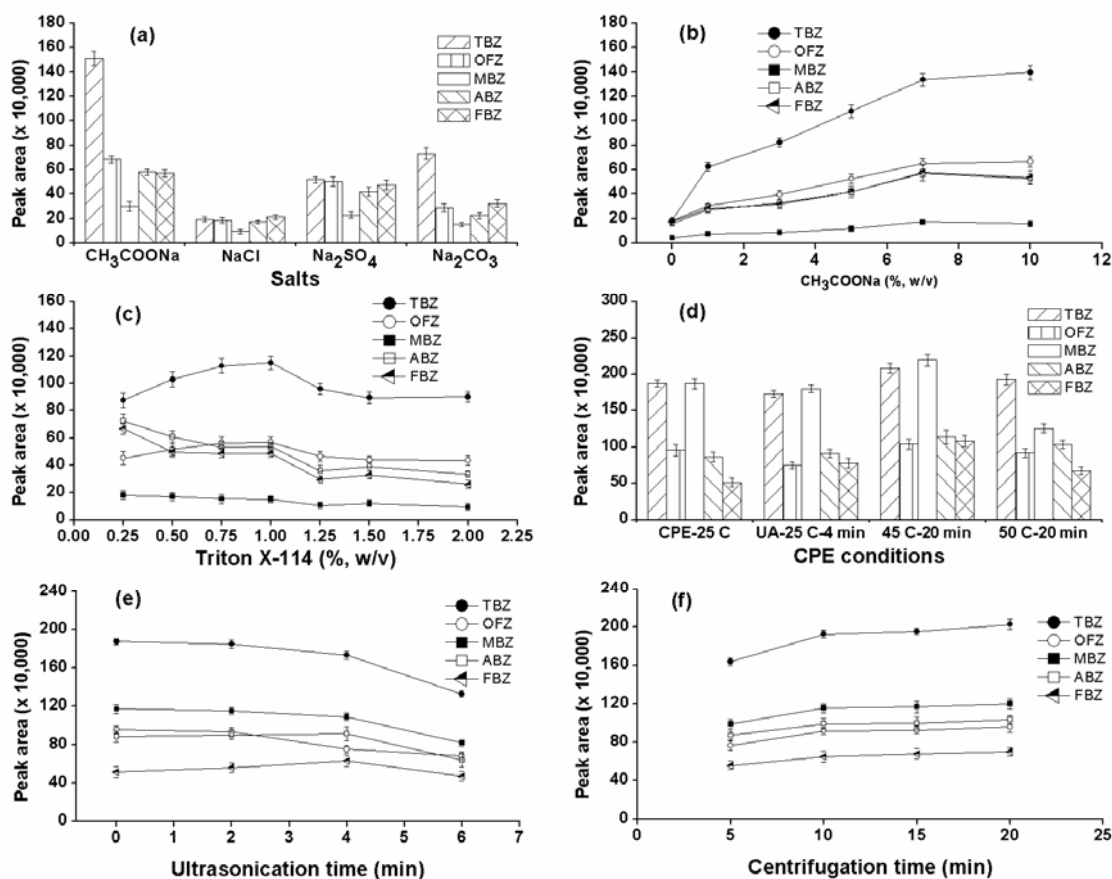
2.3.1.1 ผลของชนิดและความเข้มข้นของเกลือและพีเอชของสารละลาย

เกลือมีบทบาทสำคัญในการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดสารแบบจุดขุ่นได้ โดยช่วยลดค่าการละลายน้ำของสารเป้าหมายในชั้นสารละลายน้ำ พร้อมทั้งช่วยให้เกิดการพาร์ทิชันของสารเป้าหมายเข้าไปในชั้นสารลดแรงตึงผิวเข้มข้น (SRP) ได้ดีขึ้น และช่วยให้การแยกเฟสได้ง่ายขึ้นด้วย นอกเหนือจากนี้ ยังพบว่า เกลือที่เติมลงไปในระบบจะมีผลต่อตำแหน่งของชั้นสารลดแรงตึงผิวเข้มข้น (Santalad et al. 2009; Zhou et al. 2008) ในครั้งนี้ได้ศึกษาโดยใช้เกลือชนิดต่างๆ ได้แก่ โซเดียมอะซิเตท โซเดียมคลอไรด์ โซเดียมซัลเฟต และโซเดียมคาร์บอเนต ในปริมาณของเกลือเป็น 7% (w/v) และที่ระดับความเข้มข้นหน่วยมิลลิโมลาร์เท่ากัน (8.55 mM) จากรูปที่ 2.1a พบว่า เกลือโซเดียมอะซิเตทให้พื้นที่ใต้พีคสูงสุดเมื่อเทียบกับเกลือชนิดอื่นๆ ที่ศึกษาทั้งสองกรณี (ปริมาณ และความเข้มข้นเท่ากัน) ซึ่งสามารถเรียงลำดับการเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดสารเป้าหมายยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซล ได้ดังนี้ โซเดียมอะซิเตท > โซเดียมซัลเฟต > โซเดียมคาร์บอเนต > โซเดียมคลอไรด์

ผลของพีเอช (pH) ของสารละลายหลังจากเติมเกลือดังกล่าวข้างต้นทำการทดลองเช่นกัน เนื่องจากสารเป้าหมายยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซลสามารถแตกตัวเป็นไอออน และแสดงประจุในโครงสร้างได้ ตามค่า pK_a นั่นคือ pK_{a1} ประมาณ 4 – 6 และ pK_{a2} ในช่วง 12 – 13 (ดังตารางที่ 2.1) เมื่อพีเอชของสารละลายมากกว่า 6 สารเป้าหมายจะแสดงประจุบวก ในขณะที่พีเอชมากกว่า 12 สารเป้าหมายจะแสดงประจุลบ และสารเป้าหมายจะอยู่ในรูปเป็นกลาง เมื่อพีเอชสารละลายอยู่ในช่วง 6 – 12 (Danaher et al. 2007) ในการศึกษาครั้งนี้ พีเอชของสารละลายหลังจากเติมเกลือชนิดต่างๆ เป็นดังนี้ โซเดียมอะซิเตท (พีเอช 8.5) โซเดียมคลอไรด์ (พีเอช 7.2) โซเดียมซัลเฟต (พีเอช 6.5) และโซเดียมคาร์บอเนต (พีเอช 11.6) ดังนั้น ในสภาวะของสารละลายที่เติมเกลือเหล่านี้ สารเป้าหมายยังคงอยู่ในรูปไม่แสดงประจุ (neutral) และสารเป้าหมายถูกสกัด และเพิ่มความเข้มข้นในรูปเป็นกลางเข้าไปในกลุ่มก้อนไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิว Triton X-114 แต่อย่างไรก็ตาม แม้ว่า การใช้เกลือดังกล่าวจะสามารถสกัดสารเป้าหมายได้ แต่เกลือโซเดียมอะซิเตทให้ประสิทธิภาพการสกัดสารเป้าหมายได้สูงสุด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่า เกลือชนิดนี้ให้ความแรงของไอออนที่พอเหมาะกับการสกัดสารเป้าหมายมากกว่าเกลือชนิดอื่น ซึ่งเกลือโซเดียมอะซิเตท และโซเดียมคลอไรด์จะให้ชั้นสารลดแรงตึงผิวเข้มข้นอยู่ชั้นล่างของสารละลายหลังการสกัด จึงทำให้ง่ายต่อการแยกชั้นสารละลายน้ำ (ชั้นบน) ออกได้ง่ายกว่า เมื่อเทียบกับกรณีของเกลือโซเดียมซัลเฟต และโซเดียมคาร์บอเนต ซึ่งเกลือสองชนิดนี้ภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง พบว่า ชั้นเฟสของสารลดแรงตึง

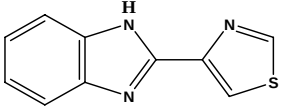
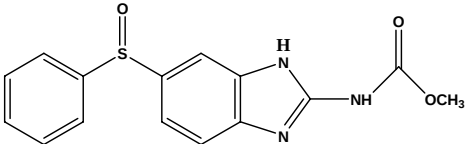
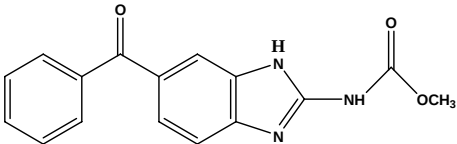
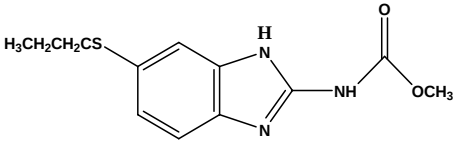
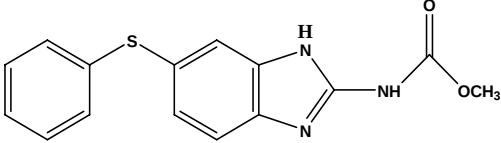
ผิวที่ได้จะมีลักษณะจับกันเป็นก้อนขนาดเล็กๆ ลอยอยู่ด้านบนของสารละลาย ซึ่งทำให้ยากในการแยกเฟสของสารละลายน้ำ และเฟสของสารลดแรงตึงผิวเข้มข้น ดังนั้นในการทดลองนี้ จึงเลือกเกลือโซเดียมอะซิเตทเป็นเกลือที่เหมาะสมในการสกัด

ผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมอะซิเตทที่มีต่อประสิทธิภาพการสกัดศึกษาในช่วง 0 – 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (% w/v) ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 2.1b จะเห็นว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือโซเดียมอะซิเตทสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดได้มากขึ้น (พื้นที่ใต้พีคของสารเป้าหมายเพิ่มขึ้น) จนกระทั่งถึง 7% (w/v) แล้วค่อนข้างคงที่เมื่อความเข้มข้นของเกลือมากขึ้นในช่วงที่ศึกษา ดังนั้น จึงเลือกความเข้มข้นของเกลือโซเดียมอะซิเตทที่ 7% (w/v) เป็นค่าที่เหมาะสมสำหรับการทดลองอื่นๆ ต่อไป



รูปที่ 2.1 ผลของพารามิเตอร์ต่างๆ ที่มีต่อประสิทธิภาพการสกัดสารเป้าหมายยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซล เมื่อ (a) ชนิดของเกลือ (b) ปริมาณของเกลือโซเดียมอะซิเตท (c) ความเข้มข้นของ Triton X-114 (d) สภาวะอุณหภูมิของการสกัดแบบจุดขุ่น (e) เวลาในการอัลตรา-โซนิก และ (f) เวลาในการปั่นเหวี่ยง

ตารางที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีและสมบัติทางเคมี-กายภาพของสารเป้าหมายกลุ่มเบนซิมิดาโซล (Danaher et al. 2007)

Name	Structure/CAS no.	Molecular weight (g/mol)	Aqueous solubility (mg/L) ^a	Octanol-water partition coefficient (K_{ow})	pKa		pH range at which substance is in neutral state
					pKa1	pKa2	
Thiabendazole (TBZ)		201.25	335.2	1.58–1.76	5.22	12.83	7.2–10.9
Oxfendazole (OFZ)		315.35	407.2	1.88–2.13	4.13	11.79	6.1–9.8
Mebendazole (MBZ)		295.29	50.08	2.44–2.52	4.13	11.79	6.1–9.8
Albendazole (ABZ)		265.33	46.39	2.20–2.92	5.54	13.11	7.7–11.2
Fenbendazole (FBZ)		299.35	6.38	3.07–4.01	5.12	12.72	7.1–9.8

^a Obtained by calculation using the Estimation Programs Interface (EPI) SuiteTM v.4.1 (Environmental Protection Agency, USA)

2.3.1.2 ผลของความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว Triton X-114

ในการศึกษาครั้งนี้ เลือกสารลดแรงตึงผิวแบบไม่มีประจุ Triton X-114 สำหรับการสกัดแบบจุดขุ่น เนื่องจากว่า Triton X-114 มีอุณหภูมิในการเกิดจุดขุ่นต่ำ (ประมาณ 22 – 23 องศาเซลเซียส) (Santalad et al. 2009; Zhou et al. 2008) และมีความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ต่ำด้วย (ประมาณ 0.2 mM) ดังนั้น สารละลายสามารถเกิดจุดขุ่น และเกิดการสกัดได้ง่ายที่อุณหภูมิห้อง ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว Triton X-114 ที่ศึกษาอยู่ในช่วง 0 – 2.0% (w/v) จากผลที่ได้ในรูปที่ 2.1c จะเห็นว่า พื้นที่ใต้พีคของไทอะเบนดาโซล ออกเฟนดาโซล และมีเบนดาโซล เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวจนถึง 0.75% (w/v) และลดลงหลังจากจุดนี้ ในขณะที่สารเป้าหมายชนิดอื่นมีพื้นที่ใต้พีคที่มีการลดลงไม่มากนักตลอดช่วงความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว ที่ศึกษา ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะว่า ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวที่สภาวะดังกล่าวเพียงพอต่อการสกัดสารเป้าหมายได้ และจากงานวิจัยอื่นๆ พบว่า สารลดแรงตึงผิวสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดได้น้อยเมื่อเทียบกับการเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์อื่นๆ ในระบบการสกัด (Santalad et al. 2009; Vichapong et al. 2011) แต่อย่างไรก็ตาม ที่ระดับความเข้มข้นสูงๆ ของสารลดแรงตึงผิวจะมีผลให้ปริมาตรของชั้นสารลดแรงตึงผิวมากขึ้นตามด้วย ซึ่งจะส่งผลให้ต้องใช้ตัวทำละลายในการละลายเฟสนี้มากด้วย และทำให้ประสิทธิภาพการสกัดลดลง ดังนั้น ในการทดลองนี้ จึงเลือกความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว Triton X-114 เป็น 0.75% (w/v) เป็นค่าที่เหมาะสม และภายใต้สภาวะดังกล่าวนี้ ปริมาตรของชั้นสารลดแรงตึงผิวเข้มข้น (Surfactant-rich phase หรือ V_{SRP}) และสารละลายน้ำ (Aqueous phase หรือ V_{AQ}) ประมาณ 200 – 250 ไมโครลิตร และ 9.9 – 10.0 มิลลิลิตร ตามลำดับ

2.3.1.3 ผลของอุณหภูมิและเวลาในการสกัดแบบจุดขุ่น

โดยทฤษฎี การที่จะให้ได้ประสิทธิภาพการสกัดสารสูงสุด สภาวะที่ใช้ทำการสกัดในเทคนิคการสกัดแบบจุดขุ่นด้วยสารลดแรงตึงผิวแบบไม่มีประจุ นั้น มักจะทำให้ที่อุณหภูมิที่มากกว่าอุณหภูมิของการเกิดจุดขุ่นประมาณ 15 – 20 องศาเซลเซียส และในระบบที่มีการเติมเกลือด้วย ตัวอย่างเช่น ในกรณีที่ใช้สารลดแรงตึงผิว Triton X-114 ทำการสกัดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และมีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ หรือโซเดียมซัลเฟต เป็นต้น (Santalad et al. 2009; Vichapong et al. 2011) ในการทดลองครั้งนี้ ทำการศึกษาเปรียบเทียบการสกัดแบบจุดขุ่นในลักษณะต่างๆ ได้แก่ การสกัดแบบจุดขุ่นรวมกับการใช้การอัลตราโซนิกที่อุณหภูมิห้อง (Ultrasound-assisted cloud-point extraction หรือ UA-CPE) การสกัดแบบจุดขุ่นดั้งเดิมที่อุณหภูมิห้อง (CPE-25C) และที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิห้อง (45 C-20 min และ 50 C-20 min) ผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 2.1d จะเห็นว่า การสกัดสารด้วยวิธี UA-CPE ที่อุณหภูมิห้องให้ผลที่ใกล้เคียงกับการสกัดแบบจุดขุ่นที่อุณหภูมิสูง (45 และ 50 องศาเซลเซียส) แม้ว่าการสกัดที่อุณหภูมิสูงจะให้ประสิทธิภาพการสกัดที่สูงกว่า แต่ต้องใช้เวลาในการสกัดค่อนข้างนาน (20 นาที) และถ้าเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดดั้งเดิมที่อุณหภูมิห้อง พบว่า พื้นที่ใต้พีคของอัลเบนดาโซล และเฟนเบนดาโซล ที่ได้จากวิธี UA-CPE มีค่าสูงโดยเฉพาะเฟนเบนดาโซล ซึ่งมีรายงานการวิจัยอื่นได้พบว่า คลื่นอัลตราซาวด์สามารถช่วยเร่งให้อัตราการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารเป้าหมายใน

สารละลายน้ำ กับสารลดแรงตึงผิว ทำให้เกิดการถ่ายโอนมวลของสารเป้าหมายเข้าไปในชั้นสารลดแรงตึงผิวเข้มข้นได้สมบูรณ์ขึ้น (Zou et al. 2012; Yao et al. 2007) ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ จึงเลือกการสกัดแบบใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัดแบบจุดซุ่นสำหรับสารเป้าหมายกลุ่มเบนซิมิดาโซล

ผลของเวลาในการอัลตราโซนิก ได้ศึกษาในช่วง 2 – 6 นาที แสดงดังรูปที่ 2.1e จะพบว่า การใช้เวลาในการสกัดด้วยอัลตราโซนิกที่นานจะส่งผลให้ประสิทธิภาพการสกัดลดลง และจะลดลงมากเมื่อเวลานานกว่า 4 นาที ยกเว้นกรณีของอัลเบนดาโซล และเฟนเบนดาโซลที่ให้การเพิ่มขึ้นของพื้นที่ใต้พีคจนถึงเวลา 4 นาทีและลดลงเมื่อเวลานานกว่าจุดนี้ ทั้งนี้อาจจะเนื่องจาก สารเป้าหมายสองชนิดนี้มีความเป็นไฮโดรโฟบิกสูงกว่าสารเป้าหมายชนิดอื่นที่ศึกษา (พิจารณาค่า K_{OW} ในตารางที่ 2.1) ซึ่งทำให้เกิดการพาร์ทิชันเข้าไปในกลุ่มก้อนไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวได้มากขึ้น ในทางตรงกันข้าม ถ้าการอัลตราโซนิกที่นานเกินไปอาจจะทำให้เกิดการแตกออกของกลุ่มก้อนไมเซลล์จึงส่งผลให้ประสิทธิภาพการสกัดลดลง ในครั้งนี้ จึงเลือกเวลา 2 นาที เป็นค่าที่เหมาะสม

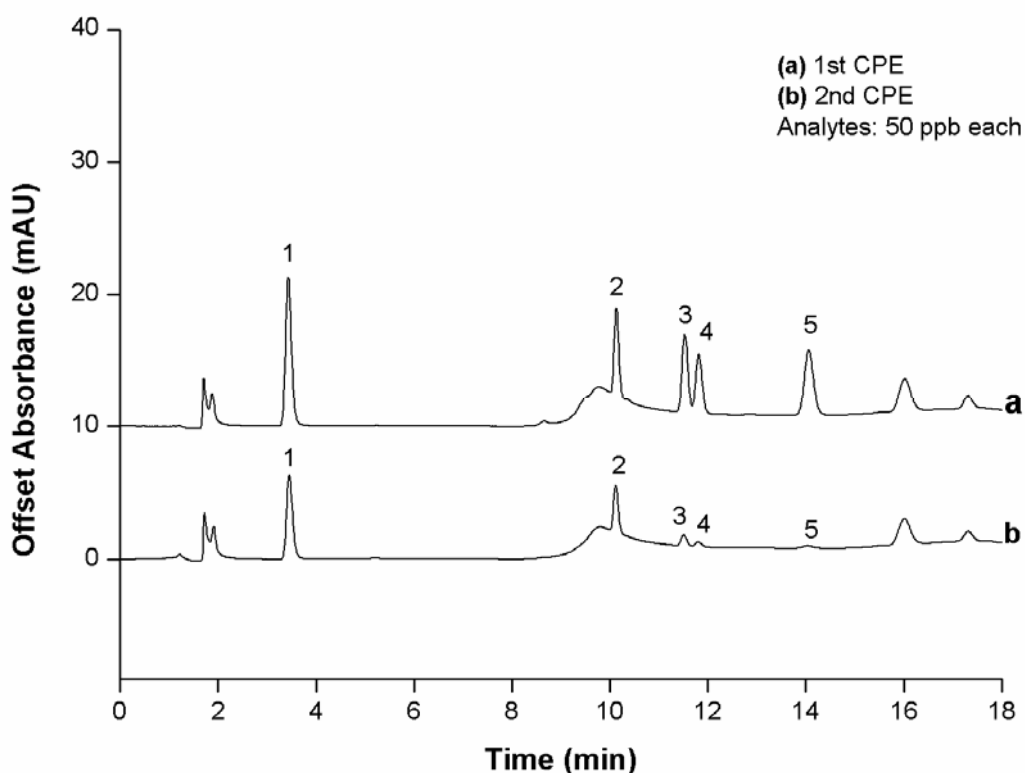
2.3.1.4 ผลของเวลาในการปั่นเหวี่ยง

แม้ว่าการปั่นเหวี่ยงจะมีผลค่อนข้างน้อยต่อประสิทธิภาพการสกัด (Santalad et al. 2009; Vichapong et al. 2011; Liu et al. 2007) แต่การใช้เวลาปั่นเหวี่ยงที่เหมาะสมจะช่วยให้การแยกเฟสเกิดได้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ซึ่งในการทดลองนี้ ทำการแปรเวลาปั่นเหวี่ยงในช่วง 5 – 20 นาที ที่อัตราการปั่นเหวี่ยง 3500 รอบต่อนาที จากผลที่ได้ดังแสดงในรูป 2.1f พบว่า ประสิทธิภาพการสกัดเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยจนถึงเวลา 10 นาที และค่อนข้างคงที่จนถึงเวลา 20 นาที ดังนั้น จึงเลือกเวลาการปั่นเหวี่ยงที่ 10 นาที

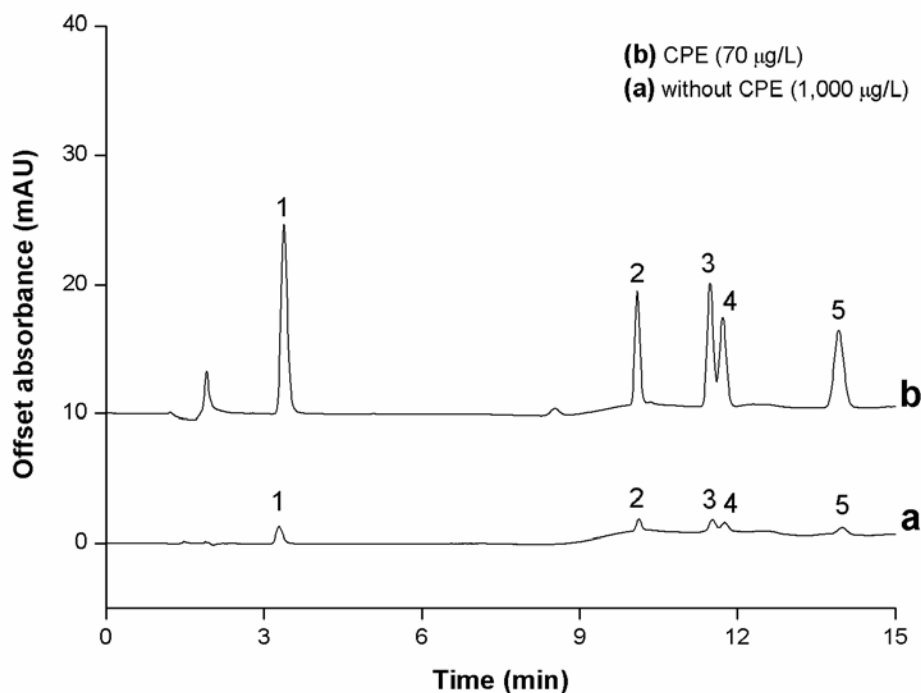
2.3.2 การประเมินประสิทธิภาพการสกัดแบบจุดซุ่น

ประสิทธิภาพการสกัดแบบจุดซุ่นที่พัฒนาขึ้น สามารถประเมินได้จากการทำการสกัดสองครั้งต่อเนื่องกันของสารเป้าหมายที่ระดับความเข้มข้นค่าหนึ่ง (ในที่นี้ศึกษาที่ 50 ไมโครกรัมต่อลิตร) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของการสกัดแบบจุดซุ่น จากการสกัดจุดซุ่นในครั้งแรก (1st extraction) ให้นำชั้นสารละลายน้ำที่ได้จากการสกัดครั้งแรกไปสกัดต่อในครั้งที่สองภายใต้สภาวะที่เหมาะสม จากนั้น นำชั้นสารลดแรงตึงผิวเข้มข้นที่ได้จากการสกัดทั้งสองครั้งไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ผลที่ได้จากการสกัดทั้งสองครั้ง แสดงดังรูปที่ 2.2 ประสิทธิภาพการสกัดคำนวณได้จากความเข้มข้นของสารเป้าหมายจากการสกัดครั้งแรกเทียบกับความเข้มข้นของสารเป้าหมายที่สกัดได้จากการครั้งที่สอง จากการคำนวณพบว่า ได้ประสิทธิภาพการสกัดสูง (90 – 100 เปอร์เซ็นต์) สำหรับมีเบนดาโซล อัลเบนดาโซล และเฟนเบนดาโซล ในขณะที่ประสิทธิภาพการสกัดของไทอะเบนดาโซล และออกเฟนดาโซล ประมาณ 70 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แม้ว่าการสกัดสารเป้าหมายที่ค่อนข้างมีขี้ขั้ว เช่น ไทอะเบนดาโซล และออกเฟนดาโซล อาจจะจำเป็นต้องสกัดสองครั้งเพื่อให้ประสิทธิภาพการสกัดสูงขึ้นก็ตาม แต่การสกัดแบบจุดซุ่นด้วยการสกัดเพียงขั้นตอนเดียวก็เพียงพอสำหรับการหาปริมาณของสารเป้าหมายได้ ซึ่งวิธีการสกัดที่นำเสนอนี้ สามารถให้แฟกเตอร์การเพิ่มความเข้มข้น (Preconcentration factor หรือ PF) ที่ดีในช่วง 18 – 164 เท่า โดยค่าแฟกเตอร์การเพิ่มความเข้มข้น คำนวณจากอัตราส่วนความเข้มข้นของสารเป้าหมายที่ได้จากการสกัดแบบจุดซุ่น

เทียบกับวิธีที่ไม่ผ่านการเพิ่มความเข้มข้น (วิธีวิเคราะห์โดยตรง) จากค่าแฟกเตอร์การเพิ่มความเข้มข้นที่ได้จะสอดคล้องกับสมบัติความเป็นไฮโดรโฟบิกของสารเป้าหมาย (พิจารณาค่า K_{OW} ตามตารางที่ 2.1) ยกเว้นไทอะเบนดาโซลที่มีค่าแฟกเตอร์การเพิ่มความเข้มข้นสูง ซึ่งอาจจะเป็นเพราะว่าไทอะเบนดาโซลมีโครงสร้างโมเลกุลขนาดเล็กจึงสามารถพาร์ทิชันเข้าไปในกลุ่มก้อนไมเซลล์ได้ดีกว่า วิธีการสกัดแบบจุดุ่นสามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารเป้าหมายได้สูงกว่าวิธีที่วิเคราะห์โดยตรง โดยโครมาโทแกรมเปรียบเทียบทั้งสองวิธีแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.2 แสดงโครมาโทแกรมที่ได้จากการสกัดสารเป้าหมายสองครั้ง เมื่อ (a) สกัดครั้งแรก และ (b) สกัดต่อเนื่องครั้งที่สอง และระบุพืชสารเป้าหมายเป็น 1, TBZ; 2, OFZ; 3, MBZ; 4, ABZ; 5, FBZ

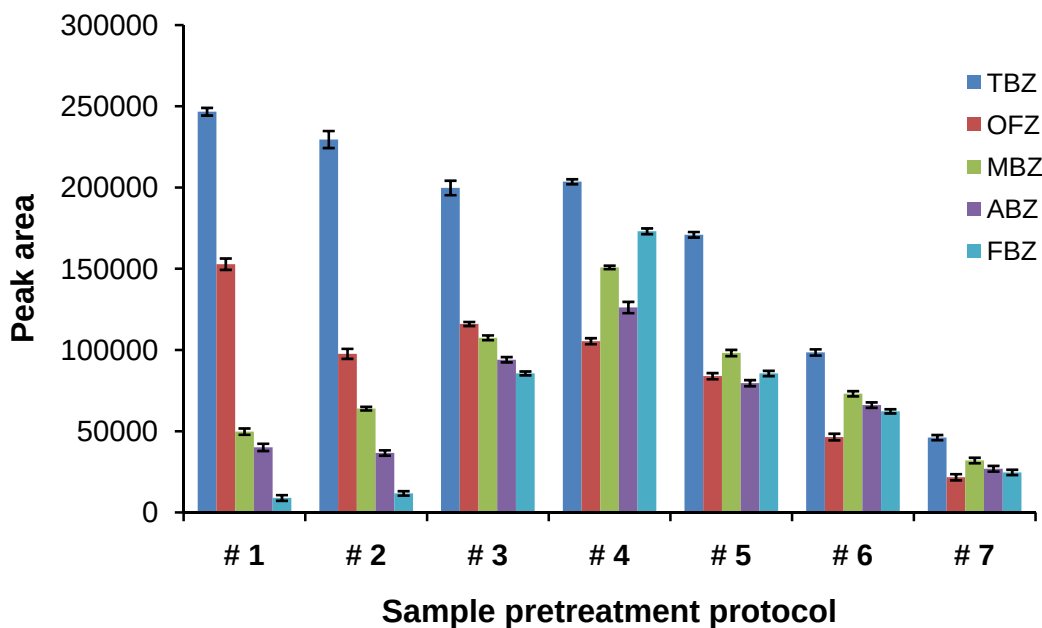


รูปที่ 2.3 โครมาโทแกรมของสารเป้าหมายที่ได้จาก (a) การวิเคราะห์โดยตรง และ (b) การสกัดแบบจุดชุ่ม และระบุพีคสารเป้าหมายเป็น 1, TBZ; 2, OFZ; 3, MBZ; 4, ABZ; 5, FBZ

2.3.3 การวิเคราะห์ในตัวอย่างนม

2.3.3.1 วิธีตกตะกอนโปรตีนและไขมัน

เนื่องจากในตัวอย่างนม มีองค์ประกอบเป็นไขมันและโปรตีนเป็นหลัก ซึ่งจะรบกวนการวิเคราะห์สารเป้าหมายได้ ดังนั้น ต้องมีวิธีการตกตะกอนโปรตีนและไขมันที่เหมาะสมก่อนเสมอ ซึ่งงานวิจัยนี้ได้ทดลองการตกตะกอนโปรตีนหลายวิธี แสดงดังรูปที่ 2.4 จะเห็นว่า การตกตะกอนโปรตีนและไขมันตามวิธีหมายเลข 4 ให้พื้นที่ใต้พีคของสารเป้าหมายหลังการสกัดแบบจุดชุ่มสูงกว่าวิธีอื่นๆ ซึ่งวิธีดังกล่าวนี้ เป็นการตกตะกอนโปรตีนและไขมันด้วยการใช้สารละลาย 1% (v/v) กรดอะซิติกในอะซิโตนไนไตรล์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และใช้เกลือโซเดียมซัลเฟต (0.5 กรัม) ต่อปริมาตรตัวอย่างนม 5 มิลลิลิตร ดังนั้น จึงเลือกวิธีการดังกล่าวนี้สำหรับตกตะกอนโปรตีนและไขมันในตัวอย่างนม ก่อนที่จะนำไปสกัดและเพิ่มความเข้มข้นตามวิธีการสกัดแบบจุดชุ่มต่อไป



รูปที่ 2.4 วิธีการตกตะกอนโปรตีนและไขมันด้วยกระบวนการต่างๆ ก่อนการสกัดด้วยวิธีแบบจุดหมุนของสารเป้าหมายเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อลิตร เมื่อหมายเลขกำกับวิธีต่างๆ เป็นดังนี้ **#1**, milk (10 mL)+water (3 mL) + 0.5 g Na_2SO_4 + 150 μL acetic acid; **#2**, milk (10 mL) + water (5 mL) + 150 μL acetic acid; **#3**, milk (5 mL) + 0.5 g Na_2SO_4 + 1% acetic acid in ACN (5 mL) and supernatant was evaporated at 40°C; **#4**, milk (5 mL) + 0.5 g Na_2SO_4 + 1% acetic acid in ACN (5 mL); **#5**, milk (5 mL) + water (1 mL) + 0.5 g Na_2SO_4 + 1% acetic acid in ACN (4 mL); **#6**, milk (5 mL) + 0.25 g Na_2SO_4 + 1% acetic acid in ACN (5 mL); and **#7**, milk (5 mL) + 1% acetic acid in ACN (5 mL). The pretreated samples were centrifuged at 3500 rpm for 5 min and then supernatants were filtered through Whatman filter paper No.1. The supernatants were diluted to 10 mL with water before subjecting to CPE.

2.3.3.1 พารามิเตอร์สำหรับการวิเคราะห์ในตัวอย่างนม

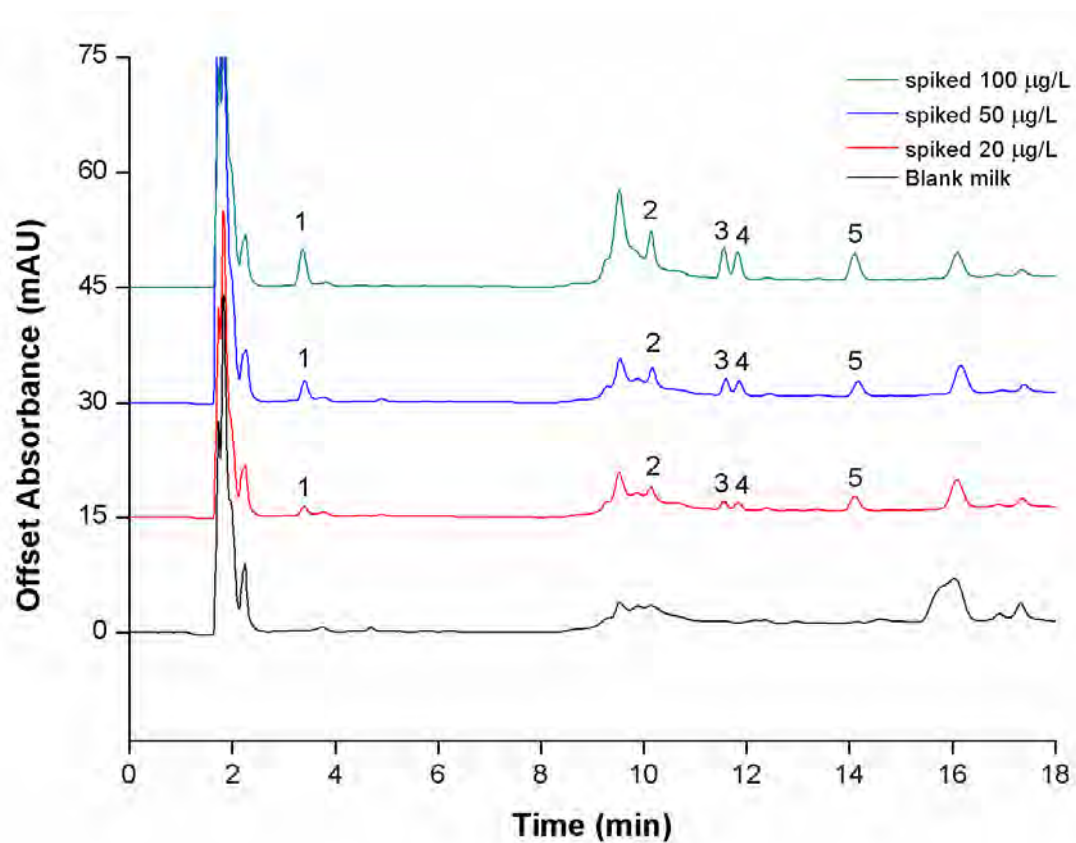
ในการวิเคราะห์การตกค้างของยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซลในตัวอย่างนม พารามิเตอร์ที่ศึกษา ประกอบด้วย การสร้างกราฟมาตรฐาน ช่วงความเป็นเส้นตรง ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด ซึ่งในการสร้างกราฟมาตรฐานจะทำการเติมสารเป้าหมายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ลงในตัวอย่างนมก่อนขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนและไขมัน ในการทดลองครั้งนี้ พบว่าตรวจไม่พบการตกค้างของยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซลในตัวอย่างนมที่ทำการวิเคราะห์ ข้อมูลกราฟมาตรฐานของสารเป้าหมายในตัวอย่างนมชนิดต่างๆ แสดงดังตารางที่ 2.2 ช่วงความเป็นเส้นตรงจะอยู่ในช่วง 10 – 200 ไมโครกรัมต่อลิตร และให้ค่าสัมประสิทธิ์การกำหนด (Coefficients of

determination หรือ R^2) มากกว่า 0.995 ขีดจำกัดของการตรวจวัด ($S/N=3$) สารเป้าหมายในตัวอย่งนอยู่ในช่วง 1 – 5 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งต่ำกว่าค่า MRLs ที่กำหนดไว้ในตัวอย่งนที่ระดับต่ำกว่า 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามมาตรฐานของ Codex (Codex Alimentarius Commission, 2011) และในช่วง 20 – 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ที่กำหนดโดยหน่วยงานประเทศออสเตรเลีย (Australian Government, 2012)

โครมาโทแกรมของตัวอย่งน (Sample blank) และที่เติมสารมาตรฐานระดับความเข้มข้นต่างๆ แสดงในรูปที่ 2.5 สำหรับการทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ จะศึกษาในเทอมของร้อยละการกลับคืน (%Recovery) โดยการเติมสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 20 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร ลงในตัวอย่งนที่ศึกษา ผลที่ได้จากการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 2.3 ซึ่งจะเห็นว่า ให้ร้อยละการกลับคืนของสารเป้าหมายที่เติมทั้งสามระดับความเข้มข้น มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ แต่สำหรับมีเบนดาโซลที่เติมในตัวอย่งนยูเอชทีเอสจีดี อาจจะให้ร้อยละการกลับคืนต่ำกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะว่ามีการรบกวนจากโปรตีนและไขมันที่อาจจะตกค้างอยู่ในตัวอย่งน แต่อย่างไรก็ตามร้อยละการกลับคืนที่ยอมรับได้ ยังอยู่ในช่วง 75 – 120 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งกำหนดโดยหน่วยงานมาตรฐานการวิเคราะห์สารตกค้างของยาฆ่าสัตว์ของประเทศออสเตรเลีย (Australian pesticides and veterinary medicines authority, 2005) จากผลการทดลองที่ได้ ชี้ให้เห็นว่า วิธีการที่นำเสนอนี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการสกัดและเพิ่มความเข้มข้น พร้อมทั้งสามารถใช้วิเคราะห์เชิงปริมาณของยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซลในตัวอย่งนได้เป็นอย่างดีด้วยความไวในการวิเคราะห์สูง และผลการวิเคราะห์ซ้ำที่ดี

ตารางที่ 2.2 ข้อมูลกราฟมาตรฐานของยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซลในตัวอย่างนมชนิดต่างๆ (n=3)

Analyte	UHT low fat milk		UHT plain milk		UHT fresh milk		Pasteurized plain milk	
	Linear equation	R ²	Linear equation	R ²	Linear equation	R ²	Linear equation	R ²
TBZ	y=476.6x-507.3	0.9967	y=470.5x-2101	0.9970	y=446.2x-923.7	0.9984	y=464.0x+1433.6	0.9954
OFZ	y=311.9x+286.7	0.9981	y=248.0x+5658	0.9965	y=245.4x+4347.8	0.9965	y=318.3x-1044.5	0.9976
MBZ	y=343.4x-2076.6	0.9985	y=297.8x+1970	0.9979	y=322.5x+683.7	0.9958	y=328.5x+3348.2	0.9981
ABZ	y=307.5x-1249.8	0.9988	y=354.1x+992	0.9976	y=348.0x-981.9	0.9988	y=320.8x+3561	0.9987
FBZ	y=533.1x-3703.6	0.9983	y=462.6x+8482	0.9990	y=529.5x-1089.3	0.9967	y=656.6x-4030.2	0.9974



รูปที่ 2.5 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารเป้าหมายกลุ่มเบนซิมิดาโซลในตัวอย่างนมโคสดยูเอชทีที่ไม่เติมสารมาตรฐาน (Sample blank) และเติมสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และระบุพิกัดสารเป้าหมายเป็น 1, TBZ; 2, OFZ; 3, MBZ; 4, ABZ; 5, FBZ

ตารางที่ 2.3 ร้อยละการกลับคืน (%Recovery) ของยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซลที่ระดับการเติมที่ความเข้มข้นต่างๆ ในตัวอย่างนมชนิดที่ศึกษา (n=3)

Analyte	Spiked (µg/L)	UHT low fat			UHT plain			UHT fresh			Pasteurized plain		
		Measured (µg/L)	R (%)	RSD (%)	Measured (µg/L)	R (%)	RSD (%)	Measured (µg/L)	R (%)	RSD (%)	Measured (µg/L)	R (%)	RSD (%)
TBZ	0	ND	-	-	ND	-	-	ND	-	-	ND	-	-
	20	21.72	108.6	2.8	22.58	112.9	2.4	19.66	98.3	1.4	20.36	101.8	2.1
	50	53.97	108.0	1.0	38.85	77.7	0.9	49.44	98.9	1.6	45.54	91.1	6.1
	100	110.60	110.6	1.1	102.40	102.4	0.2	101.91	101.9	3.5	97.74	97.7	1.1
OFZ	0	ND	-	-	ND	-	-	ND	-	-	ND	-	-
	20	20.12	100.6	7.8	21.68	108.4	4.3	20.74	103.7	4.8	20.24	101.2	6.3
	50	49.99	100.0	7.9	46.85	93.7	1.8	47.23	94.5	3.9	46.37	92.7	5.1
	100	105.20	105.2	2.0	91.80	91.8	1.5	104.47	104.5	0.7	87.04	87.0	2.0
MBZ	0	ND	-	-	ND	-	-	ND	-	-	ND	-	-
	20	21.31	106.6	0.4	17.96	89.8	0.6	19.62	98.1	4.9	19.39	97.0	3.0
	50	54.20	108.4	0.5	37.65	75.3	0.8	55.71	111.4	1.9	53.74	107.5	1.0
	100	103.57	103.6	0.4	76.28	76.3	0.4	106.95	107.0	1.2	89.68	89.7	0.8
ABZ	0	ND	-	-	ND	-	-	ND	-	-	ND	-	-
	20	21.63	108.2	1.5	22.78	113.0	0.6	22.04	110.2	1.2	22.25	111.3	0.3
	50	53.40	106.8	0.7	38.40	76.8	1.2	55.69	111.4	1.5	47.31	94.6	1.2
	100	104.47	104.5	0.7	81.30	81.3	0.5	103.74	103.7	4.1	87.84	87.8	0.3
FBZ	0	ND	-	-	ND	-	-	ND	-	-	ND	-	-
	20	20.98	104.9	4.6	17.48	87.4	3.5	21.32	106.6	4.6	20.53	102.7	4.9
	50	52.63	105.3	2.4	44.35	88.7	2.1	50.64	101.3	5.6	49.03	98.1	5.3
	100	106.30	106.3	1.0	96.55	96.6	1.2	89.36	89.4	1.1	80.68	80.7	2.7

ND: not detected, R: recovery

2.4 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้นำเสนอวิธีการสกัดแบบจุดชุ่มร่วมกับการใช้คลื่นอัลตราโซนิก (UA-CPE) สำหรับการสกัดและเพิ่มความเข้มข้นสารเป้าหมายยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซล และวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ นำไปประยุกต์ใช้วิเคราะห์สารตกค้างดังกล่าวในตัวอย่างนมชนิดต่างๆ จากผลการทดลองที่ได้ พบว่า ตรวจไม่พบการตกค้างของสารเป้าหมายในตัวอย่างนมที่ทำการวิเคราะห์ วิธีดังกล่าวนี้ให้ขีดจำกัดของการตรวจวัดสารเป้าหมายในตัวอย่างนมอยู่ในช่วง 1 – 5 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าต่ำกว่าปริมาณสารตกค้างสูงสุด (MRL) ของยาถ่ายพยาธิกลุ่มดังกล่าวในตัวอย่างนม นอกเหนือจากนี้ วิธีที่นำเสนอนี้สามารถทำการสกัดได้รวดเร็ว ให้แฟกเตอร์การเพิ่มความเข้มข้นได้สูงอยู่ระหว่าง 18 – 164 เท่า ให้อัตราการกลับคืนที่สูง และให้ผลการวิเคราะห์ซ้ำที่ดี และเป็นวิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมที่สามารถเป็นวิธีทางเลือกหนึ่งสำหรับการวิเคราะห์ยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซลในตัวอย่างอื่นๆ ได้

บทที่ 3

การเพิ่มความเข้มข้นสารเป้าหมายด้วยวิธีการสกัดระดับไมโครแบบการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ และสารลดแรงตึงผิวช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเกิดอิมัลชัน และวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

3.1 บทนำ

โดยทั่วไป ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและเพิ่มความเข้มข้นของสารเป้าหมายก่อนการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือถือว่ามีความจำเป็น ซึ่งขั้นตอนดังกล่าวนี้ จะช่วยกำจัดหรือลดสารรบกวน ในขณะเดียวกันยังช่วยเพิ่มความเข้มข้นของสารเป้าหมายได้ด้วย วิธีการเตรียมตัวอย่างและเพิ่มความเข้มข้นที่นำมาประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์สารกลุ่มเบนซิมิดาโซล เช่น การสกัดด้วยเฟสของแข็ง (Solid phase extraction หรือ SPE) (Xia et al. 2010; Chen et al. 2010) การสกัดแบบตัวทำละลายโดยใช้ความดันเข้าช่วยในการสกัด (Pressurized liquid extraction หรือ PLE) (Chen et al. 2011) การสกัดแบบจุดขุ่น (Cloud-point extraction หรือ CPE) (Halko et al. 2004) และการสกัดระดับไมโครแบบการกระจายเฟสของเหลว-ของเหลว (Dispersive liquid-liquid microextraction หรือ DLLME) (Wu et al. 2009) เมื่อเร็วๆ นี้ ได้มีการนำเสนอวิธีการแบบใหม่ คือ การสกัดระดับไมโครแบบใช้อัลตราซาวด์และสารลดแรงตึงผิวช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเกิดอิมัลชัน (Ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction หรือ UASEME) เพื่อเป็นเทคนิคทางเลือกทดแทนวิธี DLLME วิธีการสกัดระดับไมโครแบบใช้อัลตราซาวด์ช่วยการเกิดอิมัลชัน (Ultrasound-assisted emulsification microextraction หรือ UAEME) และ CPE สำหรับการวิเคราะห์สารเป้าหมายหลากหลายประเภท (Wu et al. 2010a; Wu et al. 2010b; Cheng et al. 2011a; Cheng et al. 2011b; Xia et al. 2012) เทคนิค UASEME เป็นเทคนิคที่รวมเอาข้อดีของเทคนิค DLLME UAEME และ CPE ด้วยการใช้ตัวทำละลายในการสกัด (Extraction solvent) ที่ไม่ละลายน้ำในปริมาตรระดับไมโคร เช่น คลอโรฟอร์ม ไดคลอโรมีเทน คลอโรเบนซีน เป็นต้น และใช้สารลดแรงตึงผิวเป็นสารอิมัลซิฟายเออร์ (Emulsifier) เช่น ไทรทอน เอกซ์-114 (Triton X-114) โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต (SDS) ซิทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (CTAB) เป็นต้น ภายใต้สภาวะการให้คลื่นอัลตราโซนิกเข้าช่วยในการสกัดที่อุณหภูมิ 25 ± 3 องศาเซลเซียส (Cheng et al. 2011a; Cheng et al. 2011b; Saraji et al. 2010) การสกัดในระบบดังกล่าวนี้ ที่มีการใช้สารลดแรงตึงผิวเป็นอิมัลซิฟายเออร์นั้น ได้มีรายงานว่าสามารถช่วยเร่งการเกิดหยดขนาดเล็ก (Fine droplets) ของตัวทำละลายที่ใช้สกัดสารในสารละลายน้ำ (Aqueous solution) และช่วยเพิ่มการกระจายตัวของเฟสที่ไม่ละลายน้ำให้เข้าไปละลายได้ในชั้นน้ำ ตามสมบัติความชอบและไม่ชอบน้ำของสารลดแรงตึงผิว (Cheng et al. 2011a; Cheng et al. 2011b; Saraji et al. 2010) ดังนั้น จึงทำให้ประสิทธิภาพการสกัดสารเป้าหมายสูงขึ้น (Xia et al. 2012) แต่อย่างไรก็ตาม การพัฒนาและประยุกต์ใช้เทคนิคการสกัดและเพิ่มความเข้มข้นแบบ UASEME ในตัวอย่างหลากหลายยังไม่มีมากนัก โดยเฉพาะการนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์สารกลุ่มเบนซิมิดาโซลในตัวอย่างอาหาร

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ มุ่งเน้นการพัฒนาและประยุกต์ใช้เทคนิคการสกัดแบบ UASEME ควบคู่กับเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและการตรวจวัดแบบโพโตไดโอดอาร์เรย์ สำหรับการสกัด เพิ่มความเข้มข้นและวิเคราะห์สารเป้าหมายยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซลที่ตกค้างในตัวอย่างนม ได้ศึกษาพารามิเตอร์ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดและเพิ่มความเข้มข้นในเทคนิค UASEME และศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างและตกตะกอนโปรตีนและไขมันในตัวอย่างนมด้วยงานวิจัยนี้ ถือว่าเป็นครั้งแรกที่นำวิธีการสกัดแบบ UASEME สำหรับการวิเคราะห์ยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซล

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 สารเคมี

สารเคมีและรีเอเจนต์ที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นเกรดที่มีความบริสุทธิ์สูง ซึ่งสารเคมีที่ใช้มีดังนี้

- 1) สารมาตรฐานยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซล ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Sigma-Aldrich ประกอบด้วย ไทอะเบนดาโซล (Thiabendazole หรือ TBZ) (Italy) ออกเฟนดาโซล (Oxfendazole หรือ OFZ) (Germany) เมเบนดาโซล (Mebendazole หรือ MBZ) (USA) อัลเบนดาโซล (Albendazole หรือ ABZ) (China) และเฟนเบนดาโซล (Fenbendazole หรือ FBZ) (China) สารมาตรฐานเหล่านี้ให้เตรียมเป็นสารละลายสต็อกเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเตรียมในกรดฟอร์มิกเข้มข้น (500 ไมโครลิตร) แล้วละลายและปรับปริมาตรจนครบ 10 มิลลิลิตรด้วยเมทานอล
- 2) สารละลายของสารลดแรงตึงผิวต่างๆ ให้เตรียมสารละลายสต็อกที่ระดับความเข้มข้น 25% (w/v) ด้วยการชั่งน้ำหนักสารให้เหมาะสม แล้วละลายในน้ำ สารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้แก่ Triton X-114, Dodecyl trimethyl ammonium bromide (DTAB) และ Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA), Triton X-100 (Fluka, Switzerland), Genapol X-080 (Fluka, Spain), Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) Sigma-Aldrich (India), และ Sodium dodecyl sulphate (SDS) (BDH Prolabo, Belgium)
- 3) ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้เป็นสารสกัด (Extraction solvent) ได้แก่ คลอโรฟอร์ม (BDH, Belgium) ไดคลอโรมีเทน (RCI Labscan, Thailand) และ ไตรคลอโรเอทิลีน (Ajax Finechem, Australia)
- 4) เกลือชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง เช่น โซเดียมคลอไรด์ (Ajax Finechem, New Zealand) โซเดียมซัลเฟต (Carlo Erba, France) โซเดียมคาร์บอเนต (RFCL, India) และโซเดียมอะซิเตท (Carlo Erba, France)
- 5) สารและตัวทำละลายอื่นๆ ได้แก่ กรดอะซิติกเข้มข้น กรดฟอร์มิกเข้มข้น เมทานอล และอะซิโตนไนโตรล์ จากบริษัทเมอร์ค (Merck, Germany)

6) น้ำปราศจากไอออนที่มีค่าสภาพต้านทาน $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ รุ่น RiO_5^{TM} Type I Simplicity 185 (Millipore water, USA) ซึ่งใช้สำหรับการเตรียมสารละลายในการทดลองนี้

3.2.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1) เครื่อง HPLC: Shimadzu LC-20A System 2009 (Japan) ใช้ซอฟต์แวร์ รุ่น LC Solution ในการควบคุมการทำงานและประมวลผล

- ปั๊ม (Pump): Binary รุ่น LC-20AD
- ดีเทคเตอร์ (Detector): PDA รุ่น SPD-20A Lamp D_2
- คอลัมน์ (Column): Waters Atlantis C_{18} Column (4.6 มิลลิเมตร x 150 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร) (Ireland)

2) เครื่องอัลตราโซนิก (Ultrasonic cleaner): 40 kHz, 500 W, Power sonic 410 Hwashin Technology (Korea)

3) เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge): Bench Top Centrifuge NF 200 (12 x 15 มิลลิลิตร) (Turkey)

3.2.3 สภาวะการแยกสารด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

การแยกสารเป้าหมายกลุ่มเบนซิมิดาโซลทั้ง 5 ชนิด จะใช้การชะสารแบบเกรเดียนท์ (ตารางที่ 3.1) ด้วยเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ คือ เมทานอล และ 1.0% (v/v) กรดอะซิติก โดยให้อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 296 นาโนเมตร

3.2.4 การเพิ่มความเข้มข้นด้วยเทคนิค UASEME

ขั้นตอนที่ใช้ในการสกัดแบบ UASEME ทำได้โดยการนำสารละลายมาตรฐานผสม (หรือ สารละลายตัวอย่าง) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีกับเกลือ CH_3COONa น้ำหนัก 0.3000 กรัม (6%, w/v) จากนั้นเติมสารลดแรงตึงผิว Triton X-114 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (0.5%, w/v) และเติมตัวทำละลายอินทรีย์ไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (จะสังเกตเห็นสารละลายขุ่น) หลังจากนั้นนำสารละลายดังกล่าวนี้ไปอัลตราโซนิกเคชันเป็นเวลา 4 นาที และปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาที (3500 rpm) จะได้ชั้นของสารไดคลอโรมีเทน (อยู่ชั้นล่าง) แยกจากชั้นสารละลายน้ำ (Aqueous phase) อย่างชัดเจน ทำการแยกชั้นน้ำออก แล้วละลายเฟสไดคลอโรมีเทนที่สกัดได้ด้วยเมทานอล ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปฉีด (20 μL) เข้าระบบ HPLC เพื่อทำการวิเคราะห์สารเป้าหมายต่อไป

ตารางที่ 3.1 แสดงอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ในระบบเกรเดียนท์สำหรับการแยกสารเป้าหมาย

เวลา (นาที)	เมทานอล (ร้อยละโดยปริมาตร)
0	40
3	40
5	75
10	75
12	85
15	85
17	100
20	100
22	40
25	40

3.2.5 การวิเคราะห์สารเป้าหมายตกค้างในตัวอย่างนม

ตัวอย่างนมวัวที่ทำการศึกษาคือเป็นนมพร้อมดื่มที่มีจำหน่ายทั่วไปในจังหวัดขอนแก่น เช่น นมยูเอชทีไขมันต่ำ (UHT low fat) นมยูเอชทีรสจืด (UHT plain) นมพาสเจอร์ไรส์รสจืด (pasteurized plain) และนมสด (raw fresh milk) ขั้นตอนการวิเคราะห์ตัวอย่างนม ทำได้ดังนี้

นำตัวอย่างนม (2.0 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันดีกับเกลือโซเดียมซัลเฟต 0.2 กรัม หลังจากนั้น เติมน้ำละลายกรดอะซิติกในอะซิโตนไตรคลอไรด์เข้มข้น 1.0% (v/v) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายอย่างรวดเร็วด้วยมือประมาณ 1 นาที หลังจากนั้นนำตัวอย่างนมไปปั่นเหวี่ยงที่ 3500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกตะกอนโปรตีนได้สมบูรณ์ขึ้น นำสารละลายส่วนใส (supernatant) กรองผ่านกระดาษกรอง แล้วเจือจางสารละลายที่ได้ด้วยน้ำให้ได้ปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร เพื่อตกตะกอนโปรตีนที่สมบูรณ์ขึ้น ให้เติมกรดอะซิติก 100 ไมโครลิตรอีกครั้ง แล้วนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยง หลังจากนั้น นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปสกัดและเพิ่มความเข้มข้นด้วยวิธี UASEME และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

สำหรับการศึกษาร้อยละการกลับคืน (%recovery) ให้ทำการเติมสารเป้าหมายลงในตัวอย่างนมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน เช่น 20 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร ก่อนการนำตัวอย่างไปตกตะกอนไขมันและโปรตีน

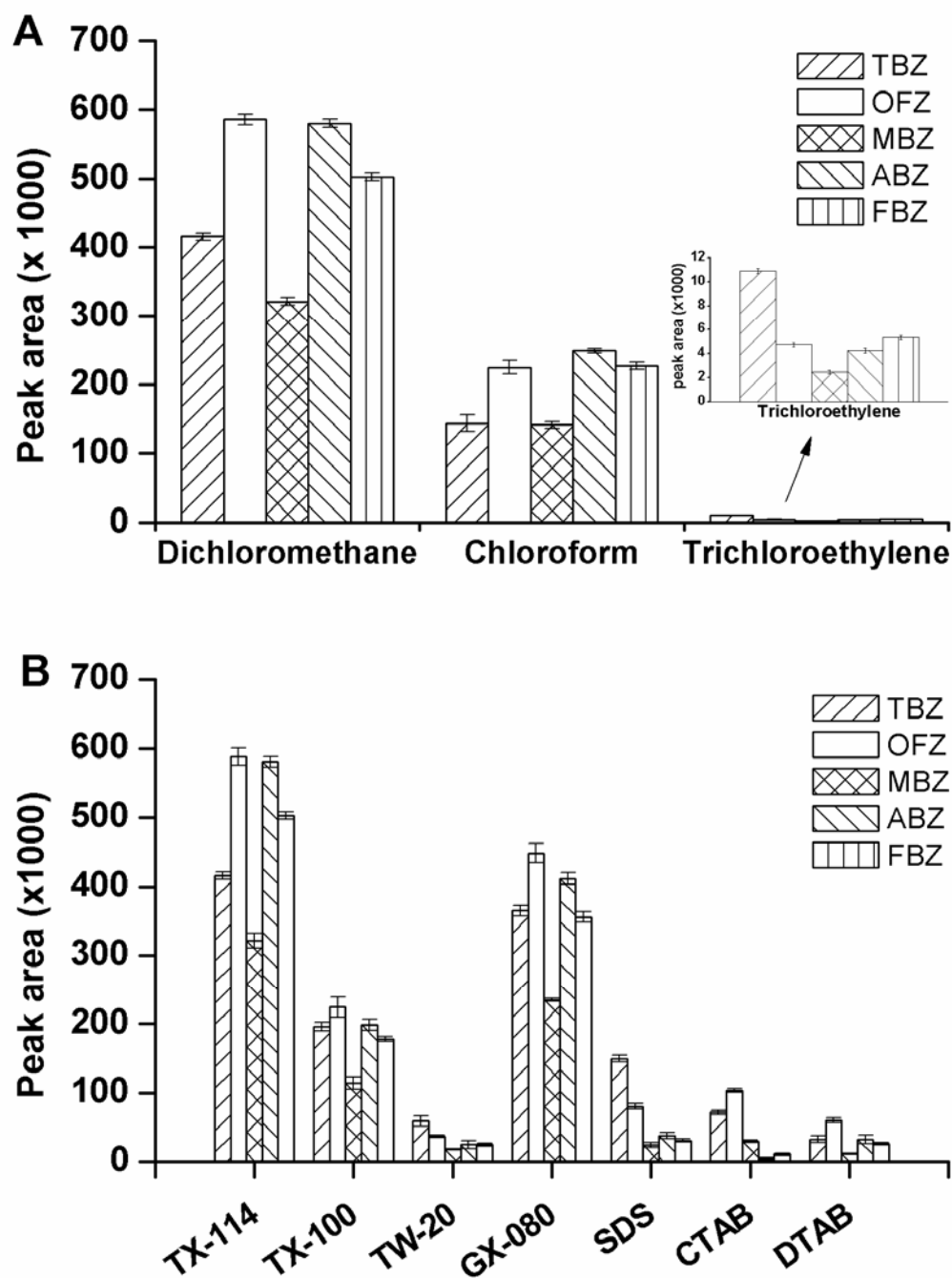
3.3 ผลการทดลองและอภิปรายผล

3.3.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค UASEME

ในการสกัดและเพิ่มความเข้มข้นด้วยเทคนิค UASEME พารามิเตอร์ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัด ได้แก่ ชนิดและปริมาตรของตัวทำละลายสกัด (extraction solvent) ชนิดและความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว (อิมัลซิฟายเออร์) ปริมาณเกลือที่เติมและพีเอชของสารละลาย และเวลาในการอัลตราโซนิก ดังนั้น เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุด จำเป็นต้องหาสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละพารามิเตอร์ข้างต้น ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ จะทำการแปรที่ละพารามิเตอร์โดยพารามิเตอร์อื่นๆ คงที่

3.3.1.1 การเลือกชนิดตัวทำละลายที่ใช้เป็นตัวสกัด (extraction solvent)

การเลือกตัวทำละลายที่ใช้สกัดสาร (Extraction solvent) ได้เหมาะสมจะเป็นการช่วยให้กระบวนการเกิดอิมัลชัน (Emulsification phenomenon) ได้ดีขึ้น และยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดด้วย (Wu et al. 2010b; Cheng et al. 2011b) ซึ่งตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้สำหรับเป็นตัวสกัดสาร ควรจะมีคุณสมบัติดังนี้ (1) มีความหนาแน่นมากกว่าน้ำ (2) ไม่ละลายน้ำหรือละลายในน้ำได้น้อย และ (3) สามารถเกิดอิมัลชันแล้วให้หยดขนาดเล็กของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เสถียร ในการทดลองนี้ ได้ศึกษาตัวทำละลายที่ใช้สกัด ได้แก่ คลอโรฟอร์ม (ความหนาแน่น 1.48 g/mL) ไดคลอโรมีเทน (ความหนาแน่น 1.33 g/mL) และไตรคลอโรเอทิลีน (ความหนาแน่น 1.46 g/mL) ภายใต้สภาวะการทดลองที่ศึกษา ได้ผลแสดงดังรูปที่ 3.1A จะเห็นว่า ไดคลอโรมีเทนให้พื้นที่ใต้พีคของสารเป้าหมายทุกชนิดสูงที่สุด เมื่อเทียบกับการใช้ตัวทำละลายอื่นที่ศึกษา การที่ไดคลอโรมีเทนสามารถสกัดสารเป้าหมายได้ดีที่สุด อาจเป็นเพราะว่าไดคลอโรมีเทนมีความเป็นขั้ว (hydrophobicity) และสภาพขั้ว (polarity) ที่ใกล้เคียงกับขั้วของสารเป้าหมาย นอกจากนี้ ไดคลอโรมีเทนอาจจะสามารถละลายและกระจายเฟสในสารละลายน้ำได้ดีกว่าตัวทำละลายอื่นๆ ภายใต้ระบบที่มีสารลดแรงตึงผิว ดังนั้น ในการทดลองนี้จะเลือกไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับสกัดสารเป้าหมาย



รูปที่ 3.1 ผลของ (A) ชนิดตัวทำละลายที่ใช้สกัดสารเป้าหมาย และ (B) ชนิดของสารลดแรงตึงผิวที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดสารเป้าหมายกลุ่มเบนซิมิดาโซล (ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อลิตร) สภาวะการทดลอง: ปริมาตรสารตัวอย่าง (5.0 มิลลิลิตร) ปริมาตรตัวทำละลายสกัด (50 ไมโครลิตร) สารลดแรงตึงผิวเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เกลือโซเดียมอะซิเตทเข้มข้น 6.0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และเวลาในการอัลตราโซนิก 3 นาที

3.3.1.2 ชนิดและความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว (อิมัลซิฟายเออร์)

บทบาทของสารลดแรงตึงผิวในกระบวนการสกัดแบบ UASEME คือ ช่วยทำให้เกิดกระบวนการอิมัลชันของตัวทำละลายสกัดที่ไม่ละลายน้ำเป็นหยดเล็กๆจำนวนมากในสารละลายน้ำ ซึ่งจะช่วยให้ประสิทธิภาพการสกัดได้ (Wu et al. 2010b) ในการทดลองนี้ ได้ศึกษาชนิดของสารลดแรงตึงผิวที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัด ได้แก่ สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ (Triton X-114, Triton X-100, Tween 20 และ Genapol X-080) สารลดแรงตึงผิวชนิดประจุลบ (SDS) และสารลดแรงตึงผิวประจุบวก (CTAB และ DTAB) จากผลการทดลองในรูปที่ 3.1B จะเห็นว่าสารลดแรงตึงผิวชนิดมีประจุบวกและลบ ให้พื้นที่ได้ฟักของสารเป้าหมายต่ำและไม่เหมาะที่จะใช้เป็นสารอิมัลซิฟายเออร์ เมื่อเทียบกับกรณีของสารลดแรงตึงผิวแบบไม่มีประจุ ผลดังกล่าวอาจเนื่องจากความจุของการละลายของสารเป้าหมายเข้าไปในสารลดแรงตึงผิวชนิดนี้มีมากกว่าชนิดมีประจุ (Cheng et al. 2011b) จากผลการทดลอง สารลดแรงตึงผิว Triton X-114 และ Genapol X-080 เป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีสมบัติอิมัลซิฟายเออร์ที่ดี แต่อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพการสกัดสารสูงสุดสำหรับสารเป้าหมายพบในกรณีที่ใช้สารลดแรงตึงผิว Triton X-114 ดังนั้น ในการทดลองนี้จึงเลือก Triton X-114 เป็นสารลดแรงตึงผิว (อิมัลซิฟายเออร์) ที่เหมาะสม

3.3.1.3 ชนิดของเกลือและพีเอชของสารละลาย

การเติมเกลือในสารละลายน้ำสามารถลดค่าการละลายของสารเป้าหมายในชั้นน้ำ (Aqueous phase) แล้วทำให้เกิดการถ่ายโอนมวลไปยังชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ (Extraction solvent) ซึ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดได้ (Wu et al. 2010a; Cheng et al. 2011a; Xia et al. 2012; Kamarei et al. 2011) ในการทดลองนี้ ศึกษาเกลือชนิดต่างๆ และพีเอช (pH) ของสารละลายหลังการเติมเกลือแต่ละชนิด ได้แก่ โซเดียมคลอไรด์ (pH 7.2) โซเดียมอะซิเตท (pH 8.5) โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (pH 4.1) โซเดียมซัลเฟต (pH 6.5) และโซเดียมคาร์บอเนต (pH 11.6) ผลการทดลองเบื้องต้น บ่งชี้ว่า เกลือโซเดียมซัลเฟต และคาร์บอเนตให้ผลที่สกัดได้ไม่ละลายในเมทานอล และให้พื้นที่ได้ฟักของสารเป้าหมายต่ำกว่าเกลือชนิดอื่น จากการเปรียบเทียบเกลือชนิดอื่นที่เหลือ พบว่า เกลือโซเดียมอะซิเตทให้พื้นที่ได้ฟักของสารเป้าหมายทั้งหมดที่ศึกษาสูงสุด ตามด้วยเกลือโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และโซเดียมคลอไรด์ ตามลำดับ

ผลของพีเอชของสารละลายหลังการเติมเกลือโซเดียมอะซิเตท (pH 8.5) โซเดียมคลอไรด์ (pH 7.2) โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (pH 4.1) ที่มีต่อการสกัดสารเป้าหมายนั้น จะเห็นว่า ทุกช่วงพีเอชสารเป้าหมายสามารถถูกสกัดได้ แต่ที่พีเอช 8.5 ของเกลือโซเดียมอะซิเตท จะให้การสกัดสารเป้าหมายสูงสุด อาจจะเป็นเพราะว่า เกลือชนิดนี้ให้ค่าความแรงของไอออน (Ionic strength) ที่เหมาะสม สำหรับการสกัดสารเป้าหมายได้ โดยปกติแล้ว สารกลุ่มเบนซิมิดาโซลสามารถแตกตัวและแสดงประจุบวกได้ เมื่อพีเอชของสารละลายน้อยกว่า 6 และแสดงประจุลบเมื่อพีเอชของสารละลายมากกว่า 12 (Danaher et al. 2007) ณ สภาวะที่เลือกเกลือโซเดียมอะซิเตท (pH 8.5) นี้ สารเป้าหมายที่ถูกสกัดจะอยู่ในสภาพเป็นกลางไม่แสดงประจุ (Neutral compound)

3.3.1.4 ผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมอะซิเตท

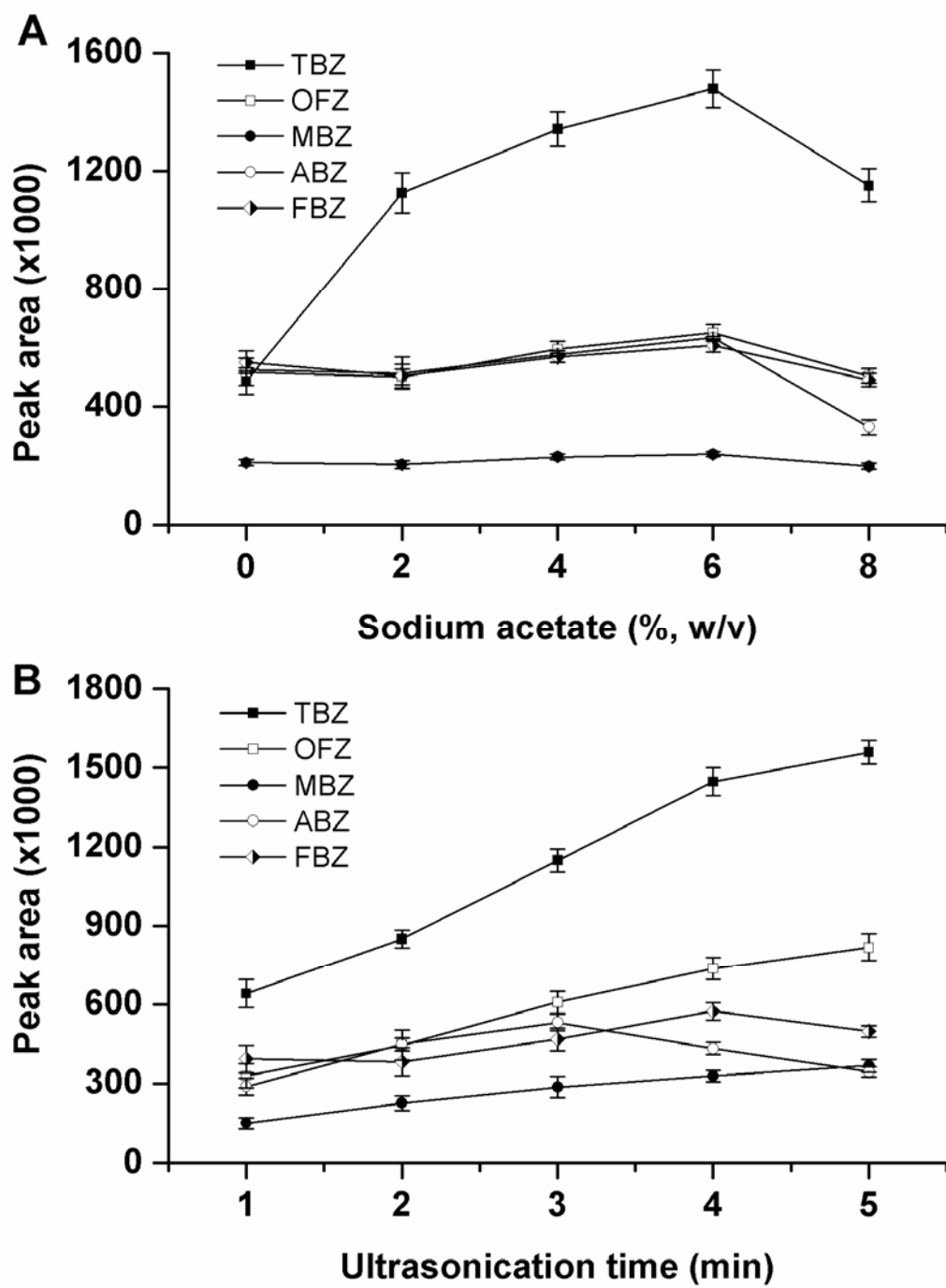
จากการศึกษาผลของเกลือโซเดียมอะซิเตทในช่วงความเข้มข้น 0 – 8% (w/v) ดังแสดงในรูปที่ 3.2A จะเห็นว่า พื้นที่ใต้พีคของสารเป้าหมายเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือ โดยเฉพาะกับสารเป้าหมายโทอะเบนดาโซล (TBZ) จนถึงความเข้มข้น 6% (w/v) ที่ให้พื้นที่ใต้พีคสูงสุด หลังจากจุดนี้ พื้นที่ใต้พีคของสารเป้าหมายทุกชนิดลดลง ซึ่งอาจเป็นเพราะว่า ความเข้มข้นของเกลือที่มากเกินไปมีผลต่อความหนืดและความหนาแน่นของสารละลายเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นการขัดขวางการเกิดกระบวนการถ่ายโอนมวลของสารเป้าหมายจากสารละลายน้ำเข้าไปยังชั้นสารอินทรีย์ที่สกัด (Wu et al. 2010a; Ozcan et al. 2009) ดังนั้น ในการทดลองนี้ จึงเลือกความเข้มข้นของเกลือโซเดียมอะซิเตทที่ 6% (w/v) เป็นค่าที่เหมาะสม

3.3.1.5 ผลของเวลาในการอัลตราโซนิก

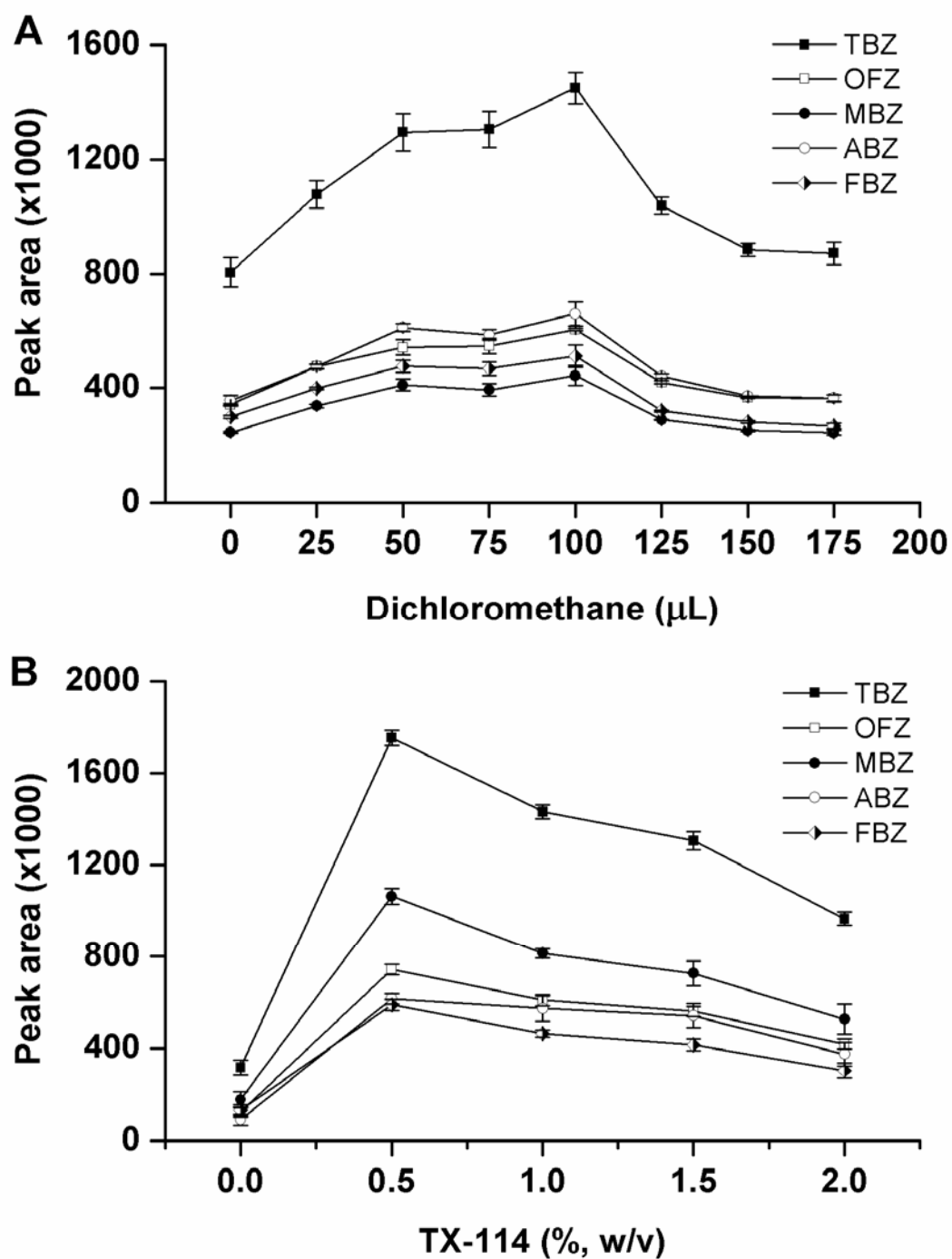
คลื่นอัลตราซาวด์มีผลต่อกระบวนการอิมัลชันและการถ่ายโอนมวล ดังนั้นจึงมีผลกระทบโดยตรงต่อประสิทธิภาพการสกัดของสารเป้าหมาย (Wu et al. 2010b; Cheng et al. 2011b; Xia et al. 2012) ซึ่งในการทดลองนี้ ได้ศึกษาเวลาในช่วง 1 – 5 นาที ผลที่ได้แสดงดังรูป 3.2B จะเห็นว่า การเพิ่มขึ้นของพื้นที่ใต้พีคของสารเป้าหมายทุกชนิดแปรตามเวลาการอัลตราโซนิกที่นานขึ้น ยกเว้น อัลเบนดาโซล (ABZ) และเฟนเบนดาโซล (FBZ) ที่ให้พื้นที่ใต้พีคลดลงที่เวลามากกว่า 3 และ 4 นาที ตามลำดับ ดังนั้น เพื่อให้พื้นที่ใต้พีคของสารทุกตัวยังคงให้ค่าที่สูงพอๆกัน จึงเลือกที่เวลาอัลตราโซนิกที่ 4 นาที เป็นเวลาที่เหมาะสมในการทดลองนี้

3.3.1.6 ผลของปริมาตรของไดคลอโรมีเทน

ศึกษาผลของปริมาตรไดคลอโรมีเทนในช่วง 0 – 175 ไมโครลิตร ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 3.3A จะเห็นว่า พื้นที่ใต้พีคของสารเป้าหมายเพิ่มตามปริมาตรของไดคลอโรมีเทนที่ใช้สกัด แต่อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพการสกัดสูงสุดพบที่ปริมาตรของไดคลอโรมีเทนเป็น 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นปริมาตรของไดคลอโรมีเทนจะมีผลทำให้การสกัดลดลง อาจเนื่องจากว่า ทำให้ปริมาตรของชั้นสารสกัดได้ (V_{sed}) มีมากขึ้น ซึ่งจะเป็นการเจือจางสารเป้าหมายที่สกัดได้นั่นเอง ดังนั้น จึงเลือกไดคลอโรมีเทนที่ปริมาตร 100 ไมโครลิตรเป็นค่าที่เหมาะสม



รูปที่ 3.2 ผลของ (A) ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมอะซิเตท และ (B) เวลาในการอัลตราโซนิกที่มีต่อประสิทธิภาพการสกัดสารเป้าหมายกลุ่มเบนซิมิดาโซล



รูปที่ 3.3 ผลของ (A) ปริมาตรไดคลอโรมีเทน และ (B) ความเข้มข้นของสาร Triton X-114 ที่มีต่อประสิทธิภาพการสกัดสารเป้าหมายกลุ่มเบนซิมิดาโซล

3.3.1.7 ผลความเข้มข้นของ Triton X-114

จากผลการศึกษาความเข้มข้นของ Triton X-114 ในช่วง 0 – 2% (w/v) แสดงดังรูปที่ 3.3B จะพบว่า ประสิทธิภาพการสกัดจะสูงขึ้นตามความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวที่เพิ่มขึ้น จนถึง 0.5% (w/v) แต่การเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวที่มากกว่านี้ มีผลทำให้ ประสิทธิภาพการสกัดสารลดลง อาจเนื่องจากปริมาตรของชั้นสารที่สกัดได้ (V_{sed}) มากขึ้น นอกจากนี้ สารลดแรงตึงผิวทำให้การละลายของสารเป้าหมายในชั้นสารละลายน้ำมากขึ้น ดังนั้นการ พาร์ทิชันหรือการเข้าไปละลายในชั้นสารที่สกัดได้ของสารเป้าหมายเกิดได้น้อยลง นั่นเอง ในการ ทดลองนี้ จึงเลือกความเข้มข้นของ Triton X-114 เท่ากับ 0.5% (w/v)

3.3.1.8 ผลของเวลาในการปั่นเหวี่ยง

ผลของเวลาในการปั่นเหวี่ยงที่มีต่อประสิทธิภาพการสกัดของสาร ศึกษา ในช่วง 0 – 15 นาที ที่อัตราความเร็ว 3500 รอบต่อนาที พบว่า ที่เวลา 10 นาที ได้พื้นที่ใต้พีคของ สารเป้าหมายทุกชนิดสูงที่สุด (ไม่ได้แสดงผล) หลังจากนั้น พื้นที่ใต้พีคจะลดลง ดังนั้น จึงเลือกเวลา 10 นาที เป็นค่าที่เหมาะสมสำหรับการปั่นเหวี่ยงสารละลาย เพื่อให้เกิดการแยกเฟสที่สมบูรณ์

3.3.2 พารามิเตอร์เชิงปริมาณวิเคราะห์สำหรับสารมาตรฐาน

จากรูปที่ 3.4A แสดงโครมาโทแกรมของสารเป้าหมายเบนซิมิดาโซลทั้ง 5 ชนิด ที่ได้ จากการสกัดและเพิ่มความเข้มข้นด้วยเทคนิค UASEME เทียบกับวิธีวิเคราะห์โดยตรงโดยไม่ผ่านวิธี เพิ่มความเข้มข้น ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของวิธี UASEME สามารถคำนวณประสิทธิภาพการสกัด (Extraction efficiency หรือ %E) และแฟกเตอร์การเพิ่มความเข้มข้น (Preconcentration factor หรือ PF) ได้ตามสมการข้างล่างนี้

$$\%E = \frac{C_{sed} \times V_{sed}}{C_{aq} \times V_{aq}} \quad (1)$$

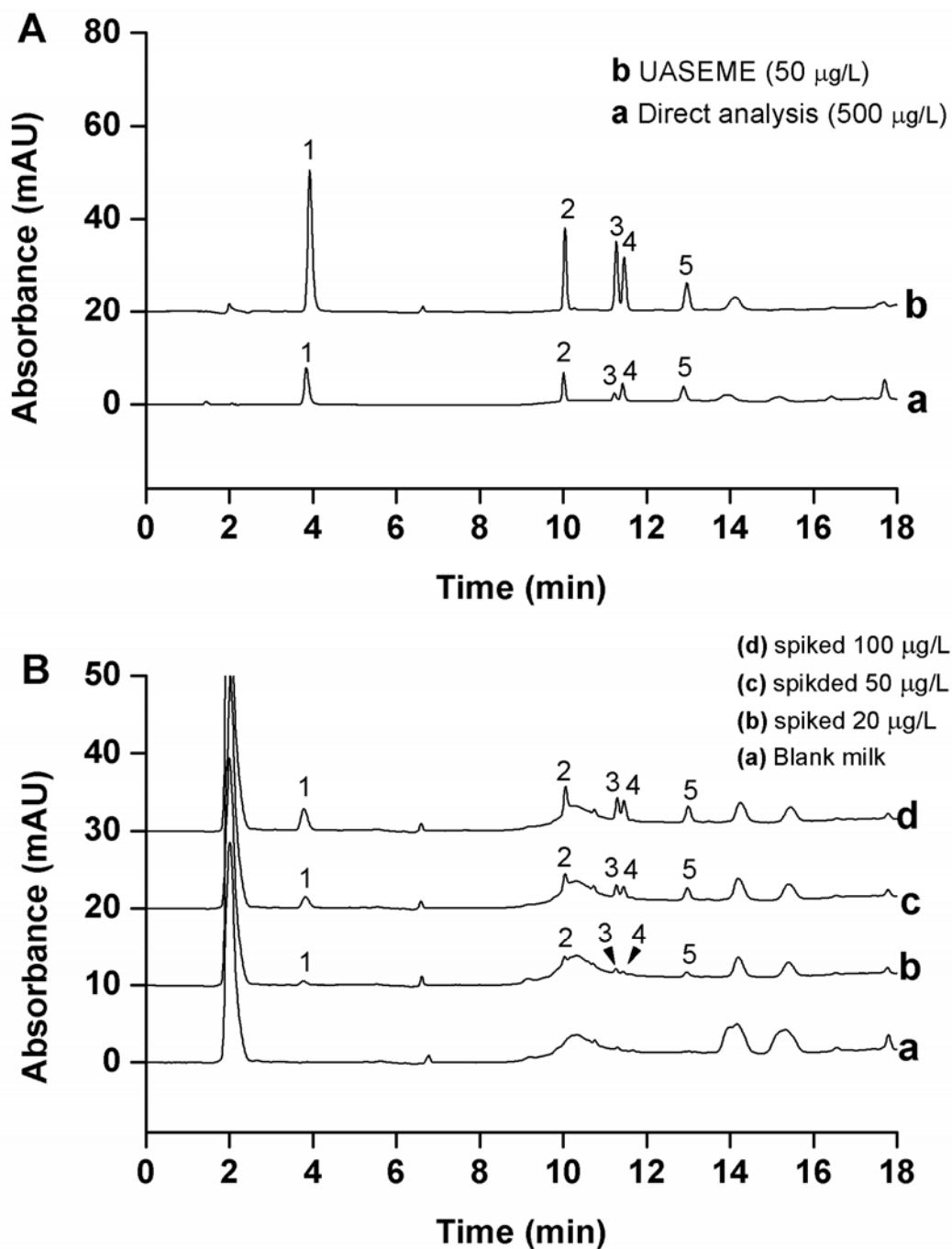
$$PF = \frac{C_{sed}}{C_{aq}} \quad (2)$$

เมื่อ C_{sed} และ C_{aq} คือ ความเข้มข้นของสารเป้าหมายในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ สกัดได้ และความเข้มข้นเริ่มต้นของสารเป้าหมายในสารละลายน้ำ ตามลำดับ โดย C_{sed} สามารถ คำนวณได้จากการเทียบกราฟมาตรฐานของสารเป้าหมายที่ได้จากวิธีไม่ผ่านการเพิ่มความเข้มข้น (ฉีด วิเคราะห์โดยตรง)

V_{sed} และ V_{aq} คือ ปริมาตรของชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ที่สกัดได้ และชั้นสารละลาย น้ำ ตามลำดับ

จากการคำนวณ พบว่า วิธีที่นำเสนอนี้ ให้ประสิทธิภาพการสกัด อยู่ในช่วง 50 – 80 เปอร์เซ็นต์ และให้แฟกเตอร์การเพิ่มความเข้มข้นอยู่ในช่วง 45 – 60 เท่า

ภายใต้สภาวะการทดลองที่เหมาะสมนี้ นำไปหาข้อมูลสำหรับทำปริมาณวิเคราะห์ และทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธี ประกอบด้วย ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) ขีดจำกัดของการตรวจวัด (Limits of detection หรือ LOD) และความเที่ยง (Precision) สำหรับการวิเคราะห์ในวันเดียวกัน และหลายวัน ข้อมูลกราฟมาตรฐานที่ได้ สรุปไว้ในตารางที่ 3.2 จะเห็นว่า ช่วงความเป็นเส้นตรงของสารเป้าหมายอยู่ในช่วง 0.1 – 100 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่ให้ค่าสัมประสิทธิ์การกำหนด (R^2) มากกว่า 0.998 ขีดจำกัดของการตรวจวัดอยู่ในช่วง 0.005 – 0.010 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าต่ำกว่าขีดจำกัดการตรวจวัดที่ได้จากวิธีวิเคราะห์โดยตรงที่อยู่ในช่วง 10 – 50 ไมโครกรัมต่อลิตร ความเที่ยงของวิธี พบว่า ให้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของพื้นที่ใต้พีค และค่าเวลาการคงอยู่ของสาร (t_R) ต่ำกว่า 9.2 และ 0.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



รูปที่ 3.4 โครมาโทแกรมของ (A) สารมาตรฐานเบนซิมิดาโซลทั้ง 5 ชนิดที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี UASEME และไม่ผ่านการเพิ่มความเข้มข้น และ (B) โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างนมยูเอชทีรสจืด (UHT plain milk) ที่เติมและไม่เติมสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อหมายเลขระบุพิกัด เป็นดังนี้ 1 thiabendazole (TBZ), 2 oxfendazole (OFZ), 3 mebendazole (MBZ), 4 albendazole (ABZ), and 5 fenbendazole (FBZ)

ตารางที่ 3.2 ข้อมูลสำหรับการทำปริมาณวิเคราะห์ของสารมาตรฐานที่ได้จากวิธีการเพิ่มความเข้มข้นแบบ UASEME

Analyte	Linear equation	Linearity ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R^2	LOD ^a ($\mu\text{g L}^{-1}$)	PF	Intra-day (n=5), %RSD		Inter-day (n=4×3 days), %RSD	
						t_R	Peak area	t_R	Peak area
TBZ	y= 2593.1x-910.8	0.1 – 100	0.9984	0.01 (10)	45	0.4	3.3	0.6	5.9
OFZ	y= 1215.0x+827.5	0.1 – 100	0.9986	0.01 (10)	45	0.1	2.8	0.4	9.2
MBZ	y= 1468.3x+3866.1	0.1 – 100	0.9981	0.005 (10)	55	0.1	3.8	0.7	4.9
ABZ	y= 1400.7x+52.8	0.1 – 100	0.9981	0.01 (50)	60	0.1	6.7	0.1	3.4
FBZ	y= 1509.5x+1408.5	0.1 – 100	0.9985	0.01 (50)	50	0.1	8.2	0.2	7.9

^a The values in parenthesis were obtained from without preconcentration (direct analysis).

3.3.3 การประยุกต์สำหรับการวิเคราะห์ในตัวอย่างนม

ประยุกต์วิธีที่นำเสนอสำหรับการวิเคราะห์ยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซลตักค้าง ในตัวอย่างนมชนิดต่างๆ ซึ่งตัวอย่างโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ในตัวอย่างนมยูเอชทีรสจืด (UHT plain milk) แสดงในรูปที่ 3.4B จากการตรวจวิเคราะห์ พบว่า ตรวจไม่พบการตกค้างของยาถ่ายพยาธิในตัวอย่างนมที่ทำการวิเคราะห์ ข้อมูลของกราฟมาตรฐานในตัวอย่างนมชนิดต่างๆ แสดงดังตารางที่ 3.3 ซึ่งกราฟมาตรฐานดังกล่าวมีความเป็นเส้นตรงในช่วง 10 – 150 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่ให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มากกว่า 0.994 ขีดจำกัดของการตรวจวัดสารเป้าหมายอยู่ในช่วง 1.8 – 3.6 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งคำนวณโดยใช้วิธี least square method จากสมการ $LOD = 3.3 \times [SD_y / Slope]$ เมื่อ SD_y คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าที่ตัดแกน y (y-intercept) และ $Slope$ คือ ความชันของกราฟมาตรฐานของสารเป้าหมายนั้นๆ จากค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดในตัวอย่างนมที่ได้นั้นมีค่าต่ำกว่าค่า MRLs ที่กำหนด โดยโคเดกซ์ (Codex Alimentarius Commission, 2011) และหน่วยงานควบคุมของออสเตรเลีย (Australian Government, 2011) นั่นคือ น้อยกว่า 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

การประเมินความแม่นยำของวิธี สามารถพิจารณาจากค่าร้อยละการกลับคืน (%Recovery) ของสารมาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่าง ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (20 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร) ซึ่งข้อมูลร้อยละการกลับคืน แสดงในตารางที่ 3.4 จะเห็นว่า วิธีที่นำเสนอขึ้นนี้ ให้ร้อยละการกลับคืนที่ดีและยอมรับได้ นั่นคือ อยู่ในช่วง 72.5 – 113.5 โดยเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ต่ำกว่า 6 เปอร์เซ็นต์ โดยทั่วไป ตามมาตรฐานกำหนดโดย Codex ถ้ามีการเติมสารมาตรฐานในช่วง 10 – 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ร้อยละการกลับคืนที่ยอมรับได้ ควรจะอยู่ในช่วง 70 – 110 (Codex Alimentarius, 1993) และ 75 – 120 (กำหนดโดย AOAC, AOAC, 2002)

3.4 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ นำเสนอวิธีการสกัดและเพิ่มความเข้มข้นด้วยเทคนิค UASEME ร่วมกับเทคนิคการวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงกับการตรวจวัดแบบโพโตไดโอดอาร์เรย์ (HPLC-PDA) สำหรับการวิเคราะห์ยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซลในตัวอย่างนมชนิดต่างๆ วิธีที่นำเสนอนี้สามารถสกัดได้ภายในเวลาอันสั้น ให้ประสิทธิภาพการสกัดที่ดี และให้ข้อมูลการวิเคราะห์ที่ดีด้วย โดยให้ขีดจำกัดการตรวจวัดสารเป้าหมายในตัวอย่างนม ต่ำกว่า 4.0 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าต่ำกว่าค่าขีดจำกัดสูงสุดที่ยอมให้มีได้ในระดับปลอดภัย (MRLs) และให้ร้อยละการกลับคืนที่ดีกว่าร้อยละ 72 โดยเฉลี่ย วิธีดังกล่าวนี้ชี้ให้เห็นว่า เป็นวิธีที่ใช้คลื่นอัลตราซาวด์ ร่วมกับการใช้สารลดแรงตึงผิวเป็นอิมัลซิฟายเออร์ สามารถให้ประสิทธิภาพการสกัดและวิเคราะห์ที่ดี ซึ่งสามารถใช้เป็นวิธีทางเลือกหนึ่งสำหรับการวิเคราะห์สารเป้าหมายกลุ่มเบนซิมิดาโซลในตัวอย่างนมหรือตัวอย่างอื่นๆ ได้

ตารางที่ 3.3 กราฟมาตรฐานของสารเป้าหมายในตัวอย่างนมที่ศึกษา (n=3)

Analyte	UHT low fat milk		UHT plain milk	
	Linear equation	R ²	Linear equation	R ²
TBZ	y=529.3x-3603	0.9952	y=546.9x+1681	0.9952
OFZ	y=327.2x-959.3	0.9953	y=350.1x-99.2	0.9960
MBZ	y=350.6x-2194.4	0.9963	y=294.4x-785	0.9950
ABZ	y=354.9x+6997.1	0.9955	y=284.0x-393	0.9970
FBZ	y=258.5x+1544	0.9970	y=271.7x-1011.1	0.9960
Analyte	Raw fresh milk		Pasteurized plain milk	
	Linear equation	R ²	Linear equation	R ²
TBZ	y=253.4x+605.9	0.9954	y=346.9x-1486.4	0.9998
OFZ	y=240.2x-894.2	0.9980	y=234.0x-1267	0.9946
MBZ	y=181.5x+17.5	0.9980	y=246.7x-1235	0.9974
ABZ	y=162.7 x-1085	0.9970	y=226.2x-2414.2	0.9950
FBZ	y=166.0x-965.4	0.9967	y=233.6x+306	0.9953

ตารางที่ 3.4 ร้อยละการกลับคืน (Recovery) ของสารเป้าหมายที่เติมในตัวอย่างนมที่ศึกษา ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (n=3)

Analyte	Spiked ($\mu\text{g L}^{-1}$)	UHT plain		UHT low fat		Pasteurized plain		Raw fresh	
		RR (%)	RSD (%)	RR (%)	RSD (%)	RR (%)	RSD (%)	RR (%)	RSD (%)
TBZ	20	99.7	0.2	109.4	0.5	105.2	2.1	85.3	3.4
	50	102.7	0.8	78.3	4.1	88.4	2.1	91.7	1.1
	100	94.9	0.5	75.0	2.4	100.2	5.1	106.9	2.4
OFZ	20	108.1	4.0	109.5	2.6	113.0	4.3	112.7	3.5
	50	96.1	5.8	72.5	1.4	95.8	5.4	91.5	3.2
	100	89.4	5.8	74.6	6.7	101.3	5.1	95.5	2.5
MBZ	20	86.8	0.5	110.6	1.9	110.2	1.9	112.1	1.4
	50	81.9	1.3	96.7	1.8	88.7	4.4	98.8	2.1
	100	73.4	1.1	82.2	4.0	90.0	3.7	102.2	3.7
ABZ	20	86.0	1.2	88.7	4.2	99.1	4.0	113.5	1.3
	50	99.6	5.2	93.1	2.3	103.3	3.5	91.4	2.8
	100	80.1	0.9	94.7	5.7	91.9	2.9	90.3	2.1
FBZ	20	96.8	4.6	105.5	1.8	111.2	4.5	111.1	3.6
	50	108.4	2.2	94.7	3.9	96.6	4.1	100.7	1.1
	100	80.5	1.1	102.8	3.1	96.0	3.6	107.6	3.8

RR: Relative recovery (on average)

บทที่ 4

บทสรุป

โครงการวิจัยนี้ ได้นำเสนอเทคนิคการสกัดและเพิ่มความเข้มข้น 2 วิธี ได้แก่ เทคนิคการสกัดแบบจุดขุ่น (Cloud-point extraction หรือ CPE) และเทคนิคการสกัดระดับไมโครแบบการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ และสารลดแรงตึงผิวช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเกิดอิมัลชัน (Ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction หรือ UASME) ควบคู่กับเทคนิคการวิเคราะห์แบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง สำหรับการตรวจวิเคราะห์ยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซลในตัวอย่างอาหาร ซึ่งสามารถกล่าวสรุปโดยย่อ และให้ข้อสังเกต ตลอดจนข้อเสนอแนะที่อาจจะเป็นประโยชน์ในการทำวิจัยในอนาคต ตามรายละเอียด ดังนี้

1) เทคนิคการเพิ่มความเข้มข้นด้วยวิธีการสกัดแบบจุดขุ่น

งานวิจัยนี้นำเสนอวิธีการสกัดแบบจุดขุ่นร่วมกับการใช้คลื่นอัลตราโซนิก (UA-CPE) สำหรับการสกัดและเพิ่มความเข้มข้นสารเป้าหมายยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซล และวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ นำไปประยุกต์ใช้วิเคราะห์สารตกค้างดังกล่าวในตัวอย่างนมชนิดต่างๆ พบว่า นอกจากจะประสบความสำเร็จ และให้ผลการวิเคราะห์ที่ดีแล้ว วิธีการสกัดดังกล่าวนี้ยังมีข้อดีหลายประการ เช่น สามารถทำการสกัดได้รวดเร็ว ให้แก่เตอร์การเพิ่มความเข้มข้นที่ดีด้วย การแยกเฟสทำได้ง่ายและปริมาตรของเฟสที่สกัดได้ไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก ซึ่งจะทำให้ได้ผลการวิเคราะห์ซ้ำที่ดี นอกเหนือจากนี้แล้ว ยังถือว่าเป็นอีกหนึ่งวิธีการที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Green analytical method) ที่สามารถจะนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์ยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซลในตัวอย่างอาหารชนิดอื่นๆ ได้ หรืออาจนำไปประยุกต์ใช้กับกลุ่มสารเป้าหมายอื่นในตัวอย่างต่างๆ ได้เช่นกัน

อย่างไรก็ตาม เนื่องจากงานวิจัยนี้ ได้เลือกใช้สารลดแรงตึงผิว Triton X-114 ซึ่งเป็นชนิดที่มีอุณหภูมิวิกฤตจุดขุ่นอยู่ที่ประมาณอุณหภูมิห้อง ดังนั้น จึงค่อนข้างสะดวกในการทำการสกัดจุดขุ่น และอาศัยเครื่องอัลตราโซนิกเข้าช่วย แล้วทำให้ได้ประสิทธิภาพการสกัดอยู่ในระดับที่น่าพอใจ แต่ในกรณีที่ใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดอื่นที่มีอุณหภูมิจุดขุ่นที่สูงขึ้น เช่น Genapol X-080 และ Triton X-100 อาจจำเป็นต้องใช้อุณหภูมิเข้าร่วมด้วย หรืออาจจะมีการปรับพารามิเตอร์อื่นๆ เช่น การเลือกใช้เกลือที่เหมาะสม ก็อาจจะนำไปเป็นประเด็นที่จะพัฒนาระบบการสกัดให้ดีขึ้น และหลากหลายมากยิ่งขึ้นได้ และความเป็นไปได้ในอนาคต อาจจะใช้เพียงแค่สารลดแรงตึงผิว ร่วมกับรีเอเจนต์บางชนิด แล้วสามารถเกิดเป็นสารละลายขุ่น และทำการสกัดสารเป้าหมายได้ที่อุณหภูมิทั่วไป ซึ่งวิธีการดังกล่าวจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สะดวกมากขึ้น สำหรับทดแทนวิธีการสกัดแบบจุดขุ่นชนิดดั้งเดิมที่ใช้เวลาในการสกัดค่อนข้างนาน

2) เทคนิคการเพิ่มความเข้มข้นด้วยวิธีการสกัดระดับไมโครแบบการใช้คลื่นอัลตรา-ซาวนด์ และสารลดแรงตึงผิวช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเกิดอิมัลชัน

เทคนิคการสกัดและเพิ่มความเข้มข้นสารเป้าหมายด้วยเทคนิค UASEME ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง สามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการตรวจวิเคราะห์ยาถ่ายพยาธิกลุ่มเบนซิมิดาโซลในตัวอย่งนมนได้ ซึ่งให้ผลการวิเคราะห์ที่ดี และเชื่อถือได้ ขั้นตอนการสกัดสามารถทำได้ง่ายและรวดเร็ว และให้ประสิทธิภาพการสกัดที่ดี ซึ่งวิธีการสกัดดังกล่าวนี้ เป็นการใช้อนุภาคนาโน (ในงานวิจัยนี้ใช้ Triton X-114) และอัลตราซาวนด์ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด โดยไม่จำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์อื่น เช่น เมทานอล เอทานอล และอะซิโตนไตริล เป็นตัวกระจายเฟส (Disperser solvent) เนื่องจากใช้สารลดแรงตึงผิวทำหน้าที่เป็นอิมัลซิฟายเออร์แทน แต่อย่างไรก็ตาม เทคนิคดังกล่าวนี้ ยังคงใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นพิษเป็นสารสกัด (Extraction solvent) เช่น คลอโรฟอร์ม ไตรคลอโรเอทิลีน และไดคลอโรมีเทน แม้ว่าจะใช้ในปริมาณในระดับไมโครลิตรก็ตาม ดังนั้น ประเด็นวิจัยที่น่าสนใจสำหรับการพัฒนาวิธีการสกัดที่สามารถต่อยอดได้ในอนาคต โดยมุ่งเน้นเพื่อให้ได้วิธีการสกัดที่ตรงตามคุณลักษณะต่อไปนี้ เช่น เป็นวิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและผู้วิเคราะห์ (Green analytical method) ให้ประสิทธิภาพการสกัดที่ดีกับสารเป้าหมายหลากหลายกลุ่ม ใช้สารหรือรีเอเจนต์ในปริมาณน้อย ทำการสกัดได้ง่ายและรวดเร็ว ซึ่งวิธีการที่จะให้บรรลุวัตถุประสงค์ดังกล่าว อาจจะทำได้ด้วยการใช้สารหรือรีเอเจนต์อื่นที่มีพิษต่ำกว่า ร่วมกับการใช้สารลดแรงตึงผิว และอัลตราซาวนด์ เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

- AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals (2002) http://www.aoac.org/Official_Methods/slv_guidelines.pdf.
- Australian Government, Australian pesticides and veterinary medicines authority (2011) The MRL standard: Maximum residue limits in food and animal feedstuff. http://www.apvma.gov.au/residues/docs/mrl_table4_march_2012.pdf.
- Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority (2005) Guidelines for the validation of analytical methods for active constituent, agricultural and veterinary chemical products. http://www.apvma.gov.au/publications/guidelines/docs/gl_69_analytical_methods.pdf
- Chen D, Tao Y, Liu Z, Liu Z, Huang L, Wang Y, Pan Y, Peng D, Dai M, Yuan Z (2010) Development of a high-performance liquid chromatography method to monitor the residues of benzimidazoles in bovine milk. J Chromatogr B 878: 2928 – 2932
- Chen D, Tao Y, Zhang H, Pan Y, Liu Z, Huang L, Wang Y, Peng D, Wang X, Dai M, Yuan Z (2011) Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry with pressurized liquid extraction method for the determination of benzimidazole residues in edible tissues. J Chromatogr B 879: 1659 – 1667
- Cheng J, Matsadiq G, Liu L, Zhou Y-W, Chen G (2011a) Development of a novel ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction method and its application to the analysis of eleven polycyclic aromatic hydrocarbons at trace levels in water. J Chromatogr A 1218: 2476–2482

- Cheng J, Xia Y, Zhou Y, Guo F, Chen G (2011b) Application of an ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction method for the analysis of diethofencarb and pyrimethani fungicides in water and fruit juice samples. *Anal Chim Acta* 701: 86 – 91
- Codex Alimentarius (1993) Residues of veterinary drugs in foods, Volume 3, 2nd, Joint FAP/WHO Food Standards Programme, FAO, Rome Italy, p59.
- Codex Alimentarius Commission (2011) Maximum residue limits for veterinary drugs in foods (CAC/MRL 2-2011). http://www.codexalimentarius.net/vetdrugs/data/MRL2_e_2011.pdf.
- Danaher M, O'Keeffe M, Glennon JD (2003) Development and optimisation of a method for the extraction of benzimidazoles from animal liver using supercritical carbon dioxide. *Anal Chim Acta* 483: 313 – 324
- Danaher M, Ruyck HD, Crooks SRH, Dowling G, O'Keeffe M (2007) Review of methodology for the determination of benzimidazole residues in biological matrices. *J Chromatogr B* 845: 1 – 37
- Guo B, Huang Z, Wang M, Wang X, Zhang Y, Chen B, Li Y, Yan H, Yao S (2010) Simultaneous direct analysis of benzimidazole fungicides and relevant metabolites in agricultural products based on multifunction dispersive solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1217: 4796 – 4807
- Halko R, Sanz CP, Ferrera ZS, Rodríguez JJS (2006) Determination of Benzimidazole Fungicides in Soil Samples Using Microwave-Assisted Micellar Extraction and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *J AOAC Int* 89: 1403 – 1409
- Halko R, Sanz P, Ferrera S, Rodríguez JJS (2004) Determination of benzimidazole fungicides by HPLC with fluorescence detection after micellar extraction. *Chromatographia* 60: 151 – 156

- Horvat AJM, Petrovic M, Babic S, Pavlovic DM, Aserger D, Pelko S, Mance AD, Kastelan-Macan M (2012) Analysis, occurrence and fate of anthelmintics and their transformation products in the environment. *Trends Anal Chem* 31: 61 – 84
- Kamarei F, Ebrahimzadeh H, Yamini Y (2011) Optimization of ultrasound-assisted emulsification microextraction with solidification of floating organic droplet followed by high performance liquid chromatography for the analysis of phthalate esters in cosmetic and environmental water samples. *Microchem J* 99: 26 – 33
- Liu W, Zhao W-j, Chen J-b, Yang M-m (2007) A cloud point extraction approach using Triton X-100 for the separation and preconcentration of Sudan dyes in chilli powder. *Anal Chim Acta* 605: 41 – 45
- Mottier L, Alvarez L, Lanusse C (2003) Quantitative chromatographic determination of several benzimidazole anthelmintic molecules in parasite material. *J Chromatogr B* 798: 117 – 125
- Msagati TAM, Nindi MM (2001) Determination of benzimidazole anthelmintic compounds by supported liquid membrane extraction and liquid chromatography. *J Sep Sci* 24: 606 – 614
- Oyama T, Yodohsi M, Yamane A, Kakehi K, Hayakawa T, Suzuki S (2010) Rapid and sensitive analyses of glycoprotein-derived oligosaccharides by liquid chromatography and laser-induced fluorometric detection capillary electrophoresis. *J Chromatogr B* 879: 2928 – 2934
- Ozcan S, Tor A, Aydin ME (2009) Application of ultrasound-assisted emulsification-microextraction for the analysis of organochlorine pesticides in waters. *Water Res* 43: 4269 – 4277
- Pourreza N, Rastegarzadeh S, Larki A (2011) Determination of Allura red in food samples after cloud point extraction using mixed micelles. *Food Chem* 126: 1465 – 1469

- Qin H, Yu G, Chen M, Zou Y, Yang Y (2012) Ultrasonic-thermostatic-assisted cloud point extraction coupled to high-performance liquid chromatography for the analysis of adrenalines residues in milk. *Eur Food Res Technol* 234: 543 – 550
- Santalad A, Srijaranai S, Burakham R, Glennon JD, Deming RL (2009) Cloud-point extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography for the determination of carbamate insecticide residues in fruits. *Anal Bioanal Chem* 394: 1307 – 1317
- Saraji M, Akbar A, Bidgoli H (2010) Dispersive liquid-liquid microextraction using a surfactant as disperser agent. *Anal Bioanal Chem* 397: 3107 – 3115
- Seebunrueng K, Santaladchaiyakit Y, Soisungneon P, Srijaranai S (2011) Catanionic surfactant ambient cloud point extraction and high-performance liquid chromatography for simultaneous analysis of organophosphorus pesticide residues in water and fruit juice samples. *Anal Bioanal Chem* 401: 1707 – 1716
- Seebunrueng K, Santaladchaiyakit Y, Srijaranai S (2012) Green extraction using catanionic surfactants of trimethyltetradecyl ammonium bromide–sodium dodecyl sulfate for preconcentration of organophosphorus pesticides in fruit samples. *Anal Methods* 4: 1674 – 1680
- Vichapong J, Santaladchaiyakit Y, Burakham R, Srijaranai S (2011) Cloud-point extraction and reversed-phase high performance liquid chromatography for analysis of phenolic compounds and their antioxidant activity in Thai local wines. *J Food Sci Technol*, doi:10.1007/s13197-011-0556-0
- Whelan M, Kinsella B, Furey A, Moloney M, Cantwell H, Lehotay SJ, Danaher M (2010) Determination of anthelmintic drug residues in milk using ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry with rapid polarity switching. *J Chromatogr A* 1217: 4612 – 4622

- Wu C, Liu N, Wu Q, Wang C, Wang Z (2010a) Application of ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction for the determination of some organophosphorus pesticides in water samples. *Anal Chim Acta* 679: 56 – 62
- Wu H, Zhao G-y, Du L-m (2010) Determination of ofloxacin and gatifloxacin by mixed micelle-mediated cloud point extraction-fluorimetry combined methodology. *Spectrochim Acta A* 75: 1624 – 1628
- Wu Q, Chang Q, Wu C, Rao H, Zeng X, Wang C, Wang Z (2010b) Ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction for the determination of carbamate pesticides in water samples by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1217: 1773 – 1778
- Wu Q, Li Y, Wang C, Liu Z, Zang X, Zhou X, Wang Z (2009) Dispersive liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography-fluorescence detection for the determination of carbandazim and thiabendazole in environmental samples. *Anal Chim Acta* 638: 139 – 145
- Xia X, Dong Y, Luo P, Wang X, Li X, Ding S, Shen J (2010) Determination of benzimidazole residues in bovine milk by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 878: 3174 – 3180
- Xia Y, Zhi X, Wang X, Chen M, Cheng J (2012) Ultrasound-enhanced surfactant-assisted dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography for determination of ketoconazole and econazole nitrate in human blood. *Anal Bional Chem* 402:1241 – 1247
- Yao B, Yang L (2007) Ultrasonic Assisted Cloud Point Extraction of Polyaromatic Hydrocarbons. *Sep Sci Technol* 42: 1843 – 1858
- Zhou J, Sun XL, Wang SW (2008) Micelle-mediated extraction and cloud-point preconcentration of osthole and imperatorin from *Cnidium monnieri* with analysis by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1200: 93 – 99

Zou Y, Li Y, Jin H, Tang H, Zou D, Liu M, Yang Y (2012) Determination of estrogens in human urine by high-performance liquid chromatography/diode array detection with ultrasound-assisted cloud-point extraction. *Anal Biochem* 421: 378 – 384

Output ที่ได้จากโครงการ

1. **Yanawath Santaladchaiyakit*** and Supalax Srijaranai. A simplified ultrasound-assisted cloud-point extraction method coupled with high performance liquid chromatography for residue analysis of benzimidazole anthelmintics in water and milk samples. *Analytical Methods*, 2012, 4: 3864 – 3873
Impact Factor (2011) =1.547
2. **Yanawath Santaladchaiyakit*** and Supalax Srijaranai. Preconcentration and simultaneous analysis of benzimidazole anthelmintics in milk samples by ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction and high-performance liquid chromatography. *Food Analytical Methods*, 2013, In Press, doi: 10.1007/s12161-0139569-9
Impact Factor (2011) =1.943

(*) Corresponding author

ภาคผนวก

ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่

A simplified ultrasound-assisted cloud-point extraction method coupled with high performance liquid chromatography for residue analysis of benzimidazole anthelmintics in water and milk samples

Yanawath Santaladchaiyakit^{*a} and Supalax Srijaranai^b

Received 3rd June 2012, Accepted 22nd September 2012

DOI: 10.1039/c2ay25569c

A simple ultrasound-assisted cloud point extraction (UA-CPE) method combined with high performance liquid chromatography-photodiode array (PDA) detection has been developed for the extraction, preconcentration and determination of benzimidazole anthelmintics (*e.g.*, thiabendazole, oxfendazole, mebendazole, albendazole, and fenbendazole) residues in water and milk samples. Parameters affecting the extraction efficiency, such as concentration of surfactant, content of salt additive, incubation temperature and time, and centrifugation were investigated and optimized. The optimum conditions of UA-CPE were 0.75% (w/v) Triton X-114, 7% (w/v) sodium acetate, 2 min ultrasonication, and 10 min centrifugation. The surfactant-rich phase (SRP) was analyzed by subjecting it to HPLC under gradient condition of 1% (v/v) acetic acid and methanol, an Inertsil ODS column (4.6 × 150 mm, 5 µm), a flow rate of 1.0 mL min⁻¹, and photodiode array detection at 296 nm. Under the optimum conditions, linearity was obtained in the range of 0.1–100 µg L⁻¹ with the correlation coefficients (*r*²) higher than 0.996. A high preconcentration factor of up to 164 was obtained, corresponding to limits of detection (LOD) in the range of 0.005–0.1 µg L⁻¹. Intra-day (*n* = 5) and inter-day (*n* = 3 × 3) precisions were obtained with relative standard deviation (RSD) for retention time and peak area lower than 2.0 and 7.0%, respectively. The recoveries for the spiked target anthelmintics at different concentrations in water (3, 10, and 70 µg L⁻¹) and milk (20, 50 and 100 µg L⁻¹) were in the ranges 81.6–111.4% and 75.3–111.4%, respectively. The proposed UA-CPE method has been demonstrated to be simple, effective, and reliable for the analysis of analytes in the samples studied. In addition, the developed method can be used as an alternative technique to the conventional CPE.

Introduction

Benzimidazoles represent an important and widely used class of anthelmintic veterinary drugs used to control gastrointestinal nematodes and lungworms,^{1–3} and are also commonly used in agriculture, aquaculture, and veterinary practices for protecting and treating these parasitic infections.^{1,4} These benzimidazoles include thiabendazole (TBZ), oxfendazole (OFZ), mebendazole (MBZ), albendazole (ABZ), and fenbendazole (FBZ), *etc.* The chemical structures and physicochemical properties of some benzimidazoles are listed in Table 1. TBZ has been found to be a fungicide for control of a wide range of fungi in field crops, stored fruit and vegetables.¹ ABZ, FBZ, and OFZ were the first such benzimidazoles to be successfully used in the treatment of

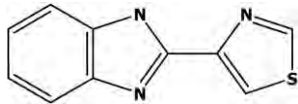
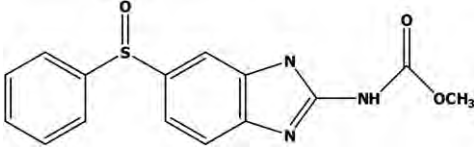
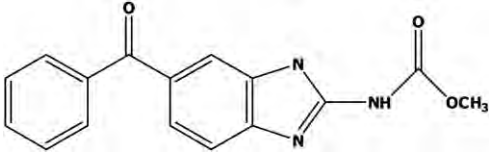
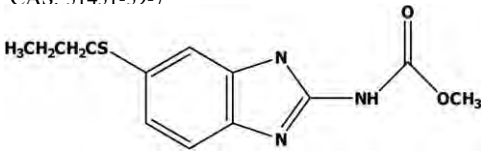
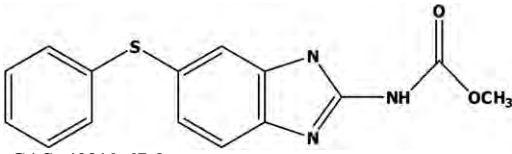
all stages of parasitic nematodes, lungworms, and adult liver flukes.^{1,5} Improper uses of these anthelmintics by inappropriate period and excess administration, especially in cows during their lactating period, may result in their residues to be present in milk and dairy products, edible tissue and animal-derived food products.^{4,6} Chronic exposure to benzimidazole compounds has been associated with several toxic effects such as teratogenicity, congenic malformations, polyploidy, diarrhea, anemia, pulmonary edemas, or necrotic lymphadenopathy.^{7,8} To avoid residue problems and potential risk to consumers, therefore, the development of sensitive, reliable and simple methods is still a challenging task and necessary for monitoring these veterinary drug residues in food and environmental samples.

High performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV),^{6,9,10} fluorescence (FL) detection^{11,12} and mass spectrometry (MS)^{4,13–15} have been accepted as popular and powerful tools for the analysis of benzimidazoles. Although the MS detector provides more sensitivity and selectivity than the UV for monitoring target compounds in complex samples, it is a very expensive and complex instrument. To improve the sensitivity of HPLC-UV, effective sample preparation and

^aDepartment of Chemistry, Faculty of Engineering, Rajamangala University of Technology Isan, Khon Kaen Campus, Khon Kaen 40000, Thailand. E-mail: sanyanawa@yahoo.com; yanawath.sa@rmu.ac.th; Fax: +66 4333 8869; Tel: +66 4333 8870 ext. 2309, 2390

^bMaterials Chemistry Research Unit, Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

Table 1 Chemical structures and physicochemical properties of the studied benzimidazole anthelmintics^a

Name	Structure/CAS no.	Aqueous solubility ^a (mg L ⁻¹)	Octanol-water partition coefficient (<i>K</i> _{ow})	<i>pK</i> _a		pH range at which substance is in neutral state
				<i>pK</i> _{a1}	<i>pK</i> _{a2}	
Thiabendazole (TBZ)	 CAS: 148-79-8	335.2	1.58–1.76	5.22	12.83	7.2–10.9
Oxfendazole (OFZ)	 CAS: 53716-50-0	407.2	1.88–2.13	4.13	11.79	6.1–9.8
Mebendazole (MBZ)	 CAS: 31431-39-7	50.08	2.44–2.52	4.13	11.79	6.1–9.8
Albendazole (ABZ)	 CAS: 54965-21-8	46.39	2.20–2.92	5.54	13.11	7.7–11.2
Fenbendazole (FBZ)	 CAS: 43210-67-9	6.38	3.07–4.01	5.12	12.72	7.1–9.8

^a Obtained by calculation using the Estimation Programs Interface (EPI) Suite™ v.4.1 (Environmental Protection Agency, USA).

preconcentration techniques are normally required. Several sample pre-treatment techniques have been applied for the analysis of benzimidazoles in various samples such as solid-phase extraction (SPE),^{4,16} pressurized liquid extraction (PLE),¹³ QuEChERS,¹⁴ dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME)¹⁷ and supercritical fluid extraction (SFE).¹⁰ However, most of these methods have some limitations including being time consuming, and using toxic organic solvents. Another promising preconcentration and separation methodology is cloud-point extraction (CPE) using surfactants as the extractant. CPE offers important advantages such as its environmental friendliness, simplicity, high extraction efficiency, and good compatibility with the organic mobile phase in HPLC. Recently, several CPE strategies such as mixed non-ionic and cationic surfactants,¹⁸ mixed non-ionic and anionic surfactants,¹⁹ and mixed cationic and anionic surfactants (called catanionic surfactant)^{20,21} have been developed to obtain higher extraction efficiency of various analytes. In conventional CPE, a temperature higher than its critical cloud-point temperature for each non-ionic surfactant is required for clouding and phase

separation into two phases. A small volume is of the surfactant-rich phase (SRP) and a large volume is of the diluted surfactant or aqueous phase (AQ). The target analytes will solubilize into surfactant aggregates in SRP, leading to preconcentrate analytes higher in comparison to their initial concentration in the aqueous phase. More recently, a new technology using ultrasound radiation in combination with conventional CPE has been developed and demonstrated as a new extraction methodology called ultrasound-assisted CPE (UA-CPE).^{22–24} In the CPE process, ultrasonic waves have been reported to speed up the combination and formation of the surfactant-rich phase and also offer a quick phase separation in comparison with the process with heating alone and conventional CPE with separation of the phases using centrifugation.²⁴ Moreover, the UA-CPE has also been proven to improve extraction efficiency and preconcentration factor. All the research studies above indicate that CPE has great analytical potential as an effective preconcentration method, but only a few reports have been found on the extraction and preconcentration of benzimidazoles in soil¹¹ and water samples.¹² Furthermore, the green extraction technology of ultrasonic assisted CPE is limited

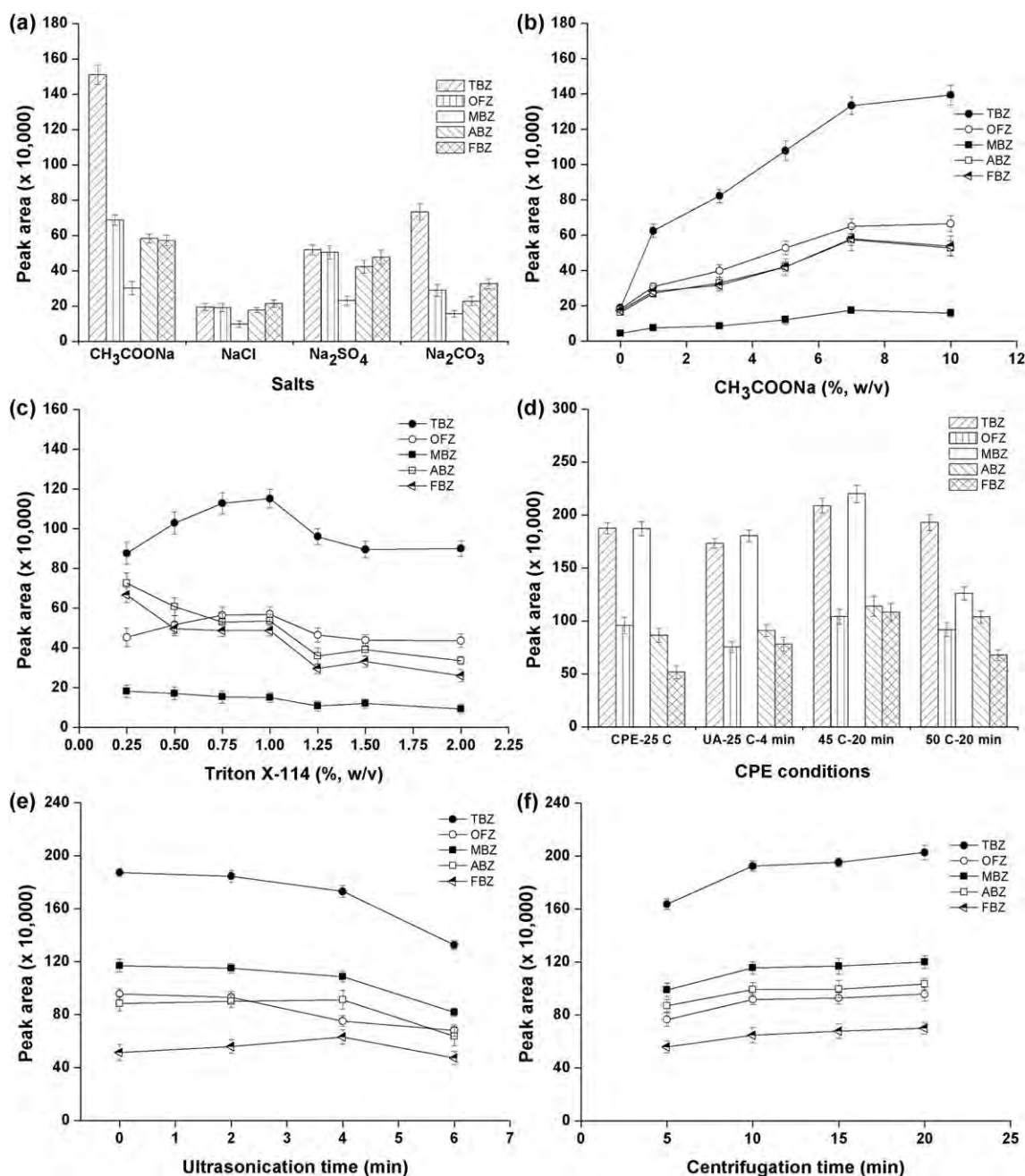


Fig. 1 Effect of the studied parameters on the preconcentration of target benzimidazoles: (a) salt types, (b) sodium acetate, (c) Triton X-114, (d) CPE extraction temperature, (e) ultrasonication time, and (f) centrifugation time.

to investigating and extending the various CPE conditions using other surfactants (such as the Triton-X series) and therefore the application of this technology for separation and preconcentration of benzimidazole anthelmintics as well as various other analytes in samples is of interest in separation science.

In this study, a simple and effective CPE procedure was developed for the extraction and preconcentration of benzimidazole anthelmintics (e.g., TBZ, OFZ, MBZ, ABZ, and FBZ) in water and milk samples. The target anthelmintics were preconcentrated using non-ionic Triton X-114 in the presence of salt additive under ultrasound-assisted conditions to elevate phase separation. The incubation of UA-CPE could be performed at ambient temperature compared to high temperature

incubation for conventional CPE. The parameters affecting the UA-CPE (such as concentration of surfactant, type and content of salts, incubation temperature, ultrasonic time, and centrifugation time) for extraction and preconcentration of target analytes as well as HPLC separation conditions were also investigated.

Experimental

Chemicals and reagents

All reagents were of the analytical reagent grade or higher. The analytical standards of benzimidazoles were purchased

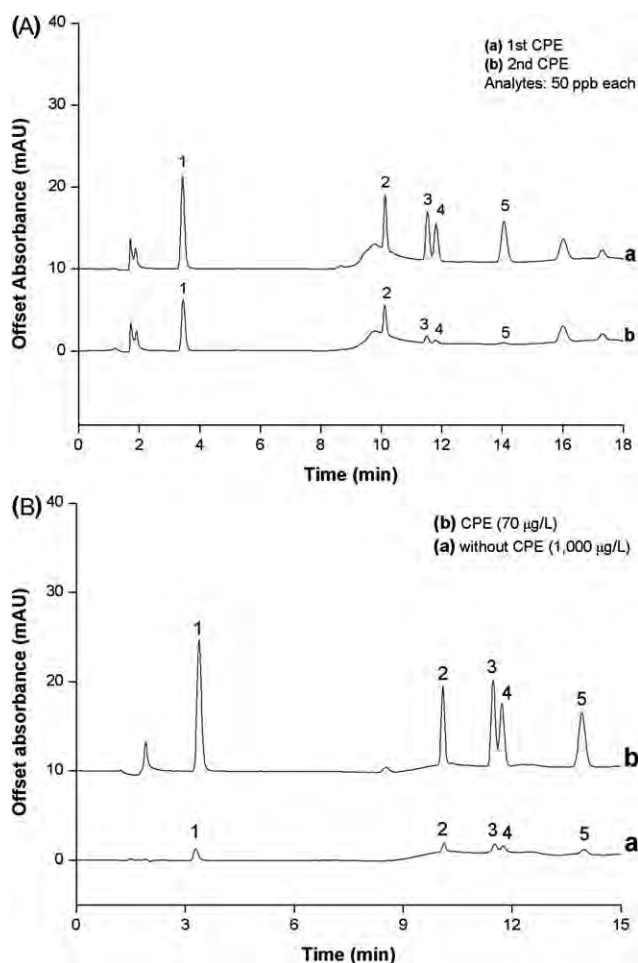


Fig. 2 Overlaid chromatograms of the studied benzimidazoles obtained from (A) the evaluation of extraction performance of the CPE and (B) the extraction without preconcentration and with CPE preconcentration. The conditions are described in the text (Experimental section). The peak assignments: 1, TBZ; 2, OFZ; 3, MBZ; 4, ABZ; and 5, FBZ.

from Sigma-Aldrich including TBZ (Italy), OFZ (Germany), MBZ (USA), and ABZ and FBZ (China). The stock solutions of each benzimidazole were prepared at 1000 mg L^{-1} by

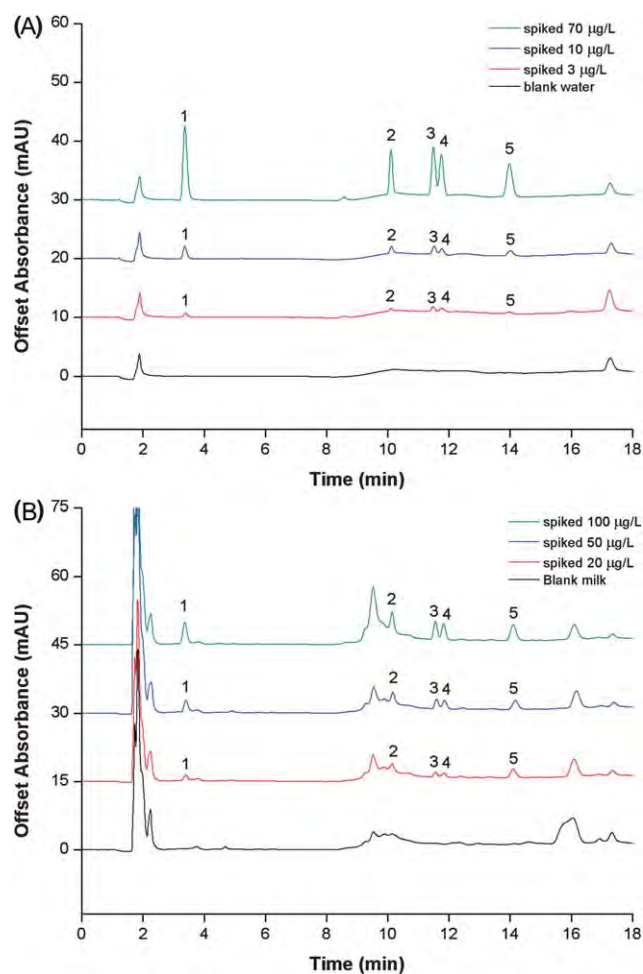


Fig. 3 Overlaid chromatograms of (A) river water and (B) UHT fresh milk unspiked (blank sample) and spiked at different concentrations. The peak assignments are described in Fig. 2.

dissolving an appropriate amount in 5% (v/v) formic acid/methanol. Triton X-114 was purchased from Sigma-Aldrich (USA). The stock solution of Triton X-114 (25%, w/v) was prepared in water. Acetic acid (glacial), formic acid,

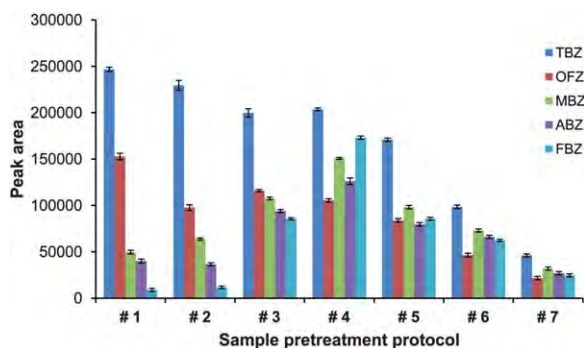
Table 2 Retention parameters of the studied benzimidazoles and analytical performances of the proposed UA-CPE method

Analyte	Retention parameters		Linear equation	Linearity ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	PF ^b	Intra-day ($n = 5$), %RSD		Inter-day ($n = 3 \times 3$ days), %RSD	
	t_R (min)	k'						t_R	Peak area	t_R	Peak area
TBZ	3.4	1.2	$y = 1586.4x + 3802.4$ ($y = 15\,541x - 8132$) ^a	0.1–100 (500–5000)	0.9982 (0.9990)	0.005 (100)	164	1.3	2.9	2.0	4.9
OFZ	10.1	5.5	$y = 764.4x + 2668.2$ ($y = 55\,635x - 3892$)	0.1–100 (500–5000)	0.9962 (0.9981)	0.005 (200)	18	0.08	3.7	0.21	3.7
MBZ	11.5	6.5	$y = 1162.7x + 2887.7$ ($y = 49\,533x - 17\,827$)	0.1–100 (500–5000)	0.9984 (0.9995)	0.005 (200)	28	0.06	4.0	0.28	6.8
ABZ	11.7	6.6	$y = 895.9x + 5328.6$ ($y = 51\,917x - 11\,857$)	0.1–100 (500–5000)	0.9978 (0.9990)	0.100 (200)	27	0.09	4.4	0.60	5.9
FBZ	13.9	8.0	$y = 941.0x + 3271.1$ ($y = 50\,604x - 14\,259$)	0.1–100 (500–5000)	0.9994 (0.9960)	0.050 (300)	29	0.07	2.6	0.47	5.1

^a These values were obtained from samples without preconcentration. ^b Preconcentration factor (PF) was calculated from the concentration of analytes ($1000 \mu\text{g L}^{-1}$) obtained from CPE and without CPE, ($n = 5$).

Table 3 Recovery obtained from the determination of benzimidazole anthelmintics in spiked water samples ($n = 3$)^a

Analyte	Spiked ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Tap			Drinking			Pond			River		
		Measured ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R (%)	RSD (%)	Measured ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R (%)	RSD (%)	Measured ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R (%)	RSD (%)	Measured ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R (%)	RSD (%)
TBZ	0	ND	—	—	ND	—	—	ND	—	—	ND	—	—
	3	2.99	99.9	4.9	2.73	91.1	0.5	3.16	105.4	1.9	3.13	104.2	2.0
	10	9.75	97.5	2.2	10.99	109.9	2.0	10.89	108.9	2.8	9.70	97.0	3.0
	70	63.86	91.3	0.5	77.48	110.7	2.4	77.07	110.1	0.9	62.52	89.3	5.1
OFZ	0	ND	—	—	ND	—	—	ND	—	—	ND	—	—
	3	2.60	86.7	4.3	3.24	108.0	1.9	2.64	88.0	6.1	3.29	109.8	5.2
	10	8.78	87.8	0.1	10.99	109.9	2.4	10.22	102.2	5.3	8.68	86.8	3.4
	70	61.95	88.5	0.9	65.31	93.3	0.5	66.95	95.6	1.1	57.12	81.6	5.6
MBZ	0	ND	—	—	ND	—	—	ND	—	—	ND	—	—
	3	3.11	103.7	3.9	3.25	108.4	0.6	3.23	107.6	0.2	3.04	101.2	2.4
	10	10.89	108.9	0.1	10.61	106.1	2.0	9.83	98.3	3.1	10.79	107.9	3.7
	70	62.86	89.8	0.3	69.22	98.9	1.7	68.11	97.3	1.9	76.02	108.6	1.1
ABZ	0	ND	—	—	ND	—	—	ND	—	—	ND	—	—
	3	2.93	97.7	1.4	2.59	86.2	3.1	3.11	103.7	3.9	2.49	83.0	1.5
	10	8.26	82.6	0.8	9.03	90.3	2.3	9.21	92.1	1.0	8.54	85.4	4.7
	70	59.43	84.9	1.0	68.96	98.5	5.6	69.98	100.0	2.3	76.18	108.8	5.6
FBZ	0	ND	—	—	ND	—	—	ND	—	—	ND	—	—
	3	3.29	109.8	2.3	3.26	108.6	1.1	3.28	109.3	4.2	3.34	111.4	2.8
	10	9.63	96.3	3.7	11.06	110.6	1.4	10.82	108.2	2.1	11.11	111.1	2.1
	70	67.69	96.7	3.6	77.31	110.4	1.0	75.28	107.5	0.7	75.78	108.3	4.0

^a ND: not detected, R: recovery.**Fig. 4** Sample pretreatment methods for precipitating fat and protein of the spiked milk samples with target analytes ($250 \mu\text{g L}^{-1}$ each) before CPE ($n = 3$). Description of tested methods: #1, milk (10 mL) + water (3 mL) + 0.5 g Na_2SO_4 + 150 μL acetic acid; #2, milk (10 mL) + water (5 mL) + 150 μL acetic acid; #3, milk (5 mL) + 0.5 g Na_2SO_4 + 1% acetic acid in ACN (5 mL) and supernatant was evaporated at 40°C ; #4, milk (5 mL) + 0.5 g Na_2SO_4 + 1% acetic acid in ACN (5 mL); #5, milk (5 mL) + water (1 mL) + 0.5 g Na_2SO_4 + 1% acetic acid in ACN (4 mL); #6, milk (5 mL) + 0.25 g Na_2SO_4 + 1% acetic acid in ACN (5 mL); and #7, milk (5 mL) + 1% acetic acid in ACN (5 mL). The pretreated samples were centrifuged at 3500 rpm for 5 min and then supernatants were filtered through Whatman filter paper No.1. The supernatants were diluted to 10 mL with water before subjecting to CPE.

methanol (MeOH), and acetonitrile (ACN) were purchased from Merck (Germany). Various salts including NaCl (Ajax Finechem, New Zealand), anhydrous Na_2SO_4 (Carlo Erba, France), Na_2CO_3 (RFCL Limited, India) and anhydrous sodium acetate (Carlo Erba, France) were used. All aqueous solutions were prepared in deionized water with resistivity of $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ from RiO_5^{TM} Type I Simplicity 185 (Millipore water, USA).

Instruments

The HPLC system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) consisted of DGU-20As in-line degasser, a model LC 20AD pump, and a model SPD-M20A UV-Vis photodiode array detector (PDA). LCsolution software (Shimadzu) was utilized to control the system and for the acquisition and data analysis. An Inertsil® ODS column ($4.6 \times 150 \text{ mm}$, $5.0 \mu\text{m}$) from GL Science (Japan) was connected to a guard C18 column (GL Science, Japan) for separation of target benzimidazoles. A 40 kHz and 500 W ultrasonic water bath with temperature control (Hwashin Technology, Korea) was used. A centrifuge (NF200 model, Nüve Inc., Turkey) was used for complete phase separation.

High performance liquid chromatographic condition

The separation of benzimidazoles was carried out on a reversed-phase system with gradient elution using MeOH and 1% (v/v) acetic acid, a flow rate of 1.0 mL min^{-1} and detection at 296 nm. The gradient elution was performed as follows: 40% (v/v) MeOH (0–3 min), ramped to 75% (v/v) MeOH (5–10 min), ramped to 85% (v/v) MeOH (12–15 min). After that, 100% (v/v) MeOH was held for 5 min to wash the excess surfactant from the system. Finally, 40% (v/v) MeOH was held (5 min) to equilibrate the column before the next run.

UA-CPE procedure

In the procedure, 10 mL standard (or sample) solution was mixed with CH_3COONa (7%, w/v) before the addition of Triton X-114 (0.75%, w/v). The cloudy solution was then sonicated in the ultrasonic bath for 2 min (40 kHz, 500 W, and $25 \pm 5^\circ\text{C}$) to help the phase separation. After that, the solution was centrifuged at 3500 rpm for 10 min to complete the phase separation and the surfactant-rich phase was observed at the bottom of the solution.

Table 4 Matrix match calibrations of benzimidazole anthelmintics in studied milk samples ($n = 3$)

Analyte	UHT low fat milk		UHT plain milk		UHT fresh milk		Pasteurized plain milk	
	Linear equation	r^2	Linear equation	r^2	Linear equation	r^2	Linear equation	r^2
TBZ	$y = 476.6x - 507.3$	0.9967	$y = 470.5x - 2101$	0.9970	$y = 446.2x - 923.7$	0.9984	$y = 464.0x + 1433.6$	0.9954
OFZ	$y = 311.9x + 286.7$	0.9981	$y = 248.0x + 5658$	0.9965	$y = 245.4x + 4347.8$	0.9965	$y = 318.3x - 1044.5$	0.9976
MBZ	$y = 343.4x - 2076.6$	0.9985	$y = 297.8x + 1970$	0.9979	$y = 322.5x + 683.7$	0.9958	$y = 328.5x + 3348.2$	0.9981
ABZ	$y = 307.5x - 1249.8$	0.9988	$y = 354.1x + 992$	0.9976	$y = 348.0x - 981.9$	0.9988	$y = 320.8x + 3561$	0.9987
FBZ	$y = 533.1x - 3703.6$	0.9983	$y = 462.6x + 8482$	0.9990	$y = 529.5x - 1089.3$	0.9967	$y = 656.6x - 4030.2$	0.9974

The aqueous phase (upper phase) was removed using a syringe. The surfactant-rich phase (~200 to 250 μL) alone was dissolved with 100 μL of 50% (v/v) MeOH and 20 μL of the solution and was subsequently injected to the HPLC system for analysis.

Water sample analysis

Water samples (tap, drinking, river, and pond) were filtered through double Whatman filter paper No. 1 and then passed through 0.45 μm membranes before extraction. Aliquots of 10 mL sample were directly subjected to the UA-CPE procedure (as described above) and analyzed by HPLC. To evaluate the recovery, the samples were spiked at concentrations of 3, 10, and 70 $\mu\text{g L}^{-1}$ before extraction and HPLC analysis.

Milk sample analysis

The studied cow milk samples were commercial milks of different types (*i.e.*, UHT low fat, UHT plain, UHT fresh and pasteurized plain milks). These commercial milks were randomly purchased from a local market in Khon Kaen province. Milk samples (5 mL) were mixed well with 0.5 g of anhydrous Na_2SO_4 . After that, 1% (v/v) acetic acid in ACN (5 mL) was added and shaken by

hand for a minute. Then, the homogenized milk samples were centrifuged at 3500 rpm for 5 min for complete fat and protein precipitation. The supernatants were filtered through Whatman filter paper No. 1. The solutions were diluted with water to 10 mL. These solutions were added to 100 μL acetic acid and centrifuged again to completely de-fat and de-proteinize. Subsequently, the obtained clear solutions were subjected to UA-CPE. For spiked samples, the samples were fortified with the target analytes at different concentrations (20, 50, and 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) before fat and protein precipitation.

Results and discussion

Optimization of the CPE conditions

The parameters affecting the performance of CPE including type and content of salt additives, concentrations of surfactant, equilibration temperature and time, and ultrasonication conditions were investigated. In addition, centrifugation time was also studied. To evaluate the performance of extraction and optimize the CPE conditions, a graph of peak area of each analyte against parameter studied was plotted. The investigation of each parameter is described in the following sections.

Table 5 Recovery obtained from the determination of benzimidazole anthelmintics in spiked milk samples ($n = 3$)^a

Analyte	Spiked ($\mu\text{g L}^{-1}$)	UHT low fat			UHT plain			UHT fresh			Pasteurized plain		
		Measured ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R (%)	RSD (%)	Measured ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R (%)	RSD (%)	Measured ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R (%)	RSD (%)	Measured ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R (%)	RSD (%)
TBZ	0	ND	—	—	ND	—	—	ND	—	—	ND	—	—
	20	21.72	108.6	2.8	22.58	112.9	2.4	19.66	98.3	1.4	20.36	101.8	2.1
	50	53.97	108.0	1.0	38.85	77.7	0.9	49.44	98.9	1.6	45.54	91.1	6.1
	100	110.60	110.6	1.1	102.40	102.4	0.2	101.91	101.9	3.5	97.74	97.7	1.1
OFZ	0	ND	—	—	ND	—	—	ND	—	—	ND	—	—
	20	20.12	100.6	7.8	21.68	108.4	4.3	20.74	103.7	4.8	20.24	101.2	6.3
	50	49.99	100.0	7.9	46.85	93.7	1.8	47.23	94.5	3.9	46.37	92.7	5.1
	100	105.20	105.2	2.0	91.80	91.8	1.5	104.47	104.5	0.7	87.04	87.0	2.0
MBZ	0	ND	—	—	ND	—	—	ND	—	—	ND	—	—
	20	21.31	106.6	0.4	17.96	89.8	0.6	19.62	98.1	4.9	19.39	97.0	3.0
	50	54.20	108.4	0.5	37.65	75.3	0.8	55.71	111.4	1.9	53.74	107.5	1.0
	100	103.57	103.6	0.4	76.28	76.3	0.4	106.95	107.0	1.2	89.68	89.7	0.8
ABZ	0	ND	—	—	ND	—	—	ND	—	—	ND	—	—
	20	21.63	108.2	1.5	22.78	113.0	0.6	22.04	110.2	1.2	22.25	111.3	0.3
	50	53.40	106.8	0.7	38.40	76.8	1.2	55.69	111.4	1.5	47.31	94.6	1.2
	100	104.47	104.5	0.7	81.30	81.3	0.5	103.74	103.7	4.1	87.84	87.8	0.3
FBZ	0	ND	—	—	ND	—	—	ND	—	—	ND	—	—
	20	20.98	104.9	4.6	17.48	87.4	3.5	21.32	106.6	4.6	20.53	102.7	4.9
	50	52.63	105.3	2.4	44.35	88.7	2.1	50.64	101.3	5.6	49.03	98.1	5.3
	100	106.30	106.3	1.0	96.55	96.6	1.2	89.36	89.4	1.1	80.68	80.7	2.7

^a ND: not detected, R: recovery.

Table 6 Comparison of the proposed method with other methods for extraction and determination of benzimidazoles in different sample matrices^{a,c}

Technique/ detection	Sample	Extraction method	Linearity ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	PF	Recovery (%)	Comment (extraction) ^b	Ref.
HPLC-UV	Bovine milk	SPE-MCX	10–200 $\mu\text{g kg}^{-1}$	3 $\mu\text{g kg}^{-1}$	—	78–112	Need more steps: washing, elution, evaporation, and re-dissolution	D. Chen <i>et al.</i> (2010) ⁶
HPLC-FL	Soils	MAE-CPE	1–1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$	0.015–30 $\mu\text{g kg}^{-1}$	—	71–105	Microwave (450 W), 8 min	R. Halko <i>et al.</i> (2006) ¹¹
HPLC-FL	Waters	CPE	1–100	0.004–6.4	—	68–96	90 °C, 5 min	R. Halko <i>et al.</i> (2004) ¹²
HPLC-PDA	Waters	MISPE	—	0.03–0.09	—	89–105	Consume large volume of organic solvents and samples	C. Cacho <i>et al.</i> (2009) ³²
HPLC-PDA	Waters	UA-CPE	0.1–100	0.005–0.1	18–164	81.6–111.4	25 °C, 2 min	This work
	Milks		10–200	1–5		75.3–111.4		

^a —: Not reported. ^b Time reported does not include centrifugation time. ^c Abbreviations: UV, ultraviolet; PDA, photodiode array; FL, fluorescence; SPE, solid-phase extraction; MCX, mixed mode cation exchange; MISPE, molecularly imprinted solid-phase extraction; MAE, microwave-assisted extraction.

Effect of type and concentration of salts and the pHs of their solutions

Salt plays an important role in improving the extraction efficiency in CPE. The effect of the addition of salts include decreasing the solubility of target analytes in aqueous solution and facilitate phase separation and enhance partitioning into the surfactant-rich phase, resulting from the salting out effect. In addition, salts are also found to affect the position of SRP (*e.g.*, at bottom or surface/top of solution) after completing the extraction.^{25,26} To investigate the influence of ionic strength on the performance of CPE, various experiments were performed by adding different salts (*e.g.*, CH_3COONa , NaCl , Na_2SO_4 , and Na_2CO_3). In preliminary studies, the same amount of each salt (0.7 g/10 mL sample solution) and equal molar concentrations (8.55 mmol L^{-1}) were studied. It was found (Fig. 1a) that CH_3COONa gave the highest peak area compared to other studied salts at the same amount and same molar concentration. The ability of the studied salts to enhance the extraction efficiency of benzimidazoles is in the order as follows: $\text{CH}_3\text{COONa} > \text{Na}_2\text{SO}_4 > \text{Na}_2\text{CO}_3 > \text{NaCl}$.

To extend the investigation, the effect of pH of solution after the addition of salts was also evaluated because the studied benzimidazoles can be ionized corresponding to their two pK_a values ($\text{pK}_{a1} \sim 4\text{--}6$ and $\text{pK}_{a2} \sim 12\text{--}13$) (Table 1). At $\text{pH} < 6$ the analytes are positively charged, while at $\text{pH} > 12$ they are negatively charged. The benzimidazoles can be present in neutral forms where the pHs of solution are in the range of 6–12 (see Table 1). Under the conditions studied, the pHs of solutions after adding the studied salts were 8.5 (CH_3COONa), 7.2 (NaCl), 6.5 (Na_2SO_4) and 11.6 (Na_2CO_3). The benzimidazoles are neutral under these solutions after addition of salts, except for some analytes present with negative charge under the sodium carbonate solution. Among the salts studied, CH_3COONa gave the highest peak area for most analytes. This may be because CH_3COONa has a suitable ionic strength (~ 0.85) for the extraction condition when compared to other salts of NaCl (~ 1.2), Na_2SO_4 (~ 1.5), and Na_2CO_3 (~ 2.0). It can be concluded that the benzimidazoles are extracted and preconcentrated in a neutral form into micellar aggregates of Triton X-114. Note that the SRP obtained after the addition of Na_2SO_4 or Na_2CO_3 was milky and present at the top of the solution, and thus it was difficult to handle the phase and

resulted in low reproducibility. Meanwhile, CH_3COONa and NaCl gave the SRP at the bottom of the solution which was easy to handle and provided good reproducibility.

For further studies, CH_3COONa was then investigated in the range of 0–10 % (w/v), with the result shown in Fig. 1b. It can be clearly seen that the peak area of most studied benzimidazoles increased with increasing CH_3COONa content until 7% (w/v) and became nearly constant afterwards. Thus, 7% (w/v) CH_3COONa was chosen for the following experimental studies.

Effect of concentration of Triton X-114

In this study, non-ionic Triton X-114 surfactant was selected as extractant in CPE because of its lower cloud-point temperature (≈ 22 to 23 °C)^{25,26} and less critical micelle concentration (≈ 0.2 mmol L^{-1}), compared to other non-ionic surfactants like Triton X-100 and Genapol X-080. Thus, the cloudy solution should easily occur at room temperature and high extraction efficiency was also expected. For the study, the concentration of Triton X-114 in the range of 0–2.0% (w/v) was evaluated. According to Fig. 1c, peak areas of TBZ, OFZ and MBZ increased with the increasing surfactant concentration up to 0.75% (w/v) and decreased the signal beyond this point. Meanwhile, the other analytes gradually decreased their peak areas over the studied concentration range of surfactant. In many published reports, it has been found that extraction efficiency of the compounds was gradually improved by increasing the concentration of surfactant,^{25,27} due to sufficient concentration for quantitative extraction. However, high concentration of surfactant used in CPE results in a large volume of surfactant-rich phase (V_{SRP}) and needs large organic solvents to completely dissolve the phase before analysis, and resulting in decreasing extraction efficiency. To compromise the recovery and give optimum V_{SRP} , 0.75% Triton X-114 was selected in this study. Under fully optimized CPE conditions, V_{SRP} and aqueous phase (V_{AQ}) were 200–250 μL and 9.9–10.0 mL, respectively. The phase volume ratio ($V_{\text{SRP}}/V_{\text{AQ}}$) was calculated to be ~ 0.020 to 0.025 .

Effect of the equilibration temperature and incubation time

Theoretically, to obtain high extraction efficiency for CPE using non-ionic surfactant, the extraction is usually performed at a

temperature higher than the cloud-point temperature around 15–20 °C and with the addition of salts. For example, the extraction using Triton X-114 is usually carried out at 45 °C for 20 min and using different salts such as NaCl, Na₂SO₄, *etc.*^{25,27} In this study, ultrasonic-assisted cloud-point extraction (UA-CPE) was investigated for extraction of target benzimidazoles in comparison with the conventional CPE systems (*e.g.*, at room temperature and higher temperature). UA-CPE was carried out using the equilibration temperature at 25 °C for 4 min under ultrasonic radiation and in the presence of CH₃COONa as salt additive. Meanwhile, the conventional CPE were performed similarly except it was equilibrated at 45 °C and 50 °C for 20 min. The separation of phases after CPE was carried out using centrifugation at 3500 rpm for 10 min in all studied systems. From the results in Fig. 1d, it can be seen that the UA-CPE carried out at room temperature gave peak area for the target compounds comparable to conventional CPEs performed at higher equilibration temperatures (45 and 50 °C). Although the conventional CPE conditions gave relatively higher signal (peak area), a longer time for incubation (such as 20 min) is required. When compared to CPE at room temperature (25 °C), peak areas of ABZ and FBZ obtained from CPE under ultrasonic conditions are high especially for FBZ. It has been reported that ultrasound can accelerate the interaction rate between the surfactant and aqueous analyte sample, resulting in complete transfer of analytes into the surfactant-rich phase.^{23,24} Thus, CPE under ultrasonic conditions was subsequently investigated. Ultrasonication time was then evaluated in the range of 2–6 min (Fig. 1e). It was found that longer ultrasonication causes a gradual decrease in peak area of the studied analytes until 4 min and sharply decreases beyond this point, with the exception of ABZ and TBZ. Peak areas of these analytes increased with increasing ultrasonication time up to 4 min and then decreased afterwards. The increase of peak area of ABZ and TBZ might be because ultrasound can help highly hydrophobic analytes (high K_{ow} , see Table 1) to penetrate more into micellar aggregates. On the other hand, longer ultrasonication time may cause micellar aggregates to break, thus decreasing extraction efficiency. In this study, 2 min ultrasonication was chosen. More investigations (with and without ultrasonication) of different solutions containing salts and Triton X-114 were studied as follows: (i) CH₃COONa (10 and 20%, w/v) in the presence of Triton X-114 (1.5 and 3.0%, w/v) and (ii) NaCl (7%, w/v) containing Triton X-114 (3%, w/v). Phase separation could be observed after the solution (especially for sodium chloride) was accelerated by ultrasonication at 25 ± 5 °C for 4 min and left for at least 5 min at ambient temperature (without centrifugation). It was also found that increasing the Triton X-114 concentration had a strong effect on the phase separation compared to salt concentration increase. However, the phase separation of the solution above cannot be completely obtained. To summarize, the CPE condition for extraction and preconcentration was carried out at room temperature (25 °C) and ultrasonication for 2 min.

Effect of centrifugation time

Although centrifugation time has less influence on the extraction efficiency,^{25,27,28} optimum centrifugation time is still required for complete phase separation. Centrifugation time in the range

5–20 min (5 min interval) at 3500 rpm was evaluated in this study (Fig. 1f). It was found that extraction performance slightly increased with time up to 10 min and was rather constant afterwards. So, 10 min centrifugation was used throughout the experiments.

Evaluation of the extraction performance of CPE

To evaluate the performance of the UA-CPE, a series ($n = 5$) of standard mixture solutions (50 µg L⁻¹ each) was studied by replicate re-extractions under the chosen CPE conditions as follows: 0.75% (w/v) Triton X-114, 7% (w/v) sodium acetate, 2 min ultrasonication, and 10 min centrifugation. The SRP (after the first CPE) was analyzed. Afterwards, the AQ solution from the first CPE was re-extracted (second CPE) under the same conditions and analyzed (see results in Fig. 2A). The extraction recovery of the analytes obtained after the first CPE was relatively high (90–100%) for MBZ, ABZ, and FBZ, whereas the recovery for TBZ and OFZ was about 70 and 75%, respectively. It was also found that the extraction is highly effective for highly hydrophobic compounds ($K_{ow} > 2$) such as MBZ, ABZ and FBZ. Meanwhile, polar analytes such as TBZ and OFZ seem to need re-extraction. However, the proposed CPE with a single step is effective enough for quantitative extraction and determination of analytes. Preconcentration factor (PF) was also calculated from the ratio of the concentration of analytes in the surfactant-rich phase (SRP) after CPE and in the original aqueous phase (before CPE). The concentration of each analyte in SRP was evaluated from the calibrations without CPE preconcentration. From this work, good extraction performance with PF in the range of 18–164 was obtained (Table 2). Different PF values for the analytes may be due to different physicochemical properties of each analyte (see Table 1) such as chemical structure, K_{ow} , *etc.* and different distribution behavior in the micellar systems. PF seems to be related to the K_{ow} values. MBZ, ABZ, and FBZ are expected to give higher preconcentration factors than OFZ and TBZ. However, TBZ gave the highest PF. This behavior may be because of its small molecule, resulting in more favorable penetration into micellar aggregates. Fig. 2B shows the overlaid chromatograms of standard benzimidazoles obtained from, with CPE and without CPE. The order of elution was TBZ, OFZ, MBZ, ABZ, and FBZ. Their retention time (t_R) and capacity factor (k') are summarized in Table 2.

Calibration parameters and method validations

The analytical performance of the proposed method, including calibration parameters and validation was evaluated and is summarized in Table 2. Calibration curves were constructed by triplicate injections of standard mixtures of benzimidazoles obtained after CPE at various concentrations (10 levels). Peak area of each target analyte was plotted against its concentration. Linear equations in the range of 0.1–100 µg L⁻¹ with high correlation coefficients ($r^2 > 0.996$) were obtained (Table 2). Limits of detection (LODs) of the analytes were carried out by identifying concentration giving signal-to-noise ratio (S/N) of 3. These were found with very low values in the range of 0.005–0.1 µg L⁻¹.

To examine the reproducibility of the method, precision in terms of intra-day and inter-day measurements were evaluated by replicate injections of the standard mixture of 1.0 mg L^{-1} each in a day ($n = 5$) and several days ($n = 3$), respectively. As the results in Table 2 show, there is good precision with the relative standard deviations (RSDs) of retention time (t_R) and peak area below 2.0% and 7%, respectively. From the results above, this developed CPE method coupled to HPLC has high precision and is very sensitive, and high preconcentration factors and low LODs are obtained.

Analysis of samples

Water samples

No contamination by the studied benzimidazoles in water samples studied (tap, drinking, pond, and river water) was observed. To evaluate the accuracy (%recovery) of the proposed method, sample blanks were fortified with corresponding analytes at different concentration levels of 3.0, 10, and $70 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, respectively. Three replicate extractions ($n = 3$) for each spiked concentration were performed. Fig. 3A demonstrates the overlaid chromatograms of river water samples studied at different spiked levels. The recovery (%R) was calculated and is listed in Table 3. The %R of the samples ranged from 81.6 to 111.4% with %RSD lower than 6%, for all the studied samples. The preceding results demonstrate that the proposed method was feasible for the quantitative analysis of target benzimidazoles in various water samples.

Milk samples

To obtain high sensitivity of detection, various different sample pretreatment protocols for precipitating protein and fat of milk samples before subjection to CPE were investigated. Trial and error was used to evaluate sample volume, salt additive, and precipitating solvent. As the results show in Fig. 4, the protocol #4 in which the milk sample (5 mL) was treated with 1% (v/v) acetic acid in ACN (5 mL) in the presence of Na_2SO_4 (0.5 g) [the ratio approx. 10/10/1 (% v/v/w)] gave the highest response compared to the other protocols. It was then selected as the optimum preparation protocol for milk samples. The proposed UA-CPE method was applied to the analysis of benzimidazoles in different brands of commercial milk samples. The matrix match calibration method was used for the quantitative analysis of target analyte residues in the samples. For the milks studied, no contamination of the studied benzimidazoles was observed in any sample. The matrix match calibration data of studied benzimidazoles obtained in milk samples is listed in Table 4. The obtained linear working range was $10\text{--}200 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ with the correlation coefficients higher than 0.995. Limits of detection (LODs) of the target compounds in milk samples were investigated by means of the concentration giving the signal-to-noise ratio (S/N) of 3. The obtained LODs were in the range $1\text{--}5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ which is lower than the maximum residue limits (MRLs) of the studied benzimidazoles in milks (*i.e.*, $100 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$) as established by Codex²⁹ and set in the range $20\text{--}100 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ as legislated by the Australian Government.³⁰ Typical chromatograms of blank and spiked milk samples are depicted in Fig. 3B. The accuracy of the proposed method

was also evaluated in terms of recovery (%R). Three different concentration levels (20.0, 50.0, and $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) were spiked into the samples ($n = 3$). The %R of each spiked level was calculated and is summarized in Table 5. It reveals good recovery obtained higher than 80% (on average) with RSDs below 8% for most studied samples. Low recoveries (<80%) of some analytes such as MBZ fortified in UHT plain milk are observed. This may be due to interference from the remaining fat and protein in the samples. However, the recoveries of 75–120% can be accepted for trace analysis.³¹ From the results, this method is an efficient approach for extraction and preconcentration as well as determination of target benzimidazoles in milk samples with adequate sensitivity and reproducibility.

Comparison of the proposed UA-CPE with other sample preparation techniques

Table 6 shows the performance of the proposed UA-CPE with other sample preconcentrations and determination of benzimidazoles. The results show that linearity, LODs, and recovery obtained from the proposed method are comparable. High preconcentration factors were obtained of up to 164. Moreover, less consumption of organic solvents and samples are required in the proposed method. Heating and cooling steps used in conventional CPE can be omitted. The phase separation can be carried out at ambient temperature ($25 \pm 5 \text{ } ^\circ\text{C}$) and complete phase separation obtained simply by centrifugation. In addition, short extraction time and a green extraction method are standpoints of the proposed UA-CPE.

Conclusions

This paper has demonstrated a simple, rapid, and sensitive ultrasound-assisted cloud-point extraction technique (UA-CPE) coupled with HPLC-PDA for the simultaneous determination of benzimidazole anthelmintic residues in water and milk samples. The developed method shows good analytical features providing low limits of detection at the level of $1\text{--}5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ which are below the acceptable MRLs for anthelmintics residues in the milk samples studied. The proposed UA-CPE can be performed easily in a short time. High preconcentration factors of 18–164, good recovery and high reproducibility were also obtained. UA-CPE has potential to be used as an alternative green extraction method for the determination of benzimidazoles in various sample matrices.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the Thailand Research Fund (TRF), the Commission on Higher Education (CHE), and Rajamangala University of Technology Isan, Khon Kaen Campus, through the TRF-CHE Research Grant for New Scholars (Grant no. MRG5480135) for financial support. The deionized water used throughout the research work obtained from the Department of Chemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University is acknowledged. The authors thank Miss Saowanee Chumpol and Miss Nuttayaporn Khamkrua for their assistance in the laboratory.

References

- 1 M. Danaher, H. De Ruyck, S. R. H. Crooks, G. Dowling and M. O'Keeffe, *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2007, **845**, 1.
- 2 L. Moreno, F. Imperiale, L. Mottier, L. Alvarez and C. Lanusse, *Anal. Chim. Acta*, 2005, **536**, 91.
- 3 H. De Ruyck, R. Van Renterghem, H. De Ridder and D. De Brabander, *Food Control*, 2000, **11**, 165.
- 4 X. Xia, Y. Dong, P. Luo, X. Wang, X. Li, S. Ding and J. Shen, *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2010, **878**, 3174.
- 5 T. A. M. Msagati and M. M. Nindi, *J. Sep. Sci.*, 2001, **24**, 606.
- 6 D. Chen, Y. Tao, Z. Liu, Z. Liu, L. Huang, Y. Wang, Y. Pan, D. Peng, M. Dai and Z. Yuan, *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2010, **878**, 2928.
- 7 X.-Z. Hu, M.-L. Chen, Q. Gao, Q.-W. Yu and Y.-Q. Feng, *Talanta*, 2012, **89**, 335.
- 8 O. Zamora, E. E. Paniagua, C. Cacho, L. E. Ver-Avila and C. Perez-Conde, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, **393**, 1745.
- 9 L. Mottier, L. Alvarez and C. Lanusse, *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2003, **798**, 117.
- 10 M. Danaher, M. O'Keeffe and J. D. Glennon, *Anal. Chim. Acta*, 2003, **483**, 313.
- 11 R. Halko, C. P. Sanz, Z. S. Ferrera and J. J. S. Rodríguez, *J. AOAC Int.*, 2006, **89**, 1403.
- 12 R. Halko, C. P. Sanz, Z. S. Ferrera and J. J. S. Rodríguez, *Chromatographia*, 2004, **60**, 151.
- 13 D. Chen, Y. Tao, H. Zhang, Y. Pan, Z. Liu, L. Huang, Y. Wang, D. Peng, X. Wang, M. Dai and Z. Yuan, *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2011, **879**, 1659.
- 14 M. Whelan, B. Kinsella, A. Furey, M. Moloney, H. Cantwell, S. J. Lehotay and M. Danaher, *J. Chromatogr., A*, 2010, **1217**, 4612.
- 15 B. Guo, Z. Huang, M. Wang, X. Wang, Y. Zhang, B. Chen, Y. Li, H. Yan and S. Yao, *J. Chromatogr., A*, 2010, **1217**, 4796.
- 16 T. Oyama, M. Yodohsi, A. Yamane, K. Kakehi, T. Hayakawa and S. Suzuki, *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2010, **879**, 2928.
- 17 Q. Wu, Y. Li, C. Wang, Z. Liu, X. Zang, X. Zhou and Z. Wang, *Anal. Chim. Acta*, 2009, **638**, 139.
- 18 N. Pourreza, S. Rastegarzadeh and A. Larki, *Food Chem.*, 2011, **126**, 1465.
- 19 H. Wu, G.-y. Zhao and L.-m. Du, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2010, **75**, 1624.
- 20 K. Seebunrueng, Y. Santaladchaiyakit, P. Soisungneon and S. Srijaranai, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, **401**, 1707.
- 21 K. Seebunrueng, Y. Santaladchaiyakit and S. Srijaranai, *Anal. Methods*, 2012, **4**, 1674.
- 22 H. Qin, G. Yu, M. Chen, Y. Zou and Y. Yang, *Eur. Food Res. Technol.*, 2012, **234**, 543.
- 23 Y. Zou, Y. Li, H. Jin, H. Tang, D. Zou, M. Liu and Y. Yang, *Anal. Biochem.*, 2012, **421**, 378.
- 24 B. Yao and L. Yang, *Sep. Sci. Technol.*, 2007, **42**, 1843.
- 25 A. Santalad, S. Srijaranai, R. Burakham, J. D. Glennon and R. L. Deming, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, **394**, 1307.
- 26 J. Zhou, X. L. Sun and S. W. Wang, *J. Chromatogr., A*, 2008, **1200**, 93.
- 27 J. Vichapong, Y. Santaladchaiyakit, R. Burakham and S. Srijaranai, *J. Food Sci. Technol.*, DOI: 10.1007/s13197-011-0556-0.
- 28 W. Liu, W.-j. Zhao, J.-b. Chen and M.-m. Yang, *Anal. Chim. Acta*, 2007, **605**, 41.
- 29 Codex Alimentarius Commission, Maximum residue limits for veterinary drugs in foods (CAC/MRL 2-2011), http://www.codexalimentarius.net/vetdrugs/data/MRL2_e_2011.pdf.
- 30 Australian Government, Australian pesticides and veterinary medicines authority, The MRL standard: maximum residue limits in food and animal feedstuff, http://www.apvma.gov.au/residues/docs/mrl_table4_march_2012.pdf.
- 31 Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, Guidelines for the validation of analytical methods for active constituent, agricultural and veterinary chemical products, http://www.apvma.gov.au/publications/guidelines/docs/gl_69_analytical_methods.pdf.
- 32 C. Cacho, E. Turiel and C. Pérez-Conde, *Talanta*, 2009, **78**, 1029.

*Preconcentration and Simultaneous
Analysis of Benzimidazole Anthelmintics
in Milk Samples by Ultrasound-Assisted
Surfactant-Enhanced Emulsification
Microextraction and High-Performance
Liquid Chromatography*

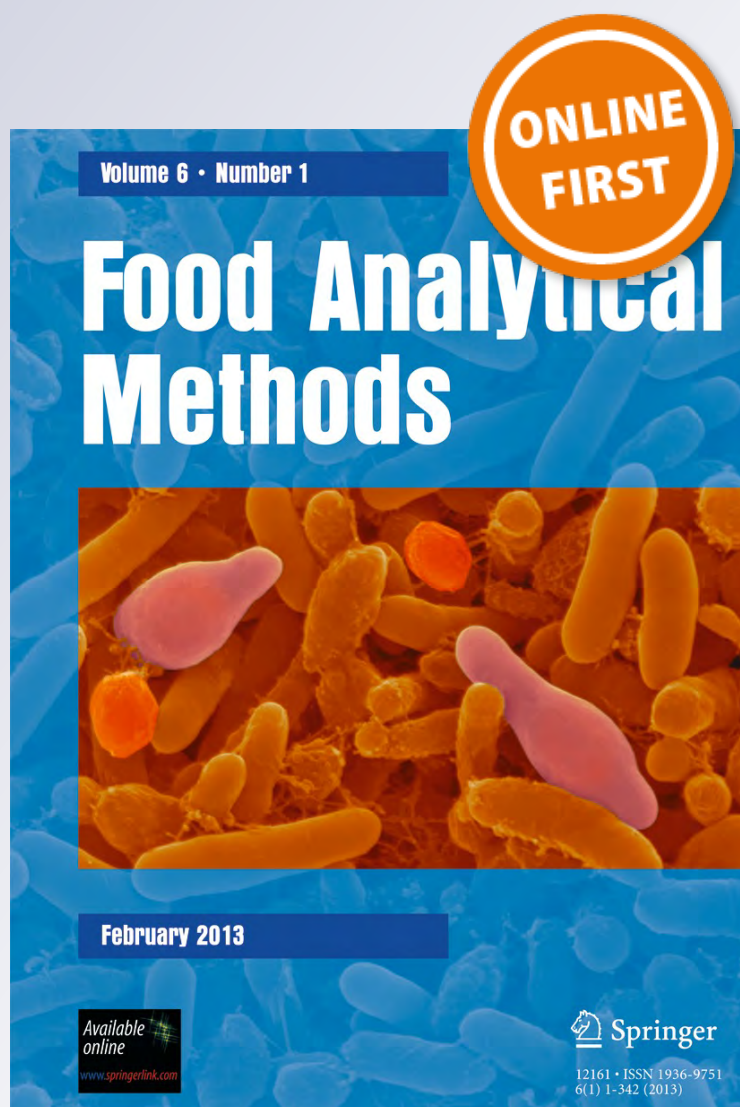
**Yanawath Santaladchaiyakit & Supalax
Srijaranai**

Food Analytical Methods

ISSN 1936-9751

Food Anal. Methods

DOI 10.1007/s12161-013-9569-9



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science +Business Media New York. 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.

Preconcentration and Simultaneous Analysis of Benzimidazole Anthelmintics in Milk Samples by Ultrasound-Assisted Surfactant-Enhanced Emulsification Microextraction and High-Performance Liquid Chromatography

Yanawath Santaladchaiyakit · Supalax Srijaranai

Received: 11 November 2012 / Accepted: 17 January 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract The proposed ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction (UASEME) coupled with high-performance liquid chromatography-photodiode array detection (HPLC-PDA) has been developed for the preconcentration and simultaneous analysis of five benzimidazole anthelmintics. Dichloromethane (extraction solvent) and Triton X-114 (emulsifier) was used for extraction of the target analytes. The parameters affecting the extraction efficiency were investigated and optimized. Under the optimum conditions, linearity was in the range from 10 to 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ with good coefficients of determination (R^2) higher than 0.994. Preconcentration factors were obtained up to 60, corresponding to limits of detection range of 1.8–3.6 $\mu\text{g L}^{-1}$. Intra-day ($n=5$) and inter-day ($n=4\times 3$) precisions were obtained with relative standard deviation of retention time and peak area below 0.8 and 9.2 %, respectively. Good recoveries for the spiked target anthelmintics at different concentrations (e.g., 20, 50, and 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) of milk samples were obtained in 72.5–113.5 %. The results demonstrated that the proposed UASEME-HPLC-PDA can be used as an alternative powerful method for the

simultaneous determination of the target analytes in milk samples.

Keywords Ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction · Benzimidazole anthelmintic · High-performance liquid chromatography · Milk

Introduction

Benzimidazole anthelmintics are drugs commonly used for prevention and treatment of parasitic infections in agriculture, aquaculture, and veterinary practices (Danaher et al. 2007; Xia et al. 2010). They include thiabendazole (TBZ), oxfendazole (OFZ), mebendazole (MBZ), albendazole (ABZ), fenbendazole (FBZ), etc. TBZ is the first benzimidazole introduced to the market, and it has been widely used for control of gastrointestinal nematodes and lungworms (Danaher et al. 2007). In addition, it has also been used as a fungicide for control of a wide range of fungi in field crops, stored fruit, and vegetables (Danaher et al. 2007). ABZ, FBZ, and OFZ are the first such benzimidazoles to be successfully used in the treatment of all stages of parasitic nematodes, lungworms, and adult liver flukes (Danaher et al. 2007; Msagati and Nindi 2001). Incorrect uses of these anthelmintics, especially in cows during their lactating period, can possibly remain in milk and dairy products, edible tissue, and animal-origin foods, which may pose a potential risk to consumers (Xia et al. 2010; Chen et al. 2010). Therefore, sensitive, effective, and reliable methods are necessary to monitor these veterinary drug residues in food and environmental samples to ensure food safety.

Y. Santaladchaiyakit (✉)
Department of Chemistry, Faculty of Engineering, Rajamangala
University of Technology Isan, Khon Kaen Campus,
Khon Kaen 40000, Thailand
e-mail: sanyanawa@yahoo.com

Y. Santaladchaiyakit
e-mail: yanawath.sa@rmu.ac.th

S. Srijaranai
Materials Chemistry Research Unit, Department of Chemistry
and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty
of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

The most analytical methods widely used for the determination of benzimidazole residues in various sample matrices are liquid chromatography (LC) with different monitoring detection modes, including ultraviolet (UV) (Chen et al. 2010; Mottier et al. 2003; Danaher et al. 2003), fluorescence (FL) (Wu et al. 2009; Halko et al. 2004), mass spectrometry (MS) (Xia et al. 2010; Chen et al. 2011; Whelan et al. 2010; Guo et al. 2010), and both UV and MS (Msagati and Nindi 2001). In general, suitable sample pretreatment and preconcentration techniques are required prior to instrumental analysis. Various sample preparations have been used for the analysis of benzimidazole residues such as solid-phase extraction (SPE) (Xia et al. 2010; Chen et al. 2010), pressurized liquid extraction (Chen et al. 2011), QuEChERS (Whelan et al. 2010), supercritical fluid extraction (Danaher et al. 2003), cloud-point extraction (CPE) (Halko et al. 2004; Santaladchaiyakit and Srijaranai 2012), and dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME) (Wu et al. 2009). Recently, a novel microextraction technique namely ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction (UASEME) has been recognized as an effective and alternative method to DLLME, ultrasound-assisted emulsification microextraction (UAEME), and CPE, for analysis of various target analytes in different sample matrices (Wu et al. 2010a; Wu et al. 2010b; Cheng et al. 2011a; Cheng et al. 2011b; Xia et al. 2012). The UASEME is a combination of techniques providing the advantages of each technique of DLLME, CPE, and UAEME using microvolumes of water-immiscible solvents (e.g., chloroform, dichloromethane, chlorobenzene) as extractant and surfactants (i.e., anionic, cationic, and nonionic) as emulsifiers under ultrasound radiation, and the extraction is carried out at mild conditions ($25\pm3^\circ\text{C}$) (Cheng et al. 2011a, b; Saraji et al. 2010). The use of surfactants as emulsifiers has been proven that they can accelerate the formation of fine droplets of the extraction solvent in aqueous sample solutions and enhance the dispersion of the water-immiscible phase into an aqueous phase due to the hydrophobic/hydrophilic properties of surfactants (Cheng et al. 2011a, b; Saraji et al. 2010), so high extraction efficiency can be obtained (Xia et al. 2012). Until now, the development and applications of UASEME for testing the feasibility of preconcentration of different analytes in various sample matrices have not received much concern.

The aim of the present work is to explore and develop a simple and efficient UASEME method coupled to HPLC with photodiode array (PDA) detection for the extraction, preconcentration, and analysis of benzimidazole anthelmintic residues in milk samples. The crucial experimental parameters affecting the UASEME and separation conditions were also investigated and optimized. The appropriate sample preparation for fat and protein precipitation of milk samples was also explored. To the best of our knowledge, this work is the first application of the UASEME-HPLC-

PDA for simultaneous analysis of benzimidazole anthelmintics in the samples studied.

Experimental

Chemicals and Reagents

All reagents were of analytical reagent grade or higher. The analytical standards of benzimidazoles were purchased from Sigma-Aldrich including TBZ (Italy), OFZ (Germany), MBZ (USA), and ABZ and FBZ (China). The stock solutions of each benzimidazole were prepared at $1,000\text{ mg L}^{-1}$ by dissolving an appropriate amount in 5 % (v/v) formic acid/methanol. Triton X-114, Dodecyl trimethyl ammonium bromide (DTAB), and Tween 20 were purchased from Sigma-Aldrich (USA). Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) was purchased from Sigma-Aldrich (India). Triton X-100 (Fluka, Switzerland) and Genapol X-080 (Fluka, Spain) were used. Sodium dodecyl sulphate (SDS) and chloroform were obtained from BDH Prolabo (Belgium). Acetic acid (glacial), formic acid, methanol, and acetonitrile were purchased from Merck (Germany). Trichloroethylene (Ajax Finechem, Australia) and dichloromethane (RCI Labscan Ltd., Thailand) were also used. Various salts including NaCl (Ajax Finechem, New Zealand), anhydrous Na_2SO_4 (Carlo Erba, France), Na_2CO_3 (RFCL Limited, India), and anhydrous sodium acetate (Carlo Erba, France) were used. All aqueous solutions were prepared in deionized water with resistivity of $18.2\text{ M}\Omega\text{cm}$ from RiO_sTM Type I Simplicity 185 (Millipore water, USA).

Instruments

The HPLC system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) consisted of DGU-20As in-line degasser, a LC 20AD pump, and a PDA detector. Lcsolution software (Shimadzu) was utilized to control the system and for the acquisition and data analysis. An Atlantis C18 column ($4.6\times150\text{ mm}$, $5.0\text{ }\mu\text{m}$) from Waters (Ireland) connected to a guard C18 column (GL Science, Japan) was used for separation of target benzimidazoles. The 40-kHz and 500-W ultrasonic water bath with temperature control (Hwashin Technology, Korea) was used in the UASEME procedure. A centrifuge (NF200 model, Nüve Inc., Turkey) was used for complete phase separation.

High-Performance Liquid Chromatographic Condition

The separation of benzimidazoles was carried out on a reversed-phase system with the gradient elution using methanol and 1 % (v/v) acetic acid, a flow rate of 1.0 mL/min , and detection at 296 nm. The gradient elution was performed as described in the previous work (Santaladchaiyakit and Srijaranai 2012).

UASEME Procedure

Aliquots of 5.0-mL sample (or standard) solution were mixed with sodium acetate (6 %, w/v) and 0.5 % (w/v) Triton X-114 before subsequently transferring to a 10-mL screw cap test tube. After the addition of dichloromethane (100 μ L) in the aqueous solution, the solution was then immersed in an ultrasonic bath for 4 min (40 kHz, 500 W, and 25 °C). The dispersion of dichloromethane in the solution was obtained (i.e., cloudy solution of tiny dichloromethane microdroplets). After that, the resulting emulsion was completely disrupted by centrifugation at 3,500 rpm for 10 min. The extraction organic droplet was sedimented at the bottom of the tube. The upper aqueous phase was removed using a 10-mL syringe. The sedimented phase was dissolved in 100 μ L methanol, and 20 μ L was then subjected to HPLC for further analysis.

Milk Sample Analysis

The studied cow milk samples were commercial and raw fresh (e.g., UHT low fat, UHT plain, pasteurized plain, and raw fresh). The commercial milks were randomly purchased from a local market in Khon Kaen province, and raw fresh milk was obtained from a farm in Khon Kaen province. Milk samples were pretreated using the slightly modified procedure from our previous work (Santaladchaiyakit and Srijaranai 2012). In brief, milk samples (2.00 mL) were mixed well with 0.2 g of anhydrous Na_2SO_4 . After that, 1 % (v/v) acetic acid in ACN (2.00 mL) was added and shaken vigorously by hand for a minute. Then, the homogenized milk samples were centrifuged at 3,500 rpm for 5 min for complete fat and protein precipitation. The supernatants were filtered through Whatman filter paper No. 1. The solutions were diluted with water to 5.00 mL in volumetric flasks. These solutions had 100 μ L acetic acid added and were centrifuged again to ensure complete precipitation of fat and protein. Consequently, the obtained clear solutions were subjected to UASEME, and the extract phase was then analyzed by HPLC. For spiked samples, the samples were fortified with the target analytes at different concentrations (20, 50, and 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) before fat and protein precipitation. All experiments were performed in triplicate.

Results and Discussion

Optimization of UASEME

Various parameters in UASEME affecting the extraction efficiency such as type and volume of extraction solvent, type and concentration of surfactant (emulsifier), amount of salt additive and their solution pHs, and ultrasonication

condition are generally investigated and optimized. The study of these parameters for the optimization of UASEME was done by “one-parameter-at-a-time” method and using the aqueous standard solution at the concentration of 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ each target analyte.

Selection of Type of Extraction Solvents

The selection of an appropriate extraction solvent is of great importance for the UASEME process because its physico-chemical properties not only affect the emulsification phenomenon but also the extraction efficiency (Wu et al. 2010b; Cheng et al. 2011b). To study the effect of the extraction solvent type, the extraction solvents with higher density than that of water such as chloroform (1.48 g/mL), dichloromethane (1.33 g/mL), and trichloroethylene (1.46 g/mL) were selected to evaluate for the extraction of target compounds. In these experiments, constant volume (50 μ L) of these solvents was used for extraction of analytes (500 $\mu\text{g L}^{-1}$ each) in the sample solution (5.00 mL) containing 1.5 % (w/v) Triton X-114 and 6.0 % (w/v) CH_3COONa . As can be seen in Fig. 1a, dichloromethane has the highest peak area for most studied analytes in comparison with the other tested solvents. The reason for the high extraction performance of dichloromethane may be because of its solvent hydrophobicity and polarity having more similar with those of target benzimidazoles and dichloromethane might have good dispersion in aqueous solution in the presence of Triton X-114 (as emulsifier). Consequently, dichloromethane was selected as the suitable extraction solvent and used in further experiments.

Selection of Type of Surfactants (Emulsifier)

In UASEME, a surfactant (emulsifier) is also important for obtaining a satisfactory preconcentration and extraction efficiency because it could accelerate the emulsification of the water-immiscible extraction solvent as very fine droplets into the aqueous solution under ultrasound radiation (Wu et al. 2010b). The emulsification helps the analytes in aqueous solution to be extracted to the organic phase due to the formation of very fine droplets of extraction solvent and resulting in increasing of the rate of mass transfer of the analytes from aqueous to organic extraction phase. Different types of surfactants, including non-ionic (e.g., Triton X-114, Triton X-100, Tween 20, and Genapol X-080), anionic (e.g., SDS), and cationic (e.g., CTAB and DTAB) at concentration of 1.5 % (w/v) were investigated for their influence on the extraction efficiency, whilst the other parameters were kept constant. From our earlier investigations, among the studied surfactants it was found (data not shown) that both anionic and cationic surfactants gave relatively low peak area and were not suitable for extraction of the target analytes

compared to non-ionic surfactants. This result might be because of larger solubilization capacity of non-ionic surfactants than that of ionic surfactants (Cheng et al. 2011b). The effect of various studied surfactants was shown in Fig. 1b. It is clearly seen that Triton X-114 and Genapol X-080 seem to be good emulsifiers in the system of aqueous solution and dichloromethane for the extraction of target compounds. However, the best extraction (highest peak areas) of analytes was found for Triton X-114. This could be because dichloromethane in the presence of Triton X-114 might have a more suitable polarity and favorable for the extraction of the polar target compounds than the other studied extraction solvents and other emulsifiers. Thus, dichloromethane and Triton X-114 were chosen as the appropriate extraction solvent and emulsifier, respectively.

Investigation of Salt Types and Their Solution pHs

Generally, the addition of salt into an aqueous solution decreases the solubility of the analytes in aqueous phase enabling a higher mass transfer towards the organic phase and results in improvement of the extraction efficiency (Wu et al. 2010a; Cheng et al. 2011a; Xia et al. 2012; Kamarei et al. 2011). In our investigation, different salts (~0.3 g/5-mL sample solution) and their solution pHs such as NaCl (pH~

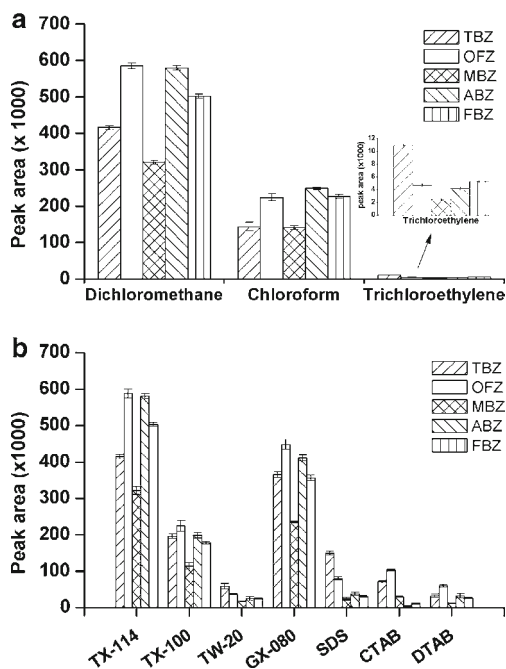


Fig. 1 Investigation of **a** selection of extraction solvents and **b** selection of surfactants (emulsifiers) affecting the extraction performance of the studied benzimidazoles (500 $\mu\text{g L}^{-1}$ each). Conditions: sample solution (5.00 mL), 50 μL of extraction solvent, 1.5 % (w/v) of surfactant, 6.0 % (w/v) CH_3COONa , 3-min ultrasonication time at 25 $^{\circ}\text{C}$, and 3,500 rpm for 5 min

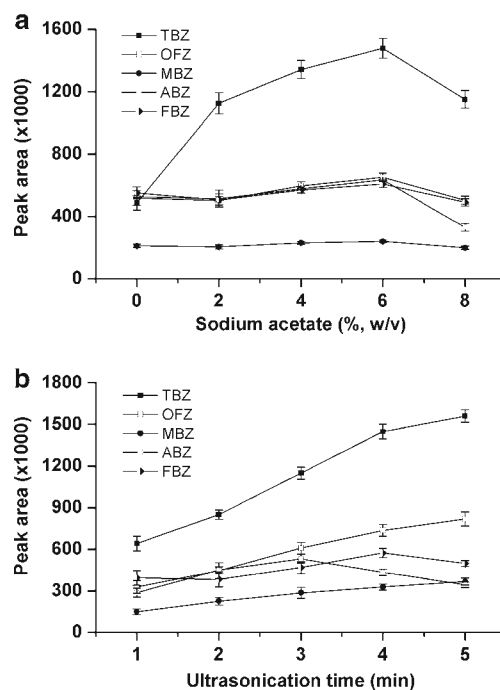


Fig. 2 Influence of **a** sodium acetate content and **b** ultrasonication time on the extraction performance of the studied benzimidazoles. Other conditions are described in Fig. 1

7.2), CH_3COONa (pH~8.5), NaH_2PO_4 (pH~4.1), Na_2SO_4 (pH~6.5), and Na_2CO_3 (pH~11.6) were investigated for the salting out effect on the extraction performance of the target benzimidazoles. It was found (data not shown) that Na_2SO_4

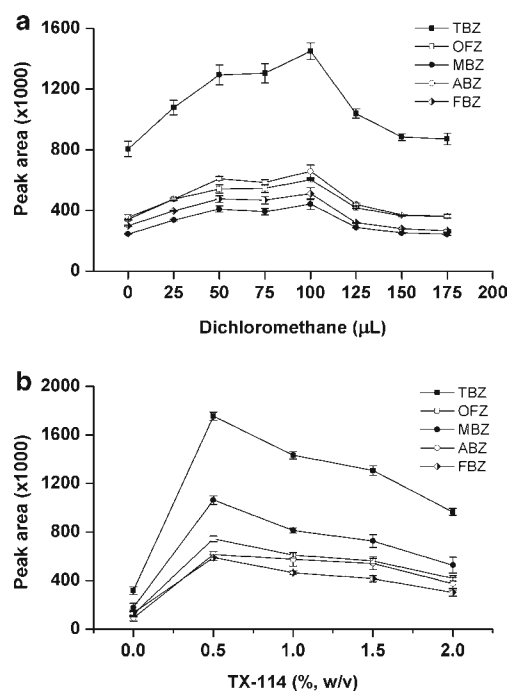


Fig. 3 Effect of **a** volume of dichloromethane and **b** concentration of Triton X-114 on the extraction efficiency of the target benzimidazoles. Other conditions are described in Fig. 1

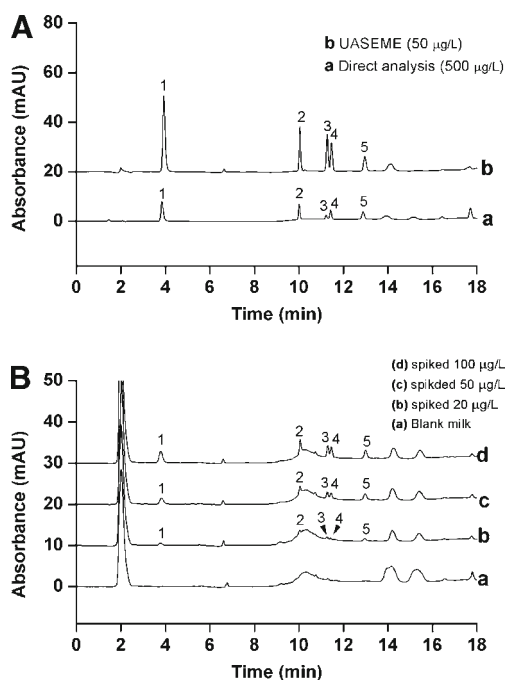


Fig. 4 Overlaid chromatograms of **A** standard mixture of five target benzimidazoles obtained with UASEME and without pre-concentration and **B** UHT plain milk samples with no spiked and spiked at different concentrations. Chromatographic separation conditions are described in the text. Peak assignment: 1 thiabendazole (TBZ), 2 oxfendazole (OFZ), 3 mebendazole (MBZ), 4 albendazole (ABZ), and 5 fenbendazole (FBZ)

and Na_2CO_3 gave extract phases which were insoluble in MeOH. The required large amount ($>500 \mu\text{L}$) of 1 % (v/v) acetic acid in ACN was used instead to dissolve the phase completely. Meanwhile, the highest extraction performance (in terms of peak area) of the target analytes was obtained using CH_3COONa in comparison with the other remaining salts studied. The effect of pH of solution after the addition of salts was also evaluated because the studied benzimidazoles can be ionized corresponding to their two pK_{a} values ($\text{pK}_{\text{a}1} \sim 4\text{--}6$ and $\text{pK}_{\text{a}2} \sim 12\text{--}13$) (Danaher et al. 2007). At $\text{pH} < 6$, the analytes are positively charged, while at $\text{pH} > 12$, they are negatively charged. The benzimidazoles can be

present in neutral forms where the pHs of solution are in the range of 6–12 (Danaher et al. 2007). According to the results, CH_3COONa ($\text{pH} \sim 8.5$) provided the highest extraction for most target compounds in comparison with the other salts, such as NaCl ($\text{pH} \sim 7.2$) and NaH_2PO_4 ($\text{pH} \sim 4.1$). This may be because CH_3COONa has a suitable ionic strength (~ 0.72) for the extraction condition when compared to other salts like NaCl (~ 1.0) and NaH_2PO_4 (~ 0.5). Based on the results above, it can be assumed that the studied benzimidazoles are well extracted and preconcentrated in neutral forms.

To summarize from the investigations above, the appropriate extraction solvent, surfactant (emulsifier), and salting out agent were dichloromethane, Triton X-114, and CH_3COONa , respectively.

Effect of Concentration of Sodium Acetate

The effect of concentration of CH_3COONa was studied over the range of 0–8 % (w/v). The results show (Fig. 2a) that salt had a significant effect on the extraction of the most target compounds, especially for TBZ. The increase of salt concentration results in increasing extraction performance (based on peak area) up to the concentration of salt at 6 % (w/v). Beyond this point, a decrease of peak areas for most analytes was obtained. The reason for this could be that high concentration of salt causes higher viscosity and density of the solution. Moreover, ultrasound energy can be absorbed by the viscous solution, which can prevent the organic phase from being dispersed into fine droplets, and therefore the efficiency of the mass-transfer process was decreased (Wu et al. 2010a; Ozcan et al. 2009). Based on the results, 6 % (w/v) CH_3COONa was selected as the appropriate amount of salting agent for subsequent experimental conditions.

Effect of Ultrasonication Time

Ultrasonic time has been shown to affect the emulsification and mass transfer process, and therefore influences the

Table 1 Analytical performances of the standard benzimidazoles obtained from the proposed UASEME method

Analyte	Linear equation	Linearity ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R^2	LOD ^a ($\mu\text{g L}^{-1}$)	PF	Intra-day ($n=5$), %RSD		Inter-day ($n=4 \times 3$ days), %RSD	
						t_R	Peak area	t_R	Peak area
TBZ	$y=2,593.1x-910.8$	0.1–100	0.9984	0.01 (10)	45	0.4	3.3	0.6	5.9
OFZ	$y=1,215.0x+827.5$	0.1–100	0.9986	0.01 (10)	45	0.1	2.8	0.4	9.2
MBZ	$y=1,468.3x+3,866.1$	0.1–100	0.9981	0.005 (10)	55	0.1	3.8	0.7	4.9
ABZ	$y=1,400.7x+52.8$	0.1–100	0.9981	0.01 (50)	60	0.1	6.7	0.1	3.4
FBZ	$y=1,509.5x+1,408.5$	0.1–100	0.9985	0.01 (50)	50	0.1	8.2	0.2	7.9

^a The values in parenthesis were obtained from without pre-concentration (direct analysis)

Table 2 Matrix-matched calibrations of benzimidazole anthelmintics in studied milk samples ($n=3$)

Analyte	UHT low fat milk		UHT plain milk		Raw fresh milk		Pasteurized plain milk		LOD ^a ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ^a ($\mu\text{g L}^{-1}$)
	Linear equation	R^2	Linear equation	R^2	Linear equation	R^2	Linear equation	R^2		
TBZ	$y=529.3x-3603$	0.9952	$y=546.9x+1,681$	0.9952	$y=253.4x+605.9$	0.9954	$y=346.9x-1,486.4$	0.9998	1.8–2.9	5.3–8.6
OFZ	$y=327.2x-959.3$	0.9953	$y=350.1x-99.2$	0.9960	$y=240.2x-894.2$	0.9980	$y=234.0x-1,267$	0.9946	2.7–3.3	8.1–10.0
MBZ	$y=350.6x-2,194.4$	0.9963	$y=294.4x-785$	0.9950	$y=181.5x+17.5$	0.9980	$y=246.7x-1,235$	0.9974	2.1–3.4	6.4–11.0
ABZ	$y=354.9x+6,997.1$	0.9955	$y=284.0x-393$	0.9970	$y=162.7x-1,085$	0.9970	$y=226.2x-2,414.2$	0.9950	2.9–3.6	8.8–10.8
FBZ	$y=258.5x+1,544$	0.9970	$y=271.7x-1,011.1$	0.9960	$y=166.0x-965.4$	0.9967	$y=233.6x+306$	0.9953	2.2–3.4	6.6–10.4

^a Evaluations were calculated using $3.3 \times [S_y/m]$ for LOD and $10 \times [S_y/m]$ for LOQ, where S_y is standard deviation of y -intercept value and m is slope of calibration curve

extraction efficiency of the analytes (Wu et al. 2010b; Cheng et al. 2011b; Xia et al. 2012). The effect of ultrasound extraction time in this study was varied in the range of 1–5 min (see Fig. 2b). It indicates that the extraction performances of analytes increased with increasing sonication time, especially for TBZ, OFZ, and MBZ. Meanwhile, ABZ and FBZ show highest peak areas at 3 and 4 min, respectively, and then decrease in peak areas afterward. To compromise the extraction performance of all studied compounds, 4-min ultrasonication was used throughout the experiments.

Effect of Volume of Dichloromethane

To evaluate the extraction solvent on the performance of UASAEME, different volumes of dichloromethane over the range from 0 to 175 μL with 25- μL interval were studied. It is clearly seen (Fig. 3a) that the amount of extraction solvent had a strong influence on the extraction efficiency. With increasing dichloromethane volume, the extraction performance of most analytes increased up to 100 μL . At a volume used higher than 100 μL , the efficiency decreased afterwards. It was also found that high volumes of dichloromethane produced high volumes of sediment phase (V_{sed}) after extraction. It caused dilution of the target analytes and resulted in decreasing extraction performance. Based on the results above, 100 μL of dichloromethane was chosen as the optimum volume for throughout extractions.

Effect of Triton X-114 Concentration

Due to surfactants affecting the extraction efficiency, the concentration of Triton X-114 was investigated in the range of 0–2 % (w/v). As the results in Fig. 3b show, the extraction performance is very poor in the without Triton X-114 (0 %) system. Meanwhile, the addition of Triton X-114 amount of 0.5 % (w/v) can improve the extraction performance with obtained highest peak areas for most analytes studied. However, higher amounts of Triton X-114 than 0.5 % (w/v) gave lower peak responses over the studied concentrations due to higher volume of V_{sed} obtained after extraction. In another point, higher concentrations of surfactant may affect the partition of analytes between the aqueous phase and sediment phase by increasing solubility of analytes in aqueous sample solution. The analytes were less extracted into the sediment phase. In this study, the concentration of Triton X-114 was chosen at 0.5% (w/v).

Effect of Centrifugation Time

Centrifugation with an appropriate time is required to ensure complete separation of the extracted phase and improve the extraction performance. The effect of centrifugation time on the extraction of target compounds was also investigated in

the range of 0–15 min at 3,500 rpm. It is clearly found (data not shown) that centrifugation time has an effect on the extraction. With increasing centrifugation, high peak areas were observed up to 10 min for most analytes, except ABZ. Beyond this point, most target analytes have decrease in peak responses. Thus, 10-min centrifugation was selected to obtain high extraction efficiency for most studied compounds and used throughout the experiments.

Analytical Characteristics of the Proposed Method

Figure 4A shows the typical chromatograms of five target benzimidazoles obtained from with UASEME and without preconcentration (direct analysis). Under the optimum UASEME, percent extraction recovery (%ER) was obtained in the range of 50–80 for the studied benzimidazoles. The %ER and preconcentration factor (PF) were calculated based on the following equations:

$$\%ER = \frac{C_{sed} \times V_{sed}}{C_{aq} \times V_{aq}} \quad (1)$$

$$PF = \frac{C_{sed}}{C_{aq}} \quad (2)$$

Where C_{sed} and C_{aq} are concentration of the target analytes in the sedimented organic phase and initial concentration of

analytes in the aqueous phase ($500 \mu\text{gL}^{-1}$), respectively. V_{sed} (200 μL final volume) and V_{aq} (5.0 mL) are the volume of the sedimented phase and aqueous sample phase, respectively. The C_{sed} was calculated from the calibration curves of the target benzimidazoles constructed by direct injections of standard solutions in the range of 50–7,000 μgL^{-1} .

The analytical performances and method validations of the proposed method were evaluated including linear equations, linearity, limits of detection (LODs), and precisions in terms of intra-day and inter-day measurements. Calibration curves were constructed by triplicate injections of standard mixtures of benzimidazoles obtained after UASEME at different concentrations ($n=10$ levels). Peak area of each compound was plotted against its concentration. The calibration data are listed in Table 1. Linearity for all studied compounds was obtained in the range of 0.1–100 μgL^{-1} with coefficient of determination (R^2) higher than 0.998. LODs were carried out based on the concentration giving a signal-to-noise ratio of 3. The LODs were found to be in the range 0.005–0.01 μgL^{-1} with obtained PF in the range of 45–60, whereas the LODs obtained without preconcentration were 10–50 μgL^{-1} . Precisions were investigated by replicate injections of standard mixture of studied compounds (0.5 mgL^{-1} each) in a day ($n=5$) and several days ($n=12$) for intra-day (repeatability) and inter-day (reproducibility), respectively. The relative standard deviations (RSDs) of peak area and retention time (t_R) were below 9.2 and 0.8 %, respectively.

Table 3 Recovery obtained from the determination of benzimidazole anthelmintics in spiked milk samples ($n=3$)

Analyte	Spiked (μgL^{-1})	UHT plain		UHT low fat		Pasteurized plain		Raw fresh		Reproducibility ^a ($n=3 \times 4$ days)	
		RR (%)	RSD (%)	RR (%)	RSD (%)	RR (%)	RSD (%)	RR (%)	RSD (%)	RR (%)	RSD (%)
TBZ	20	99.7	0.2	109.4	0.5	105.2	2.1	85.3	3.4	99.9	10.5
	50	102.7	0.8	78.3	4.1	88.4	2.1	91.7	1.1	90.3	11.1
	100	94.9	0.5	75.0	2.4	100.2	5.1	106.9	2.4	94.3	14.6
OFZ	20	108.1	4.0	109.5	2.6	113.0	4.3	112.7	3.5	110.8	12.2
	50	96.1	5.8	72.5	1.4	95.8	5.4	91.5	3.2	89.0	6.6
	100	89.4	5.8	74.6	6.7	101.3	5.1	95.5	2.5	90.2	12.7
MBZ	20	86.8	0.5	110.6	1.9	110.2	1.9	112.1	1.4	104.9	11.5
	50	81.9	1.3	96.7	1.8	88.7	4.4	98.8	2.1	91.5	8.5
	100	73.4	1.1	82.2	4.0	90.0	3.7	102.2	3.7	87.0	14.1
ABZ	20	86.0	1.2	88.7	4.2	99.1	4.0	113.5	1.3	96.8	12.9
	50	99.6	5.2	93.1	2.3	103.3	3.5	91.4	2.8	96.9	5.7
	100	80.1	0.9	94.7	5.7	91.9	2.9	90.3	2.1	89.3	7.1
FBZ	20	96.8	4.6	105.5	1.8	111.2	4.5	111.1	3.6	106.2	6.4
	50	108.4	2.2	94.7	3.9	96.6	4.1	100.7	1.1	100.1	6.1
	100	80.5	1.1	102.8	3.1	96.0	3.6	107.6	3.8	96.7	12.2

RR relative recovery (on average)

^a Reproducibility was evaluated in raw fresh milk (as representative sample)

Application to Milk Samples

The proposed UASEME was applied for the analysis of target benzimidazole anthelmintics residue in milk samples. The identification and confirmation of target peaks were performed by (1) comparison of the retention time of known standard, (2) spiking with known analytes and looking for increases in peak height, and (3) comparison of absorption spectra obtained to those from the standards using photodiode array detection as well as evaluation of peak purity index for each spiked target analyte.

Calibration curves were produced using the matrix-matched calibration method ($n=6$) for all studied milk samples. The analytical features of the method for milk analysis are listed in Table 2. Curves indicated good linearities over the studied concentration ranges ($10\text{--}150\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$) with the determination coefficients greater than 0.994. It was found that no residues of the studied benzimidazoles were detected in all studied samples. The LODs and LOQs of the studied benzimidazoles in the different studied milk samples were evaluated and found to be in the range of $1.8\text{--}3.6$ and $5.3\text{--}11.0\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ for LOD and LOQ, respectively. It is clearly seen that the obtained LODs for all studied benzimidazoles are below the acceptable maximum residue limits (MRLs) of target benzimidazole anthelmintics in milks, i.e., $<100\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$, as established by Codex (Codex Alimentarius Commission 2011) and Australian Government recommendations (Australian Government 2011).

To evaluate the accuracy of the proposed method by means of relative recovery (%RR) of benzimidazoles spiked in the samples, milk samples were fortified with different concentrations (20 , 50 , and $100\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$) of target compounds and analyzed by the proposed method. The results are summarized in Table 3. The obtained recoveries of target benzimidazoles in the studied milk samples are acceptable in the range $72.5\text{--}113.5\%$ (on average) with RSD less than 6.0% . Typically, mean recoveries at the fortified concentration of $10\text{--}100\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$ are accepted in the region of $70\text{--}110\%$ (Codex Alimentarius 1993) and $75\text{--}120\%$ (AOAC 2002). Reproducibility ($n=3\times 4$ days) of the method was also evaluated in raw fresh milks (as a representative sample). Good relative recovery was obtained in range $87.0\text{--}110.8\%$ with RSD lower than 15% . The precision (at concentration of $10\text{--}100\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$) is accepted with RSD in the range of $32\text{--}16\%$ (AOAC 2002) or below 23% (Official Journal of the European Communities 2002). Figure 4B shows typical chromatograms of UHT plain milk sample extracted without and with spiked benzimidazoles at various concentrations. Based on the results above, the proposed method gave good analytical performance and reproducibility for the analysis of target benzimidazoles in the studied milk samples.

Table 4 Comparison of the proposed UASEME method with other sample preconcentration methods used in the determination of benzimidazole anthelmintics

Extraction method	Technique/detection	Sample	Linearity ($\mu\text{g/L}$)	LOD ($\mu\text{g/L}$)	PF	Recovery (%)	Comment (extraction) ^a	Ref.
SPE-MCX	HPLC-UV	Bovine milk	10–200 $\mu\text{g/kg}$	3 $\mu\text{g/kg}$	–	78–112	Need more steps: washing, elution, evaporation, and re-dissolution	Chen et al. (2010)
MISPE	HPLC-PDA	Waters	–	0.03–0.09	–	89–105	Consume large volume of organic solvents and samples	Cacho et al. (2009)
MAE-CPE	HPLC-FL	Soils	1–1000 $\mu\text{g/kg}$	0.015–30 $\mu\text{g/kg}$	–	71–105	Need microwave (450 W), 8 min	Halko et al. (2006)
Conventional CPE	HPLC-FL	Waters	1–100	0.004–6.4	–	68–96	High incubation temperature (90 °C), 5 min	Halko et al. (2004)
UA-CPE	HPLC-PDA	Waters Milks	0.1–100 10–200	0.005–0.1 1–5	18–164	81.6–111.4 75.3–111.4	25 °C, 2 min	Our previous work (Santaladchaiyakit and Srijaranai 2012)
UASEME	HPLC-PDA	Milks	10–150	1.8–3.6	45–60	72.5–113.5	25 °C, 4 min	Proposed method

– not reported, SPE solid-phase extraction, MCX mixed mode cation exchange, MISPE molecularly imprinted solid-phase extraction, MAE microwave-assisted extraction, UA-CPE ultrasound-assisted cloud-point extraction, UV ultraviolet, PDA photodiode array, FL fluorescence

^a Centrifugation time is not included

Comparison of the Proposed UASEME Method with Other Reported Methods

Table 4 compares the characteristic data of the proposed UASEME method with those other reported preconcentration techniques such as SPE, molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE), and various strategies of CPE. It is clearly seen that the proposed method gave comparable analytical results and permits the quantification of benzimidazoles at trace levels in comparison with those of other methods. SPE method is very time-consuming (needs more steps), and conventional CPE requires high incubation temperature (90 °C) toward the proposed method. The proposed UASEME method can be used as an alternative powerful technique to our previous developed ultrasound-assisted CPE (UA-CPE) for the concentration and simultaneous analysis of target benzimidazoles in milk samples.

Conclusions

A simple and sensitive UASEME method in combination with HPLC–PDA has been developed for the preconcentration and simultaneous analysis of benzimidazole anthelmintics in milk samples. The proposed method provided short extraction time, high extraction efficiency, and good analytical results. LODs in milk samples were less than 4 µg L⁻¹ and well below the MRLs of the target anthelmintic residues in milk samples. Good recoveries (>72 %, on average) of the method applied for milk samples were also achieved. The method has been proven to be a useful alternative extraction method for polar organic compounds in the studied milk sample matrices. The uses of surfactant and less consumption of organic extraction solvents are good in accordance with green analytical methods.

Acknowledgments This research was financially supported by the Thailand Research Fund (TRF), the Commission on Higher Education (CHE), and Rajamangala University of Technology Isan, Khon Kaen Campus through the TRF-CHE Research Grant for New Scholars under grant no. MRG5480135. The authors would like to acknowledge Department of Chemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University for providing deionized water. The authors also thank Miss Jitraporn Phaphakdee and Miss Sudathip Supaket for their assistance in the laboratory.

References

AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals (2002) http://www.aoac.org/Official_Methods/slv_guidelines.pdf. Accessed 1 Sept 2012

Australian Government, Australian pesticides and veterinary medicines authority (2011) The MRL standard: Maximum residue limits in

food and animal feedstuff. http://www.apvma.gov.au/residues/docs/mrl_table4_march_2012.pdf. Accessed 15 Jan 2012

Cacho C, Turiel E, Perez-Conde C (2009) Molecularly imprinted polymers: an analytical tool for the determination of benzimidazole compounds in water samples. *Talanta* 78:1029–1035

Chen D, Tao Y, Liu Z, Liu Z, Huang L, Wang Y, Pan Y, Peng D, Dai M, Yuan Z (2010) Development of a high-performance liquid chromatography method to monitor the residues of benzimidazoles in bovine milk. *J Chromatogr B* 878:2928–2932

Chen D, Tao Y, Zhang H, Pan Y, Liu Z, Huang L, Wang Y, Peng D, Wang X, Dai M, Yuan Z (2011) Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry with pressurized liquid extraction method for the determination of benzimidazole residues in edible tissues. *J Chromatogr B* 879:1659–1667

Cheng J, Matsadiq G, Liu L, Zhou Y-W, Chen G (2011a) Development of a novel ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction method and its application to the analysis of eleven polycyclic aromatic hydrocarbons at trace levels in water. *J Chromatogr A* 1218:2476–2482

Cheng J, Xia Y, Zhou Y, Guo F, Chen G (2011b) Application of an ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction method for the analysis of diethofencarb and pyrimethan fungicides in water and fruit juice samples. *Anal Chim Acta* 701:86–91

Codex Alimentarius (1993) Residues of veterinary drugs in foods. Joint FAO/WHO Food Standards Programme, volume 3, 2nd edition, Rome, Italy

Codex Alimentarius Commission (2011) Maximum residue limits for veterinary drugs in foods (CAC/MRL 2–2011). http://www.codexalimentarius.net/vetdrugs/data/MRL2_e_2011.pdf. Accessed 15 Jan 2012

Danaher M, O'Keeffe M, Glennon JD (2003) Development and optimization of a method for the extraction of benzimidazoles from animal liver using supercritical carbon dioxide. *Anal Chim Acta* 483:313–324

Danaher M, Ruyck HD, Crooks SRH, Dowling G, O'Keeffe M (2007) Review of methodology for the determination of benzimidazole residues in biological matrices. *J Chromatogr B* 845:1–37

Guo B, Huang Z, Wang M, Wang X, Zhang Y, Chen B, Li Y, Yan H, Yao S (2010) Simultaneous direct analysis of benzimidazole fungicides and relevant metabolites in agricultural products based on multifunction dispersive solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1217:4796–4807

Halko R, Sanz P, Ferrera S, Rodríguez JJS (2006) Determination of benzimidazole fungicides in soil samples using microwave-assisted micellar extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *J AOAC Int* 89:1403–1409

Halko R, Sanz P, Ferrera S, Rodríguez JJS (2004) Determination of benzimidazole fungicides by HPLC with fluorescence detection after micellar extraction. *Chromatographia* 60:151–156

Kamarei F, Ebrahimzadeh H, Yamini Y (2011) Optimization of ultrasound-assisted emulsification microextraction with solidification of floating organic droplet followed by high performance liquid chromatography for the analysis of phthalate esters in cosmetic and environmental water samples. *Microchem J* 99:26–33

Mottier L, Alvarez L, Lanusse C (2003) Quantitative chromatographic determination of several benzimidazole anthelmintic molecules in parasite material. *J Chromatogr B* 798:117–125

Msagati TAM, Nindi MM (2001) Determination of benzimidazole anthelmintic compounds by supported liquid membrane extraction and liquid chromatography. *J Sep Sci* 24:606–614

Official Journal of the European Communities (2002) Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002/657/EC)

- Ozcan S, Tor A, Aydin ME (2009) Application of ultrasound-assisted emulsification-microextraction for the analysis of organochlorine pesticides in waters. *Water Res* 43:4269–4277
- Santaladchaiyakit Y, Srijaranai S (2012) A simplified ultrasound-assisted cloud-point extraction method coupled with high performance liquid chromatography for residue analysis of benzimidazole anthelmintics in water and milk samples. *Anal Methods* 4:3864–3873
- Saraji M, Akbar A, Bidgoli H (2010) Dispersive liquid–liquid microextraction using a surfactant as disperser agent. *Anal Bioanal Chem* 397:3107–3115
- Whelan M, Kinsella B, Furey A, Moloney M, Cantwell H, Lehotay SJ, Danaher M (2010) Determination of anthelmintic drug residues in milk using ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with rapid polarity switching. *J Chromatogr A* 1217:4612–4622
- Wu C, Liu N, Wu Q, Wang C, Wang Z (2010a) Application of ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction for the determination of some organophosphorus pesticides in water samples. *Anal Chim Acta* 679:56–62
- Wu Q, Chang Q, Wu C, Rao H, Zeng X, Wang C, Wang Z (2010b) Ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction for the determination of carbamate pesticides in water samples by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1217:1773–1778
- Wu Q, Li Y, Wang C, Liu Z, Zang X, Zhou X, Wang Z (2009) Dispersive liquid–liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography-fluorescence detection for the determination of carbandazim and thiabendazole in environmental samples. *Anal Chim Acta* 638:139–145
- Xia X, Dong Y, Luo P, Wang X, Li X, Ding S, Shen J (2010) Determination of benzimidazole residues in bovine milk by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 878:3174–3180
- Xia Y, Zhi X, Wang X, Chen M, Cheng J (2012) Ultrasound-enhanced surfactant-assisted dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography for determination of ketoconazole and econazole nitrate in human blood. *Anal Bioanal Chem* 402:1241–1247