



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

วิธีการเพิ่มความเข้มข้นด้วยการเกิดเฟสแบบ in situ สำหรับ  
การวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรียด้วยเทคนิค  
โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงในตัวอย่างอาหาร  
และสิ่งแวดล้อม

ผศ. ดร. ญาณวรรณ แสนตลาดชัยกิตติ์ และคณะ

พฤษภาคม 2563

สัญญาเลขที่ MRG6180071

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: วิธีการเพิ่มความเข้มข้นด้วยการเกิดเฟสแบบ in situ สำหรับการวิเคราะห์  
สารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรียด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง  
ในตัวอย่างอาหารและสิ่งแวดล้อม

### คณะผู้วิจัย

ผศ. ดร. ญาณวรรณ แสนตลาดชัยกิตติ  
ศ. ดร. ศุภลักษณ์ ศรีจารนัย

### สังกัด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน  
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG6180071

ชื่อโครงการ: วิธีการเพิ่มความเข้มข้นด้วยการเกิดเฟสแบบ in situ สำหรับการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรียด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงในตัวอย่างอาหารและสิ่งแวดล้อม

ชื่อนักวิจัย: ผศ.ดร.ญาณวรรณ แสนตลาดชัยกิตติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน  
ศ.ดร.ศุภลักษณ์ ศรีจารนัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

อีเมล: sanyanawa@gmail.com; yanawath.sa@rmuti.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี (2 พฤษภาคม 2561 ถึง 1 พฤษภาคม 2563)

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการเพิ่มความเข้มข้นด้วยวิธีการเกิดเฟสที่ละลายได้แบบ in situ โดยอาศัยการเกิดชั้นคูไฮดรอกไซด์ที่มีสารลดแรงตึงผิว สำหรับการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรียในตัวอย่างน้ำและน้ำผึ้ง ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) และตรวจวัดด้วยโพโตไอโอไดต์แอเรย์ (PDA) กระบวนการสกัดที่นำเสนอนี้ สามารถทำได้ในขั้นตอนเดียวโดยการเพิ่มสารละลายของโซเดียมไฮดรอกไซด์ แมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ อะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ และโซเดียมโอดีเติลซัลเฟต ลงในสารละลายตัวอย่างที่มีสารเป้าหมาย หลังการปั่นเหวี่ยงจะได้เฟสที่ตกตะกอน ทำการดึงเฟสน้ำออก แล้วละลายเฟสที่สกัดได้ด้วยกรดฟอร์มิกเข้มข้น ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ก่อนทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ภายใต้สภาวะที่ได้ วิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถให้แฟกเตอร์การเพิ่มความเข้มข้นอยู่ในช่วง 12.5 – 23.7 ซีดจำกัดการตรวจวัด (LODs) และขีดจำกัดการหาปริมาณ (LOQs) อยู่ในช่วง 0.1 – 0.3 และ 0.3 – 1.0 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ วิธีที่นำเสนอขึ้นนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรียในตัวอย่างน้ำและน้ำผึ้งได้ จากผลการทดลอง พบว่า ไม่พบการตกค้างของสารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรียในตัวอย่างที่ทำการศึกษา ให้ร้อยละการกลับคืนที่ดีอยู่ในช่วง 78.4 – 117.8 และ 72.7 – 117.9 สำหรับตัวอย่างน้ำและน้ำผึ้ง ตามลำดับ สามารถสรุปได้ว่า วิธีที่นำเสนอนี้ รวดเร็ว ง่าย เชื่อถือได้ และสามารถใช้เป็นวิธีการสกัดทางเลือกหนึ่งสำหรับการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรียได้

คำสำคัญ: ชั้นคูไฮดรอกไซด์ โซเดียมโอดีเติลซัลเฟต โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ตัวอย่างทางสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างอาหาร

## Abstract

---

**Project Code:** MRG6180071

**Project Title:** *In situ* phase formation-based preconcentration method for the analysis of benzoylurea insecticides in food and environmental samples by high performance liquid chromatography

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

**E-mail Address:** sanyanawa@gmail.com; yanawath.sa@rmuti.ac.th

**Project Period:** 2 years (2 May 2018 to 1 May 2020)

A preconcentration method using *in situ* dissolvable phase formation based on layered-double hydroxides in the presence of surfactant prior to high performance liquid chromatography-photodiode array detection (HPLC-PDA) was developed for the analysis of benzoylurea insecticides (BUs) in water and honey samples. The proposed extraction method for target analytes was prepared in one step by the subsequent addition of the solutions of sodium hydroxide, magnesium ion, aluminium ion, and sodium dodecyl sulfate, into the sample solution containing the target BUs. After centrifugation, the co-precipitate phase was obtained. Then, aqueous phase was removed and the co-precipitate phase was subsequently dissolved with formic acid (200  $\mu$ L) before analysis by HPLC. Under the selected conditions, the developed method provided enrichment factor of 12.5 – 23.7. LODs and LOQs were obtained in the range of 0.1 – 0.3 and 0.3 – 1.0  $\mu$ g/L, respectively. The proposed method was successfully applied for the analysis of BUs in water and honey samples. The results showed that the contamination by BUs in the studied samples was not detected. Good recoveries obtained between 78.4 – 117.8% and 72.7 – 117.9% for water and honey samples, respectively. It can be concluded that the proposed method is rapid, simple, reliable and can be used as an alternative extraction method for the analysis of benzoylurea insecticides.

**Keywords:** layered double hydroxide; sodium dodecyl sulfate; high-performance liquid chromatography; environmental sample; food sample

## Executive Summary

### วิธีการเพิ่มความเข้มข้นด้วยการเกิดเฟสแบบ in situ สำหรับการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรียด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงในตัวอย่างอาหารและสิ่งแวดล้อม

สารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรีย (Benzoylurea insecticides) เป็นสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มหนึ่งที่นิยมใช้ในการควบคุมแมลงในทางการเกษตร เนื่องจากออกฤทธิ์ได้ดีต่อแมลงกลุ่มเป้าหมาย แต่มีพิษต่อมนุษย์ สลายตัวเร็ว และอัตราการตกค้างต่ำในสิ่งแวดล้อม แต่อย่างไรก็ตาม การใช้สารกำจัดแมลงที่ไม่ถูกต้อง และในปริมาณที่มากเกินไป อาจส่งผลให้เกิดการตกค้างในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร และในตัวอย่างสิ่งแวดล้อมได้ ถ้าหากผู้บริโภคได้รับสารกำจัดแมลงกลุ่มนี้เข้าไปในร่างกาย อาจเกิดเป็นพิษสะสมเรื้อรัง และพิษเฉียบพลันได้ ดังนั้น สหภาพยุโรปได้กำหนดค่าขีดจำกัดการตกค้างสูงสุด (MRLs) ของสารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรียไม่เกิน 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เพื่อความปลอดภัยต่อสุขภาพของผู้บริโภค และไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ให้มีประสิทธิภาพสำหรับการตรวจวัดพร้อมกัน และสามารถตรวจวัดในระดับต่ำ ๆ ได้ดี สำหรับสารกำจัดแมลงตกค้างในตัวอย่างชนิดต่าง ๆ เช่น ตัวอย่างอาหาร และตัวอย่างทางสิ่งแวดล้อม

เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography หรือ HPLC) ควบคู่กับการตรวจวัดแบบโฟโตไดโอดแอเรย์ (Photodiode array detection หรือ PDA) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรีย เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ง่าย สะดวก มีประสิทธิภาพ เชื่อถือได้ และสามารถวิเคราะห์สารเป้าหมายได้พร้อมกัน อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ร่วมกับการเตรียมตัวอย่างและเพิ่มความเข้มข้นที่เหมาะสมจะช่วยเพิ่มความไวในการตรวจวัด (Sensitivity) ได้ดีขึ้น เทคนิคการสกัดระดับจุลภาคแบบการกระจายเฟสของเหลว-ของเหลว (Dispersive liquid-liquid microextraction หรือ DLLME) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบัน เนื่องจากมีข้อดีหลายประการ ได้แก่ ง่าย สะดวก รวดเร็ว มีประสิทธิภาพ และใช้ปริมาณตัวทำละลายน้อย แต่ข้อเสียหลักของเทคนิค DLLME คือ การใช้ตัวทำละลายที่มีพิษสูงเป็นตัวทำละลายในการสกัด เช่น คาร์บอนเตตระคลอไรด์ และคลอโรฟอร์ม ทำให้มีการเลือกใช้ตัวทำละลายทางเลือกอื่น เช่น โดเดคานอล และของเหลวไอออนิก (Ionic liquids) แต่การใช้สารโดเดคานอล จะต้องใช้อุปกรณ์พิเศษในกระบวนการสกัด เนื่องจากตัวทำละลายนี้มีความหนาแน่นน้อยกว่าน้ำ ทำให้ยุ่งยากในการแยกเฟสที่สกัดได้หลังกระบวนการสกัดแล้วเสร็จ ส่วนการใช้สารของเหลวไอออนิกนั้น ต้องทำการเลือกสารให้เหมาะสมกับสมบัติของสารเป้าหมาย จึงจะทำให้ประสิทธิภาพการสกัดสารได้ดีขึ้น นอกจากนี้ของเหลวไอออนิกมีราคาค่อนข้างแพง

จากข้อจำกัดดังกล่าวนี้ จึงทำให้เกิดประเด็นการวิจัยที่น่าสนใจ คือ การประยุกต์ใช้ชั้นคู่ไฮดรอกไซด์ (Layered double hydroxides หรือ LDHs) สำหรับการสกัดและเพิ่มความเข้มข้นของสารเป้าหมายกลุ่มเบนโซอิลยูเรีย ซึ่ง LDHs เป็นสารประกอบเคลย์ชนิดหนึ่ง โครงสร้างภายใน

ประกอบด้วยชั้นคู่ของโลหะออกไซด์ และแสดงประจุบวกที่ผิวเลเยอร์ ส่วนระหว่างเลเยอร์จะดูลดด้วยไอออนลบ ในทางปฏิบัตินิยมเตรียม LDHs จากไอออนของ  $Mg^{2+}$  และ  $Al^{3+}$  ในอัตราส่วน 3:1 ภายใต้สภาวะของสารละลายเบสที่มีค่าพีเอชมากกว่า 10 และโดยปกติแล้ว มักจะทำการสังเคราะห์ LDHs เป็นตัวดูดซับก่อนนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ แต่กระบวนการสังเคราะห์ LDHs พบว่า ใช้เวลาในการสังเคราะห์นาน มีขั้นตอนที่ยุ่งยากซับซ้อน และบางกรณีต้องมีการควบคุมสภาวะภายใต้อุณหภูมิและความดันที่เหมาะสมด้วย นอกจากนี้ พบว่า การประยุกต์ใช้ LDHs สามารถใช้กับสารเป้าหมายที่มีประจุลบในโครงสร้างเท่านั้น (Inorganic and organic anions) ดังนั้น ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดพัฒนา LDHs ให้สามารถเตรียมได้ในขั้นตอนเดียว และสามารถสกัดสารเป้าหมายที่ไม่มีประจุ (เป็นกลาง) และไม่มีขั้ว โดยการเติมสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุลบ (Anionic surfactant) เช่น โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate หรือ SDS) ลงไปในระบบการสกัด ซึ่งแนวคิดที่เป็นไปได้ คือ ประจุลบของสารลดแรงตึงผิวจะเกิดอันตรกิริยากับประจุบวกที่ผิวของ LDHs และส่วนที่ไม่มีขั้วของสารลดแรงตึงผิวจะเกิดอันตรกิริยาด้วยความไม่มีขั้วระหว่างโมเลกุล จึงอาจเป็นการทำให้สารเป้าหมายที่ไม่มีประจุและไม่มีขั้ว สามารถเข้าไปเกิดอันตรกิริยาในระหว่างชั้นของ LDHs และสกัดสารเป้าหมายได้

โครงการวิจัยนี้ ทำการพัฒนา LDHs เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม สำหรับเป็นวิธีการสกัดและเพิ่มความเข้มข้นของสารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรีย จำนวน 4 ชนิด (ไตรฟลูมูรอน เฮกซะฟลูมูรอน ฟลูอะซุรอน และฟลูเฟนอซุรอน) และทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC จากนั้นทำการประยุกต์วิธีที่พัฒนาขึ้นสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารเป้าหมายในตัวอย่างน้ำชนิดต่าง ๆ และตัวอย่างน้ำดื่มที่มีจำหน่ายในท้องตลาดทั่วไป

จากผลการวิจัย ได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารเป้าหมายด้วยเทคนิค HPLC คือ กรดฟอร์มิกเข้มข้น 0.1% (v/v) และอะซิโตนไทรล์ (ที่อัตราส่วน 22:78) เป็นเฟสเคลื่อนที่ และใช้คอลัมน์ InertSustain C8 (4.6×150 mm, 5.0  $\mu$ m) อัตราการไหลเป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรการฉีดสารตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร และทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ภายใต้สภาวะการแยกนี้ สามารถแยกสารเป้าหมายทั้ง 4 ชนิดได้ภายใน 6 นาที โดยลำดับการแยกเป็น ไตรฟลูมูรอน เฮกซะฟลูมูรอน ฟลูอะซุรอน และฟลูเฟนอซุรอน ตามลำดับ ภายใต้สภาวะเหมาะสมนี้ จะใช้ทำการศึกษาเพื่อประเมินหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารเป้าหมายด้วยวิธี LDHs ส่วนสภาวะการทดลองที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารเป้าหมายด้วยวิธี LDHs ได้แก่ 0.5 mol/L NaOH (150  $\mu$ L), 120  $\mu$ L  $Mg^{2+}$  (300 mmol/L), 40  $\mu$ L  $Al^{3+}$  (300 mmol/L) และ 5 mmol/L SDS (500  $\mu$ L) โดยสารละลายดังกล่าวนี้สามารถเติมลงไปได้ต่อเนื่องในครั้งเดียวในกระบวนการสกัด หลังจากนั้น นำสารละลายไปทำการวอร์เทกซ์เป็นเวลา 20 วินาที ที่อัตราเร็ว 1,800 รอบต่อนาที และทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเฟสที่สกัดได้ โดยใช้อัตราการปั่นเหวี่ยงที่ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการละลายเฟสที่สกัดได้ด้วยกรดฟอร์มิกปริมาตร 200 ไมโครลิตร ก่อนการวิเคราะห์ด้วย HPLC

ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมข้างต้น พบว่า ได้ช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วง 0.3 – 200 ไมโครกรัมต่อลิตร ขีดจำกัดการตรวจวัดและขีดจำกัดของการหาปริมาณอยู่ในช่วง 0.1 – 0.3 และ 0.3 – 1.0 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ให้แฟกเตอร์การเพิ่มความเข้มข้นอยู่ในช่วง 12.5 – 23.7

เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการที่ไม่ผ่านการเพิ่มความเข้มข้น (วิเคราะห์โดยตรง) ความเที่ยงของวิธี (Precisions) ทดสอบที่ระดับความเข้มข้นของสารเป้าหมาย 100 ไมโครกรัมต่อลิตร สำหรับการวิเคราะห์ในวันเดียวกัน (n=6) และหลายวัน (n=6×3 days) พบว่า ให้ความเที่ยงที่ยอมรับ โดยค่าร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ต่ำกว่า 0.60 และ 11.2 สำหรับเวลาในการคงอยู่และพื้นที่ใต้พีคของสารเป้าหมาย

ประยุกต์วิธีที่พัฒนาขึ้นสำหรับการวิเคราะห์การตกค้างของสารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรียในตัวอย่างน้ำชนิดต่าง ๆ (3 ชนิด) และตัวอย่างน้ำผึ้ง (4 ยี่ห้อ) พบว่า ไม่พบการตกค้างของสารกำจัดแมลงในตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ อย่างไรก็ตาม ทำการศึกษาความแม่นยำของวิธีโดยประเมินค่าร้อยละการกลับคืนของสารเป้าหมายที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน (7.5 25 และ 45 ไมโครกรัมต่อลิตร) พบว่า ให้ร้อยละการกลับคืนที่ดีและยอมรับได้ ในช่วง 78.4 – 117.8 และ 72.7 – 117.9 สำหรับตัวอย่างน้ำ และน้ำผึ้ง ตามลำดับ โดยค่าร้อยละเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่า 13.5

โดยสรุป วิธี LDHs ที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถทำการสกัดและเพิ่มความเข้มข้นของสารเป้าหมายได้ภายในขั้นตอนเดียว รวดเร็ว ทำได้ง่าย และมีประสิทธิภาพที่ดี สามารถใช้เป็นวิธีอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในการสกัดสารเป้าหมายที่ไม่มีประจุ และขยายผลการศึกษาในวงกว้างต่อไปได้

#### ผลงานที่อยู่ระหว่างพิจารณาตีพิมพ์

1. **Yanawath Santaladchaiyakit\*** and Supalax Srijaranai. In-situ dissolvable Mg/Al layered double hydroxides in the presence of surfactant as extraction and preconcentration method for high performance liquid chromatographic analysis of benzoylurea insecticide residues in water and honey samples. Submitted to *Journal of Separation Science* (Submitted date: 3 May 2020)

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่สนับสนุนเงินทุนวิจัยสำหรับทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ ภายใต้สัญญาเลขที่ MRG6180071 เป็นระยะเวลา 2 ปี (พฤษภาคม 2561 – พฤษภาคม 2563) จนสามารถทำวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์ นอกเหนือจากนี้ ขอขอบพระคุณ สาขาวิชาเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตขอนแก่น ที่สนับสนุนเครื่องมือ อุปกรณ์ และอำนวยความสะดวกในสถานที่สำหรับทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. ศุภลักษณ์ ศรีจารนัย สังกัดภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ท่านได้กรุณาเป็นนักวิจัยที่ปรึกษา และให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ต่อการทำวิจัย และการตีพิมพ์ผลงานวิจัย ตลอดจนอำนวยความสะดวกในระหว่างช่วงทำวิจัยจนงานวิจัยได้เสร็จสิ้นสมบูรณ์ และสามารถปิดโครงการวิจัยได้ภายในกำหนดเวลา

ผศ.ดร.ญาณวรรณ แสนตลาดชัยกิตติ  
หัวหน้าโครงการวิจัย

## สารบัญ

|                                                           | หน้า |
|-----------------------------------------------------------|------|
| บทคัดย่อ                                                  | i    |
| Abstract                                                  | ii   |
| Executive Summary                                         | iii  |
| กิตติกรรมประกาศ                                           | vii  |
| สารบัญตาราง                                               | ix   |
| สารบัญรูป                                                 | x    |
| <br>                                                      |      |
| บทที่ 1    บทนำ                                           | 1    |
| บทที่ 2    การทบทวนงานวิจัยและเอกสารที่เกี่ยวข้อง         | 7    |
| บทที่ 3    ระเบียบวิธีการวิจัย                            | 12   |
| บทที่ 4    ผลการทดลองและอภิปรายผล                         | 16   |
| บทที่ 5    บทสรุปงานวิจัย และข้อเสนอแนะ                   | 29   |
| เอกสารอ้างอิง                                             | 31   |
| Output ที่ได้จากโครงการ                                   | 39   |
| ภาคผนวก: ต้นฉบับผลงานวิจัยที่กำลังดำเนินการตีพิมพ์เผยแพร่ | 40   |

## สารบัญตาราง

|              |                                                                                               | หน้า |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ตารางที่ 4.1 | พารามิเตอร์ในการวิเคราะห์ปริมาณของสารเป้าหมาย                                                 | 25   |
| ตารางที่ 4.2 | ร้อยละการกลับคืนที่ได้จากการประเมินความแม่นยำของวิธีในการวิเคราะห์สารเป้าหมายในตัวอย่างน้ำ    | 27   |
| ตารางที่ 4.3 | ร้อยละการกลับคืนที่ได้จากการประเมินความแม่นยำของวิธีในการวิเคราะห์สารเป้าหมายในตัวอย่างน้ำฝั่ | 28   |

## สารบัญรูป

|             | หน้า                                                                                                                                                                    |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| รูปที่ 1.1  | โครงสร้างของไตรฟลูมูรอน (TRF) 4                                                                                                                                         |
| รูปที่ 1.2  | โครงสร้างของเฮกซะฟลูมูรอน (HXF) 4                                                                                                                                       |
| รูปที่ 1.3  | โครงสร้างของฟลูอะซุรอน (FLU) 5                                                                                                                                          |
| รูปที่ 1.4  | โครงสร้างของฟลูเฟนอซุรอน (FLF) 5                                                                                                                                        |
| รูปที่ 2.1  | โครงสร้างของ Layered double hydroxides (LDHs) 9                                                                                                                         |
| รูปที่ 2.2  | โครงสร้างของ LDHs ที่แสดงเลเยอร์ อินเตอร์เลเยอร์และ basal spacing 10                                                                                                    |
| รูปที่ 3.1  | ขั้นตอนการสกัดในภาพรวมด้วยวิธี in-situ LDHs 14                                                                                                                          |
| รูปที่ 3.2  | ลักษณะทางกายภาพที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการสกัด เมื่อ (1) สารละลายที่ได้ระหว่างการสกัดจะมีลักษณะขุ่นแขวนลอย (2) สารละลายที่เห็นการแยกเฟสที่ได้หลังจากการปั่นเหวี่ยง 14 |
| รูปที่ 4.1  | โครมาโทแกรมของการแยกสารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรียภายใต้สภาวะที่เหมาะสม 17                                                                                             |
| รูปที่ 4.2  | ผลของความเข้มข้นของ $Mg^{2+}$ และ $Al^{3+}$ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดสารเป้าหมาย 18                                                                                  |
| รูปที่ 4.3  | ผลของปริมาตรของ $Mg^{2+}$ และ $Al^{3+}$ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดสารเป้าหมาย 19                                                                                      |
| รูปที่ 4.4  | ผลของปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 20                                                                                                                             |
| รูปที่ 4.5  | ผลของความเข้มข้นของ SDS ที่มีผลต่อการสกัดสารเป้าหมาย 21                                                                                                                 |
| รูปที่ 4.6  | ผลของ vortex speed ที่มีผลต่อการสกัดสารเป้าหมาย 22                                                                                                                      |
| รูปที่ 4.7  | ผลของ vortex time ที่มีผลต่อการสกัดสารเป้าหมาย 22                                                                                                                       |
| รูปที่ 4.8  | ผลของ centrifugation speed ที่มีผลต่อการสกัดสารเป้าหมาย 23                                                                                                              |
| รูปที่ 4.9  | ผลของ centrifugation time ที่มีผลต่อการสกัดสารเป้าหมาย 24                                                                                                               |
| รูปที่ 4.10 | ผลของปริมาตรของกรดฟอร์มิกที่ใช้ในการละลายเฟสที่สกัดได้ 25                                                                                                               |
| รูปที่ 4.11 | โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำ (Blank surface water) และการเติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 27                                                           |
| รูปที่ 4.12 | โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำผึ้ง (Blank honey brand #2) และจากการเติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 28                                                   |

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ที่มาและความสำคัญ

สารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรีย (Benzoylurea insecticides หรือ BUs) ได้ถูกผลิตขึ้นมาในราวปี ค.ศ. 1978 โดยบริษัทเบเยอร์ ประเทศเยอรมนี (Brutti et al., 2010) ซึ่งสารออกฤทธิ์ในกลุ่มนี้ เช่น triflumuron chlorfluazuron teflubenzuron hexalumuron flufenoxuron และ flucycloxuron สารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรียเป็นสารกำจัดศัตรูพืชอีกกลุ่มหนึ่งในอีกหลายกลุ่ม (เช่น สารกำจัดวัชพืช สารกำจัดแมลง และสารกำจัดเชื้อรา) ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับการควบคุมและกำจัดแมลงที่จะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผลผลิตทางการเกษตรเสียหายได้ การที่เกษตรกรนิยมใช้สารกำจัดแมลงกลุ่มนี้อาจเป็นเพราะว่า สามารถออกฤทธิ์ในการควบคุมและกำจัดแมลงได้ดี สลายตัวง่าย อัตราการตกค้างต่ำในสิ่งแวดล้อม และเป็นพิษต่ำต่อมนุษย์ (Xi et al., 2016) โดยที่สารกลุ่มนี้จะไปยับยั้งการสังเคราะห์ไคติน และกระบวนการลอกคราบของแมลง ทำให้แมลงไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (Xi et al., 2016; Vazquez et al., 2014) แม้ว่าสารกำจัดแมลงกลุ่มนี้จะเป็นประโยชน์ในทางการเกษตร แต่การใช้กันอย่างแพร่หลาย และใช้ไม่ถูกวิธี หรือใช้ในปริมาณที่มากเกินไป อาจทำให้เกิดการตกค้างในผลผลิตทางการเกษตร และส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคได้ นอกจากนี้ องค์การอนามัยโลก (WHO) และองค์การความปลอดภัยทางอาหารแห่งยุโรป (European Food Safety Authority หรือ EFSA) ได้รายงานไว้ว่า สารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรียมีพิษค่อนข้างสูงต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำ (Vazquez et al., 2014) ซึ่งการตกค้างของสารกำจัดแมลงกลุ่มนี้อาจส่งผลกระทบต่อความเป็นพิษแบบเรื้อรัง และเฉียบพลันได้ (Peng et al., 2016) ในการนี้สหภาพยุโรป (EU) จึงได้มีการกำหนดค่าการตกค้างสูงสุด (Maximum residue limits หรือ MRLs) ของสารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรีย ไม่ควรเกิน 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Xi et al., 2016) ดังนั้น เพื่อความปลอดภัยต่อสุขภาพของผู้บริโภค และไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ให้มีประสิทธิภาพสำหรับการตรวจวัดพร้อมกันของสารกำจัดแมลงที่ตกค้างในตัวอย่างชนิดต่าง ๆ

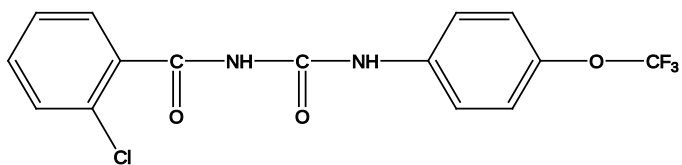
เนื่องด้วยสารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรียไม่เสถียรทางความร้อน ทำให้ไม่ค่อยเหมาะในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography หรือ GC) (Mensah et al., 1997) แต่เทคนิคที่นิยมใช้สำหรับการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่มนี้ คือ เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลว (Liquid chromatography หรือ LC) ควบคู่กับการตรวจวัดแบบอัลตราไวโอเลต (Xi et al., 2016; Peng et al., 2016; Wang et al., 2014; Zhou et al., 2014; Liu et al., 2015; Mei et al., 2015; Ruan et al., 2015; Yang et al., 2015; Zhang et al., 2016; Yang et al., 2016) การตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ (Vazquez et al., 2008) และการตรวจวัดแมสสเปกโตรเมตรี (Brutti et al., 2010; Mei et al., 2015; Carro et al., 2012; Kim et al., 2013; Chen et al., 2014) ถ้าหากมีการเตรียมตัวอย่างและเพิ่มความเข้มข้นด้วยวิธีการที่เหมาะสมร่วมกับการตรวจวัด

ด้วยเทคนิคทางเครื่องมือข้างต้น จะสามารถช่วยทำให้การตรวจวัดสารเป้าหมายในระดับต่ำ ๆ ได้ดีขึ้น โดยวิธีแบบดั้งเดิม นิยมใช้เทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลายหรือการสกัดแบบของเหลว-ของเหลว (Liquid-liquid extraction หรือ LLE) (Markoglou et al., 2007; Martinez-Galera et al., 2001) และการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (Solid-phase extraction หรือ SPE) (Millidis et al., 1999; de la Pena et al., 2003) แต่เทคนิคดังกล่าวใช้เวลาในการสกัดนาน และใช้ปริมาณมากของตัวทำละลาย ในการสกัด ดังนั้น จึงมีการพัฒนาเทคนิคการสกัดในระดับจุลภาค (Microextraction methods) ที่ใช้ตัวทำละลายในการสกัดน้อยลงสำหรับการสกัดและเพิ่มความเข้มข้นของสารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรีย ได้แก่ การใช้ตัวทำละลายกลุ่มแฮโลจีเนท (เช่น คาร์บอนเตตระคลอไรด์ คลอโรฟอร์ม คลอโรเบนซีน) (Zhou et al., 2013) ตัวทำละลายที่มีความหนาแน่นน้อยกว่าน้ำ (เช่น 1-dodecanol และ 1-undecanol) (Xi et al., 2016; Peng et al., 2016) และการใช้ตัวทำละลายของเหลวไอออนิก (Ionic liquids หรือ ILs) (Ruan et al., 2015; Yang et al., 2015; Wang et al., 2016; Wang et al., 2017; Zhang et al., 2012; Yang et al., 2014) นอกจากนี้ยังพบว่ามีการพัฒนาวิธีการสกัด โดยใช้อนุภาคนาโนที่มีสมบัติแม่เหล็ก (Magnetic nanoparticles) (Wang et al., 2017; Liu et al., 2019; Huang et al., 2019; Wang et al., 2018) อย่างไรก็ตาม เทคนิคการสกัดข้างต้นมีข้อเสียบางประการ เช่น การใช้ตัวทำละลายที่เป็นพิษในกรณีที่ใช้สารกลุ่มแฮโลจีเนท การใช้อุปกรณ์พิเศษในการสกัดเพื่อแยกเฟสที่ได้ในกรณีของการใช้ตัวทำละลายที่มีความหนาแน่นน้อยกว่าน้ำ และของเหลวไอออนิกมีราคาค่อนข้างแพงและต้องเลือกให้เหมาะสมกับสมบัติของสารเป้าหมายที่จะทำการสกัด ส่วนการใช้อนุภาคนาโนสำหรับการสกัดนั้น พบว่า มีขั้นตอนยุ่งยาก และใช้เวลาในการสังเคราะห์อนุภาคเหล่านั้นก่อนที่จะนำมาประยุกต์ใช้สำหรับกระบวนการสกัด

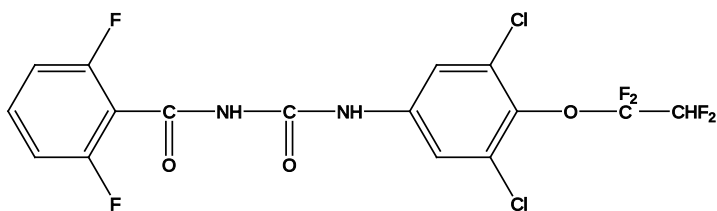
ในปัจจุบัน ได้มีการพัฒนาวิธีการสกัดที่มีประสิทธิภาพแบบย่อบาง และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เป็นที่น่าสนใจว่าได้มีการพัฒนาสารเชิงวัสดุที่มีสมบัติในการดูดซับ ที่เรียกว่า ชั้นคู่ไฮดรอกไซด์ (Layered double hydroxides หรือ LDHs) ซึ่ง LDHs ได้ถูกนำเสนอและพัฒนาขึ้นมาในครั้งแรก โดยกลุ่มวิจัยของ Tang & Lee ในปี ค.ศ. 2013 (Tang and Lee, 2013) หลังจากนั้น ก็ได้มีนักวิจัยทำการศึกษาและพัฒนาวิธีการสังเคราะห์ LDHs ขึ้นมาอย่างต่อเนื่อง และมีรายงานการประยุกต์ใช้กันอย่างแพร่หลาย (Sajid & Basheer, 2016; Mishra et al., 2018; Chatterjee et al., 2019) LDHs เป็นวัสดุที่มีโครงสร้าง 2 มิติระดับนาโน ประกอบด้วยเลเยอร์ที่มีประจุบวกของโลหะออกไซด์ที่มีไอออนลบคู่ประจุอยู่ระหว่างเลเยอร์ (Sajid & Basheer, 2016) ซึ่งมีสูตรโครงสร้างเป็น  $[M_{1-x}^{2+}M_x^{3+}(OH)_2]^+ [X_{x/m}^{m-}] \cdot nH_2O$  เมื่อ  $M^{2+}$  และ  $M^{3+}$  เป็นโลหะไอออน 2+ และ 3+ ประกอบเป็นโครงสร้างแบบออกตะฮีดรัล ส่วน  $X^{m-}$  เป็นไอออนลบที่คู่ประจุอยู่ระหว่างเลเยอร์ (Gaun et al., 2014) โดยโลหะไอออนที่นิยมใช้ในการเตรียม LDHs คือ  $Mg^{2+}$  และ  $Al^{3+}$  ซึ่ง Mg-Al-LDHs สามารถเตรียมได้โดยการผสมสารละลายของโลหะไอออนทั้งสองชนิดในสารละลายเบส (เช่น สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์) ที่มีพีเอชสูงกว่า 10 ซึ่งจะทำให้เกิดเป็นตะกอนสีขาวขึ้นอย่างรวดเร็ว กระบวนการดังกล่าวนี้ อาจเรียกว่าการเกิดเฟสแบบ in situ สมบัติพิเศษของ LDHs ได้แก่ โครงสร้างมีพื้นผิวสูง พื้นผิวมีประจุบวก มีความสามารถในการแลกเปลี่ยนไอออนได้สูง โครงสร้างมีความยืดหยุ่นได้ดี มีความต้านทานต่อความร้อน และเป็นวัสดุที่มีราคาถูก (Sajid & Basheer, 2016) นอกเหนือจากนี้ ยังถือว่า LDHs เป็นวัสดุชนิดใหม่ที่ไม่พิษที่ใช้เป็นตัวดูดซับที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

ทำให้มีนักวิจัยนำเอา LDHs ไปประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลายสำหรับเป็นตัวดูดซับสารหลากหลายชนิด เช่น โลหะที่เป็นพิษ (Rajabi et al., 2017; Asiabi et al., 2017; Chen et al., 2016) สารอินทรีย์ ไอออนลบ (de Oliveira et al., 2016; Ji et al., 2017; Gissawong et al., 2017) สารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Liu et al., 2012) กรดฟีนอลิกชนิดต่าง ๆ (Saraji&Ghani, 2014) สารประกอบที่มีโครงสร้างอะโรมาติกและแสดงประจุลบ (Tang & Lee, 2013) สารปฏิชีวนะ (Phiroonsoontorn et al., 2017; Di et al., 2019) และสารสีย้อมชนิดประจุลบ (Lei et al., 2017; Bu et al., 2016; Abdellaoui et al., 2017) นอกเหนือจากนี้ ยังได้มีการพัฒนา LDHs ด้วยการเติมสารลดแรงตึงผิวประจุลบ เช่น sodium dodecyl sulfate (SDS) และ sodium dodecylbenzene sulfonate ในกระบวนการสังเคราะห์ตัวดูดซับ เพื่อช่วยปรับปรุงโครงสร้างภายในของ LDHs ให้มีสมบัติความไม่แข็งตัวมากขึ้น สำหรับการดูดซับและการกำจัดสารประกอบอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ (Grover et al., 2019a, 2019b; Zhang et al., 2017; Zhang et al., 2019; Mahjoubi et al., 2019) รวมทั้งการสังเคราะห์ LDHs ผสมกับสารลดแรงตึงผิว ให้อยู่ในรูปอนุภาคระดับนาโนที่มีความเป็นแม่เหล็ก สำหรับการวิเคราะห์สารมลพิษชนิดต่าง ๆ ด้วยเทคนิค HPLC เช่นการวิเคราะห์สารประกอบพาทาเลท สารกำจัดวัชพืช และสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัส (Zhao et al., 2015; Xiaoli et al., 2020; Du et al., 2019) อย่างไรก็ตาม การสังเคราะห์ LDHs ประเภทต่าง ๆ ข้างต้น ต้องใช้เวลานานในการสังเคราะห์ (เช่น มากกว่า 10 ชั่วโมง) และในบางกรณี อาจจำเป็นต้องเตรียมในสภาวะควบคุมอุณหภูมิและความดัน ซึ่งอาจจะส่งผลต่อขนาดอนุภาค รูปร่างและพื้นผิวของ LDHs ที่สังเคราะห์ขึ้น นอกจากนี้ การนำอนุภาค LDHs ที่สังเคราะห์ขึ้นกลับมาใช้ซ้ำใหม่ในหลาย ๆ รอบ อาจจะทำให้เกิดปรากฏการณ์ “memory effect” ขึ้นได้ (Grover et al., 2019; Sajid & Basheer, 2016) และมีการใช้ตัวทำละลายสำหรับเป็นตัวชะในปริมาณที่สูง ดังนั้น การพัฒนาวิธีการเตรียม LDHs โดยไม่ผ่านกระบวนการสังเคราะห์ที่ยุ่งยากซับซ้อน แต่ยังแนวคิดและสมบัติของ LDHs ที่มีสารลดแรงตึงผิวเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย สำหรับการสกัดและเพิ่มความเข้มข้นของสารเป้าหมายที่ไม่มีประจุ จึงเป็นประเด็นการวิจัยที่น่าสนใจ และพัฒนาให้เป็นวิธีการทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพจากการทบทวนงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่า ยังไม่มีการพัฒนาและประยุกต์ใช้ LDHs ร่วมกับการเติมสารลดแรงตึงผิว สำหรับการสกัดและเพิ่มความเข้มข้นของสารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรียในตัวอย่างชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะตัวอย่างอาหารและสิ่งแวดล้อม

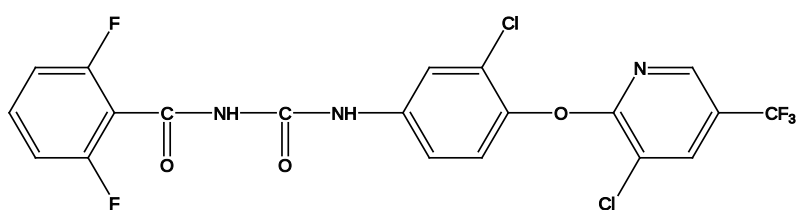
งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างและเพิ่มความเข้มข้นด้วยวิธี LDHs แบบการเกิดเฟสขึ้นตอนเดียวในสารละลาย (in situ phase formation) โดยใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดประจุลบเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดของสารเป้าหมายกลุ่มเบนโซอิลยูเรียที่ไม่มีขั้วและไม่มีประจุจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ ไตรฟลูมูรอน (TRF) เฮกซะฟลูมูรอน (HXF) ฟลูอะซูรอน (FLU) และฟลูเฟนอซูรอน (FLF) (โครงสร้างของสารเป้าหมายทั้งหมด แสดงดังรูปที่ 1.1 – 1.4) ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พร้อมทั้งประยุกต์ใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นสำหรับการวิเคราะห์การตกค้างของสารเป้าหมายในตัวอย่างน้ำ และตัวอย่างน้ำผึ้ง



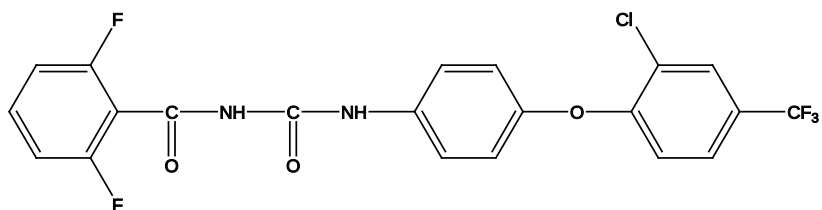
รูปที่ 1.1 โครงสร้างของไตรฟลูออโรน (TRF)



รูปที่ 1.2 โครงสร้างของเฮกซะฟลูออโรน (HXF)



รูปที่ 1.3 โครงสร้างของฟลูออโรน (FLU)



รูปที่ 1.4 โครงสร้างของฟลูออโรน (FLF)

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1) ศึกษาวิธีการแยก และวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรียพร้อมกันด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
- 2) ศึกษาและพัฒนาวิธีการสกัดและเพิ่มความเข้มข้นของสารเป้าหมายด้วยวิธีการสกัดแบบ LDHs ด้วยการใส่สารลดแรงตึงผิวชนิดประจุลบสำหรับการเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดสารเป้าหมายที่ไม่มีขั้ว

3) ประยุกต์วิธีที่พัฒนาขึ้นสำหรับการวิเคราะห์สารตกค้างของสารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรียในตัวอย่างน้ำ และตัวอย่างน้ำฝั่

### 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

- 1) สารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรียที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ ไตรฟลูมูรอน (TRF) เฮกซะฟลูมูรอน (HXF) ฟลูอะซูรอน (FLU) และฟลูเฟนอซูรอน (FLF)
- 2) ศึกษาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการแยกและวิเคราะห์สารมาตรฐานเป้าหมายพร้อมกันด้วยเทคนิค HPLC
- 3) ศึกษาสถานะที่เหมาะสมของการสกัดสารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรียด้วยเทคนิค LDHs โดยศึกษาผลของพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัด เช่น ความเข้มข้น และอัตราส่วนของปริมาตรของสารละลาย  $Mg^{2+}$  และ  $Al^{3+}$  ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) อัตราเร็วและเวลาที่ใช้ในการรอร์เท็กซ์ และอัตราเร็วและเวลาที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยง
- 4) นำวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์สารตกค้างของสารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรียในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างน้ำฝั่

### 1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ได้สถานะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรียพร้อมกันด้วยเทคนิค HPLC
- 2) ได้วิธีการทางเลือกใหม่สำหรับการสกัดและเพิ่มความเข้มข้นที่สะดวก ง่าย และให้ประสิทธิภาพที่ดี และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์การตกค้างของสารเป้าหมายในตัวอย่างชนิดต่าง ๆ ได้
- 3) สามารถตีพิมพ์ผลงานวิจัยในระดับนานาชาติควอเตอร์ที่ 1 หรือ 2 ได้อย่างน้อย 1 เรื่อง

## บทที่ 2

### การทบทวนงานวิจัยและเอกสารที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 การเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรียด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

การสกัดสารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรียโดยวิธีดั้งเดิม จะใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายหรือการสกัดแบบของเหลว-ของเหลว (LLE) เช่น การใช้สารเอทิลอะซิเตท (Martinez-Galera et al., 2001; Markoglou et al., 2007; Kim et al., 2013) แต่อย่างไรก็ตาม การสกัดด้วยวิธี LLE จะต้องใช้ตัวทำละลายในการสกัดในปริมาณมาก และโดยปกติมักจะผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีการสกัดแบบเฟสของแข็ง (SPE) ก่อนการวิเคราะห์และตรวจวัดด้วยแมสสเปกโตรเมทรี ส่วนวิธีทางเลือกอื่น เช่น การสกัดด้วยตัวทำละลายแบบใช้ความดัน (PLE) ก็สามารถนำมาประยุกต์ใช้สำหรับการสกัดและตรวจวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรียด้วยเทคนิค LC-MS (Brutti et al., 2010; Lorenzo et al., 2012).

การสกัดด้วยเฟสของแข็ง (SPE) สามารถนำมาใช้สำหรับสกัดสารกำจัดแมลง Bus และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC (Huang et al., 2011) โดยตัวดูดซับที่ใช้ คือ Titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanotube และมีการพัฒนาตัวดูดซับชนิดนี้ให้เป็นตัวดูดซับในระดับจุลภาค นั่นคือ TiO<sub>2</sub> nanotube array micro-SPE ( $\mu$ SPE) (Zhou et al., 2014) แม้ว่าวิธีดังกล่าวนี้จะให้ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดที่ต่ำกว่า 0.1 ไมโครกรัมต่อลิตร แต่อย่างไรก็ตามตัวดูดซับประเภทนี้จำเป็นต้องมีกระบวนการสังเคราะห์ก่อนการประยุกต์ใช้ และการสกัดที่ยุ่งยากหลายขั้นตอน

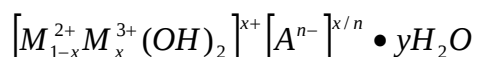
วิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็งระดับจุลภาคแบบการกระจาย (Dispersive  $\mu$ SPE หรือ d- $\mu$ SPE) โดยใช้สาร  $\beta$ -cyclodextrin-modified attapulgit composite เป็นตัวดูดซับสำหรับประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์สารกำจัดแมลง BUS ในตัวอย่างน้ำผึ้ง (Zhang et al., 2016) นอกเหนือจากนี้ ยังมีงานวิจัยที่มีแนวคิดเดียวกัน เช่น การพัฒนาตัวดูดซับ  $\beta$ -cyclodextrin-modified attapulgit ( $\beta$ -CD/ATP) ร่วมกับของเหลวไอออนิก (Yang et al., 2016) และการสังเคราะห์วัสดุใหม่ที่เรียกว่า metal organic framework (MOF-C) (Liu et al., 2015) อย่างไรก็ตาม วิธีการสังเคราะห์วัสดุดังกล่าวนี้ มีขั้นตอนยุ่งยาก และในบางกรณีจำเป็นต้องควบคุมสภาวะในการสังเคราะห์เป็นพิเศษ

การสกัดด้วยเฟสของแข็งระดับจุลภาค (Solid-phase microextraction หรือ SPME) ได้ถูกพัฒนาและนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์สารกำจัดแมลง BUS ในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างน้ำผลไม้ (Vazquez et al., 2008; Wang et al., 2014; Mei et al., 2015) โดยใช้ไฟเบอร์ชนิดต่าง ๆ เช่น polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB) (Vazquez et al., 2008), poly(vinylidene fluoride) membrane (Wang et al., 2014) และ multiple monolithic (Mei et al., 2015) แม้ว่าจะเป็นวิธีการที่น่าสนใจและให้ขีดจำกัดการตรวจวัดที่ต่ำ แต่เทคนิค SPME มีราคาที่สูง ค่อนข้างแพง ไฟเบอร์ตัวดูดซับที่ใช้ในการสกัดเป็นวัสดุที่แตกหักได้ง่าย และใช้เวลานานในกระบวนการสกัดในแต่ละครั้ง

เทคนิคการสกัดในระดับจุลภาคที่น่าสนใจอีกวิธีหนึ่ง ได้แก่ การสกัดระดับจุลภาคแบบการกระจายด้วยเฟสของเหลว-ของเหลว (Dispersive liquid-liquid microextraction หรือ DLLME) สามารถนำมาประยุกต์ใช้สำหรับการสกัดสารกำจัดแมลง BUS ในตัวอย่างน้ำได้ดี (Zhou et al., 2013) โดยใช้สารคลอโรเบนซีน เป็นตัวทำละลายในการสกัด (Extraction solvent) และเอทานอลเป็นตัวทำละลายในการกระจายเฟส (Dispersive solvent) ข้อดีของวิธีนี้ คือ ง่าย สะดวก รวดเร็ว มีประสิทธิภาพสูงในการสกัด และให้ความไวในการตรวจวัดสารเป้าหมายได้ดี แต่วิธีนี้มีการใช้ตัวทำละลายในการสกัดที่มีพิษ และเป็นสารก่อมะเร็ง เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้ตัวทำละลายในการสกัดที่มีพิษ จึงได้มีการใช้ตัวทำละลายชนิดใหม่ทดแทน เช่น 1-dodecanol (Zhou et al., 2009; Xi et al., 2016) และ 1-undecanol (Peng et al., 2016) แต่ตัวทำละลายกลุ่มนี้มีความหนาแน่นน้อยกว่าน้ำ จะทำให้แยกเฟสที่สกัดได้ยาก และในบางกรณีมักจำเป็นต้องใช้อุปกรณ์พิเศษและเฉพาะสำหรับการสกัดเพื่อช่วยในการแยกเฟสได้ง่าย และสะดวกขึ้น ตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่งที่น่าสนใจ และมีการนำมาใช้ทดแทนได้ คือ ของเหลวไอออนิก (Ionic liquids หรือ ILs) เช่น  $[C_6MIM][PF_6]$  (Zhang et al., 2012; Ruan et al., 2015) และ  $[C_8MIM][PF_6]$  (Vazquez et al., 2014) ซึ่งข้อดีของของเหลวไอออนิก ได้แก่ มีความหนาแน่นสูงกว่าน้ำ จึงสามารถแยกเฟสที่สกัดได้ง่ายหลังกระบวนการสกัดเสร็จสิ้น แต่อย่างไรก็ตาม ของเหลวไอออนิกมีราคาค่อนข้างแพง มีความหนืดสูง และบางกรณีต้องเลือกชนิดของของเหลวไอออนิกให้เหมาะสมหรือมีสมบัติใกล้เคียงกับสมบัติของสารเป้าหมาย เพื่อที่จะช่วยให้ประสิทธิภาพการสกัดสูงขึ้น นอกเหนือจากนี้ มีการประยุกต์ใช้ของเหลวไอออนิกร่วมกับตัวทำละลายที่มีความหนาแน่นน้อยกว่าน้ำสำหรับสกัดสารกำจัดแมลงกลุ่ม BUS ในตัวอย่างต่าง ๆ เช่น การใช้สารละลายผสมระหว่าง 1-dodecanol และ trihexyl(tetradecyl)phosphonium hexafluorophosphate เป็นตัวทำละลายสกัดร่วม (Yang et al., 2014; Yang et al., 2015) แม้ว่าจะเป็นทางเลือกการใช้ตัวทำละลายที่เป็นพิษที่เคยใช้ในเทคนิค DLLME แบบดั้งเดิม แต่การใช้สารละลายผสมที่เป็นตัวทำละลายสกัดร่วมกับของเหลวไอออนิก ยังคงพบว่า จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์พิเศษในการสกัด เพื่อช่วยในการแยกเฟสได้ง่ายขึ้น

## 2.2 ชั้นคูไฮดรอกไซด์ (Layered double hydroxides หรือ LDHs)

LDHs เป็นลักษณะเลเยอร์และโครงสร้างแบบ brucite  $[Mg(OH)_2]$  ดังรูปที่ 2.1 และ 2.2 ซึ่งประกอบด้วยไอออนของแมกนีเซียมที่ล้อมรอบด้วยไอออนของไฮดรอกไซด์ และจัดเรียงโครงสร้างสร้างเป็นออกตะฮีดรอล (Octahedral) โดยที่ช่องว่างของออกตะฮีดรอล (octahedral) จะมีไอออนของแมกนีเซียมบรรจุอยู่ (Dong et al., 2015) ถ้าตำแหน่งอะตอมกลางมีการแทนที่ด้วยไอออนของอะลูมิเนียมก็จะทำให้เลเยอร์แสดงประจุบวกได้ ซึ่งสูตรทั่วไปของ LDHs จะอยู่ในรูป ดังนี้



เมื่อ  $M^{2+}$  เป็นโลหะไอออนประจุ 2+ เช่น  $Mg^{2+}$   $Ni^{2+}$   $Ca^{2+}$   $Cu^{2+}$   $Mn^{2+}$   $Co^{2+}$  และ  $Zn^{2+}$

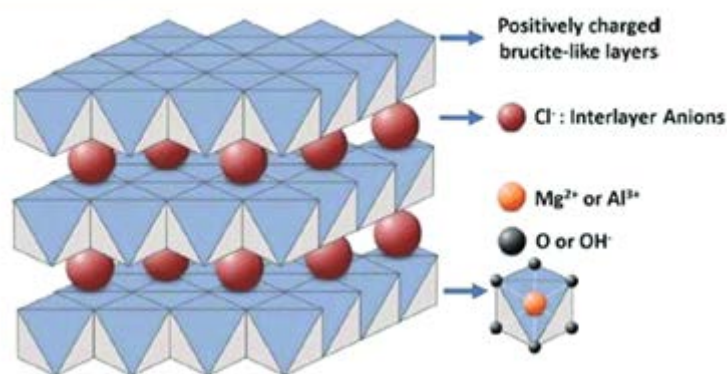
$M^{3+}$  เป็นโลหะไอออนประจุ 3+ เช่น  $Al^{3+}$   $Cr^{3+}$   $Ga^{3+}$  และ  $Fe^{3+}$

$A^{n-}$  เป็นไอออนลบที่อยู่ระหว่างชั้น เช่น  $CO_3^{2-}$   $SO_4^{2-}$   $Cl^-$   $NO_3^-$

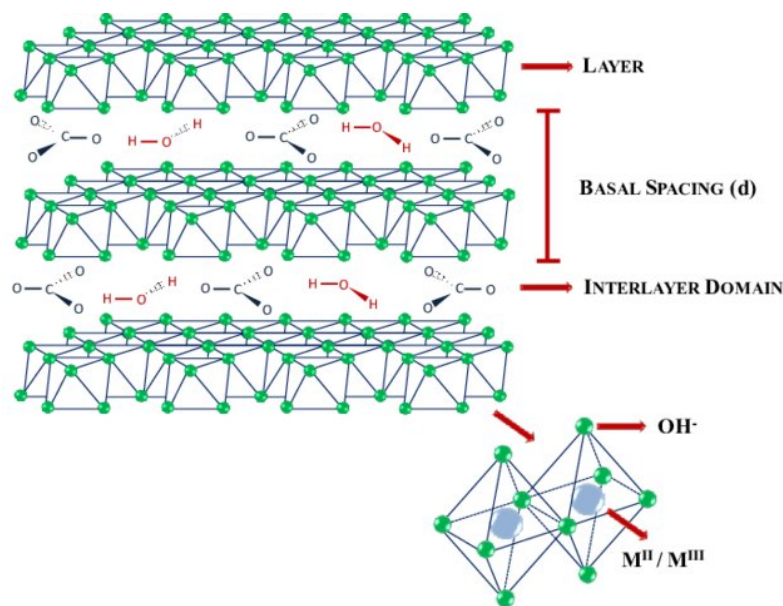
x เป็นค่าที่คำนวณได้จากอัตราส่วนโดยโมลของ  $\frac{M^{3+}}{(M^{2+} + M^{3+})}$

y เป็นจำนวนโมเลกุลของน้ำที่อยู่ระหว่างชั้น

**Anionic clay Mg/Al-layered double hydroxide (LDH)**



**รูปที่ 2.1** โครงสร้างของ Layered double hydroxides (LDHs)  
(ที่มา : [Dong et.al., 2015](#))



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของ LDHs ที่แสดงเลเยอร์ อินเตอร์เลเยอร์และ basal spacing  
(ที่มา : Benicio et.al., 2015)

#### วิธีการเตรียม LDHs

การเตรียม LDHs คู่อไอออนที่นิยมใช้เตรียม คือ  $Mg^{2+}$  และ  $Al^{3+}$  โดยสามารถเตรียมได้หลายวิธี (Saraji & Ghani, 2014) เช่น

- 1) วิธี Sol-gel
- 2) วิธี Hydrothermal
- 3) วิธีทางเคมีไฟฟ้า
- 4) วิธี Co-precipitation

วิธีที่นิยมใช้มากที่สุดคือวิธี Co-precipitation ซึ่งสามารถเตรียมได้โดยการเติมสารละลายของไอออน 2+ และไอออน 3+ (ในอัตราส่วนที่เหมาะสม โดยปกติมักจะเป็นอัตราส่วน 3:1) ลงไปให้เกิดการผสมกันอย่างช้า ๆ จากนั้นเติมสารละลายเบส เช่น NaOH ซึ่งจะทำให้เกิดการตกตะกอนของไอออนทั้งสองขึ้น

ข้อดีของเทคนิค LDHs ได้แก่

- 1) มีความเป็นพิษต่ำและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (green adsorbents)
- 2) ชั้นของ LDHs เป็นประจุบวก
- 3) ความจุในการแลกเปลี่ยนไอออนลบได้สูง
- 4) พื้นที่ผิวมาก
- 5) ไม่ละลายน้ำ

### 2.3 การประยุกต์ของชั้นคูไฮดรอกไซด์ (LDHs)

การประยุกต์ใช้ของ LDHs โดยการนำไปเป็นตัวดูดซับ หรือการสกัดและเพิ่มความเข้มข้นของสารเป้าหมายกลุ่มที่ไม่มีประจุ พบว่า มีงานวิจัยค่อนข้างจำกัด แต่โดยส่วนมาก นิยมใช้สำหรับการดูดซับและการกำจัดสารจำพวกที่มีประจุหรืออยู่ในรูปไอออน ดังตัวอย่างงานวิจัยต่อไปนี้

งานวิจัยของ Abdelloui และคณะ (Abdellaoui et al., 2017) ได้นำเสนอ MgAl-LDHs สำหรับการดูดซับและกำจัดสีย้อมกลุ่มอะมาแรนท (Amaranth) โดยใช้ interlayer anions ที่แตกต่างกัน ( $\text{MgAlNO}_3$  และ  $\text{MgAlCO}_3$ ) ในกระบวนการสังเคราะห์ LDHs นอกจากนี้ การสังเคราะห์ตัวดูดซับ Ni-Fe LDHs ยังพบว่ามีงานนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการดูดซับเพื่อกำจัดสีย้อมออกจากสารละลายน้ำได้เช่นกัน (Lei et al., 2017)

Mg-Al LDHs ได้ถูกนำมาใช้เป็นตัวดูดซับ และการสกัดไอออนลบ เช่น การดูดซับโบรมेट (Ji et al., 2017) และการสกัดฟอสเฟต (Gissawong et al., 2017) ในตัวอย่างน้ำ ส่วนงานวิจัยที่เกี่ยวกับการดูดซับและกำจัดโครเมต จะใช้การสังเคราะห์ LDHs ชนิด Zn-Ni LDHs (Oliveira et al., 2016) นอกเหนือจากนี้ ยังพบว่า มีงานวิจัยที่มีการประยุกต์ LDHs สำหรับการดูดซับและกำจัดโลหะที่เป็นพิษได้เช่นกัน เช่น Ni (Chen et al., 2016), Cd, Pb, Cu, และ Zn (Asiabi et al., 2017), Cd, Cr, Pb, Co, และ Ni (Rajabi et al., 2017)

งานวิจัยที่น่าสนใจในปัจจุบัน คือ การพัฒนา LDHs สำหรับการเป็นตัวดูดซับ หรือการสกัดสารเป้าหมายที่ไม่มีประจุ เช่น การประยุกต์ใช้ Zn-Al LDHs เป็นตัวดูดซับในการสกัดด้วยเฟสของแข็งสำหรับสารกลุ่มโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic aromatic hydrocarbon หรือ PAHs) ในตัวอย่างน้ำ ซึ่งจุดเด่นของงานวิจัยนี้ คือ การสังเคราะห์ Zn-Al LDHs โดยใช้สารลดแรงตึงผิวประจุลบเข้าไปอยู่ระหว่างชั้นของเลเยอร์ ซึ่งสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ โซเดียมโดเดซิลเบนซีสัลโฟเนต (SDBS) และพบว่า สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารเป้าหมายดังกล่าวได้ (Liu et al., 2012)

จากการทบทวนการวิจัยที่ผ่านมาข้างต้น จะพบว่า การพัฒนา LDHs สำหรับการสกัดและเพิ่มความเข้มข้นของสารเป้าหมายกลุ่มที่ไม่มีประจุ และกลุ่มที่เป็นสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างขนาดใหญ่ขึ้น ยังมีงานวิจัยไม่แพร่หลายนัก ดังนั้น จึงเป็นประเด็นที่น่าสนใจที่จะทำการพัฒนาวิธีการสกัดโดยใช้ LDHs ร่วมกับการเติมสารลดแรงตึงผิวประจุลบ และพัฒนาให้เป็นวิธีการที่ไม่ต้องทำการสังเคราะห์ LDHs แต่สามารถทำให้เกิดเฟสของ LDHs (หรือ in situ phase formation) ขึ้นในระหว่างกระบวนการสกัดได้ ซึ่งจะช่วยให้ลดเวลาในการสกัด ทำได้รวดเร็ว และยังคงให้ประสิทธิภาพที่ดี

## บทที่ 3

### ระเบียบวิธีการวิจัย

#### 3.1 สารเคมีและรีเอเจนต์

สารเคมีและรีเอเจนต์ที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นเกรดที่มีความบริสุทธิ์สูง และใช้สำหรับงานเคมีวิเคราะห์ ดังนี้

1) สารมาตรฐานกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรีย ประกอบด้วย Triflumuron (TRF) และ Hexaflumuron (HXF) เป็นผลิตภัณฑ์บริษัท Sigma-Aldrich (Germany) ส่วน Fluazuron (FLU) และ Flufenoxuron (FLF) เป็นผลิตภัณฑ์ของ Dr.Ehrestorfer GmbH (Germany) ซึ่งเตรียมสารมาตรฐานเหล่านี้ให้เป็นสารละลายสต็อกที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยการละลายสารมาตรฐานในปริมาณที่แน่นอน (ตามการคำนวณ) ด้วยอะซิโตนประมาณ 500 – 1,000 ไมโครลิตร จากนั้นเจือจางให้ได้ปริมาตรที่ต้องการด้วยเมทานอล

2) แมกนีเซียมคลอไรด์ ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ) และอะลูมิเนียมคลอไรด์ ( $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ ) ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Ajax Finechem (Australia)

3) โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ผลิตภัณฑ์ของ BDH Prolabo (Belgium)

4) สารและตัวทำละลายอื่น ๆ ได้แก่ formic acid, methanol (MeOH), and acetonitrile (ACN) (Merck, Germany), acetone (ANaPure, New Zealand), และ NaOH (Kemaus, Australia)

5) น้ำปราศจากไอออน (Deionized water) เป็นของบริษัท RCI Labscan (Thailand)

#### 3.2 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<sub>2</sub>

- คอลัมน์ (Column): InertSustain C<sub>8</sub> Column (4.6 มิลลิเมตร x 150 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร) (GL Science, Japan) และ guard InertSustain C<sub>8</sub> column (4.0 x 10 mm, 5 µm) (GL Science, Japan)

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

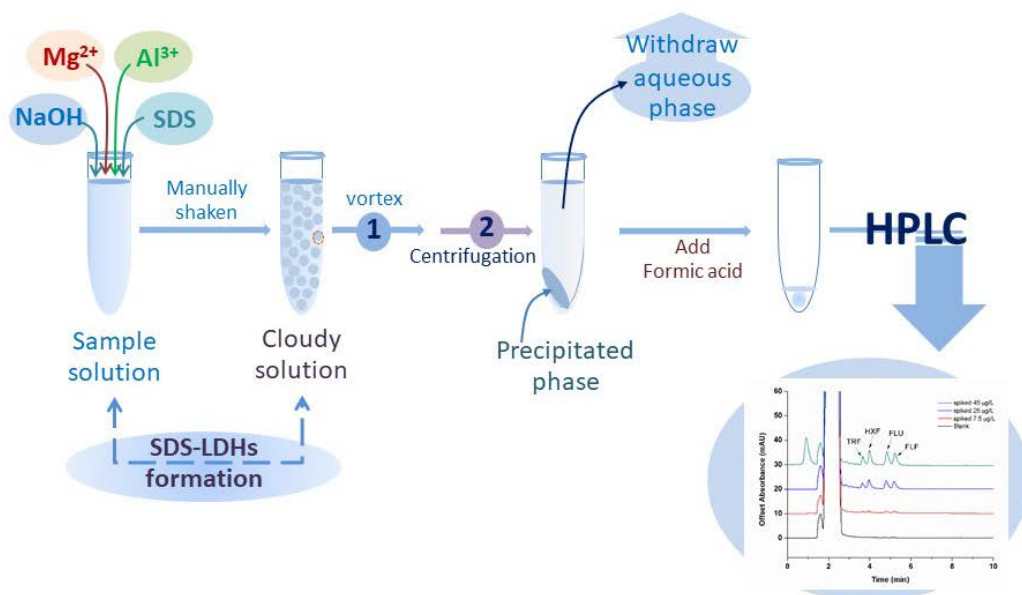
3) เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge): Bench Top Centrifuge NF 200 (12 x 15 มิลลิลิตร) (Turkey)

#### 3.3 สภาวะการแยกสารด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

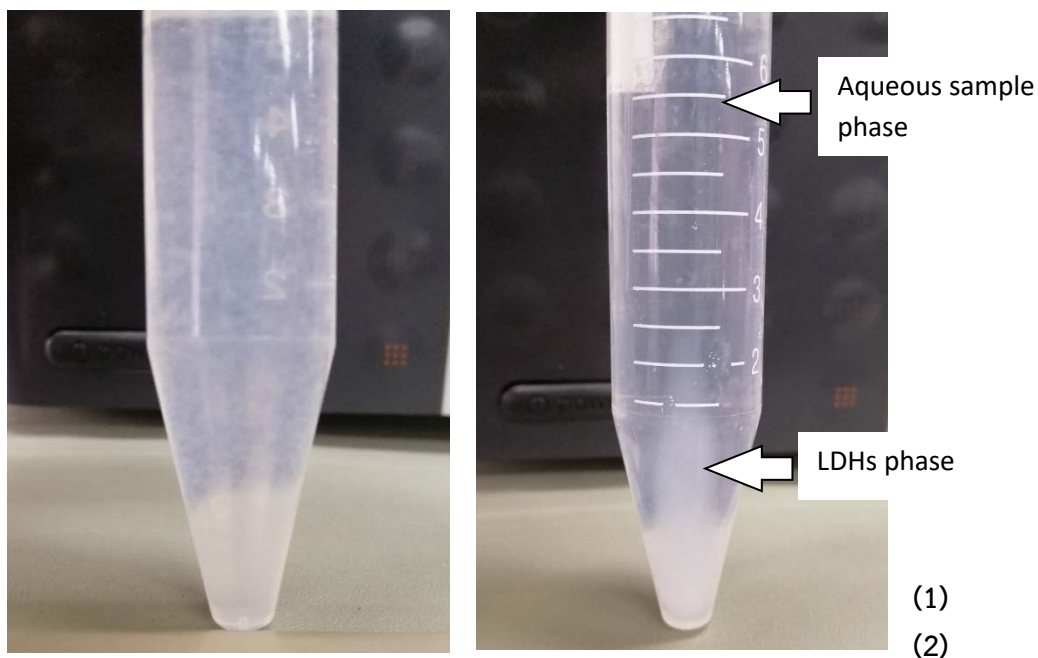
การแยกสารเป้าหมายจะใช้ระบบของรีเวิร์สเฟสโครมาโทกราฟีของเหลวโครมาโทกราฟี และใช้โมบายเฟส ประกอบด้วย กรดฟอร์มิกเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (% , v/v) และอะซิโตนไนไตรล์ (ACN) ที่อัตราส่วน 78%(v/v) ACN อัตราการไหลของโมบายเฟสเป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรตัวอย่างที่ฉีดวิเคราะห์เป็น 20 ไมโครลิตร และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

### 3.4 ขั้นตอนการสกัดด้วยวิธี in-situ LDHs

ขั้นตอนในการสกัดด้วยวิธี in-situ LDHs ทำได้โดยการนำสารละลายมาตรฐานผสม (หรือสารละลายตัวอย่าง) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงกันแหลม แล้วทำการเติมสารละลาย 0.5 mol/L NaOH ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ตามด้วยสารละลาย 120 ไมโครลิตร ของ  $Mg^{2+}$  (300 mmol/L) และ 40 ไมโครลิตรของสารละลาย  $Al^{3+}$  (300 mmol/L) หลังจากนั้น เติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (5 mmol/L) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันด้วยการเขย่ามือประมาณ 5 วินาที ตามด้วยการวอร์เท็กซ์ที่ 1800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 วินาที และนำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกเฟสที่สกัดได้ออกจากเฟสของสารละลายน้ำ แผนภาพสรุปขั้นตอนการสกัดแสดงดังรูปที่ 3.1 (ลักษณะทางกายภาพของสารละลายที่สังเกตได้ในขณะทำการสกัด และหลังการปั่นเหวี่ยง แสดงดังรูปที่ 3.2) หลังจากนั้นทำการแยกเฟสสารละลายน้ำออก และนำเฉพาะชั้นเฟสที่สกัดได้ของ LDHs ละลายด้วยกรดฟอร์มิกเข้มข้นในปริมาตร 200 ไมโครลิตร ตามด้วยการฉีดวิเคราะห์ (20 ไมโครลิตร) สารละลายที่สกัดได้ด้วยเทคนิค HPLC ต่อไป



รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการสกัดในภาพรวมด้วยวิธี in-situ LDHs



รูปที่ 3.2 ลักษณะทางกายภาพที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการสกัด เมื่อ (1) สารละลายที่ได้ระหว่างการสกัดจะมีลักษณะขุ่นขาวลอย (2) สารละลายที่เห็นการแยกเฟสที่ได้หลังจากการปั่นเหวี่ยง

### 3.5 การวิเคราะห์สารเป้าหมายตกค้างในน้ำตัวอย่าง และน้ำผึ้ง

ตัวอย่างน้ำที่ทำการวิเคราะห์ ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำต่าง ๆ ในจังหวัดขอนแก่น จำนวน 3 แหล่งเป้าหมาย (น้ำผิวดิน น้ำบ่อขนาดกลาง และน้ำบึงขนาดใหญ่) ซึ่งก่อนนำน้ำตัวอย่างไปทำการวิเคราะห์ ต้องทำการกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman #1 และตามด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นนำน้ำตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร ไปทำการสกัดตามขั้นตอนข้างต้น และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

ตัวอย่างน้ำผึ้ง ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำผึ้งที่มีจำหน่ายทั่วไปในท้องตลาด จำนวน 4 ยี่ห้อ (ประกอบด้วยน้ำผึ้งเลี้ยง และน้ำผึ้งดอกไม้ป่า) สำหรับการวิเคราะห์น้ำผึ้ง ทำการชั่งน้ำผึ้ง 5.0 กรัม และเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นทำการกรองตัวอย่างด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วทำการวิเคราะห์ตามขั้นตอนในข้อ 3.4

สำหรับการศึกษาร้อยละการกลับคืน (%recovery) ให้ทำการเติมสารเป้าหมายลงในตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ได้แก่ 7.5 25 และ 45 ไมโครกรัมต่อลิตร ก่อนการนำตัวอย่างไปสกัด และเพิ่มความเข้มข้น ตามด้วยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

## บทที่ 4

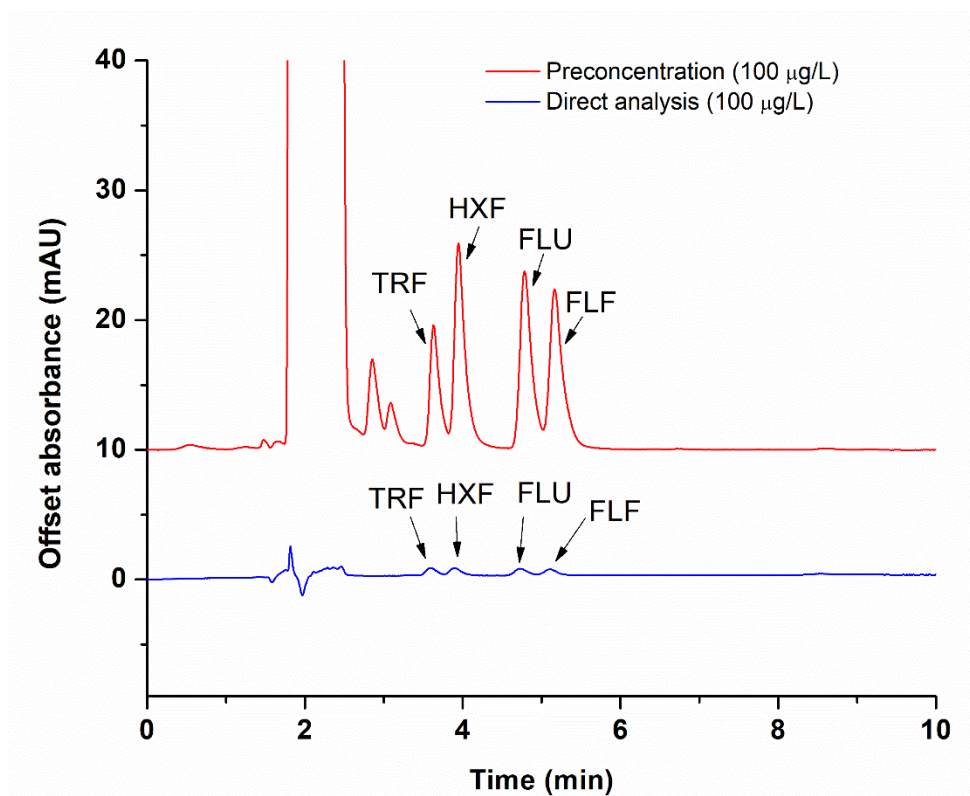
### ผลการทดลองและอภิปรายผล

งานวิจัยนี้นำเสนอการพัฒนาวิธีการสกัดที่อาศัยการเกิดเฟสในสารละลายขณะทำการสกัด (in-situ phase formation) โดยใช้ระบบของ Mg-Al-LDHs ที่มีสารลดแรงตึงผิวชนิดประจุลบ เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดสารเป้าหมายกลุ่มที่ไม่มีขั้วและไม่มีประจุ ซึ่งในที่นี้คือการประยุกต์สำหรับการสกัดสารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรีย และวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) โดยผลการทดลอง สามารถแบ่งเป็น 4 ประเด็น ดังนี้

- 1) สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารเป้าหมายด้วยเทคนิค HPLC
- 2) สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดด้วยวิธี LDHs
- 3) พารามิเตอร์สำหรับการทำปริมาณวิเคราะห์ และการทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธี
- 4) การประยุกต์วิธีที่พัฒนาขึ้นสำหรับการวิเคราะห์สารเป้าหมายตกค้างในตัวอย่างน้ำ และตัวอย่างน้ำผึ้ง

#### 4.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารเป้าหมายด้วยเทคนิค HPLC

จากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารเป้าหมาย 4 ชนิด (TRF, HXF, FLU, และ FLF) โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น 0.1 % (v/v) formic acid และอะซิโตนไนไตรล์ ตามสภาวะที่ได้ระบุไว้แล้วในบทที่ 3 ซึ่งภายใต้สภาวะที่เหมาะสมนี้ สามารถแยกสารเป้าหมายทั้ง 4 ชนิด ได้ภายในเวลา 6 นาที ดังแสดงในรูปที่ 4.1 และจะใช้สภาวะเหมาะสมนี้ สำหรับการประเมินสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดด้วยวิธี LDHs ในลำดับถัดไป



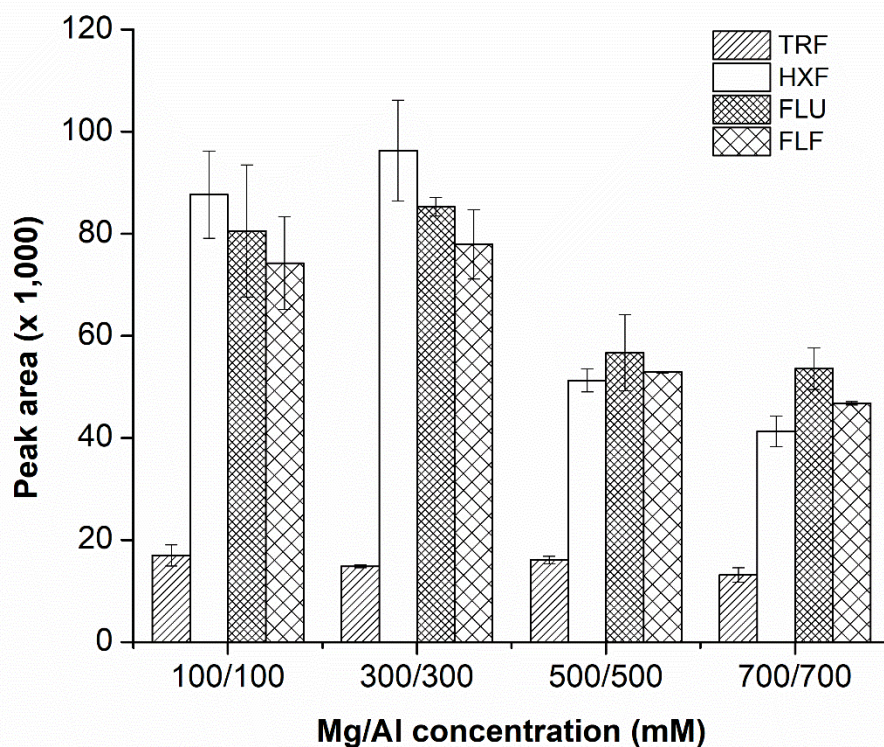
รูปที่ 4.1 โครมาโทแกรมของการแยกสารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรียภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

#### 4.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคการสกัดด้วย LDHs

พารามิเตอร์ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัด ได้แก่ ความเข้มข้นและปริมาตรของ  $Mg/Al$  ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นของโซเดียมโตะเตซิลลเฟต อัตราเร็วและเวลาในการวอร์เท็กซ์ และอัตราเร็วและเวลาในการปั่นเหวี่ยง ซึ่งในการหาสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละพารามิเตอร์ข้างต้น จะทำการแปรทีละพารามิเตอร์โดยพารามิเตอร์อื่น ๆ คงที่ โดยที่ประสิทธิภาพการสกัดนั้น พิจารณาจากพื้นที่ใต้พีคของสารเป้าหมายในแต่ละพารามิเตอร์ที่ค่าสูงสุด

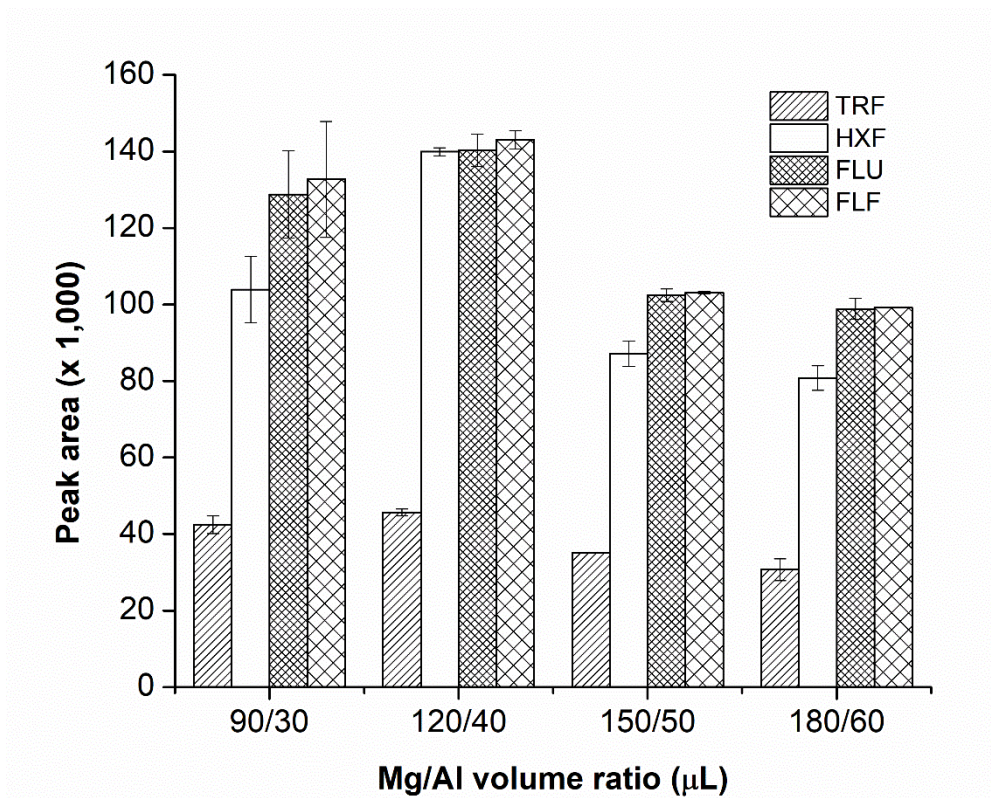
##### 4.2.1 ความเข้มข้นและปริมาตรของ $Mg^{2+}$ และ $Al^{3+}$

ในงานวิจัยนี้ ศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย  $Mg^{2+}$  และ  $Al^{3+}$  อยู่ในช่วง 100 – 700 mmol/L โดยให้อัตราส่วนโดยโมลของที่ 3:1 และอัตราส่วนปริมาตรของ  $Mg^{2+}$  และ  $Al^{3+}$  (150/50 ไมโครลิตร) ผลการทดลองที่ได้แสดงในรูปที่ 4.2 จะเห็นว่า ประสิทธิภาพการสกัดของสารเป้าหมาย (ยกเว้น TRF) จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของคู่อิออนทั้งสองที่ใช้จนกระทั่งถึงความเข้มข้น 300 mmol/L แต่หลังจากนั้นประสิทธิภาพการสกัดลดลง เนื่องจากผลของการเจือจางเฟสที่สกัดได้ที่เกิดขึ้นมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของคู่อิออนทั้งสอง ดังนั้น จึงต้องละลายเฟสที่สกัดได้ด้วยกรดฟอริกในปริมาตรที่มากขึ้นด้วย ดังนั้น จึงเลือกที่ความเข้มข้นของไอออนทั้งสองเป็น 300 mmol/L เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาพารามิเตอร์อื่นในลำดับต่อไป



รูปที่ 4.2 ผลของความเข้มข้นของ  $Mg^{2+}$  และ  $Al^{3+}$  ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดสารเป้าหมาย

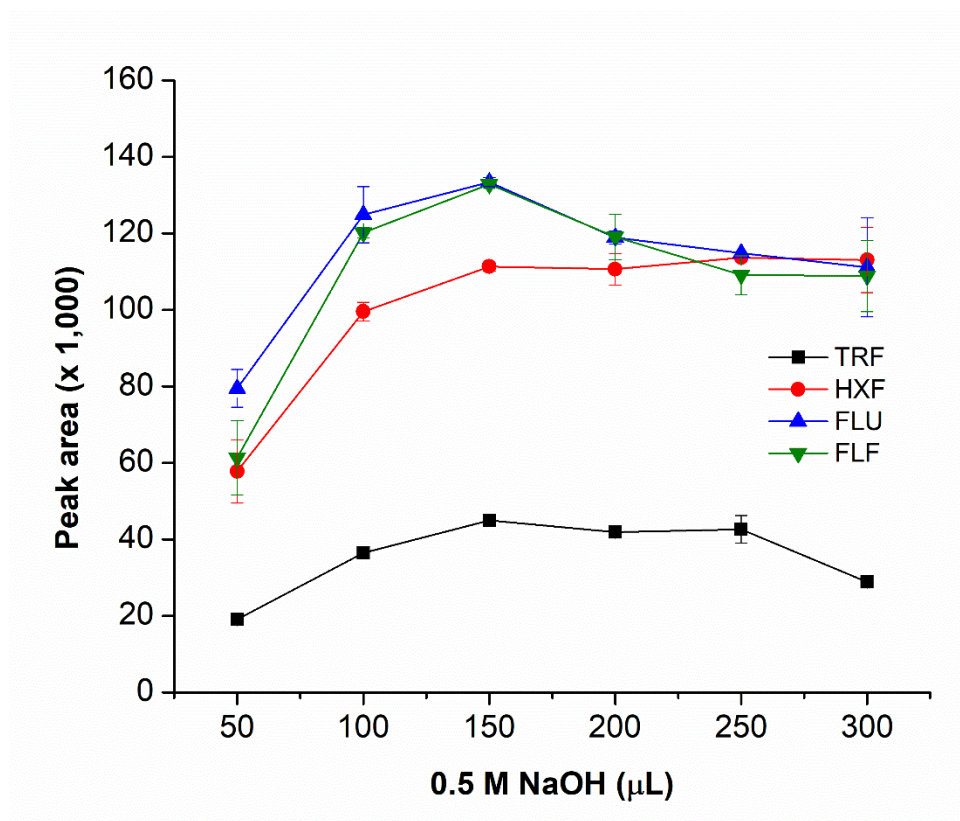
จากรูปที่ 4.2 จะได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ  $Mg^{2+}$  และ  $Al^{3+}$  ที่ 300 mmol/L หลังจากนั้น ศึกษาผลของอัตราส่วนของปริมาตรของไอออนทั้งสองที่ความเข้มข้นดังกล่าวนี้ ในช่วง ปริมาตรที่ยังคงอัตราส่วนเป็น 3 ต่อ 1 เสมอ โดยศึกษาที่อัตราส่วน 90/30 120/40 150/50 และ 180/60 ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.3 จะเห็นว่า ที่อัตราส่วน 120/40 จะให้ผลที่สูงที่สุด หลังจากนั้น ประสิทธิภาพการสกัดลดลง ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะว่าเกิดการแข่งขันของเคาน์เตอร์ไอออนลบที่มากขึ้น เมื่อปริมาตรของไอออนมากขึ้น ดังนั้น ในกรณีนี้จึงเลือกที่อัตราส่วน 120/40 ไมโครลิตร เป็นค่าที่เหมาะสม



รูปที่ 4.3 ผลของปริมาตรของ  $Mg^{2+}$  และ  $Al^{3+}$  ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดสารเป้าหมาย

#### 4.2.2 ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

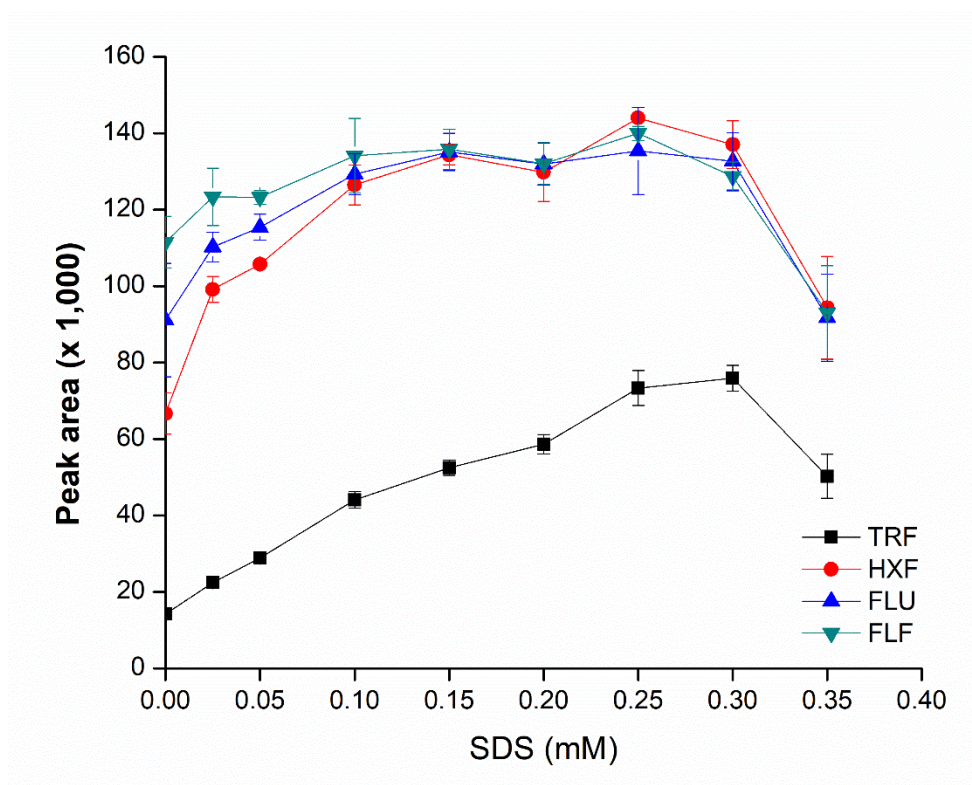
ในทางทฤษฎี การเตรียมเฟส LDHs โดยวิธีตกตะกอนร่วมภายใต้สภาวะเบสที่มีพีเอชสูงกว่า 8 และอยู่ในรูปของตัวดูดซับที่เป็นโลหะออกไซด์ (Tang & Lee, 2013) ในงานวิจัยนี้ ทำการศึกษาผลของปริมาตรของ 0.5 mol/L NaOH ในช่วง 50 – 300 ไมโครลิตร ดังผลที่ได้แสดงในรูปที่ 4.4 จะเห็นว่าประสิทธิภาพการสกัดเพิ่มขึ้นตามปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เติมลงไป จนถึงปริมาตร 150 ไมโครลิตร หลังจากนั้น ปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เติมลงไปมากเกินไป ไม่ได้ทำให้ประสิทธิภาพของการสกัดเพิ่มขึ้น และโดยมากจะทำให้ประสิทธิภาพลดลง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการที่สภาวะเบสที่มากเกินไป อาจทำให้เกิดชั้นคูไฮดรอกไซด์ไม่เสถียร หรืออาจเกิดจากการแข่งขันกันระหว่างไอออนไฮดรอกไซด์ที่มีมากขึ้นกับแคตไอออนอื่น เช่น คลอไรด์ ดังนั้น ในงานนี้จึงเลือก ที่ปริมาตร 150 ไมโครลิตรเป็นค่าที่เหมาะสม



รูปที่ 4.4 ผลของปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

#### 4.2.3 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS)

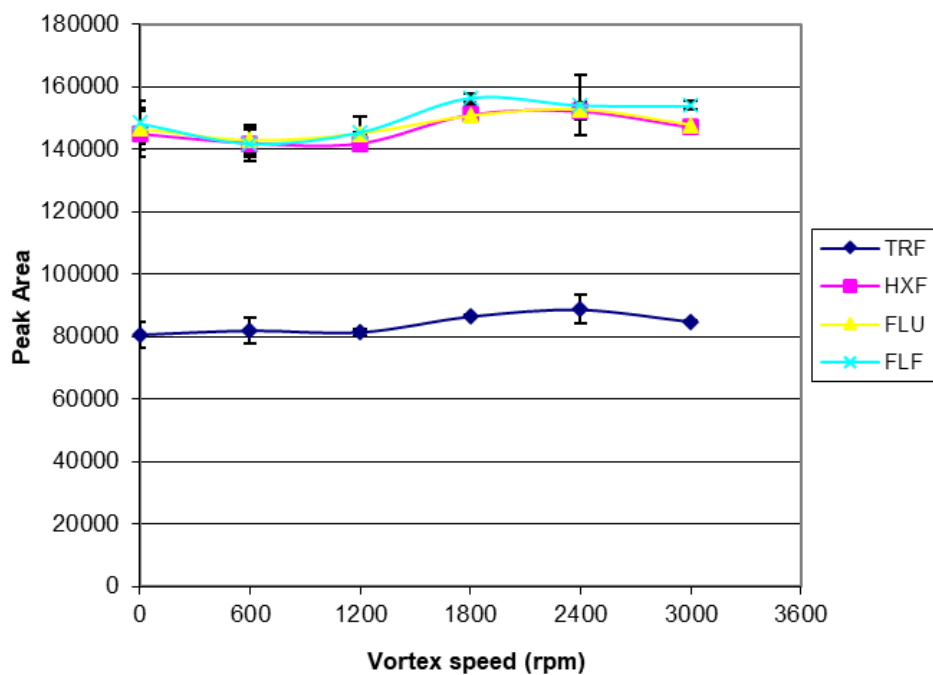
เนื่องจาก LDHs มีสมบัติในการแลกเปลี่ยนไอออนลบได้ดี ดังนั้นช่องว่างระหว่างเลเยอร์อาจจะปรับปรุงสมบัติได้ด้วยการเติมสารลดแรงตึงผิวชนิดประจุลบ (ในการวิจัยนี้เลือกใช้ SDS) เพื่อที่จะปรับพื้นผิวของ LDHs ที่มีสมบัติเป็น Hydrophilic ไปเป็น Hydrophobic เพื่อที่จะเพิ่มแนวโน้มในการสกัดสารเป้าหมายที่ไม่มีขั้วและไม่มีประจุ ในการทดลองนี้ ทำการศึกษาความเข้มข้นของ SDS ในช่วง 0 – 0.35 mmol/L ซึ่งผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.5 จะเห็นว่า การเติม SDS ลงไปในระบบการสกัดสามารถสกัดสารเป้าหมายโดยให้ประสิทธิภาพการสกัดสูงขึ้นสำหรับสารเป้าหมายทั้ง 4 ชนิด โดยเฉพาะสาร TRF จนความเข้มข้นของ SDS ถึง 0.25 mmol/L หลังจากนั้น ประสิทธิภาพการสกัดจะลดลง ดังนั้น จึงเลือกความเข้มข้นของ SDS ที่ 0.25 mmol/L เป็นค่าที่เหมาะสม



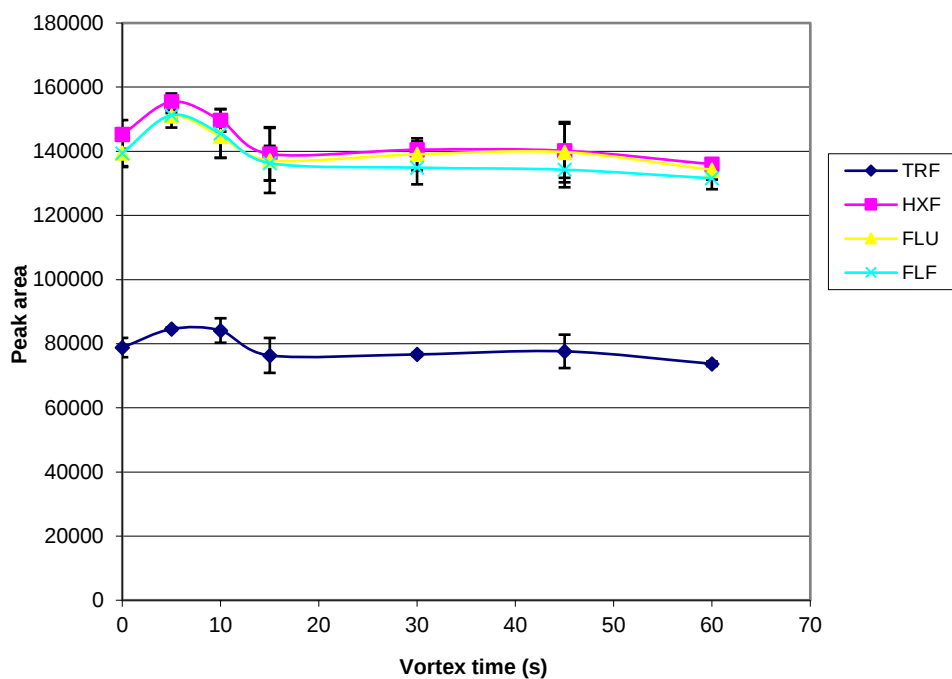
รูปที่ 4.5 ผลของความเข้มข้นของ SDS ที่มีผลต่อการสกัดสารเป้าหมาย

#### 4.2.5 ผลของการวอร์เทกซ์ (Vortex agitation)

การวอร์เทกซ์ทั้งอัตราเร็วและเวลา (Speed and time) ศึกษาผลอยู่ในช่วง 300 – 3000 รอบต่อนาที และเวลา 0 – 60 วินาที (ผลแสดงดังรูปที่ 4.6 และ 4.7 ตามลำดับ) พบว่า การวอร์เทกซ์ไม่ค่อยมีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดอย่างมีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตามที่อัตราเร็ว 1800 รอบต่อนาที ให้ประสิทธิภาพการสกัดสูงที่สุด ส่วนเวลาในการวอร์เทกซ์ พบว่า ที่เวลา 5 วินาที จะให้ประสิทธิภาพการสกัดสูงที่สุด แต่อย่างไรก็ตาม ที่เวลา 15 วินาที จะให้ผลการวิเคราะห์ซ้ำที่ดีกว่าเมื่อประเมินการวิเคราะห์ในหลายวัน ถ้าเวลานานกว่า 15 วินาที จะให้ผลที่ค่อนข้างคงที่ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงเลือกการวอร์เทกซ์ที่ 1800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที เป็นค่าที่เหมาะสม



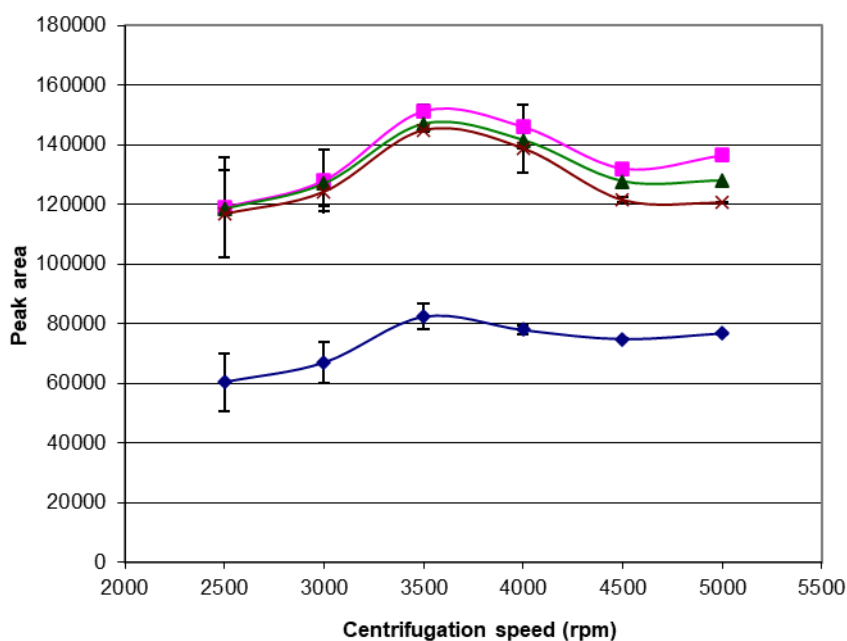
รูปที่ 4.6 ผลของ vortex speed ที่มีผลต่อการสกัดสารเป้าหมาย



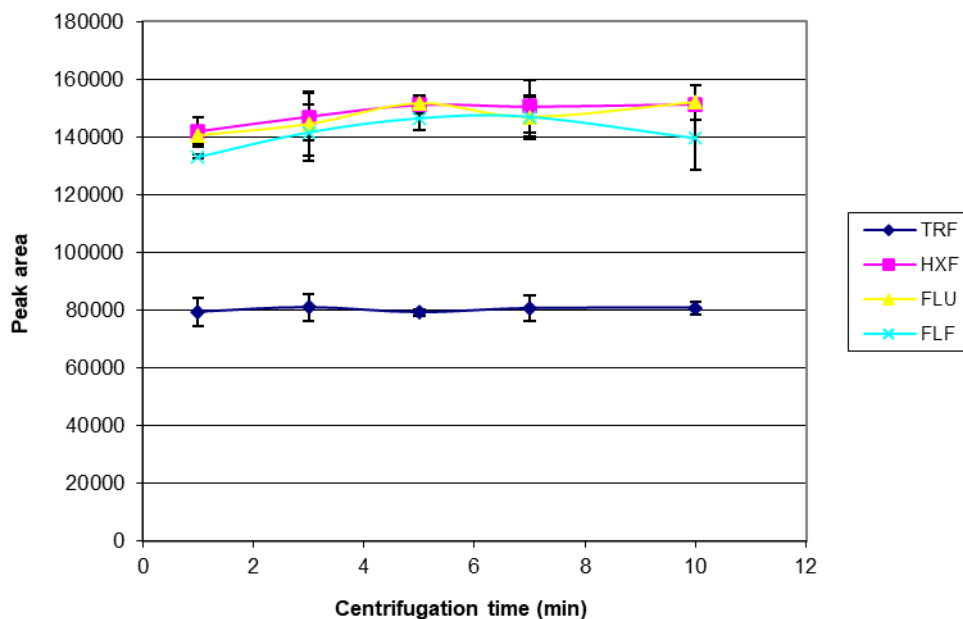
รูปที่ 4.7 ผลของ vortex time ที่มีผลต่อการสกัดสารเป้าหมาย

#### 4.2.6 ผลของการปั่นเหวี่ยง (Centrifugation)

ผลของการปั่นเหวี่ยงที่มีต่อประสิทธิภาพการสกัด สามารถพิจารณาจากการศึกษาอัตราเร็ว และเวลาในการปั่นเหวี่ยง ซึ่งการใช้อัตราเร็วและเวลาที่เหมาะสมจะช่วยให้การแยกเฟสของสารละลายได้อย่างสมบูรณ์ ในงานวิจัยนี้ ทำการศึกษาอัตราเร็วในช่วง 2500 – 5000 รอบต่อนาที (รูปที่ 4.8) จะเห็นว่า อัตราเร็วในการปั่นเหวี่ยงมีผลค่อนข้างมากต่อประสิทธิภาพการสกัดของสารเป้าหมาย การใช้อัตราเร็วที่สูงขึ้นทำให้พื้นที่ใต้พีคของสารสูงขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่า สามารถแยกเฟส LDHs ที่สกัดได้ออกจากเฟสสารละลายน้ำได้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น จนกระทั่งถึงอัตราเร็วที่ 3500 รอบต่อนาที ที่ให้ประสิทธิภาพสูงสุด แต่หลังจากนั้น ประสิทธิภาพจะลดลง อาจเป็นเพราะว่าการปั่นเหวี่ยงที่อัตราเร็วสูงเกินไป อาจทำให้เฟสของ LDHs กระจายเข้าไปละลายในชั้นของเฟสน้ำได้มากขึ้น จึงทำให้ได้ผลวิเคราะห์ลดลง ดังนั้น จึงเลือกที่อัตราเร็ว 3500 รอบต่อนาที แล้วทำการศึกษาผลของเวลาในช่วง 1 – 10 นาที (รูปที่ 4.9) พบว่า เวลาที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยงไม่ได้ให้ผลที่แตกต่างกันมากนัก แต่ที่เวลา 5 นาที ให้ประสิทธิภาพการสกัดสูงสุด การใช้เวลาในการปั่นเหวี่ยงนานเกินไปจะมีผลทำให้ประสิทธิภาพการสกัดลดลง ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงเลือกอัตราเร็วที่ 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เป็นค่าที่เหมาะสม



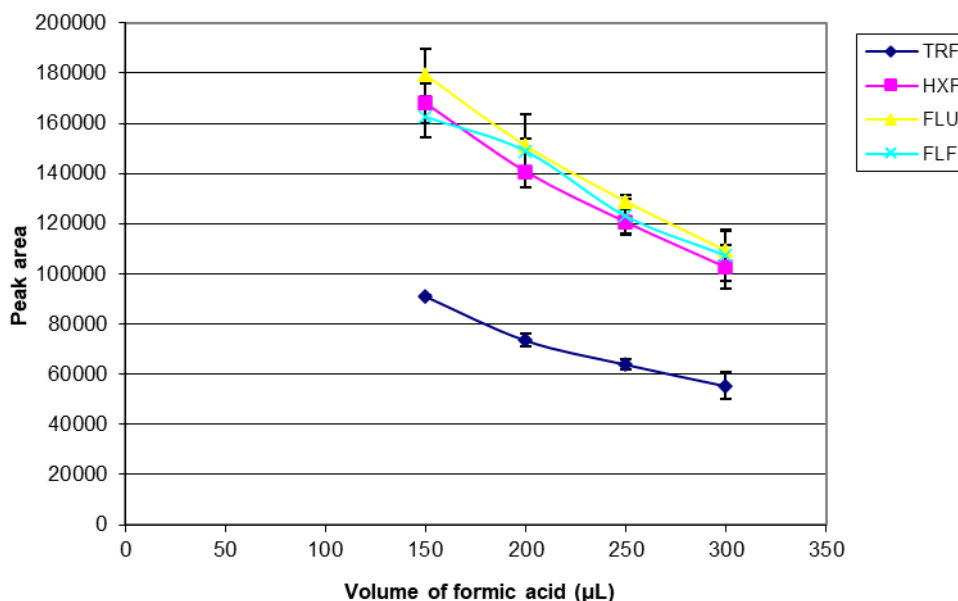
รูปที่ 4.8 ผลของ centrifugation speed ที่มีผลต่อการสกัดสารเป้าหมาย



รูปที่ 4.9 ผลของ centrifugation time ที่มีผลต่อการสกัดสารเป้าหมาย

#### 4.2.7 ปริมาตรของกรดฟอร์มิคที่มีผลต่อการละลายเฟสที่สกัดได้

การละลายเฟส LDHs จะต้องใช้ตัวทำละลายที่เป็นกรดที่มีพีเอชน้อยกว่า 4 (Tang & Lee, 2013; Gissawong et al., 2017; Phiroonsoontorn et al., 2017) จึงจะสามารถฉีดยาวิเคราะห์เข้าไปในเทคนิค HPLC ได้ ซึ่งในงานวิจัยนี้ ใช้กรดฟอร์มิคเป็นตัวทำละลายในการละลายเฟส LDHs ที่สกัดได้ โดยศึกษาในช่วงปริมาตร 150 – 300 ไมโครลิตร ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.10 จะเห็นว่า การใช้ปริมาตรของกรดฟอร์มิคที่มากขึ้น แม้ว่าจะสามารถละลายเฟสได้ดี แต่จะทำให้สารเป้าหมายที่สกัดได้ถูกเจือจางลง แต่ในขณะที่ปริมาตรที่ใช้ละลายเฟสน้อยกว่า 200 ไมโครลิตร จะไม่สามารถละลายเฟสได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ จึงเลือกปริมาตรของกรดฟอร์มิคที่ 200 ไมโครลิตร เป็นค่าที่เหมาะสม



รูปที่ 4.10 ผลของปริมาตรของกรดฟอร์มิกที่ใช้ในการละลายเฟสที่สกัดได้

#### 4.3 พารามิเตอร์เชิงปริมาณวิเคราะห์สำหรับสารมาตรฐาน

ศึกษาพารามิเตอร์ในการทำปริมาณวิเคราะห์ ได้แก่ ช่วงความเป็นเส้นตรง ชีตจำกัดในการตรวจวัด (LODs) ชีตจำกัดในการวิเคราะห์ปริมาณ (LOQ) ความเที่ยงในการวิเคราะห์ (Intra-day and inter-day precisions) และแฟกเตอร์การเพิ่มความเข้มข้น ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 พารามิเตอร์ในการวิเคราะห์ปริมาณของสารเป้าหมาย

| Analyte | Linearity (μg/L) | R <sup>2</sup> | LOD (μg/L) | LOQ (μg/L) | Intra-day precision <sup>a</sup> (n=6), %RSD |           | Inter-day precision <sup>a</sup> (n=6×3 days), %RSD |           | EF                                              |                                                          |
|---------|------------------|----------------|------------|------------|----------------------------------------------|-----------|-----------------------------------------------------|-----------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
|         |                  |                |            |            | tr                                           | Peak area | tr                                                  | Peak area | [C <sub>ex</sub> /C <sub>o</sub> ] <sup>b</sup> | [S <sub>precon</sub> /S <sub>direct</sub> ] <sup>c</sup> |
| TRF     | 1–100            | 0.9937         | 0.3        | 1.0        | 0.5                                          | 6.8       | 0.3                                                 | 11.2      | 12.5                                            | 13.2                                                     |
| HXF     | 0.3–200          | 0.9977         | 0.1        | 0.3        | 0.5                                          | 5.6       | 0.3                                                 | 7.9       | 21.0                                            | 18.3                                                     |
| FLU     | 0.3–200          | 0.9977         | 0.1        | 0.3        | 0.6                                          | 5.2       | 0.4                                                 | 8.3       | 21.2                                            | 19.6                                                     |
| FLF     | 0.3–200          | 0.9972         | 0.1        | 0.3        | 0.6                                          | 6.2       | 0.4                                                 | 7.2       | 23.7                                            | 21.3                                                     |

<sup>a</sup> Precisions were evaluated at the concentration of 100 μg/L each BUs.

<sup>b</sup> Ratio of the concentration of target analytes in the extraction phase to the initial concentration in original sample solutions

<sup>c</sup> Ratio of the slopes of the calibration curves obtained with the proposed preconcentration and direct analysis (without preconcentration)

จากตารางที่ 4.1 จะเห็นว่า ช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.3 – 200 ไมโครกรัมต่อลิตร และให้ค่าสัมประสิทธิ์ในการวิเคราะห์ปริมาณสูงกว่า 0.993 ชีตจำกัดการตรวจวัด (LOD) และชีตจำกัดในการตรวจวัดปริมาณ (LOQ) โดยค่า LOD ประเมินจาก S/N=3 และค่า LOQ ประเมินจาก S/N=10 ซึ่ง LOD และ LOQ ให้ค่าอยู่ในช่วง 0.1 – 0.3 และ 0.3 – 1.0 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนความเที่ยงในการวิเคราะห์ พบว่า ให้ร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่า 0.6 สำหรับเวลาการคงอยู่ของสาร และน้อยกว่า 11.2 สำหรับพื้นที่ใต้พีคของสาร ซึ่งถือว่าเป็นค่าที่ยอมรับได้

ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ให้ค่าแฟกเตอร์การเพิ่มความเข้มข้น (EF) คำนวณจากอัตราส่วนของความเข้มข้นของสารเป้าหมายที่อยู่ในเฟสที่สกัดได้และความเข้มข้นเริ่มต้นของสารเป้าหมายก่อน

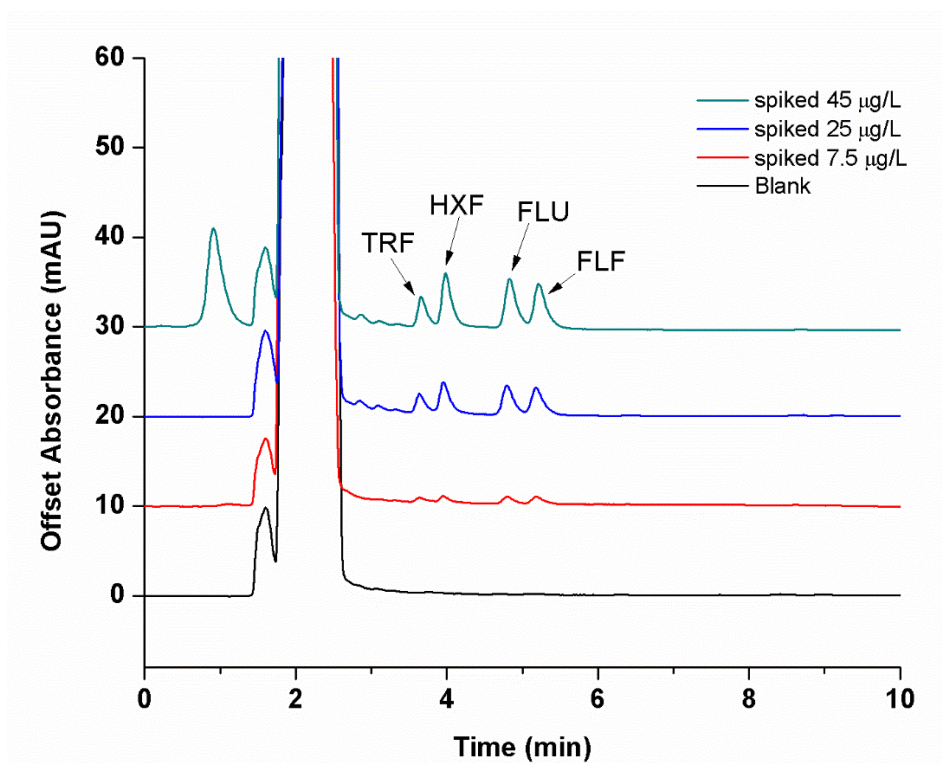
การสกัด และอัตราส่วนของความชื้นของสมการเส้นตรงของสารเป้าหมายที่ได้จากวิธีการเพิ่มความเข้มข้นเทียบกับวิธีที่วิเคราะห์โดยตรง จะได้ค่า EF อยู่ในช่วง 12.5 – 23.7 และ 13.2 – 21.3 ตามลำดับ ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องในทิศทางเดียวกัน

#### 4.4 การประยุกต์สำหรับการวิเคราะห์ในตัวอย่างน้ำ และตัวอย่างน้ำผึ้ง

การวิเคราะห์สารตกค้างของสารกำจัดแมลงในตัวอย่างน้ำที่สุ่มเก็บจาก 3 แหล่ง ที่แตกต่างกัน จากการวิเคราะห์ พบว่า ตรวจไม่พบการตกค้างของสารกำจัดแมลงในตัวอย่างน้ำที่ทำการศึกษา แต่อย่างไรก็ตาม เพื่อประเมินประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้นต่อการนำไปประยุกต์ใช้ จึงได้ทำการประเมินความแม่นยำของวิธี ซึ่งพิจารณาจากค่าร้อยละการกลับคืน (%Recovery) ของสารมาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่าง ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (7.5 25 และ 45 ไมโครกรัมต่อลิตร) ซึ่งโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ในตัวอย่างน้ำ และที่ทำการศึกษาความแม่นยำของวิธี แสดงดังรูปที่ 4.11 และข้อมูลร้อยละการกลับคืน แสดงในตารางที่ 4.2 จะเห็นว่า วิธีที่นำเสนอขึ้นนี้ ให้ร้อยละการกลับคืนที่ดีและยอมรับได้ นั่นคือ อยู่ในช่วง 78.4 – 117.4 โดยเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ต่ำกว่า 13.5 เปอร์เซ็นต์

ส่วนการวิเคราะห์ในตัวอย่างน้ำผึ้งที่สุ่มตัวอย่างจากท้องตลาดจำนวน 4 ยี่ห้อ จากการวิเคราะห์ พบว่า ตรวจไม่พบการตกค้างของสารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรียในตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ แต่เพื่อทดสอบความแม่นยำของวิธี จึงได้ทำการประเมินร้อยละการกลับคืน (%Recovery) ของสารเป้าหมายที่ระดับความเข้มข้น 7.5 25 และ 45 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์แสดงดังรูปที่ 4.12 และร้อยละการกลับคืน แสดงในตารางที่ 4.3 พบว่า ให้ร้อยละการกลับคืนที่ดีและยอมรับได้ในช่วง 72.7 – 117.9 และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่า 12.5

ถ้าพิจารณาค่าร้อยละการกลับคืนและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ตามมาตรฐานของ SANCO กำหนดให้ค่ามาตรฐานร้อยละการกลับคืนที่ยอมรับได้จะอยู่ในช่วง 70 – 120 และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้นที่ศึกษาในช่วง 10 – 100 ไมโครกรัมต่อลิตร (Document N° SANCO, 2006) ซึ่งจะพบว่า วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรียในตัวอย่างทางสิ่งแวดล้อม และตัวอย่างอาหารได้ โดยให้ประสิทธิภาพ และให้ความเชื่อถือได้ของวิธีที่ดี

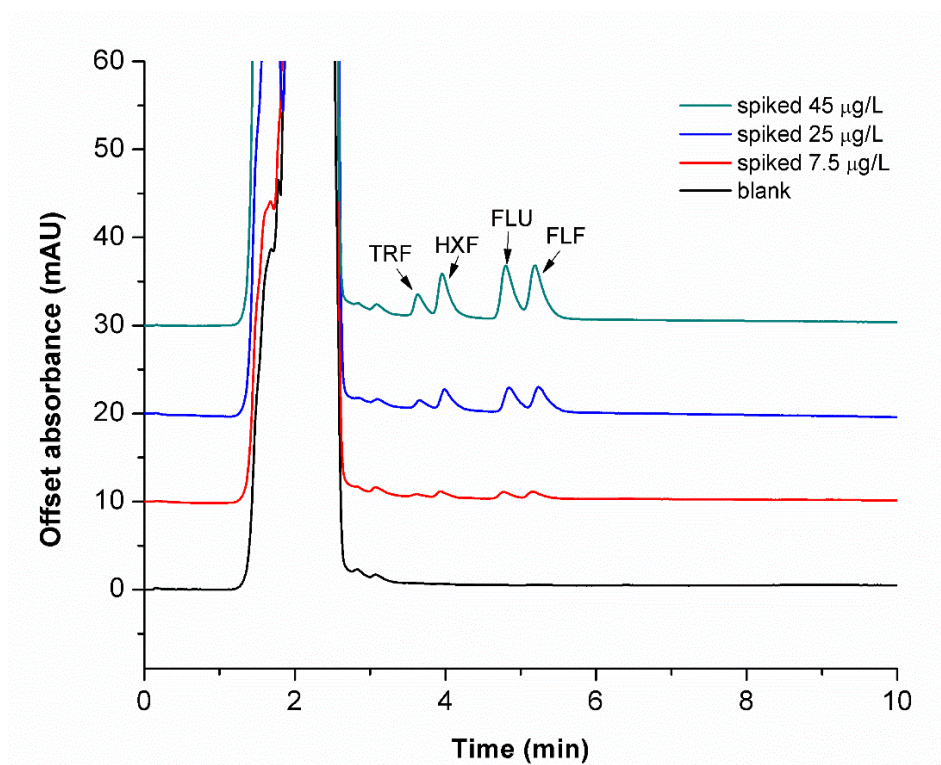


รูปที่ 4.11 โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำ (Blank surface water) และการเติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ตารางที่ 4.2 ร้อยละการกลับคืนที่ได้จากการประเมินความแม่นยำของวิธีในการวิเคราะห์สารเป้าหมายในตัวอย่างน้ำ

| Analyte | Spiked (µg/L) | Surface water   |       |        | Pond water      |       |        | Lake water      |       |        |
|---------|---------------|-----------------|-------|--------|-----------------|-------|--------|-----------------|-------|--------|
|         |               | Detected (µg/L) | RR(%) | RSD(%) | Detected (µg/L) | RR(%) | RSD(%) | Detected (µg/L) | RR(%) | RSD(%) |
| TRF     | 0             | ND              | -     | -      | ND              | -     | -      | ND              | -     | -      |
|         | 7.5           | 7.06            | 94.2  | 5.0    | 8.73            | 116.4 | 4.8    | 6.05            | 80.6  | 13.5   |
|         | 25            | 24.85           | 99.4  | 1.0    | 28.23           | 112.9 | 5.4    | 27.39           | 109.6 | 5.6    |
|         | 45            | 39.55           | 87.9  | 4.2    | 52.08           | 115.7 | 3.6    | 53.00           | 117.8 | 7.7    |
| HXF     | 0             | ND              | -     | -      | ND              | -     | -      | ND              | -     | -      |
|         | 7.5           | 7.58            | 101.1 | 1.8    | 7.81            | 104.2 | 10.5   | 4.29            | 78.4  | 11.4   |
|         | 25            | 25.93           | 103.7 | 1.4    | 24.85           | 99.5  | 10.6   | 24.77           | 99.1  | 4.9    |
|         | 45            | 44.27           | 98.4  | 4.2    | 47.37           | 105.3 | 1.4    | 47.29           | 105.1 | 0.8    |
| FLU     | 0             | ND              | -     | -      | ND              | -     | -      | ND              | -     | -      |
|         | 7.5           | 6.45            | 86.0  | 5.2    | 6.67            | 88.9  | 6.9    | 7.52            | 100.3 | 11.9   |
|         | 25            | 26.56           | 106.3 | 2.4    | 26.38           | 105.5 | 1.2    | 24.48           | 97.9  | 5.6    |
|         | 45            | 47.05           | 104.6 | 7.5    | 51.52           | 114.5 | 5.3    | 46.66           | 103.7 | 1.3    |
| FLF     | 0             | ND              | -     | -      | ND              | -     | -      | ND              | -     | -      |
|         | 7.5           | 6.54            | 87.2  | 5.8    | 8.25            | 109.9 | 8.5    | 6.14            | 81.9  | 11.4   |
|         | 25            | 25.74           | 103.0 | 4.5    | 22.87           | 91.5  | 6.4    | 23.32           | 93.3  | 3.2    |
|         | 45            | 46.09           | 102.4 | 6.2    | 49.37           | 109.7 | 6.4    | 45.19           | 100.4 | 5.0    |

RR: Relative recovery



รูปที่ 4.12 โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำผึ้ง (Blank honey brand #2) และจากการเติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ตารางที่ 4.3 ร้อยละการกลับคืนที่ได้จากการประเมินความแม่นยำของวิธีในการวิเคราะห์สารเป้าหมายในตัวอย่างน้ำผึ้ง

| Analyte | Spiked (µg/L) | Honey brand #1  |       |        | Honey brand #2  |       |        | Honey brand #3  |       |        | Honey brand #4  |       |        |
|---------|---------------|-----------------|-------|--------|-----------------|-------|--------|-----------------|-------|--------|-----------------|-------|--------|
|         |               | Detected (µg/L) | RR(%) | RSD(%) | Detected (µg/L) | RR(%) | RSD(%) | Detected (µg/L) | RR(%) | RSD(%) | Detected (µg/L) | RR(%) | RSD(%) |
| TRF     | 0             | ND              | -     | -      | ND              | -     | -      | ND              | -     | -      | ND              | -     | -      |
|         | 7.5           | 6.79            | 90.5  | 9.7    | 8.85            | 117.9 | 1.5    | 6.96            | 92.8  | 3.2    | 7.43            | 99.1  | 1.1    |
|         | 25            | 21.98           | 87.9  | 5.6    | 18.17           | 72.7  | 4.5    | 21.83           | 87.3  | 11.2   | 19.88           | 79.5  | 3.4    |
|         | 45            | 42.66           | 94.8  | 1.8    | 40.47           | 89.9  | 3.7    | 39.98           | 88.8  | 12.5   | 36.23           | 80.5  | 10.3   |
| HXF     | 0             | ND              | -     | -      | ND              | -     | -      | ND              | -     | -      | ND              | -     | -      |
|         | 7.5           | 5.80            | 77.3  | 5.6    | 8.40            | 110.2 | 0.7    | 8.28            | 110.3 | 2.9    | 7.56            | 100.8 | 11.3   |
|         | 25            | 23.65           | 94.6  | 5.8    | 21.65           | 83.0  | 5.5    | 23.09           | 92.4  | 10.6   | 24.14           | 96.6  | 8.6    |
|         | 45            | 41.90           | 93.1  | 1.1    | 41.04           | 91.2  | 1.6    | 41.15           | 91.4  | 7.3    | 43.03           | 95.6  | 11.1   |
| FLU     | 0             | ND              | -     | -      | ND              | -     | -      | ND              | -     | -      | ND              | -     | -      |
|         | 7.5           | 6.01            | 80.1  | 7.1    | 6.87            | 89.9  | 3.4    | 8.53            | 113.8 | 2.4    | 7.13            | 95.1  | 10.2   |
|         | 25            | 23.78           | 95.1  | 8.8    | 21.50           | 82.6  | 5.3    | 24.53           | 98.1  | 8.2    | 23.95           | 95.8  | 9.6    |
|         | 45            | 41.88           | 93.1  | 1.8    | 43.08           | 95.7  | 2.8    | 41.69           | 92.6  | 5.0    | 44.54           | 99.0  | 6.3    |
| FLF     | 0             | ND              | -     | -      | ND              | -     | -      | ND              | -     | -      | ND              | -     | -      |
|         | 7.5           | 5.56            | 78.0  | 8.8    | 7.26            | 95.0  | 4.4    | 7.08            | 94.4  | 3.7    | 8.06            | 107.5 | 6.0    |
|         | 25            | 24.76           | 99.0  | 11.2   | 22.72           | 88.9  | 5.1    | 22.70           | 90.8  | 7.7    | 24.27           | 97.1  | 4.0    |
|         | 45            | 44.15           | 98.1  | 0.9    | 44.78           | 99.5  | 5.4    | 40.15           | 89.2  | 4.3    | 47.71           | 106.0 | 0.5    |

RR: Relative recovery

## บทที่ 5

### บทสรุปงานวิจัย และข้อเสนอแนะ

#### 5.1 บทสรุปงานวิจัย

โครงการวิจัยนี้ได้นำเสนอวิธีการใหม่ของการสกัดและเพิ่มความเข้มข้นแบบ in-situ phase formation ในขั้นตอนเดียว โดยการเตรียมผ่านดับเบิลไฮดรอกไซด์หรือชั้นคู่ไฮดรอกไซด์ (Layered double hydroxides หรือ LDHs) และมีการเติมสารลดแรงตึงผิวประจุลบเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดของสารเป้าหมายที่ไม่มีประจุ ซึ่งในงานวิจัยนี้ ทำการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรียจำนวน 4 ชนิด (Triflumuron, Hexaflumuron, Fluazuron และ Flufenoxuron) ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารเป้าหมายกลุ่มนี้ สามารถแยกสารได้ภายในเวลา 6 นาที จากนั้นประยุกต์วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ สำหรับการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงในตัวอย่างน้ำ และตัวอย่างน้ำผึ้ง

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารเป้าหมายด้วยวิธี LDHs 0.5 mol/L NaOH (150  $\mu$ L), 120  $\mu$ L  $Mg^{2+}$  (300 mmol/L), 40  $\mu$ L  $Al^{3+}$  (300 mmol/L) และ 5 mmol/L SDS (500  $\mu$ L) โดยสารละลายดังกล่าวนี้สามารถเติมลงไปได้ต่อเนื่องในครั้งเดียวในกระบวนการสกัด หลังจากนั้น นำสารละลายไปทำการรอร์เทกซ์เป็นเวลา 20 วินาที ที่อัตราเร็ว 1,800 รอบต่อนาที และทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเฟสที่สกัดได้ โดยใช้อัตราการปั่นเหวี่ยงที่ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการละลายเฟสที่สกัดได้ด้วยกรดฟอร์มิกปริมาตร 200 ไมโครลิตร ก่อนการวิเคราะห์ด้วย HPLC

ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมข้างต้น พบว่า ได้ช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วง 0.3 – 200 ไมโครกรัมต่อลิตร ชีตจำกัดการตรวจวัดและขีดจำกัดของการหาปริมาณอยู่ในช่วง 0.1 – 0.3 และ 0.3 – 1.0 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ให้แฟกเตอร์การเพิ่มความเข้มข้นอยู่ในช่วง 12.5 – 23.7 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการที่ไม่ผ่านการเพิ่มความเข้มข้น (วิเคราะห์โดยตรง) ความเที่ยงของวิธี (Precisions) ทดสอบที่ระดับความเข้มข้นของสารเป้าหมาย 100 ไมโครกรัมต่อลิตร สำหรับการวิเคราะห์ในวันเดียวกัน ( $n=6$ ) และหลายวัน ( $n=6 \times 3$  วัน) พบว่า ให้ความเที่ยงที่ยอมรับ โดยค่าร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ต่ำกว่า 0.60 และ 11.2 สำหรับเวลาในการคงอยู่และพื้นที่ใต้พีคของสารเป้าหมาย

ประยุกต์วิธีที่พัฒนาขึ้นสำหรับการวิเคราะห์การตกค้างของสารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรียในตัวอย่างน้ำชนิดต่าง ๆ (3 ชนิด) และตัวอย่างน้ำผึ้ง (4 ยี่ห้อ) พบว่า ไม่พบการตกค้างของสารกำจัดแมลงในตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ อย่างไรก็ตาม ทำการศึกษาความแม่นยำของวิธีโดยประเมินค่าร้อยละการกลับคืนของสารเป้าหมายที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน (7.5 25 และ 45 ไมโครกรัมต่อลิตร) พบว่า ให้ร้อยละการกลับคืนที่ดีและยอมรับได้ ในช่วง 78.4 – 117.8 และ 72.7 – 117.9 สำหรับตัวอย่างน้ำ และน้ำผึ้ง ตามลำดับ โดยค่าร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่า 13.5

วิธี LDHs ที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถทำการสกัดและเพิ่มความเข้มข้นของสารเป้าหมายได้ภายในขั้นตอนเดียว รวดเร็ว ทำได้ง่าย และมีประสิทธิภาพที่ดี สามารถใช้เป็นวิธีอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในการสกัดสารเป้าหมายที่ไม่มีประจุ และขยายผลการศึกษาในวงกว้างต่อไปได้

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

โครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์นี้ ได้ทำการศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิวประจุลบเพียงชนิดเดียว คือ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) เท่านั้น ดังนั้น ควรศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิวประจุลบชนิดอื่น ๆ ด้วย เพื่อให้ได้ผลการวิจัยเชิงเปรียบเทียบ และต่อยอดได้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น นอกจากนี้ ควรนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์สารตกค้างดังกล่าวในตัวอย่างสิ่งแวดล้อมอื่น เช่น ดิน หรือตัวอย่างอาหาร ผักผลไม้ และผลิตภัณฑ์ที่ผลิตมาจากผักหรือผลไม้ เพื่อจะได้เห็นภาพรวมในการประเมินประสิทธิภาพการสกัด และความเป็นไปได้ของการประยุกต์ใช้ของวิธีที่พัฒนาขึ้น

## เอกสารอ้างอิง

- Abdellaoui, K., Pavlovic, I., Bouhent, M., Benhamou, A., Barriga, C., A comparative study of the amaranth azo dye adsorption/desorption from aqueous solutions by layered double hydroxides. *App. Clay Sci.* 2017, 143, 142 – 150.
- Asiabi, H., Yamini, Y., Shamsayei, M., Tahmasebi, E., Highly selective and efficient removal and extraction of heavy metals by layered double hydroxides intercalated with the diphenylamine-4-sulfonate: A comparative study. *Chem. Eng. J.* 2017, 323, 212 – 223.
- Benício, L.P.F., Silva, R.A., Lopes, J.A., Eulálio, D., dos Santos, R.M.M., de Aquino, L.A., Vergütz, L., Novais, R.F., da Costa, L.M., Pinto, F.G., Tronto, J., Layered double hydroxides: nanomaterials for applications in agriculture, *R. Bras. Ci. Solo* 2015, 39, 1–13.
- Brutti, M., Blasco, C., Pico, Y., Determination of benzoylurea insecticides in food by pressurized liquid extraction and LC-MS. *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 1 – 10.
- Bu, R., Chen, F., Li, J., Li, W., Yang, F., Adsorption capability for anionic dyes on 2-hydroxyethylammonium acetate-intercalated layered double hydroxide. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 2016, 511, 312 – 319.
- Carro, A.M., Garcia-Rodriguez, D., Gonzalez-Siso, P., Lorenzo, R.A., Determination of chemotherapeutic agents in fish and shellfish by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 2012, 35, 2866 – 2874.
- Chatterjee, A., Bharadiya, P., Hansora, D., Layered double hydroxide based bionanocomposites. *Appl. Clay Sci.* 2019, 177, 19 – 36.
- Chen, H., Qian, G., Ruan, X., Frost, R.L., Removal process of nickel(II) by using dodecyl sulfate intercalated calcium aluminum layered double hydroxide. *App. Clay Sci.* 2016, 132-133, 419 – 424.
- Chen, L., Chen, J., Guo, Y., Li, J., Yang, Y., Xu, L., Fu, F., Study on the simultaneous determination of seven benzoylurea pesticides in Oolong tea and their leaching characteristics during infusing process by HPLC-MS/MS. *Food Chem.* 2014, 143, 405 – 410.
- de la Pena, A.M., Mahedero, M.C., Bautista-Sanchez, A., Monitoring of phenylurea and propanil herbicides in river water by solid-phase-extraction high performance

- liquid chromatography with photoinduced-fluorimetric detection. *Talanta* 2003, 60, 279 – 285.
- de Oliveira, H.B., Wypych, F., Evaluation of layered zinc hydroxide nitrate and zinc/nickel double hydroxide salts in the removal of chromate ions from solutions. *J. Solid State Chem.* 2016, 243, 136 – 145.
- Di, X., Wang, X., Liu, Y., Guo, X., Di, X., Dissolvable layered double hydroxide as a sorbent in dispersive micro-solid phase extraction for the determination of acidic quinolones in honey by HPLC. *J. Sep. Sci.* 2019, 42, 2255 – 2262.
- Document N° SANCO/10232/2006, Quality control procedures for pesticide residues analysis, 2006, [http://ec.europa.eu/food/plant/resources/qualcontrol\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/resources/qualcontrol_en.pdf)
- Dong, H., Wu, L., Zhang, L., Chen, H., Gao, C., Clay nanosheets as charged filler materials for High-performance and fouling-resistant thin film nanocomposite membranes. *J. Membrane Sci.* 2015, 494, 92 – 103
- Du, L., Wang, X., Liu, T., Li, J., Wang, J., Gao, M., Wang, H., Magnetic solid-phase extraction of organophosphorus pesticides from fruit juices using NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@polydopamine/Mg/Al-layered double hydroxides nanocomposites as an adsorbent. *Microchem. J.* 2019, 150, 104128.
- Gissawong, N., Sansuk, S., Srijaranai, S., The alternative use of layered double hydroxides as extraction medium coupled with microcomplexation for determination of phosphate in water samples. *Spectrochim. Acta A* 2017, 173, 994 – 1000.
- Grover, A., Kaur, R., Mohiuddin, I., Malik, A.K., Aulakh, J.S., Tsang, Y.F., Kim, K.-Y., Surfactant-modified Zn/Al-layered double hydroxides for efficient extraction of alkyl phenols from aqueous samples. *Environ. Res.* 2019, 177, 108605.
- Grover, A., Mohiuddin, I., Malik, A.K., Aulakh, J.S., Kim, K.-H., Zn-Al layered double hydroxides intercalated with surfactant: Synthesis and applications for efficient removal of organic dyes. *J. Clean Prod.* 2019, 240, 118090.
- Guan, W., Zhou, W., Han, D., Zhang, M., Lu, C., Lin, J.-M., One-step enrichment and chemiluminescence detection of sodium dodecyl benzene sulfonate in river water using Mg-Al-carbonate layered double hydroxides. *Talanta* 2014, 120, 268 – 273.
- Huang, X., Qiao, K., Li, L., Liu, G., Xu, X., Lu, R., Gao, H., Xu, D., Preparation of a magnetic grapheme/polydopamine nanocomposite for magnetic dispersive solid-phase extraction of benzoylurea insecticides in environmental water samples. *Sci. Rep.* 2019, 9, 8919.

- Huang, Y., Zhou, Q., Xie, G., Liu, H., Lin, H., Titanium dioxide nanotubes for solid phase extraction of benzoylurea insecticides in environmental water samples, and determination by high performance liquid chromatography with UV detection. *Microchim. Acta*, 2011, 172, 109 – 115.
- Ji, H., Wu, W., Li, F., Yu, X., Fu, J., Jia, L., Enhanced adsorption of bromate from aqueous solutions on ordered mesoporous Mg-Al layered double hydroxides (LDHs). *J. Hazard. Mater.* 2017, 334, 212 – 222.
- Kim, J.-H., Seo, J.-S., Moon, J.-K., Kim, J.-H., Multi-residue method development of 8 benzoylurea insecticides in mandarin and apple using high performance liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Korean Soc. App. Bi.* 2013, 56, 47 – 54.
- Lei, C., Pi, M., Kuang, P., Guo, Y., Zhang, F., Organic dye removal from aqueous solutions by hierarchical calcined Ni-Fe layered double hydroxide: Isotherm, kinetic and mechanism studies. *J. Colloid Interface Sci.* 2017, 496, 158 – 166.
- Liu, X., Wang, C., Wang, Z., Wu, Q., Wang, Z., Nanoporous carbon derived from a metal organic framework as a new kind of adsorbent for dispersive solid phase extraction of benzoylurea insecticides. *Microchim. Acta* 2015, 182, 1903 – 1910.
- Liu, Y.-L., Zhou, J.-B., Zhao, R.-S., Chen, X.-F., Using Zn/Al layered double hydroxide as a novel solid-phase extraction adsorbent to extract polycyclic aromatic hydrocarbons at trace levels in water samples prior to the determination of gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, 404, 1603 – 1610.
- Liu, Z., Lin, X., Liu, X., Li, J., Zhou, W., Gao, H., Zhang, S., Lu, R., Magnetic nanoparticles modified with hyperbranched polyamidoamine for the extraction of benzoylurea insecticides prior to their quantitation by HPLC. *Microchim. Acta* 2019, 186, 351.
- Lorenzo, R.A., Pais, S., Racamonde, I., Garcia-Rodriguez, D., Carro, A.M., Pesticides in seaweed: optimization of pressurized liquid extraction and in-cell clean-up and analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010, 404, 173 – 181.
- Mahjoubi, F.Z., Khalidi, A., Elhalil, A., Barka, N., Characteristics and mechanisms of methyl orange sorption onto Zn/Al layered double hydroxide intercalated by dodecyl sulfate anion. *Scientific African* 2019, 6, e00216.

- Markoglou, A.N., Bempelou, E.D., Liapis, K.S., Ziogas, B.N., Determination of benzoylurea insecticide residues in tomatoes by high-performance liquid chromatography with ultraviolet-diode array and atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry detection. *J. AOAC Int.* 2007, 90, 1395 – 1401.
- Martinez-Galera, M., Lopez-Lopez, T., Gil-Garcia, M.D., Martinez-Vidal, J.L., Vazquez, P., Determination of benzoylureas in tomato by high-performance liquid chromatography using continuous on-line post-elution photoirradiation with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 2001, 918, 79 – 85.
- Mei, M., Huang, X., Liao, K., Yuan, D., Sensitive monitoring of benzoylurea insecticides in water and juice samples treated with multiple monolithic fiber solid-phase microextraction and liquid chromatographic analysis. *Anal. Chim. Acta* 2015, 860, 29 – 36.
- Mensah, J.K., Lundanes, E., Greibrokk, T., Holen, B., Determination of diflubenzuron in apples by gas chromatography. *J. Chromatogr. A* 1997, 765, 85 – 90.
- Millidis, G.E., Tsiropoulos, N.G., Aplada-Sarlis, P.G., High-performance liquid chromatographic determination of benzoylurea insecticides residues in grapes and wine using liquid and solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A* 1999, 835, 113 – 120.
- Mishra, G., Dash, B., Pandey, S., Layered double hydroxides: A brief review from fundamentals to application as evolving biomaterials. *Appl. Clay Sci.* 2018, 153, 172 – 186.
- Oliveira, H.B., Wypych, F., Evaluation of layered zinc hydroxide nitrate and zinc/nickel double hydroxide salts in the removal of chromate ions from solutions. *J. Solid State Chem.* 2016, 243, 136 – 145.
- Peng, G., He, Q., Mmereki, D., Lu, Y., Zhong, Z., Liu, H., Pan, W., Zhou, G., Chen, J., Dispersive solid-phase extraction followed by vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of a floating organic droplet for the determination of benzoylurea insecticides in soil and sewage sludge. *J. Sep. Sci.* 2016, 39, 1258 – 1265.
- Phiroonsoontorn, N., Sansuk, S., Santaladchaiyakit, Y., Srijaranai, S., The use of dissolvable layered double hydroxide components in an in situ solid-phase extraction for chromatographic determination of tetracyclines in water and milk samples. *J. Chromatogr. A* 2017, 1519, 38 – 44.
- Rajabi, M., Arghavani-Beydokhit, S., Barfi, B., Asghari, A., Dissolvable layered double hydroxide as an efficient nanosorbent for centrifugeless air-agitated dispersive

- solid-phase extraction of potentially toxic metal ions from bio-fluid samples. *Anal. Chim. Acta* 2017, 957, 1 – 9.
- Ruan, C., Zhao, X., Liu, C., Determination of diflubenzuron and chlorbenzuron in fruits by combining acetonitrile-based extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography. *J. Sep. Sci.* 2015, 38, 2931 – 2937.
- Sajid, M., Basheer, C., Layered double hydroxides: Emerging sorbent materials for analytical extractions. *Trends Anal. Chem.* 2016, 75, 174 – 182.
- Saraji, M., Ghani, M., Dissolvable layered double hydroxide coated magnetic nanoparticles for extraction followed by high performance liquid chromatography for the determination of phenolic acids in fruit juices. *J. Chromatogr. A* 2014, 1366, 24 – 30.
- Tang, S., Lee, H.K., Application of dissolvable layered double hydroxides as sorbent in dispersive solid-phase extraction and extraction by co-precipitation for the determination of aromatic acid anions. *Anal. Chem.* 2013, 85, 7426 – 7433.
- Vazquez, M.M.P., Vazquez, P.P., Galera, M.M., Moreno, A.U., Comparison of two ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction approaches for the determination of benzoylurea insecticides in wastewater using liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry: Evaluation of green parameters. *J. Chromatogr. A* 2014, 1356, 1 – 9.
- Vazquez, P.P., Mughari, A.R., Galera, M.M., Solid-phase microextraction for the determination of benzoylureas in orange juice using liquid chromatography combined with post-column photochemically induced fluorimetry derivatization and fluorescence detection. *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 56 – 63.
- Wang, C.-H., Ma, X.-X., Wang, C., Wu, Q.-H., Wang, Z., Poly(vinylidene fluoride) membrane based thin film microextraction for enrichment of benzoylurea insecticides from water samples followed by their determination with HPLC. *Chinese Chem. Letters.* 2014, 25, 1625 – 1629.
- Wang, H., Hu, L., Li, W., Lu, R., Zhang, S., Zhou, W., Gao, H., A rapid and simple pretreatment method for benzoylurea insecticides in honey samples using in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction based on the direct solidification of ionic liquids. *J. Chromatogr. A* 2016, 1471, 60 – 67.
- Wang, H., Hu, L., Li, W., Yang, X., Lu, R., Zhang, S., Zhou, W., Gao, H., Li, J., In-syringe dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of ionic

- liquids for the determination of benzoylurea insecticides in water and tea beverage samples. *Talanta* 2017, 162, 625 – 633.
- Wang, J., Jiao, C., Li, M., Wang, X., Wang, C., Wu, Q., Wang, Z., Porphyrin based porous organic polymer modified with Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as an efficient adsorbent for the enrichment of benzoylurea insecticides. *Microchim. Acta* 2018, 185, 36.
- Xi, X., Yang, M., Shen, G., Wu, X., Lu, R., Zhou, W., Zhang, S., Gao, H., Pipette vial dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography for the determination of benzoylurea insecticide in fruit juice. *J. Sep. Sci.* 2016, 39, 391 – 398.
- Xiaoli, G., Yanting, L., Bo, Z., Lingling, Y., Xin, D., Xin, D., Development of dispersive solid phase extraction based on dissolvable Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-layered double hydroxide for high-performance liquid chromatographic determination of phenoxy acid herbicides in water samples. *Microchem. J.* 2020, 152, 104443.
- Yang, M., Wu, X., Xi, X., Zhang, P., Yang, X., Lu, R., Zhou, W., Zhang, S., Gao, H., Li, J., Using  $\beta$ -cyclodextrin/attapulgitite-immobilized ionic liquid as sorbent in dispersive solid-phase microextraction to detect the benzoylurea insecticide contents of honey and tea beverages. *Food Chem.* 2016, 197, 1064 – 1072.
- Yang, M., Xi, X., Yang, X., Bai, L., Lu, R., Zhou, W., Zhang, S., Gao, H., Determination of benzoylurea insecticides in environmental water and honey samples using ionic-liquid-mingled air-assisted liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplets. *RSC Adv.* 2015, 5, 25572 – 25580.
- Yang, M., Zhang, P., Hu, L., Lu, R., Zhou, W., Zhang, S., Gao, H., Ionic liquid-assisted liquid-phase microextraction based on the solidification of floating organic droplets combined with high performance liquid chromatography for the determination of benzoylurea insecticide in fruit juice. *J. Chromatogr. A* 2014, 1360, 47 – 56.
- Yang, X., Gao, K., Ye, Y., Yang, M., Li, J., Gao, H., Zhang, S., Zhou, W., Lu, R., Facile synthesis of multifunctional attapulgitite/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/polyaniline nanocomposites for magnetic dispersive solid phase extraction of benzoylurea insecticides in environmental water samples. *Anal. Chim. Acta* 2016, 934, 114 – 121.
- Zhang, B., Dong, Z., Sun, D., Wu, T., Li, Y., Enhanced adsorption capacity of dyes by surfactant-modified layered double hydroxides from aqueous solution. *J. Ind. Eng. Chem.* 2017, 49, 208 – 218.

- Zhang, J., Li, M., Yang, M., Peng, B., Li, Y., Zhou, W., Gao, H., Lu, R., Magnetic retrieval of ionic liquids: Fast dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of benzoylurea insecticides in environmental water samples. *J. Chromatogr. A* 2012, 1254, 23 – 29.
- Zhang, M., Zhao, C., Li, J., Xu, L., Wei, F., Hou, D., Sarkar, B., Ok, Y.S., Organo-layered double hydroxides for the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil washing effluents containing high concentrations of surfactants. *J. Hazard. Mater.* 2019, 373, 678 – 686.
- Zhang, P., Cui, X., Yang, X., Zhang, S., Zhou, W., Gao, H., Lu, R., Dispersive micro-solid-phase extraction of benzoylurea insecticides in honey samples with a  $\beta$ -cyclodextrin-modified attapulgite composite as sorbent. *J. Sep. Sci.* 2016, 39, 412 – 418.
- Zhao, X., Liu, S., Wang, P., Tang, Z., Niu, H., Cai, Y., Wu, F., Wang, H., Meng, W., Giesy, J.P., Surfactant-modified flowerlike layered double hydroxide-coated magnetic nanoparticles for preconcentration of phthalate esters from environmental water samples. *J. Chromatogr. A* 2015, 1414, 22 – 30.
- Zhou, J., Liu, R., Song, G., Zhang, M., Determination of Carbamate and Benzoylurea Insecticides in Peach Juice Drink by Floated Organic Drop Microextraction–High Performance Liquid Chromatography. *Anal. Lett.* 2009, 42, 1805 – 1819.
- Zhou, Q., Wang, G., Xie, G., Dispersive liquid-phase microextraction in combination with HPLC for the enrichment and rapid determination of benzoylurea pesticides in environmental water samples. *J. Sep. Sci.* 2013, 36, 2323 – 2329.
- Zhou, Q., Wu, W., Huang, Y., Analysis of benzoylurea insecticides in water samples with TiO<sub>2</sub> nanotube array micro-solid phase extraction coupled to high performance liquid chromatography. *RSC Adv.* 2014, 4, 45946 – 45952.

## Output ที่ได้จากโครงการ

ผลงานที่อยู่ระหว่างพิจารณาตีพิมพ์

1. **Yanawath Santaladchaiyakit\*** and Supalax Srijaranai. In-situ dissolvable Mg/Al layered double hydroxides in the presence of surfactant as extraction and preconcentration method for high performance liquid chromatographic analysis of benzoylurea insecticide residues in water and honey samples. Submitted to *Journal of Separation Science* (Submitted date: 3 May 2020)

---

(\*) Corresponding author

## ภาคผนวก

ต้นฉบับผลงานวิจัยที่กำลังดำเนินการตีพิมพ์เผยแพร่

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

การใช้ประโยชน์ด้านวิชาการ

ผลการดำเนินงานจากโครงการวิจัยเรื่อง “วิธีการเพิ่มความเข้มข้นด้วยการเกิดเฟสแบบ in situ สำหรับการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรียด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงในตัวอย่างอาหารและสิ่งแวดล้อม” สามารถสร้างทางเลือกใหม่สำหรับเทคนิคการสกัดแบบ LDHs ที่ไม่จำเป็นต้องผ่านกระบวนการสังเคราะห์ที่ยุ่งยาก รวมทั้งสามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการสกัดสารเป้าหมายที่ไม่มีประจุและไม่มีขั้วได้ ซึ่งเป็นการต่อยอดงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับวิธี LDHs ให้กว้างขวางมากขึ้น โดยเฉพาะการนำมาประยุกต์ใช้ในแขนงวิชาเคมีวิเคราะห์ได้หลากหลายมากขึ้น



**In-situ dissolvable Mg/Al layered double hydroxides in the presence of surfactant as extraction and preconcentration method for high performance liquid chromatographic analysis of benzoylurea insecticide residues in water and honey samples**

|                               |                                                                                                                                                                   |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Journal:                      | <i>Journal of Separation Science</i>                                                                                                                              |
| Manuscript ID                 | jssc.202000511                                                                                                                                                    |
| Wiley - Manuscript type:      | Original Paper                                                                                                                                                    |
| Date Submitted by the Author: | 03-May-2020                                                                                                                                                       |
| Complete List of Authors:     | Santaladchaiyakit, Yanawath; Rajamangala University of Technology Isan, Chemistry, Faculty of Engineering<br>Srijaranai, Supalax; Khon Kaen University, Chemistry |
| Keywords:                     | layered double hydroxide, sodium dodecyl sulfate, high-performance liquid chromatography, environmental sample, food sample                                       |
|                               |                                                                                                                                                                   |

SCHOLARONE™  
Manuscripts

**In-situ dissolvable Mg/Al layered double hydroxides in the presence of surfactant as extraction and preconcentration method for high performance liquid chromatographic analysis of benzoylurea insecticide residues in water and honey samples**

Yanawath Santaladchaiyakit<sup>1,\*</sup> and Supalax Srijaranai<sup>2</sup>

**A running title:** Dissolvable layered double hydroxides and HPLC for analysis of benzoylureas

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Engineering, Rajamangala University of Technology Isan, Khon Kaen Campus, Khon Kaen 40000, Thailand

<sup>2</sup>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

\*Corresponding author: Tel.: +66 4333 8870 ext. 2309, 2390; Fax: +66 4333 8869

E-mail: sanyanawa@gmail.com, yanawath.sa@rmuti.ac.th (Y. Santaladchaiyakit)

## Abstract

A rapid and simple preconcentration method using *in situ* dissolvable phase formation based on layered-double hydroxides (*is*-dissolvable LDHs) in the presence of surfactant prior to high performance liquid chromatography-photodiode array detection (HPLC-PDA) was developed for the analysis of benzoylurea insecticides (BUs) in water and honey samples. The proposed *is*-dissolvable LDHs for extraction of target analytes was prepared in one step by the subsequent addition of the solutions of sodium hydroxide, magnesium ion, aluminium ion, and sodium dodecyl sulfate, into the sample solution containing the target BUs. The co-precipitate phase was simply obtained after centrifugation, and the phase was then dissolved with formic acid before analysis by HPLC. Under the selected conditions, the developed method provided enrichment factor of 12.5 – 23.7, LODs in the range of 0.1 – 0.3 µg/L, and LOQs in the range of 0.3 – 1.0 µg/L. The proposed method was successfully applied for the contaminant analysis of BUs in water and honey samples with good recoveries ranging from 78.4 – 117.8% and 72.7 – 117.9% for water and honey samples, respectively.

**Keywords:** layered double hydroxide; sodium dodecyl sulfate; high-performance liquid chromatography; environmental sample; food sample

## 1. Introduction

Benzoylurea insecticides (BUs) such as triflumuron, chlorfluazuron, teflubenzuron, hexalumuron, flufenoxuron, and flucycloxuron were firstly introduced in 1978 by Bayer Company (Germany) [1]. BUs have been increasingly and widely used as promising substances for pest control because of their high biological activity, easy biodegradation, low environmental persistence, and low mammalian toxicity [2]. The insecticidal mechanism of BUs acts on the larval stages by inhibiting the chitin synthesis and blocks the molting process of target insects [2, 3]. Although BUs provide more benefits to agricultural production, their wide application leaves undesirable residues in environmental samples (e.g., water and soil) and on the surface of agricultural products and the residues can be transferred to processed agricultural products [2]. BUs has also been defined as high toxic to aquatic organisms by the European Food Safety Authority (EFSA), the European Chemical Agency (ECHA), and the World Health Organization (WHO) [3]. The contamination of these insecticides in environmental and food samples may lead to chronic exposure and long-term toxicity effects [4]. To protect the consumers, the maximum residue limits (MRLs) have been legislated by various national and international standards such as the European Union (EU). The default value of all BUs is 0.01 mg/kg [2]. Flufenoxuron and teflubenzuron have MRLs in the range of 0.01 – 5 mg/kg in various sample matrices such as fruit, vegetables, and animal products [1]. Thus, it is of great importance to control and determine the contamination of BUs in environmental and food samples using sensitive, rapid, reliable, and simple methods.

Since BUs is thermally unstable, the determination of BUs by gas chromatography (GC) was limited [5]. The much better and widely used technique for the analysis of BUs was liquid chromatography (LC) with various effective detection modes such as UV [2, 4, 6 – 13], fluorescence [14] and mass spectrometry [1, 3, 15 – 17]. A suitable sample preparation and preconcentration is very important step required before instrumental analysis of trace level of

74 BUs. Traditionally, liquid-liquid extraction (LLE) [18, 19] and solid-phase extraction (SPE)  
75 [20, 21] have been used. However, these techniques are time-consuming and require large  
76 volume of organic extraction solvents. Minimized extraction solvent-based microextraction  
77 method using halogenated solvents [22], floating organic solvents [2, 4], and ionic liquids [10,  
78 11, 23–26] for preconcentration of BUs have further been developed. Another interesting  
79 innovative material based on magnetic nanoparticles is popular as a new type for  
80 preconcentration of BUs [24, 27–29]. Although these mentioned techniques were successful for  
81 applications purposed, some drawbacks were also found such as (1) using toxic halogenated  
82 solvents (as in conventional dispersive liquid-liquid microextraction or DLLME), (2) required  
83 special extraction devices (as in case of floating organic solvents used), (3) relative expensive  
84 (in case of ionic liquids used), and needed complicated synthesis steps for magnetic  
85 nanoparticles.

86 Recently, the minimized, efficient, and environmentally friendly extraction methods  
87 have been developed. Interestingly, layered double hydroxides (LDHs) have been served as *in*  
88 *situ* emerging sorbent materials. The LDHs as sorbent have firstly introduced by Tang and Lee  
89 in 2013 [30] and have recently been reviewed and summarized [31–33]. LDHs are two-  
90 dimensional nanostructure materials comprising positively charged layers of metal hydroxides  
91 with charge-balancing anions and some water molecules located in between the layers [31]. The  
92 general formula is  $[M_{1-x}^{2+}M_x^{3+}(OH)_2]^{x+}[X_{x/m}^{m-}] \cdot nH_2O$ , where  $M^{2+}$  and  $M^{3+}$  are divalent and  
93 trivalent metal cations that occupy octahedral positions in the brucite-like layer, and  $X^{m-}$  is  
94 structural balance anions [34]. Different divalent and trivalent ions can be used in the formation  
95 of LDHs. However,  $Mg^{2+}$  and  $Al^{3+}$  are the most useful ions. Mg-Al-LDHs can be easily formed  
96 by mixing solutions of magnesium and aluminium salts in the alkaline NaOH solution (pH ~  
97 10). The resulting white precipitate was immediately formed. This process can be called as *in*  
98 *situ* phase formation. The unique properties of LDHs include their low cost, two-dimensional

99 structure, high surface area, positive charge on the surface, high anion-exchange capacities,  
100 tunable interior architecture, and resistant to changes upon heating [31]. In addition, LDHs have  
101 been served as novel class of green adsorbents in environmental purification because of their  
102 non-toxicity. In applications, LDHs have been used as adsorbents for the extraction and/or  
103 removal of various toxic metals [35–37], inorganic anions [38–40], polycyclic aromatic  
104 hydrocarbons [41], phenolic acids [42], aromatic acid anions [30], antibiotics [43, 44], and  
105 anionic dyes [45–47]. The developments of modified architecture of general LDHs using  
106 anionic surfactants (e.g., sodium dodecyl sulfate (SDS), and sodium dodecylbenzene sulfonate)  
107 as anionic-intercalated agents to change the LDHs properties from hydrophilic to hydrophobic  
108 have also been demonstrated for efficient adsorption/removal of various organic compounds  
109 [48–52]. In addition, surfactant-modified LDHs-coated magnetic nanoparticles have also been  
110 developed for HPLC analysis of various pollutants including phthalate esters [53], phenoxy  
111 acid herbicides [54], and organophosphorus pesticides [55]. However, most synthesized LDHs  
112 sorbents required long times (e.g., > 10 h) for the synthesis steps and sometimes special  
113 conditions such as high temperature and pressure were also controlled. The particle size,  
114 morphology and surface area of the synthesized LDHs may lead to limitation in the  
115 applications. In addition, “memory effect” of the synthesized LDHs for their reusability may  
116 be found [31, 48] and large consumption of organic solvent as eluent was also required. Thus,  
117 a simple method without synthesis of the sorbents using dissolvable LDHs in the presence of  
118 anionic surfactant to enhance the performance for preconcentrating non-ionic analytes is of  
119 interest and it could be extended to develop as the alternatively effective methodology. To the  
120 best of our knowledge, the application of dissolvable LDHs in the presence of anionic surfactant  
121 to the analysis of BUs has not been reported. In addition, one-step preconcentration methods  
122 without thermal synthesis procedure of LDHs sorbent are interesting strategies, especially for  
123 BUs analysis in environmental and food samples.

In this work, *in situ* phase formation based on Mg/Al LDHs in the presence of anionic surfactant for the extraction and preconcentration of non-ionic BUs (e.g., fluazuron, flufenoxuron, hexaflumuron, and triflumuron) and analysis by HPLC was developed. SDS was used as anionic surfactant in this study to enhance the extraction performance of LDHs for the target insecticides. Factors influencing extraction performance of LDHs were also investigated and optimized. The developed method was then applied for the BUs residues analysis in environmental water and honey samples.

## 2. Experimental

### 2.1 Chemicals and reagents

All reagents used in this research were of analytical reagent grade or higher. The analytical standards of benzoylurea insecticides were purchased from Sigma-Aldrich (Germany) including Fluazuron and Flufenoxuron, while Triflumuron, and Hexaflumuron were obtained from Dr.Ehrestorfer GmbH (Germany). The stock solutions (1,000 mg/L) of each insecticide were prepared at by dissolving an appropriate amount in a few amounts (500 – 1,000  $\mu$ L) of acetone and further diluted with methanol (MeOH). Acetone was purchased from (ANaPURE, New Zealand) and NaOH was purchased from Kemaus (Australia). Magnesium chloride ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) and aluminium chloride ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) were purchased from Ajax Finechem (Australia). Sodium dodecyl sulphate (SDS) was obtained from BDH Prolabo® (Belgium). Formic acid, MeOH, and acetonitrile (ACN) were purchased from Merck (Germany). All aqueous solutions were prepared in deionized water (RCI Labscan Ltd., Thailand).

### 2.2 Instruments

The HPLC system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) consisted of the DGU-20As in-line degasser, an LC 20AD pump, and a photo-diode array detector (PDA). LCsolution

software (Shimadzu) was used to utilize and control the system as well as for the acquisition and data analysis. An InertSustain C8 column (4.6×150 mm, 5.0 µm) connected to a guard InertSustain C8 column (4.0×10 mm, 5 µm) (GL Science, Japan) was used for separation of target benzoylurea insecticides. Centrifugation (Nuve, Turkey) was used for phase separation completely. A vortex mixer (Scientific Industries, Inc., USA) was also used.

### 2.3 HPLC analysis condition

The separation of the target BUs was carried out on a reversed-phase HPLC system with the elution using ACN and 0.1% (v/v) formic acid, a flow rate of 1.0 mL/min and detection at 254 nm. The temperature was kept at 25 °C and the sample injection volume was 20 µL. The separation of target BUs was completely obtained within 6 min using 78% ACN. Before the next run, the separation column was washed with 95% ACN and 35% ACN for 10 min to elute excess surfactant.

### 2.4 The *in situ* dissolvable LDH procedure

Standard or sample solution (10.0 mL) in the conical centrifuge tube (15-mL capacity) was conditioned with 0.5 M NaOH (150 µL). Then, the solutions of 120 µL Mg<sup>2+</sup> (300 mM) and 40 µL Al<sup>3+</sup> (300 mM) were added and followed by the addition of 500 µL SDS (ca. 0.25 mM). After that, a mixture solution was manually shaken for 5 s and vortex at 1800 rpm for 20 s. Subsequently, the solution was centrifuged at 3500 rpm for 5 min to completely separate the precipitate phase. **Figure S1** shows steps of preconcentration procedure, while the photographs of the solutions during extraction and after centrifugation are provided in **Figure S2**. After the upper aqueous phase was removed, the precipitate phase was then dissolved with conc. formic acid (200 µL) and vortex for 10 s to make complete dissolution before subjecting it (20 µL) to HPLC for the analysis.

## 2.5 Water and honey analyses

Water samples (e.g., surface, pond, and lake) were random collected from sample sources in Muang district, Khon Kaen, Thailand. All water samples were firstly filtered through double Whatman filter paper No.1 to remove the particulate matter and then passed through 0.45  $\mu\text{m}$  membranes before the analysis. Honey samples (including different 4 brands of natural flower and wild honey) were purchased from supermarket in Khon Kaen. Each honey sample (5.0 g) was weighed and diluted with deionized water to 50 mL and then passed through 0.45  $\mu\text{m}$  nylon membrane filter prior to analysis.

Aliquot of 10 mL sample solution was subsequently subjected to extraction and preconcentration procedure and followed analysis by HPLC. For the accuracy evaluation, the studied samples were fortified with the standard BUs at different concentrations of 7.5, 25, and 45  $\mu\text{g/L}$  prior to the extraction and preconcentration.

## 3. Results and discussion

The parameters affecting the extraction efficiency of target BUs were investigated including concentrations of Mg/Al and their volume ratios, volume of NaOH, concentration of SDS, vortex agitation, and centrifugation. In this study, one-parameter-at-a-time method was used for the optimization of each parameter. Peak areas of each studied compound were used for evaluating the performance of extraction and preconcentration method.

### 3.1 Effect of concentrations of $\text{Mg}^{2+}$ and $\text{Al}^{3+}$ ions and their volume ratios

In this study, the concentrations of  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Al}^{3+}$  ions were investigated in the range of 100 – 700 mM, at a fix volume ratio (3:1) of  $\text{Mg}^{2+}/\text{Al}^{3+}$  (150/50  $\mu\text{L}$ ). As can be seen in **Figure S3a**, it was obviously found that the extraction efficiencies for most target analytes (except

TRF) increased with the increase of concentrations of  $\text{Mg}^{2+}/\text{Al}^{3+}$  up to 300 mM. Afterwards, the efficiencies significantly decreased due to the dilution effect of the large volume of formic acid required for phase dissolution. High concentrations of  $\text{Mg}^{2+}/\text{Al}^{3+}$  obtained high amount of the precipitate phase, then more volumes of formic acid were consequently required to dissolve the extract phase completely. Thus, 300 mM of both  $\text{Mg}^{2+}/\text{Al}^{3+}$  ions was chosen. The volume ratios of  $\text{Mg}^{2+}/\text{Al}^{3+}$  solution (at 3:1, v/v) were then investigated as **Figure S3b**. The results showed that the efficiency increased when the ratios increase up to 120/40  $\mu\text{L}$ , and then decreased afterwards. This may be because of a strong competition of counter anions at high  $\text{Mg}^{2+}/\text{Al}^{3+}$  salt solutions. Therefore, 120/40  $\mu\text{L}$   $\text{Mg}^{2+}/\text{Al}^{3+}$  was selected.

### 3.2 Effect of volume of sodium hydroxide solution on extraction performance

Theoretically, LDHs are normally prepared by co-precipitation method under basic condition ( $\text{pH} > 8$ ) to form metal hydroxide sorbent [30]. In this study, the effect of 0.5 M NaOH volumes was investigated as the results shown in **Figure S4**. It can be seen that the efficiency increased as the increasing of NaOH volumes consumed up to 150  $\mu\text{L}$ . After that, more volumes of NaOH could not provide more extraction efficiency of target analytes. This may be due to the complete formation of metal hydroxides and the competition of excess anions (e.g.,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ , and anionic surfactant) in the solution. Thus, 150  $\mu\text{L}$  of 0.5 M NaOH was chosen for further experiments.

### 3.3 Effect of concentration of SDS

Due to their anion exchange property of LDHs, the interlayer surfaces may be modified with organic anionic surfactants (e.g., SDS, in this study) to convert the hydrophilic surface of LDHs to hydrophobic surface [49] and resulted in improving extraction performances of hydrophobic compounds. In this study, the concentrations of SDS were investigated in the

range of 0 – 0.35 mM (Figure S5), which are lower than the critical micelle concentration (CMC) of SDS ( $\approx$  8 mM). It was clearly seen that SDS in the monomeric forms interacted with positive charge surface of LDHs can improve the extraction performance of the target BUs especially more hydrophilic analyte (e.g., TRF), up to the concentration of 0.25 – 0.30 mM. The concentration of SDS at 0.25 mM was chosen as the optimum value. The increasing of extraction efficiency of target analytes when the concentrations of SDS increase because SDS structure containing hydrophilic head group and hydrophobic tail resulted in high interaction with positively charged LDHs (i.e., strong electrostatic attraction) and target insecticides (i.e., hydrophobic like-dissolve-like or van der Waals forces). At higher concentrations of SDS caused the decreasing of extraction efficiency may be because of the limitation of interlayer space (i.e., capacity of the layers) and breakdown of LDHs formation. In the experiments, it was also found that the amount of precipitate phase obtained after centrifugation was obtained as much as the concentrations of SDS added in the extraction system. However, high precipitate phase was consequently difficult to dissolve in acidic medium and also required much more solvent volumes.

### 3.4 Effect of vortex agitation

Vortex agitation (speed and time) was evaluated in the range of 300 – 3000 rpm and 0 – 60 s. It revealed that vortex agitation seems to be insignificantly different affecting on the performance of extraction (data not shown). However, vortex speed at 1800 rpm provided the highest efficiency. Meanwhile, vortex time at 5 s gave the highest performance but better reproducibility ( $n>3$ ) in terms of intra- and inter-day precisions was obtained when the vortex times were longer than 15 s and kept constant afterwards. Thus, vortex agitation at 1,800 rpm for 15 s was selected as the optimum condition.

### 3.5 Effect of centrifugation

Centrifugation speed and time are crucial parameters for isolating the precipitate phase from whole aqueous solution. The speed (2500 – 5000 rpm) and time (1 – 10 min) was investigated (data not shown). The results indicated that high centrifugation speed is effective in isolating the phase. After 3500 rpm, extraction efficiencies decreased for most analytes. This may be due to the fact that higher speeds caused the precipitate phase re-dissolving into the aqueous solution. Meanwhile, centrifugation times investigated (at 3500 rpm) showed less effect on the extraction efficiency. In this study, centrifugation at 3500 rpm for 5 min provided the highest extraction performance for almost target BUs.

### 3.6 Effect of volume of formic acid

The extract LDHs phase can normally be dissolved in an acidic medium (pH<4) [30, 40, 43] before subjecting to HPLC. In this case, formic acid was used and investigated (150 – 300 µL) (data not shown). It was found that low volumes of formic acid (< 150 µL) cannot dissolve the precipitate phase, while large volumes (> 300 µL) caused dramatically low extraction efficiency due to the dilution effect. Therefore, 200 µL of formic acid was used to obtain the phase soluble completely.

### 3.7 Analytical performance and method evaluation

The analytical characteristics of the method were investigated such as linearity, coefficient of determination ( $R^2$ ), limits of detection (LODs), limits of quantitation (LOQs) and precision (i.e., intra-day and inter-day). The obtained results are summarized in Table 1. Linearity was in the range of 0.3 – 200 µg/L, with  $R^2$  higher than of 0.993. LODs and LOQs were defined as the concentrations of the target analytes giving the signal-to-noise ratio of 3 (S/N=3) and 10 (S/N=10), respectively. The obtained values of LODs were 0.1 – 0.3 µg/L,

while LOQs were in the range of 0.3 – 1.0 µg/L. Precisions in terms of intra-day (n=6) and inter-day (n= 6×3 days) were also evaluated and reported as the relative standard deviations (RSD) of retention time ( $t_R$ ) and peak area of the target BUs (at 100 µg/L each). Good acceptable precisions with RSD less than of 0.60 and 11.2% for  $t_R$  and peak area, respectively, were obtained.

Under the optimum condition, the extraction performance of the developed method was evaluated in terms of enrichment factor (EF). The EF can be calculated using two definitions: (1) the ratio of the extracted analyte concentration in the precipitate phase to its initial concentration in the aqueous sample solution and (2) the ratio of the slopes obtained from the preconcentration method to without preconcentration method (direct analysis). As the results shown in **Table 1**, it was found that the obtained EFs as calculated by different 2 manners were comparable (12.5 – 23.7 and 13.2 – 21.3). TRF shows the lowest EF in this study due to its high polar compound ( $K_{ow}$ ~4.24) in comparison to the other target BUs ( $K_{ow}$ ~ 5.23 – 5.97). It can be concluded that the developed method can be used as an effectively enhance signal of the target BUs when compared to that of without preconcentration (direct injection analysis) (see overlaid chromatogram in **Figure S6**).

### 3.8 Application to environmental water and honey samples

The applicability of the developed method was investigated in three different sources of water samples and four different brands of honey samples. The matrix-match calibration was used to evaluate the quantitation of target analytes in this study. The results revealed that no target BU insecticides were detected in all analyzed water and honey samples. To evaluate the applicability of the proposed method, the samples were spiked with the target BU compounds at different concentrations of 7.5, 25.0, and 45.0 µg/L, before the extraction and analysis. **Figure 1A** and **Figure 1B** show representative overlaid chromatograms of blank and spiked

water and honey samples, respectively. The relative recoveries of the target insecticides in water samples were summarized in Table S1, while the Table S2 shows the recoveries of target BUs in honey samples. The results showed that good recoveries were obtained in the range of 78.4 – 117.8% and 72.7 – 117.9% for water and honey samples, respectively, with the satisfied relative standard deviations (RSDs) below 13.5%. The acceptable recoveries (%) of 70–120 and RSDs<20%, at the investigated concentrations in the range of 10 – 100 µg/L have been set as the standard values [56]. It can be consequently indicated that the developed method was effective and reliable for the analysis of target BUs in water and honey samples.

### 3.9 Comparison of the proposed method to other relevant strategies

To highlight the outstanding points of the developed method, a comparison of the proposed method with other relevant strategies was demonstrated and summarized in Table S3. As can be seen, it is clearly found that the developed method provided LODs in comparable to those from the other strategies. The standpoints of the present method are simple procedure, short extraction time, short analysis time, use of low toxic extraction reagents, and improvement extraction performance of normal LDHs (unmodified form) by anionic surfactant without thermally synthesized sorbent. Meanwhile, other methods for analysis of BUs (e.g., SPE,  $\mu$ -SPE, magnetic-SPE, and DLLME) have some limitations such as long extraction time and complicated, required synthesis procedure of adsorbents, relatively expensive for some extraction solvent (e.g., ionic liquids), needed special extraction devices for collecting the floating-extract phase (in case of floating extraction solvents), and use of toxic organic solvent (as in conventional DLLME). Therefore, it can be assumed that the proposed method using in situ dissolvable LDH in the presence of anionic surfactant (i.e., SDS) can be used as a powerful alternative miniaturized extraction and preconcentration for the analysis of BU insecticides in water and honey samples.

#### 4. Conclusions

A one-step for the extraction and preconcentration of target benzoylurea insecticides using *in situ* dissolvable layered-double hydroxides (*is*-LDH) in the presence of SDS (as anionic surfactant for improving extraction performance) coupled with HPLC-PDA has been successfully developed for the analysis of the studied insecticides in different sources of water and honey samples. This method provided low LODs (i.e., 0.1 – 0.3 µg/L) and good acceptable recoveries (72.7 – 117.9%) in the studied samples. This developed method has also been demonstrated to be as a minimized extraction and preconcentration strategy and can be used as an alternative method to the other complicated synthesized-based extraction methods.

#### Acknowledgements

This research was financially supported by the Thailand Research Fund (TRF) and the Commission on Higher Education (CHE), through the research grant for new scholars under grant no. MRG6180071. The authors also thank to Miss Ploypiwan Pakping and Miss Tararut Wongsas for their assistance in the laboratory.

#### Conflict of interest

The authors have declared no conflicts of interest.

#### References

1. Brutti, M., Blasco, C., Pico, Y., Determination of benzoylurea insecticides in food by pressurized liquid extraction and LC-MS. *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 1 – 10.
2. Xi, X., Yang, M., Shen, G., Wu, X., Lu, R., Zhou, W., Zhang, S., Gao, H., Pipette vial dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid

- 349 chromatography for the determination of benzoylurea insecticide in fruit juice. *J. Sep.*  
350 *Sci.* 2016, 39, 391 – 398.
- 351 3. Vazquez, M.M.P., Vazquez, P.P., Galera, M.M., Moreno, A.U., Comparison of two ionic  
352 liquid dispersive liquid-liquid microextraction approaches for the determination of  
353 benzoylurea insecticides in wastewater using liquid chromatography-quadrupole-linear  
354 ion trap-mass spectrometry: Evaluation of green parameters. *J. Chromatogr. A* 2014,  
355 1356, 1 – 9.
- 356 4. Peng, G., He, Q., Mmereki, D., Lu, Y., Zhong, Z., Liu, H., Pan, W., Zhou, G., Chen, J.,  
357 Dispersive solid-phase extraction followed by vortex-assisted dispersive liquid-liquid  
358 microextraction based on the solidification of a floating organic droplet for the  
359 determination of benzoylurea insecticides in soil and sewage sludge. *J. Sep. Sci.* 2016,  
360 39, 1258 – 1265.
- 361 5. Mensah, J.K., Lundanes, E., Greibrokk, T., Holen, B., Determination of diflubenzuron in  
362 apples by gas chromatography. *J. Chromatogr. A* 1997, 765, 85 – 90.
- 363 6. Wang, C.-H., Ma, X.-X., Wang, C., Wu, Q.-H., Wang, Z., Poly(vinylidene fluoride)  
364 membrane based thin film microextraction for enrichment of benzoylurea insecticides  
365 from water samples followed by their determination with HPLC. *Chinese Chem. Letters.*  
366 2014, 25, 1625 – 1629.
- 367 7. Zhou, Q., Wu, W., Huang, Y., Analysis of benzoylurea insecticides in water samples  
368 with TiO<sub>2</sub> nanotube array micro-solid phase extraction coupled to high performance  
369 liquid chromatography. *RSC Adv.* 2014, 4, 45946 – 45952.
- 370 8. Liu, X., Wang, C., Wang, Z., Wu, Q., Wang, Z., Nanoporous carbon derived from a  
371 metal organic framework as a new kind of adsorbent for dispersive solid phase extraction  
372 of benzoylurea insecticides. *Microchim. Acta* 2015, 182, 1903 – 1910.

- 373 9. Mei, M., Huang, X., Liao, K., Yuan, D., Sensitive monitoring of benzoylurea insecticides  
374 in water and juice samples treated with multiple monolithic fiber solid-phase  
375 microextraction and liquid chromatographic analysis. *Anal. Chim. Acta* 2015, 860, 29 –  
376 36.
- 377 10. Ruan, C., Zhao, X., Liu, C., Determination of diflubenzuron and chlorbenzuron in fruits  
378 by combining acetonitrile-based extraction with dispersive liquid-liquid microextraction  
379 followed by high-performance liquid chromatography. *J. Sep. Sci.* 2015, 38, 2931 –  
380 2937.
- 381 11. Yang, M., Xi, X., Yang, X., Bai, L., Lu, R., Zhou, W., Zhang, S., Gao, H., Determination  
382 of benzoylurea insecticides in environmental water and honey samples using ionic-  
383 liquid-mingled air-assisted liquid-liquid microextraction based on solidification of  
384 floating organic droplets. *RSC Adv.* 2015, 5, 25572 – 25580.
- 385 12. Zhang, P., Cui, X., Yang, X., Zhang, S., Zhou, W., Gao, H., Lu, R., Dispersive micro-  
386 solid-phase extraction of benzoylurea insecticides in honey samples with a  $\beta$ -  
387 cyclodextrin-modified attapulgite composite as sorbent. *J. Sep. Sci.* 2016, 39, 412 – 418.
- 388 13. Yang, X., Gao, K., Ye, Y., Yang, M., Li, J., Gao, H., Zhang, S., Zhou, W., Lu, R., Facile  
389 synthesis of multifunctional attapulgite/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /polyaniline nanocomposites for magnetic  
390 dispersive solid phase extraction of benzoylurea insecticides in environmental water  
391 samples. *Anal. Chim. Acta* 2016, 934, 114 – 121.
- 392 14. Vazquez, P.P., Mughari, A.R., Galera, M.M., Solid-phase microextraction for the  
393 determination of benzoylureas in orange juice using liquid chromatography combined  
394 with post-column photochemically induced fluorimetry derivatization and fluorescence  
395 detection. *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 56 – 63.

- 396 15. Carro, A.M., Garcia-Rodriguez, D., Gonzalez-Siso, P., Lorenzo, R.A., Determination of  
397 chemotherapeutic agents in fish and shellfish by matrix solid-phase dispersion and liquid  
398 chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 2012, 35, 2866 – 2874.
- 399 16. Kim, J.-H., Seo, J.-S., Moon, J.-K., Kim, J.-H., Multi-residue method development of 8  
400 benzoylurea insecticides in mandarin and apple using high performance liquid  
401 chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Korean Soc.*  
402 *App. Bi.* 2013, 56, 47 – 54.
- 403 17. Chen, L., Chen, J., Guo, Y., Li, J., Yang, Y., Xu, L., Fu, F., Study on the simultaneous  
404 determination of seven benzoylurea pesticides in Oolong tea and their leaching  
405 characteristics during infusing process by HPLC-MS/MS. *Food Chem.* 2014, 143, 405 –  
406 410.
- 407 18. Markoglou, A.N., Bempelou, E.D., Liapis, K.S., Ziogas, B.N., Determination of  
408 benzoylurea insecticide residues in tomatoes by high-performance liquid  
409 chromatography with ultraviolet-diode array and atmospheric pressure chemical  
410 ionization-mass spectrometry detection. *J. AOAC Int.* 2007, 90, 1395 – 1401.
- 411 19. Martinez-Galera, M., Lopez-Lopez, T., Gil-Garcia, M.D., Martinez-Vidal, J.L., Vazquez,  
412 P. P., Determination of benzoylureas in tomato by high-performance liquid  
413 chromatography using continuous on-line post-elution photoirradiation with fluorescence  
414 detection. *J. Chromatogr. A* 2001, 918, 79 – 85.
- 415 20. Millidis, G.E., Tsiropoulos, N.G., Aplada-Sarlis, P.G., High-performance liquid  
416 chromatographic determination of benzoylurea insecticides residues in grapes and wine  
417 using liquid and solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A* 1999, 835, 113 – 120.
- 418 21. de la Pena, A.M., Mahedero, M.C., Bautista-Sanchez, A., Monitoring of phenylurea and  
419 propanil herbicides in river water by solid-phase-extraction high performance liquid  
420 chromatography with photoinduced-fluorimetric detection. *Talanta* 2003, 60, 279 – 285.

22. Zhou, Q., Wang, G., Xie, G., Dispersive liquid-phase microextraction in combination with HPLC for the enrichment and rapid determination of benzoylurea pesticides in environmental water samples. *J. Sep. Sci.* 2013, 36, 2323 – 2329.
23. Wang, H., Hu, L., Li, W., Lu, R., Zhang, S., Zhou, W., Gao, H., A rapid and simple pretreatment method for benzoylurea insecticides in honey samples using in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction based on the direct solidification of ionic liquids. *J. Chromatogr. A* 2016, 1471, 60 – 67.
24. Wang, H., Hu, L., Li, W., Yang, X., Lu, R., Zhang, S., Zhou, W., Gao, H., Li, J., In-syringe dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of ionic liquids for the determination of benzoylurea insecticides in water and tea beverage samples. *Talanta* 2017, 162, 625 – 633.
25. Zhang, J., Li, M., Yang, M., Peng, B., Li, Y., Zhou, W., Gao, H., Lu, R., Magnetic retrieval of ionic liquids: Fast dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of benzoylurea insecticides in environmental water samples. *J. Chromatogr. A* 2012, 1254, 23 – 29.
26. Yang, M., Zhang, P., Hu, L., Lu, R., Zhou, W., Zhang, S., Gao, H., Ionic liquid-assisted liquid-phase microextraction based on the solidification of floating organic droplets combined with high performance liquid chromatography for the determination of benzoylurea insecticide in fruit juice. *J. Chromatogr. A* 2014, 1360, 47 – 56.
27. Liu, Z., Lin, X., Liu, X., Li, J., Zhou, W., Gao, H., Zhang, S., Lu, R., Magnetic nanoparticles modified with hyperbranched polyamidoamine for the extraction of benzoylurea insecticides prior to their quantitation by HPLC. *Microchim. Acta* 2019, 186, 351.
28. Huang, X., Qiao, K., Li, L., Liu, G., Xu, X., Lu, R., Gao, H., Xu, D., Preparation of a magnetic grapheme/polydopamine nanocomposite for magnetic dispersive solid-phase

- 446 extraction of benzoylurea insecticides in environmental water samples. *Sci. Rep.* 2019, 9,  
447 8919.
- 448 29. Wang, J., Jiao, C., Li, M., Wang, X., Wang, C., Wu, Q., Wang, Z., Porphyrin based  
449 porous organic polymer modified with Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as an efficient adsorbent for  
450 the enrichment of benzoylurea insecticides. *Microchim. Acta* 2018, 185, 36.
- 451 30. Tang, S., Lee, H.K., Application of dissolvable layered double hydroxides as sorbent in  
452 dispersive solid-phase extraction and extraction by co-precipitation for the determination  
453 of aromatic acid anions. *Anal. Chem.* 2013, 85, 7426 – 7433.
- 454 31. Sajid, M., Basheer, C., Layered double hydroxides: Emerging sorbent materials for  
455 analytical extractions. *Trends Anal. Chem.* 2016, 75, 174 – 182.
- 456 32. Mishra, G., Dash, B., Pandey, S., Layered double hydroxides: A brief review from  
457 fundamentals to application as evolving biomaterials. *Appl. Clay Sci.* 2018, 153, 172 –  
458 186.
- 459 33. Chatterjee, A., Bharadiya, P., Hansora, D., Layered double hydroxide based  
460 bionanocomposites. *Appl. Clay Sci.* 2019, 177, 19 – 36.
- 461 34. Guan, W., Zhou, W., Han, D., Zhang, M., Lu, C., Lin, J.-M., One-step enrichment and  
462 chemiluminescence detection of sodium dodecyl benzene sulfonate in river water using  
463 Mg-Al-carbonate layered double hydroxides. *Talanta* 2014, 120, 268 – 273.
- 464 35. Rajabi, M., Arghavani-Beydokhit, S., Barfi, B., Asghari, A., Dissolvable layered double  
465 hydroxide as an efficient nanosorbent for centrifugeless air-agitated dispersive solid-  
466 phase extraction of potentially toxic metal ions from bio-fluid samples. *Anal. Chim. Acta*  
467 2017, 957, 1 – 9.
- 468 36. Asiabi, H., Yamini, Y., Shamsayei, M., Tahmasebi, E., Highly selective and efficient  
469 removal and extraction of heavy metals by layered double hydroxides intercalated with

the diphenylamine-4-sulfonate: A comparative study. *Chem. Eng. J.* 2017, 323, 212 – 223.

37. Chen, H., Qian, G., Ruan, X., Frost, R.L., Removal process of nickel(II) by using dodecyl sulfate intercalated calcium aluminum layered double hydroxide. *App. Clay Sci.* 2016, 132-133, 419 – 424.

38. de Oliveira, H.B., Wypych, F., Evaluation of layered zinc hydroxide nitrate and zinc/nickel double hydroxide salts in the removal of chromate ions from solutions. *J. Solid State Chem.* 2016, 243, 136 – 145.

39. Ji, H., Wu, W., Li, F., Yu, X., Fu, J., Jia, L., Enhanced adsorption of bromate from aqueous solutions on ordered mesoporous Mg-Al layered double hydroxides (LDHs). *J. Hazard. Mater.* 2017, 334, 212 – 222.

40. Gissawong, N., Sansuk, S., Srijaranai, S., The alternative use of layered double hydroxides as extraction medium coupled with microcomplexation for determination of phosphate in water samples. *Spectrochim. Acta A* 2017, 173, 994 – 1000.

41. Liu, Y.-L., Zhou, J.-B., Zhao, R.-S., Chen, X.-F., Using Zn/Al layered double hydroxide as a novel solid-phase extraction adsorbent to extract polycyclic aromatic hydrocarbons at trace levels in water samples prior to the determination of gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, 404, 1603 – 1610.

42. Saraji, M., Ghani, M., Dissolvable layered double hydroxide coated magnetic nanoparticles for extraction followed by high performance liquid chromatography for the determination of phenolic acids in fruit juices. *J. Chromatogr. A* 2014, 1366, 24 – 30.

43. Phiroonsoontorn, N., Sansuk, S., Santaladchaiyakit, Y., Srijaranai, S., The use of dissolvable layered double hydroxide components in an in situ solid-phase extraction for chromatographic determination of tetracyclines in water and milk samples. *J. Chromatogr. A* 2017, 1519, 38 – 44.

- 495 44. Di, X., Wang, X., Liu, Y., Guo, X., Di, X., Dissolvable layered double hydroxide as a  
496 sorbent in dispersive micro-solid phase extraction for the determination of acidic  
497 quinolones in honey by HPLC. *J. Sep. Sci.* 2019, 42, 2255 – 2262.
- 498 45. Lei, C., Pi, M., Kuang, P., Guo, Y., Zhang, F., Organic dye removal from aqueous  
499 solutions by hierarchical calcined Ni-Fe layered double hydroxide: Isotherm, kinetic and  
500 mechanism studies. *J. Colloid Interface Sci.* 2017, 496, 158 – 166.
- 501 46. Bu, R., Chen, F., Li, J., Li, W., Yang, F., Adsorption capability for anionic dyes on 2-  
502 hydroxyethylammonium acetate-intercalated layered double hydroxide. *Colloids Surf. A*  
503 *Physicochem. Eng. Asp.* 2016, 511, 312 – 319.
- 504 47. Abdellaoui, K., Pavlovic, I., Bouhent, M., Benhamou, A., Barriga, C., A comparative  
505 study of the amaranth azo dye adsorption/desorption from aqueous solutions by layered  
506 double hydroxides. *App. Clay Sci.* 2017, 143, 142 – 150.
- 507 48. Grover, A., Mohiuddin, I., Malik, A.K., Aulakh, J.S., Kim, K.-H., Zn-Al layered double  
508 hydroxides intercalated with surfactant: Synthesis and applications for efficient removal  
509 of organic dyes. *J. Clean Prod.* 2019, 240, 118090.
- 510 49. Zhang, B., Dong, Z., Sun, D., Wu, T., Li, Y., Enhanced adsorption capacity of dyes by  
511 surfactant-modified layered double hydroxides from aqueous solution. *J. Ind. Eng.*  
512 *Chem.* 2017, 49, 208 – 218.
- 513 50. Zhang, M., Zhao, C., Li, J., Xu, L., Wei, F., Hou, D., Sarkar, B., Ok, Y.S., Organo-  
514 layered double hydroxides for the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from  
515 soil washing effluents containing high concentrations of surfactants. *J. Hazard. Mater.*  
516 2019, 373, 678 – 686.
- 517 51. Grover, A., Kaur, R., Mohiuddin, I., Malik, A.K., Aulakh, J.S., Tsang, Y.F., Kim, K.-Y.,  
518 Surfactant-modified Zn/Al-layered double hydroxides for efficient extraction of alkyl  
519 phenols from aqueous samples. *Environ. Res.* 2019, 177, 108605.

52. Mahjoubi, F.Z., Khalidi, A., Elhalil, A., Barka, N., Characteristics and mechanisms of methyl orange sorption onto Zn/Al layered double hydroxide intercalated by dodecyl sulfate anion. *Scientific African* 2019, 6, e00216.
53. Zhao, X., Liu, S., Wang, P., Tang, Z., Niu, H., Cai, Y., Wu, F., Wang, H., Meng, W., Giesy, J.P., Surfactant-modified flowerlike layered double hydroxide-coated magnetic nanoparticles for preconcentration of phthalate esters from environmental water samples. *J. Chromatogr. A* 2015, 1414, 22 – 30.
54. Xiaoli, G., Yanting, L., Bo, Z., Lingling, Y., Xin, D., Xin, D., Development of dispersive solid phase extraction based on dissolvable Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-layered double hydroxide for high-performance liquid chromatographic determination of phenoxy acid herbicides in water samples. *Microchem. J.* 2020, 152, 104443.
55. Du, L., Wang, X., Liu, T., Li, J., Wang, J., Gao, M., Wang, H., Magnetic solid-phase extraction of organophosphorus pesticides from fruit juices using NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@polydopamin@Mg/Al-layered double hydroxides nanocomposites as an adsorbent. *Microchem. J.* 2019, 150, 104128.
56. Document N° SANCO/10232/2006, Quality control procedures for pesticide residues analysis, 2006, [http://ec.europa.eu/food/plant/resources/qualcontrol\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/resources/qualcontrol_en.pdf)

## Figure captions

**Figure 1** Overlaid chromatograms of (a) surface water sample and (b) honey samples (Brand#2) with no spiked and spiked at various concentrations of target BU insecticides.

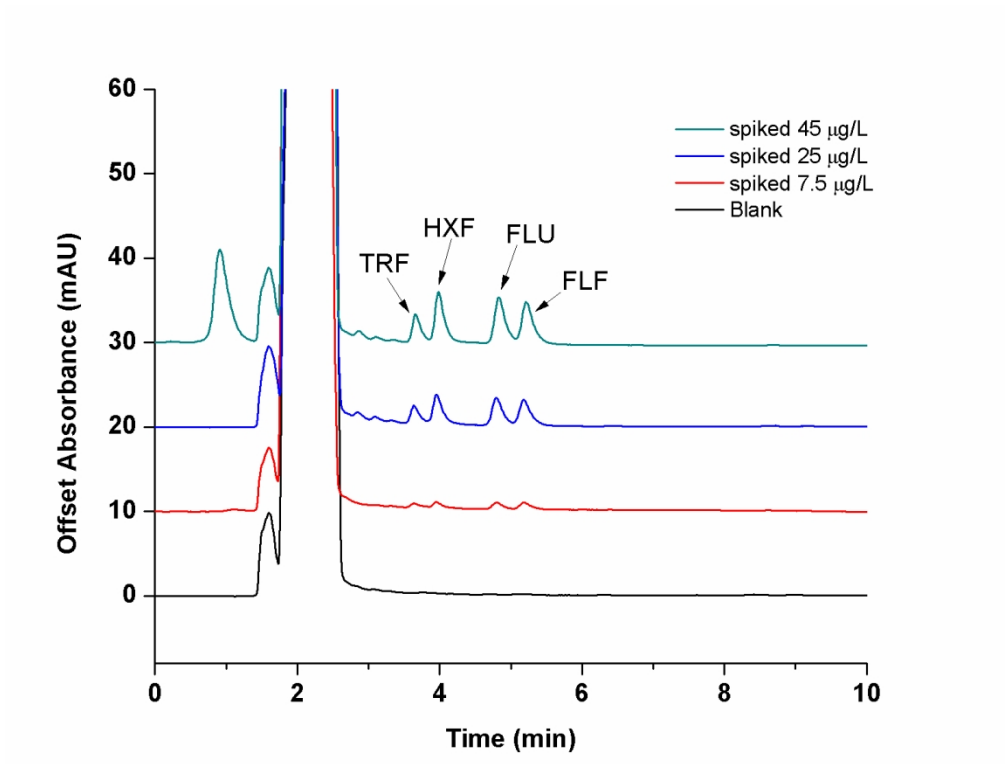


Figure 1A

271x208mm (150 x 150 DPI)

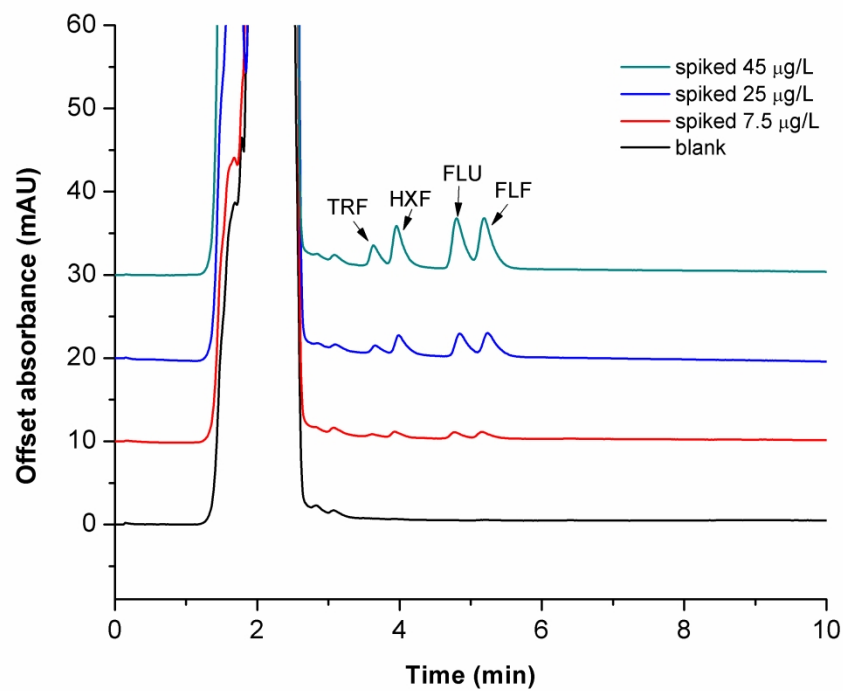


Figure 1B

271x209mm (300 x 300 DPI)

**Table 1** Analytical characteristics of the proposed method

| Analyte | Linearity<br>(µg/L) | R <sup>2</sup> | LOD<br>(µg/L) | LOQ<br>(µg/L) | Intra-day precision <sup>a</sup><br>(n=6), %RSD |           | Inter-day precision <sup>a</sup><br>(n=6×3 days), %RSD |           | EF                                              |                                                          |
|---------|---------------------|----------------|---------------|---------------|-------------------------------------------------|-----------|--------------------------------------------------------|-----------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
|         |                     |                |               |               | t <sub>R</sub>                                  | Peak area | t <sub>R</sub>                                         | Peak area | [C <sub>ex</sub> /C <sub>o</sub> ] <sup>b</sup> | [S <sub>precon</sub> /S <sub>direct</sub> ] <sup>c</sup> |
| TRF     | 1– 100              | 0.9937         | 0.3           | 1.0           | 0.5                                             | 6.8       | 0.3                                                    | 11.2      | 12.5                                            | 13.2                                                     |
| HXF     | 0.3 – 200           | 0.9977         | 0.1           | 0.3           | 0.5                                             | 5.6       | 0.3                                                    | 7.9       | 21.0                                            | 18.3                                                     |
| FLU     | 0.3 – 200           | 0.9977         | 0.1           | 0.3           | 0.6                                             | 5.2       | 0.4                                                    | 8.3       | 21.2                                            | 19.6                                                     |
| FLF     | 0.3 – 200           | 0.9972         | 0.1           | 0.3           | 0.6                                             | 6.2       | 0.4                                                    | 7.2       | 23.7                                            | 21.3                                                     |

<sup>a</sup> Precisions were evaluated at the concentration of 100 µg/L each BUs.  
<sup>b</sup> Ratio of the concentration of target analytes in the extraction phase to the initial concentration in original sample solutions  
<sup>c</sup> Ratio of the slopes of the calibration curves obtained with the proposed preconcentration and direct analysis (without preconcentration)