

**MULTIRESIDUE ANALYSIS OF  $\beta$ -AGONISTS IN PORCINE  
TISSUES BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS-MASS  
SPECTROMETRY**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY  
(PHARMACEUTICAL CHEMISTRY AND PHYTOCHEMISTRY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY  
2008**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

**MULTIRESIDUE ANALYSIS OF  $\beta$ -AGONISTS IN PORINE TISSUES BY  
CAPILLARY ELECTROPHORESIS-MASS SPECTROMETRY**

ORAPHAN ANURUKVORAKUN 4737710 PYPP/ D

Ph.D. (PHARMACEUTICAL CHEMISTRY AND PHYTOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORS: LEENA SUNTORNSUK, Ph.D., WOLFGANG  
BUCHBERGER, Ph.D., NONGLUCK RUANGWISES, Ph.D.**ABSTRACT**

$\beta$ -agonists (clenbuterol, salbutamol and terbutaline) are adrenergic drugs, which were originally developed for the treatment of chronic obstructive pulmonary diseases, especially asthma. Additionally, these drugs benefit the meat-producing industry by enhancing muscle accretion and diminishing muscle protein breakdown. Therefore,  $\beta$ -agonist drugs have been used as growth promoters in livestock. However, the misuse of  $\beta$ -agonist drugs as growth promoters have been banned because they cause sickness and heart complications to humans. Analysis of  $\beta$ -agonist residues in meat is, therefore, essential for consumer protection.

This work emphasizes the method of development of non-aqueous capillary electrophoresis-mass spectrometry NACE-MS for the analysis of three  $\beta$ -agonist residues (*e.g.*, salbutamol, clenbuterol and terbutaline) in porcine muscle. The method was validated and compared with high performance liquid chromatography (HPLC)-MS-MS. NACE-DAD was first optimized using "two factorial design". The optimum NACE-DAD condition was obtained from 18 mM ammonium acetate in methanol: acetonitrile: glac. acetic acid (66:33:1 by volume) using the injection at 50 mbar for 4 s, voltage of 28 kV and temperature of 24 °C. The NACE-DAD method sensitivity was enhanced using a high sensitivity detection cell (bubble cell) or a MS detector. The MS interface was achieved using an electrospray interface using sheath liquid consisting of 5 mM ammonium acetate in methanol (80 % v/v), delivered at a flow rate of 2  $\mu$ L/min. The injection conditions were 50 mbar and 10 kV for 12 s, spray tip potential was 2300, Nozzle Potential was 130 and seconds per spectrum scanning (spectrum acquisition setting) was 3.00. The method was validated with high performance liquid (HPLC)-MS-MS and data showed that NACE-MS provided wider linearity range, and comparable precision and recoveries. The NACE-MS provided the lower limit of detection, LOD (0.3 vs 1.6 ppb), shorter analysis time (18 vs. 25 min) and lower cost than HPLC-MS-MS (9 fold cheaper). However, the NACE-MS method should be improved to enhance the reliability of the assay since the ion suppression from porcine muscle could act upon the results.

The NACE-MS was applied for the determination of porcine muscle in comparison with HPLC-MS-MS method and the values reported by the Ministry of Public Health, Thailand. The data obtained no statistical differences between the two methods and the values reported from the Ministry of Public Health, Thailand ( $P > 0.05$ ), at 95% confidence level, calculated from salbutamol.

**KEY WORDS:**  $\beta$ -AGONISTS / PORCINE TISSUES / CAPILLARY ELECTROPHORESIS  
/ MASS SPECTROMETRY / FACTORIAL DESIGN

203 pp.

การวิเคราะห์สารเบต้า-อะโกนิสต์ตกค้างในเนื้อเยื่อหมูโดยวิธีแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส-สเปกโตรเมตรีมวล (MULTIRESIDUE ANALYSIS OF  $\beta$ -AGONISTS IN PORCINE TISSUES BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS-MASS SPECTROMETRY)

อรรถพรณ อนุรักษ์วรกุล 4737710 PYPP/D

ปร.ด. (เภสัชเคมีและพฤกษเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ลีณา สุนทรสุข, Ph.D., Wolfgang Buchberger, Ph.D.,

นงลักษณ์ เรืองวิเศษ, Ph.D.

บทคัดย่อ

สารเบต้า-อะโกนิสต์ (clenbuterol, salbutamol และ terbutaline) เป็นยา adrenergic ที่เริ่มพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการรักษาโรคเรื้อรังเกี่ยวกับปอด เช่น หอบหืด นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็น สารเร่งเนื้อแดงในเนื้อสัตว์โดยการเพิ่มกล้ามเนื้อและลดการสลายตัวของโปรตีน ในทางปศุสัตว์ได้นำสารสารเบต้า-อะโกนิสต์มาเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตของสัตว์ต่าง ๆ แต่การนำมาใช้ดังกล่าวถูกห้ามเพราะสารเหล่านี้มีผลกระทบต่อการทำงานของหัวใจ และมีผลเสียต่อผู้บริโภค และอาจเป็นสาเหตุให้เกิดโรคต่าง ๆ การวิเคราะห์สารตกค้างสารเบต้า-อะโกนิสต์ในเนื้อสัตว์จึงมีความจำเป็นเพื่อป้องกันอันตรายจากสารดังกล่าวต่อผู้บริโภค

งานวิจัยนี้เน้นการพัฒนาวิธีแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ไม่ใช้น้ำร่วมกับสเปกโตรเมตรีมวล (non-aqueous capillary electrophoresis-mass spectrometry, NACE-MS) สำหรับการวิเคราะห์สารเร่งเนื้อแดงที่ตกค้างในเนื้อหมู ได้แก่ salbutamol, clenbuterol และ terbutaline วิธีการดังกล่าวได้ถูกตรวจสอบและเปรียบเทียบกับวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ร่วมกับ สเปกโตรเมตรีมวล (high performance liquid chromatography, HPLC-MS-MS) โดยในเบื้องต้นได้ศึกษาสภาวะของแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ไม่ใช้น้ำร่วมกับ photodiode array (NACE-DAD) ในการแยกสารดังกล่าวด้วยการออกแบบการทดลองโดยใช้หลักสถิติ two factorial design สภาวะที่เหมาะสมของ NACE-DAD คือ สารละลายผสมของ แอมโมเนียมอะซิเตต ความเข้มข้น 18 มิลลิโมลาร์ ใน เมทานอล: อะซิโตรไนโตร: กรดอะซิติกกรด เชียล (66:33:1 โดยปริมาตร) ฉีดสารด้วยความดัน 50 มิลลิบาร์, 4 วินาที, ความต่างศักย์ไฟฟ้า 28 กิโลโวลต์ และ อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส การเพิ่มสภาพไหลของการตรวจหาสามารถทำได้โดยใช้ bubble cell และใช้สเปกโตรเมตรีมวลเป็นเครื่องตรวจหา โดยสเปกโตรเมตรีมวลดังกล่าวเป็น electrospray interface ต่อเข้ากับ NACE ด้วย sheath liquid ประกอบด้วยสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตต ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ละลายใน เมทานอล 80 % ด้วยอัตราการไหล 2 ไมโครลิตร/นาที และฉีดสารโดยใช้ความดัน 50 มิลลิบาร์ และความต่างศักย์ไฟฟ้า 10 กิโลโวลต์, 12 วินาที, spray tip potential เท่ากับ 2300, nozzle potential เท่ากับ 130 และสแกนสเปกตรัมทุก ๆ 3 วินาที วิธี NACE-MS ถูกตรวจสอบและเปรียบเทียบกับ HPLC-MS-MS และพบว่า NACE-MS ให้ช่วง linearity range ที่กว้างกว่า HPLC-MS-MS โดยมีความแม่นยำ และการวิเคราะห์หาความถูกต้องด้วยเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (% recovery) ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ NACE-MS ยังให้ขีดจำกัดการตรวจหา (limit of detection, LOD) ที่ต่ำกว่า (0.3 ต่อ 1.6 ppb) และใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้นกว่า (18 ต่อ 25 นาที) และค่าใช้จ่ายที่น้อยกว่า HPLC-MS-MS (น้อยกว่า 9 เท่า) แต่อย่างไรก็ตามควรจะพัฒนา วิธีการ NACE-MS ต่อไปเพื่อเพิ่มความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ เนื่องจากมีสารรบกวนในเนื้อหมูซึ่งส่งผลกระทบต่อให้เกิด ion suppression

วิธี NACE-MS ที่พัฒนาขึ้นได้นำไปวิเคราะห์สารเบต้า-อะโกนิสต์ในหมูเนื้อแดงเปรียบเทียบกับวิธี HPLC-MS-MS พบว่าผลที่ได้จากทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จำนวนจาก salbutamol

203 หน้า