บทที่ 1
บทนำ

1.1 เทคนิคการแยกสารในคอลัมน์ขนาดเล็กระดับไมโครเมตร (Micro-Separation Techniques)

เทคนิคการแยกสารในคอลัมน์ขนาดเล็กในระดับไมโครเมตร เช่น ไมโครไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (micro high-performance liquid chromatography, μHPLC) หรือ คะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส (capillary electrophoresis, CE) เป็นที่สนใจในปัจจุบัน เนื่องจากใช้เฟสเคลื่อนที่หรือบัฟเฟอร์และปริมาณสารตัวอย่างในการวิเคราะห์น้อย ทำให้ลดค่าใช้จ่ายของสารเคมี ลดปริมาณของเสียที่จะเกิดขึ้น และลดค่าใช้จ่ายในการกำจัดของเสีย มีประสิทธิภาพสูงในการแยกสาร และสามารถต่อเข้ากับเครื่องตรวจวัดแบบแมสสเปกโทรมิเตอร์ (mass spectrometer, MS) ได้ดี [Legido-Quigley *et al.*: 2003]

1.1.1 ไมโครไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (Micro-High Performance Liquid Chromatography, μHPLC) เบื้องต้น [Skoog and Leary: 1992, Poole: 2003]

ลิควิดโครมาโทกราฟี (liquid chromatography, LC) เป็นเทคนิคการแยกสารที่อาศัยสมดุลระหว่างเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นของเหลว และเฟสคงที่ (stationary phase) เป็นของแข็งหรือของเหลวที่เคลือบอยู่บนของแข็ง เมื่อสารผสมเคลื่อนที่เข้าไปในคอลัมน์ที่บรรจุเฟสคงที่โดยอาศัยเฟสเคลื่อนที่ที่เป็นของเหลวพาเข้าในคอลัมน์ สารแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่ภายในคอลัมน์ได้เร็วช้าแตกต่างกันขึ้นกับอันตรกิริยาระหว่างสารกับเฟสคงที่และเฟสเคลื่อนที่

ต่อมามีการพัฒนาเฟสคงที่ให้มีขนาดเล็กลงเพื่อให้ประสิทธิภาพการแยกสารดีขึ้น เพื่อให้สามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยๆ ได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ เทคนิคดังกล่าวเรียกว่า ไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) โดยอาศัยปั๊มแรงดันสูง (high pressure pump) พาเฟสเคลื่อนที่ผ่านเข้าไปในคอลัมน์ที่บรรจุเฟสคงที่ขนาดเล็ก โดยทั่วไป คอลัมน์ที่ใช้ใน HPLC เป็นคอลัมน์ที่ผลิตจากสแตนเลสหรือแก้วที่มีความแข็งแรงสูง มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายในระดับมิลลิเมตร (2-4 มิลลิเมตร) และบรรจุด้วยเฟสคงที่ในระดับไมโครเมตร

ในปัจจุบันได้มีพัฒนาเทคนิค HPLC ที่ใช้คอลัมน์ขนาดเล็กหรือคะพิลลารีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระดับไมโครเมตรที่บรรจุด้วยเฟสคงที่ เรียกว่า ไมโครไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (micro-high performance liquid chromatography, μHPLC) ซึ่ง μHPLC มีข้อได้เปรียบ คือ อนุภาคขนาดเล็กของเฟสคงที่ทำให้มีความสม่ำเสมอของการบรรจุและลดความแตกต่างของระยะทางที่สามารถเคลื่อนที่ในคอลัมน์ (ลด eddy diffusion) จึงทำให้เกิดการกระจายของโซนสาร

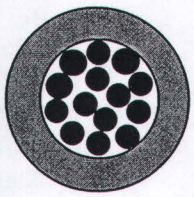
น้อยกว่า ดังนั้นพีกของสารที่ได้จึงแคบและประสิทธิภาพของการแยกสารใน μHPLC จึงดีกว่า HPLC ทั่วไป

ในปัจจุบันได้มีคำว่า nano-HPLC ซึ่งหมายถึง HPLC ที่ใช้คะพิลลารีคอลัมน์ขนาดไมโครเมตรที่มีอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็นนาโนลิตรต่อนาที ซึ่งทำให้ μHPLC อาจหมายถึงอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ในระดับไมโครลิตรต่อนาที ทั้ง nano-HPLC และ μHPLC อาจใช้คะพิลลารีคอลัมน์เดียวกัน เพียงแต่อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ต่างกัน แต่ในงานวิจัยนี้ μHPLC หมายถึง HPLC ที่ใช้คะพิลลารีคอลัมน์ขนาดไมโครเมตรและมีอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ในระดับไมโครลิตรหรือนาโนลิตรต่อนาที

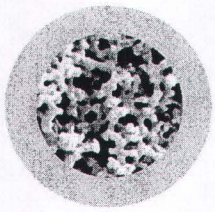
1.1.2 คอลัมน์มอนอลิตเบื้องต้น [Neue: 1997]

คอลัมน์ที่นิยมใช้ในเทคนิค HPLC คือ คอลัมน์ที่บรรจุด้วยอนุภาคซิลิกา อะลูมินา หรือเป็นของเหลวที่เคลือบอยู่บนอนุภาค เรียกว่า packed column (รูปที่ 1.1) ขนาดของอนุภาคที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์อยู่ในระดับไมโครเมตร (ประมาณ 3-10 μm) ในการแยกสารนั้น ยิ่งใช้ขนาดอนุภาคเล็กลงประสิทธิภาพการแยกสารยิ่งดีขึ้น จึงได้มีการพัฒนาเฟสคงที่ให้มีอนุภาคขนาดเล็กลงเรื่อยๆ เพื่อช่วยปรับปรุงการแยกสาร แต่ในขณะเดียวกันต้องใช้แรงดันขับเคลื่อนเฟสเคลื่อนที่ (pressure drop) สูงขึ้น จึงจำเป็นต้องใช้ปั๊มความดันสูง ซึ่งไม่เหมาะกับปั๊มที่ใช้กับเครื่อง HPLC ทั่วไป ที่มีความดันสูงสุดประมาณ 35-40 MPa ดังนั้นเพื่อแก้ไขปัญหาเรื่องแรงดันดังกล่าว จึงได้มีการพัฒนาใช้คอลัมน์ที่มีเฟสคงที่เป็นของแข็งที่มีรูพรุนและเป็นชิ้นเดียวยาวต่อเนื่องตลอดทั้งคอลัมน์ เรียกว่า คอลัมน์มอนอลิต (monolithic column) [Tanaka *et al.* 2000] ดังรูปที่ 1.1 ทำให้ลดแรงดันขับเคลื่อนเฟสเคลื่อนที่ใน HPLC ลง และสามารถใช้กับปั๊มของเครื่อง HPLC ปกติได้โดยที่ประสิทธิภาพในการแยกสารดีขึ้น และอัตราการไหลมากกว่าปกติที่ใช้กับ HPLC ประเภท packed column จึงใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์สารสั้นลงเมื่อเทียบกับการใช้ packed column และสามารถใช้คอลัมน์ที่มีความยาวมากๆ ได้ ส่งผลให้ปรับปรุงการแยกสารได้ดีขึ้น

วัสดุที่เป็นเฟสคงที่ประเภทมอนอลิตใน μHPLC แบ่งได้ออกเป็น 2 ประเภท คือ มอนอลิตประเภทพอลิเมอร์ที่เป็นสารอินทรีย์ (organic polymer-based monolith) และมอนอลิตประเภทพอลิเมอร์ที่เป็นสารอนินทรีย์ (inorganic polymer-based monolith) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นซิลิกา [Poole: 2003] มอนอลิตทั้งสองประเภทสามารถเตรียมได้ง่ายในคะพิลลารี (*in situ*) ด้วยปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันของสารตั้งต้น มอนอลิตประเภทซิลิกามีข้อดี คือ มีผิวเหมือนอนุภาคที่นิยมบรรจุใน packed column ซึ่งเป็นซิลิกา จึงดัดแปรหมู่ฟังก์ชันได้ง่ายโดยใช้วิธีเดียวกันกับการดัดแปรหมู่ฟังก์ชันของเฟสคงที่ใน packed column ที่ใช้กันทั่วไปใน HPLC สำหรับมอนอลิตประเภทพอลิเมอร์ที่เป็นสารอินทรีย์มีข้อดี คือ สามารถเลือกชนิดต่างๆ ของพอลิเมอร์ได้ และทน pH ได้ในช่วงกว้าง



Packed column



Monolithic column

รูปที่ 1.1 ภาพตัดขวางของ packed และ monolithic column: ดัดแปลงจาก [Li *et al.*: 2004]

1.1.3 คะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส (Capillary Electrophoresis, CE) เบื้องต้น [Khaledi: 1998]

คะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส (Capillary Electrophoresis, CE) เป็นเทคนิคของการแยกสารภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้าในคะพิลลารีที่บรรจุสารละลายอิเล็กโทรไลต์ (background electrolyte, BGE) ข้อดีของเทคนิค CE ที่เหนือ HPLC ได้แก่ ไม่ใช้หรือใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณน้อย ไม่เสี่ยงต่อการทำละลายหรืออุดตันของคอลัมน์ ให้ประสิทธิภาพการแยกที่ดีกว่า ในกรณีที่สารผ่านเครื่องตรวจวัดแล้ว เทคนิค CE สามารถไล่สารอื่นที่อยู่ในคอลัมน์ได้ภายใน 30 วินาที ในขณะที่เทคนิค HPLC ใช้เวลา 5-30 นาที

เทคนิค CE แบ่งออกได้เป็นหลายประเภท ตามกลไกการแยกสาร ได้แก่

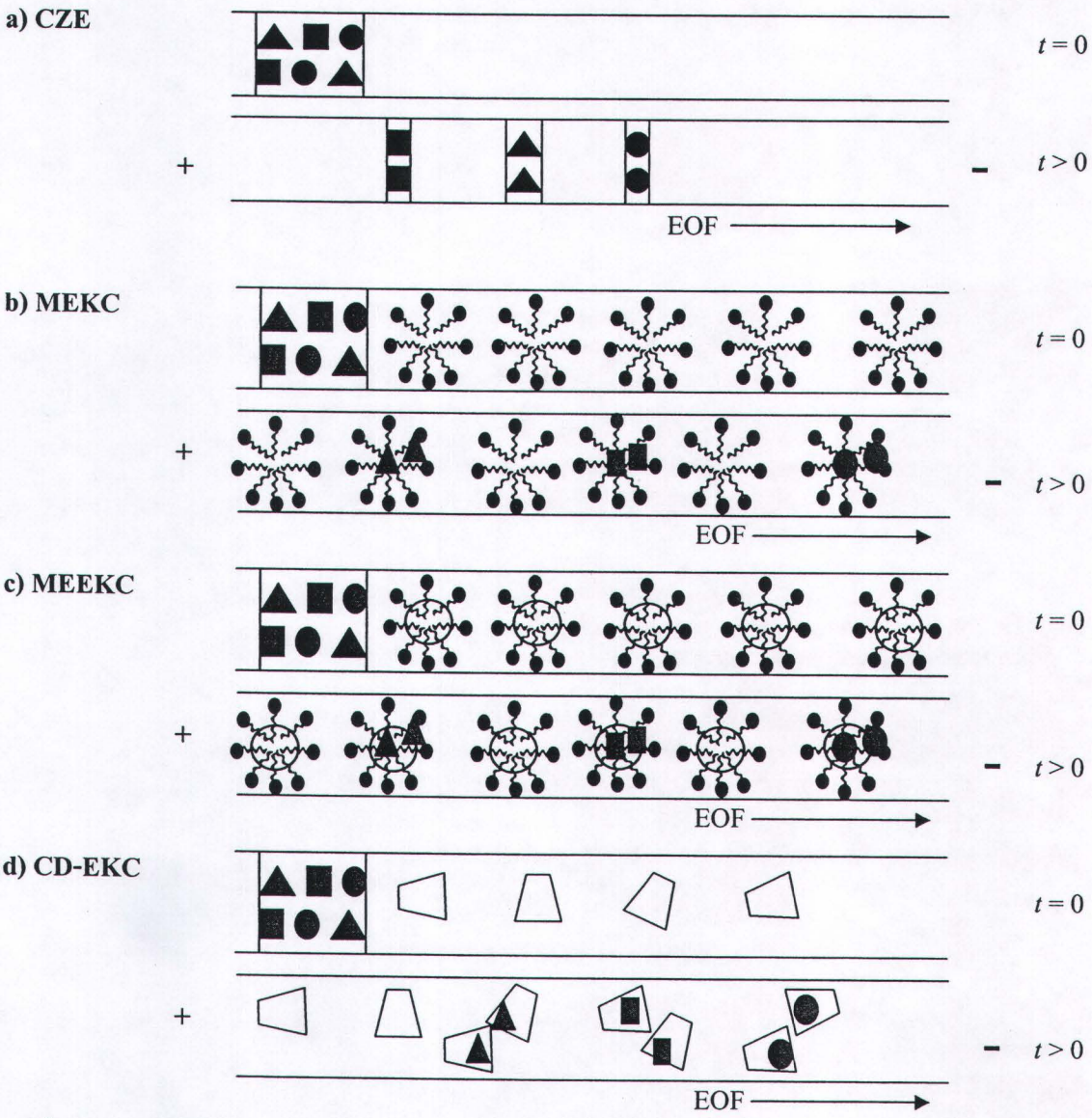
1) capillary zone electrophoresis (CZE)
2) capillary electrokinetic chromatography (CEKC) เช่น micellar electrokinetic chromatography (MEKC), microemulsion electrokinetic chromatography (MEEKC) และ cyclodextrin electrokinetic chromatography (CD-EKC)
3) capillary electrochromatgraphy
4) capillary gel electrophoresis
5) capillary isoelectric focusing

สำหรับงานวิจัยนี้เกี่ยวข้องกับเทคนิค CZE และ CEKC ในบทนี้จึงขอกล่าวเฉพาะรายละเอียดของเทคนิคทั้งสองประเภทนี้

1.1.3.1 Capillary Zone Electrophoresis (CZE) [Khaledi: 1998]

CZE เป็นเทคนิค CE ประเภทหนึ่งที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยใช้ BGE เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ทั่วๆ ไป เช่น บอเรต ฟอสเฟต หรืออะซิเตตบัฟเฟอร์ กลไกการแยกสารขึ้นกับความแตกต่างของความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร (electrophoretic mobility, μ) ซึ่งแปรผันกับอัตราส่วนของประจุต่อขนาดของไอออน ดังรูปที่ 1.2a คะพิลลารีนิยมใช้เป็น fused silica ซึ่งผิวด้านในของคะพิลลารีประกอบด้วยหมู่ซิลานอล ในการแยกสารด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี

pH มากกว่า 2 จะเกิดการแตกตัวของหมู่ซิลานอลที่ผิวคะพิลลารีได้เป็นประจุลบ เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าเพื่อแยกสาร จึงเกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า อิเล็กโทรออสโมซิส และการไหลของอิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmotic flow, EOF) มีทิศทางไปด้านขั้วแคโทด (ขั้วลบ) ในการแยกทั่วๆ ไป ขั้วไฟฟ้าทางด้านเครื่องตรวจวัดมักเป็นขั้วแคโทด ดังนั้นสารที่มีประจุบวกจะเคลื่อนที่ไปด้านขั้วแคโทดด้วยความเร็วในการเคลื่อนที่ของสารรวมกับ EOF สารที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปด้านขั้วแอโนด (ขั้วบวก) ซึ่งมีทิศทางตรงกันข้ามกับ EOF แต่ผลของ EOF มีมากกว่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร จึงเคลื่อนที่ไปด้านเครื่องตรวจวัดได้ ส่วนในกรณีที่เป็นสารที่ไม่มีประจุจะเคลื่อนนี้ออกมาพร้อมกับ EOF เทคนิคประเภทนี้จึงเหมาะสำหรับการแยกสารที่มีประจุและละลายน้ำได้ดี ส่วนสารที่ไม่มีประจุไม่เกิดการแยกขึ้น



รูปที่ 1.2 การแยกสารของเทคนิค CE ประเภทต่างๆ (a) CZE, (b) MEKC, (c) MEEKC และ (d) CD-EKC: ดัดแปลงจาก [Grossman and Colburn: 1992, Altria: 2000]

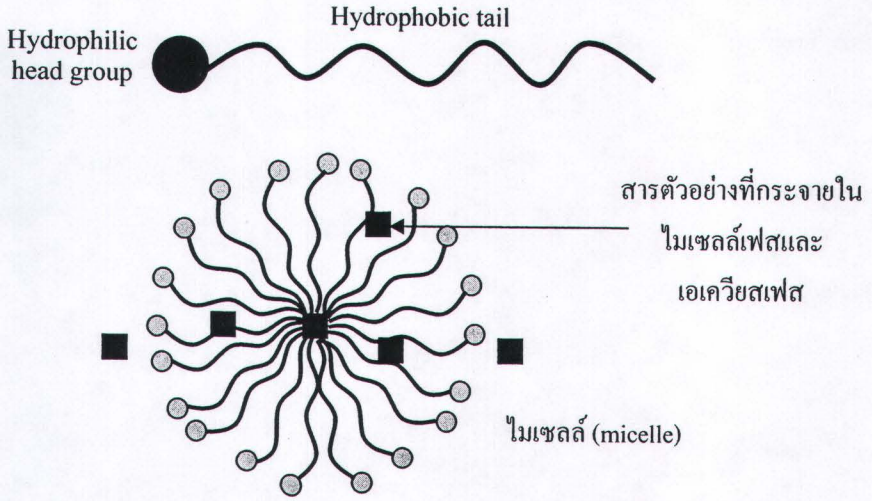
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

1.1.3.2 Capillary Electrokinetic Chromatography (CEKC) [Khaledi: 1998]

CEKC เป็นเทคนิคที่มีการเติมสารเติมแต่งลงไปในบัฟเฟอร์เพื่อทำหน้าที่เป็นเฟสคงที่เทียม (pseudo-stationary phase คล้ายกับเฟสคงที่ใน HPLC เพียงแต่เคลื่อนที่ได้) หรือ complexing agent ทำให้กลไกการแยกสารแตกต่างจาก CZE ในเทคนิค CEKC สารผสมแยกจากกันได้โดยเกิดความแตกต่างของความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าได้ด้วยการเกิดความแตกต่างของอันตรกิริยาของสารกับเฟสคงที่เทียมหรือ complexing agent นอกเหนือจากเกิดความแตกต่างจากความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารเอง ดังรูปที่ 1.2b ถึง d เทคนิคประเภทดังกล่าวจึงแยกได้ทั้งสารที่มีและไม่มีประจุ เทคนิค CEKC สามารถแบ่งย่อยได้ตามชนิดของเฟสคงที่เทียมหรือ complexing agent ได้แก่ MEKC, MEEKC และ CD-EKC

1) Micellar Electrokinetic Chromatography (MEKC) [Khaledi: 1998]

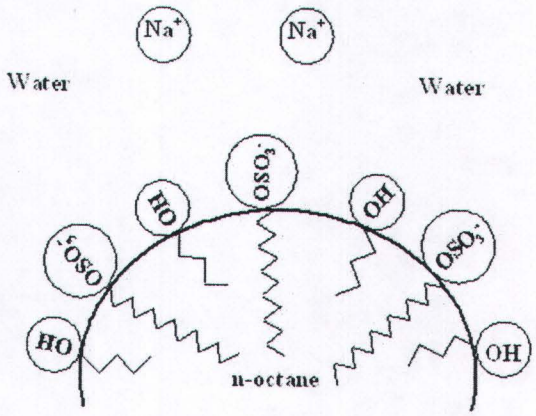
บัฟเฟอร์ของ MEKC ประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ซึ่งโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวประกอบด้วยส่วนหัวที่มีประจุหรือมีขั้วที่ชอบน้ำ (hydrophilic head group) และส่วนหางที่ไม่มีขั้วซึ่งไม่ชอบน้ำ (hydrophobic tail) เมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวลงไปในปริมาณที่มากกว่า critical micellar concentration (CMC) สารลดแรงตึงผิวจะรวมตัวกันเป็นไมเซลล์ (micelle) (รูปที่ 1.3) และทำหน้าที่เป็นเฟสคงที่เทียม กลไกการแยกสารอาศัยหลักความแตกต่างของการกระจายตัวของสารระหว่างเฟสคงที่เทียมและเอเควียสเฟส (aqueous phase) และความสามารถในการเคลื่อนที่ของสารเอง สารลดแรงตึงผิวสามารถเลือกใช้ได้ทั้งสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุ (ionic surfactant) สำหรับแยกสารทั้งที่มีหรือไม่มีประจุ และสารลดแรงตึงผิวที่ไม่มีประจุ (nonionic surfactant) หรือ zwitterionic surfactant สำหรับแยกสารที่มีประจุ โดยสารลดแรงตึงผิวที่นิยมใช้กันมากในเทคนิค MEKC คือ sodium dodecyl sulfate (SDS) ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุลบ (anionic surfactant) ต่ออยู่กับสายโซ่คาร์บอนที่เป็น C_{12} เนื่องจาก SDS เป็นสารที่มีความบริสุทธิ์สูง หาง่ายและราคาถูก มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดี ค่า CMC ต่ำ ดูดกลืนแสงช่วงยูวี-วิสิเบิลต่ำ



รูปที่ 1.3 โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวและไมเซลล์: ดัดแปลงจาก [Khaledi: 1998]

2) Microemulsion Electrokinetic Chromatography (MEEKC) [Altria: 2000]

บัฟเฟอร์ของ MEEKC ประกอบด้วยหยดน้ำมัน (เช่น n-octane, ethyl acetate), สารลดแรงตึงผิว (เช่น SDS) และสารลดแรงตึงผิวร่วม (co-surfactant เช่น 1-บิวทานอล) โดยสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมจะไปล้อมรอบหยดน้ำมันดังรูปที่ 1.4 หยดน้ำมันจะมีขนาดเป็นนาโนเมตรและกระจายอยู่ในบัฟเฟอร์ ลักษณะนี้เรียกว่า ไมโครอิมัลชัน (microemulsion) ในเทคนิค MEEKC หยดน้ำมันที่ล้อมรอบด้วยสารลดแรงตึงผิวหรือเรียกว่าเฟสไมโครอิมัลชัน (microemulsion phase) ทำหน้าที่เป็นเฟสคงที่เทียมเช่นเดียวกับไมเซลล์ของเทคนิค MEKC

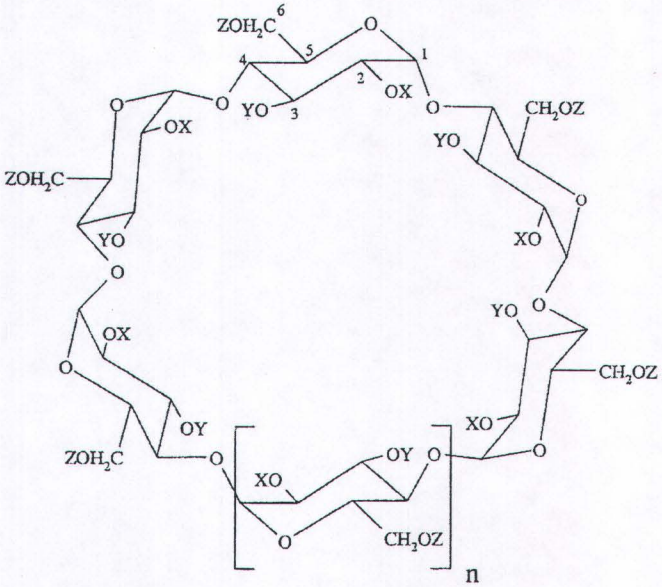


รูปที่ 1.4 หยดน้ำมันที่มีสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมมาล้อมรอบ : ดัดแปลงจาก [Altria: 2000]

3) Cyclodextrin Electrokinetic Chromatography (CD-EKC) [Khaledi: 1998]

สำหรับ CD-EKC มีการเติมไซโคลเด็กซ์ทริน (cyclodextrin, CD) ลงไปเพื่อเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับสารตัวอย่าง โดย CD เป็นวงโอลิโกแซคาไรด์ (cyclic oligosaccharide) ที่

ประกอบด้วยหน่วยของน้ำตาล *D*-(+)-กลูโคไพราโนส (glucopyranose) ที่แต่ละวงต่อกันด้วยพันธะเคมีระหว่างตำแหน่ง α-(1,4) โดยมีจำนวน 6, 7 และ 8 หน่วย และมีชื่อเรียกว่า α-, β- และ γ-CD ตามลำดับ สูตรโครงสร้างของ CD แสดงดังรูปที่ 1.5 นิยมใช้ CD แยกทั้งสารประเภทไครัล (chiral compound) และ อะไครัล (achiral compound) เนื่องจาก CD มีความเสถียรใน pH ช่วงกว้าง มีการดูดกลืนแสงในช่วงยูวีน้อยมาก (ช่วงยูวีเป็นช่วงความยาวคลื่นที่นิยมใช้ในการตรวจวัดสาร) และสามารถเพิ่มความจำเพาะในการแยกสารโดยใช้ CD ที่มีประจุหรือไม่มีประจุ และอนุพันธ์ต่างๆ ของ CD เนื่องจาก CD มีลักษณะโครงสร้างที่เป็นโพรงที่มีความไฮโดรโฟบิก (hydrophobic cavity) จึงสามารถเกิด inclusion complex กับสารตัวอย่าง โดยเฉพาะสารที่มีวงแหวนเบนซิน โดยที่วงเบนซีนจะเข้าไปอยู่ในโพรง กลไกการแยกสารด้วย CD-EKC ขึ้นอยู่กับความแตกต่างกันของ binding constant (*K*) ในการเกิด inclusion complex และความสามารถในการเคลื่อนที่ของสารเอง จึงทำให้สารมีความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าแตกต่างกัน



รูปที่ 1.5 ไซโคลเด็กทรินซ์มีน้ำตาล 6, 7, 8 หน่วย สำหรับ α-, β- และ γ-CD ตามลำดับ โดยที่ x, y, z เป็น H สำหรับ native CD และ หมู่แทนที่สำหรับอนุพันธ์ เช่น หมู่เมทิล เป็นต้น

1.2 ประสิทธิภาพการแยก (Efficiency) การรีเทน (Retention) และค่าจำเพาะการแยก (Selectivity) ต่อค่าการแยกสาร (Resolution) [Poole: 2003]

ค่าการแยกของสาร (Resolution, R_s) ใน HPLC มีความสัมพันธ์กับตัวแปรต่างๆ คือ

$$R_s = \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right)\left(\frac{k_2}{1+k_2}\right)\frac{\sqrt{N}}{4} \qquad (1.1)$$

เมื่อ k เป็น retention factor ของสาร

α เป็น selectivity หรือ separation factor นิยามเป็นอัตราส่วนของ k เช่น $\alpha = k_2/k_1$ สำหรับ $k_2 > k_1$

$\overline{N}$ ค่าเฉลี่ยของประสิทธิภาพของพีก (peak efficiency) หรือจำนวนเพลททางทฤษฎี (number of theoretical plate)

ในขณะที่ค่าการแยกของสารใน CE มีความสัมพันธ์กับตัวแปรต่างๆ ดังสมการ

$$R_s = \frac{\sqrt{\overline{N}}}{4} \cdot \frac{\Delta\mu}{\overline{\mu} + \mu_{eo}} \tag{1.2}$$

เมื่อ $\Delta\mu$ เป็นผลต่างของμ และ μ_{eo} เป็น electroosmotic mobility

เมื่อจัดรูปสมการที่ 1.2 ให้มีความสัมพันธ์กับเทอมของประสิทธิภาพการแยก, selectivity และ mobility คล้ายคลึงกับใน HPLC ได้ดังสมการ

$$R_s = \left(\frac{\sqrt{\overline{N}}}{4}\right)\left(\frac{\alpha_m - 1}{\alpha_m}\right)\left|\frac{\mu_2}{\overline{\mu} + \mu_{eo}}\right| \tag{1.3}$$

เมื่อ α_m เป็น separation selectivity หรือ mobility selectivity นิยามเป็นอัตราส่วนของ effective electrophoretic mobility (μ_{eff}) เช่น $\mu_{eff,2}/\mu_{eff,1}$, $\alpha_m > 1$

จากสมการที่ 1.1 และ 1.3 เห็นได้ว่าค่าการแยกของสารขึ้นกับ selectivity เป็นหลัก นอกจากนี้ retention และ efficiency ก็เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อค่าการแยกสารสำหรับเทคนิคทาง HPLC และ CE ด้วย

1.3 วัตถุประสงค์และขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้เน้นศึกษาเชิงทฤษฎีของ retention และ selectivity รวมถึงหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับแยกกลุ่มสารที่สนใจด้วยเทคนิค μHPLC และ CE โดยวัตถุประสงค์ของงานวิจัยแบ่งออกเป็น 6 หัวข้อหลัก ได้แก่

1) เปรียบเทียบประสิทธิภาพการแยก และหาภาวะที่เหมาะสมของการแยกสารกลุ่มที่สนใจใน HPLC กับ μHPLC

2) ศึกษาพฤติกรรมการเคลื่อนที่และการแยกของสาร รวมถึงเปรียบเทียบ selectivity ของสารใน μHPLC ด้วยคอลัมน์ประเภทซิลิกามอนอลิตที่มีเฟสคงที่ต่างกัน

3) เปรียบเทียบและทำนายการรีเทนของสารในเทคนิค MEKC และ MEEKC

4) สร้างแบบจำลองของ separation selectivity สำหรับสารที่มีประจุในเทคนิค MEKC

5) สร้างแบบจำลองของ separation selectivity สำหรับสารที่มีประจุในเทคนิค CD-EKC

6) เปรียบเทียบ separation selectivity ของสารในเทคนิค CZE, MEKC และ CD-EKC

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยแรก (บทที่ 2) เป็นการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการแยก และหาภาวะที่เหมาะสมของการแยกสารกลุ่มที่มีลักษณะสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกันด้วย HPLC ด้วย packed column กับ μHPLC ด้วยคอลัมน์ประเภทมอนอลิต สารกลุ่มที่สนใจ ได้แก่ ฟีนอกซีแอซิด (phenoxy acids) ซึ่งเป็นสารปราบวัชพืช และสารกลุ่มบิสฟีนอลเอไดไกลซิดิลอีเทอร์ (bisphenol-A-diglycidyl ether, BADGE) บิสฟีนอลเอฟไดไกลซิดิลอีเทอร์ (bisphenol-F-diglycidyl ether, BFDGE) และอนุพันธ์ ซึ่งเป็นสารปนเปื้อนในอาหารที่บรรจุกระป๋อง งานวิจัยนี้ได้เตรียมและทดสอบประสิทธิภาพของคะพิลลารีคอลัมน์ประเภทซิลิกามอนอลิตที่ปรับปรุงพื้นผิวแบบ reversed-phase และนำคอลัมน์ที่เตรียมได้ใช้แยกและวิเคราะห์สารทั้งสองกลุ่มดังกล่าว โดยทำการปรับเปลี่ยนเฟสคงที่ และชนิดและองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ จากนั้นเปรียบเทียบการแยกที่ได้ใน μHPLC ด้วยคอลัมน์ประเภทมอนอลิต กับ HPLC ด้วย packed column

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยที่สอง (บทที่ 3) คือ ศึกษาพฤติกรรมการเคลื่อนที่และการแยกของสาร รวมถึงเปรียบเทียบ selectivity ของสารใน μHPLC ด้วยคอลัมน์ประเภทซิลิกามอนอลิตที่ปรับปรุงพื้นผิวแบบ reversed-phase ที่แตกต่างกัน เน้นศึกษาการแยกของสารประกอบที่มีแฮโลเจนเป็นองค์ประกอบซึ่งสารประกอบประเภทนี้มีสารหลากหลายกลุ่ม แต่ละกลุ่มประกอบด้วย homologues และ isomers มากมาย ในการศึกษาและเปรียบเทียบการรีเทนและ selectivity ของสารได้เตรียมและใช้คอลัมน์ประเภทซิลิกาที่ปรับปรุงพื้นผิวให้มีเฟสคงที่ต่างกันตามที่มีรายงานก่อนหน้านี้ ได้แก่ คอลัมน์ที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยหมู่ C18 ซึ่งนิยมใช้ใน reversed phase ทั่วไป [Miyamoto *et al.*: 2008] และ poly(octadecyl methacrylate) ซึ่งได้พัฒนาขึ้นมาใหม่เมื่อไม่นานนี้ [Núñez *et al.*: 2007] โดยได้ทำการปรับเปลี่ยนชนิดและองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ในการแยกสารด้วยเฟสคงที่แต่ละประเภท ในการศึกษาข้อมูลเปรียบเทียบ selectivity ของเฟสคงที่จะทำให้เข้าใจอันตรกิริยาจะที่เกิดขึ้นระหว่างสารกับเฟสคงที่ทั้งสอง เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการเลือกเฟสคงที่ให้เหมาะสมกับการวิเคราะห์สารที่สนใจในการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์

สำหรับงานวิจัยเรื่องที่สาม (บทที่ 4) เป็นการเปรียบเทียบและทำนายการรีเทนของสารในเทคนิค MEKC และ MEEKC นั้น เห็นได้ว่าเทคนิคทั้งสองมีความคล้ายคลึงกันต่างกันเพียงเฟสคงที่เทียมเป็นไมเซลล์ใน MEKC และไมโครอิมัลชันสำหรับ MEEKC จึงมีหลายงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ศึกษาและเปรียบเทียบพฤติกรรมการรีเทนของสารต่างๆ ในเทคนิค MEKC และ MEEKC เช่น กลุ่ม BADGE และอนุพันธ์ [Pooutree *et al.*: 2007] ยาปราบศัตรูพืช [Song *et al.*: 1995] เป็นต้น

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

นอกจากนี้งานวิจัยก่อนหน้า [Kelly *et al.*: 2001] ได้มีรายงานสมการและวิธีการทำนายค่ารีเทนชันของสารประกอบแอโรแมติกที่มีหมู่แทนที่ในเทคนิค MEKC โดยพบว่า ค่า log k ที่ทำนายได้ของสารประกอบแอโรแมติกที่มีหมู่แทนที่สองหมู่ซึ่งเป็นไอโซเมอร์โครงสร้างกันมีค่าเท่ากัน ในขณะที่ค่าที่ได้จากการทดลองไม่เท่ากัน ในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษา เปรียบเทียบและทำนายการรีเทนของสารประกอบแอโรแมติกที่มีหมู่แทนที่สองหมู่แตกต่างกันและเป็นไอโซเมอร์โครงสร้างกันใน MEKC และ MEEKC โดยคำนึงถึงตำแหน่งของไอโซเมอร์โครงสร้างด้วย หมู่แทนที่บนวงแอโรแมติกที่ได้ทำการศึกษา ได้แก่ หมู่เมทิล เมทอกซี แอลดีไฮด์ และแฮโลเจน

งานวิจัยเรื่องที่สี่ (บทที่ 5) เป็นการแยกสารที่มีประจุด้วยเทคนิค MEKC ขึ้นอยู่กับความแตกต่างของการ partitioning ของสารระหว่างไมเซลล์เฟสและเอเควียสเฟส นอกเหนือจากความแตกต่างของค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารเอง จึงทำให้ separation selectivity ของสารเปลี่ยนไปได้ เมื่อเทียบกับในเทคนิค CZE ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้จัดรูปสมการของ separation selectivity ใน MEKC ให้มีความสัมพันธ์กับ mobility selectivity ใน CZE และ retention selectivity ของสารใน MEKC เอง และสร้างแบบจำลองของ separation selectivity ของสารที่มีประจุในเทคนิค MEKC รวมถึงเปรียบเทียบค่า separation selectivity ใน MEKC ที่ได้จากการทำนายและได้จากการทดลอง เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีการแยกสารที่มีประจุด้วย MEKC

งานวิจัยชิ้นที่ห้า (บทที่ 6) มีแนวคิดคล้ายคลึงกับงานวิจัยชิ้นที่สี่ (บทที่ 5) โดยเป็นการแยกสารที่มีประจุซึ่งมีค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าใน CZE แตกต่างกัน ด้วยเทคนิค CD-EKC ดังนั้นความแตกต่างของค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารจึงขึ้นกับทั้งผลของ binding constant ในการเกิด inclusion complex ระหว่างสารกับ CD และผลของค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารเอง ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค CZE การแยกสารในเทคนิค CD-EKC อาจทำให้สารมี separation selectivity และลำดับการออกของสารเปลี่ยนไปได้ โดยในงานวิจัยนี้ได้จัดรูปสมการของ separation selectivity ใน CD-EKC ให้มีความสัมพันธ์กับตัวแปรที่ไม่มีหน่วย ได้แก่ mobility selectivity ใน CZE, binding selectivity, อัตราส่วนของค่า mobility ของสารใน CZE และค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง analyte กับ CD, อัตราส่วนของค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารกับ CD สำหรับสารทั้งสองตัว และผลคูณของ binding constant กับความเข้มข้นของ CD หลังจากจัดรูปสมการของ separation selectivity ใน CD-EKC แล้ว จึงนำไปสร้างแบบจำลองของ separation selectivity สำหรับสารที่มีประจุในเทคนิค CD-EKC และเปรียบเทียบค่า separation selectivity ใน CD-EKC ที่ได้จากการทำนายและจากการทดลอง เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีการแยกสารที่มีประจุด้วยเทคนิค CD-EKC

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยเรื่องที่หก (บทที่ 7) คือ เปรียบเทียบ separation selectivity ของสารที่มีค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าใกล้เคียงกันมากในเทคนิค CZE, MEKC และ

CD-EKC โดยปรับเปลี่ยนองค์ประกอบต่างๆ ของบัฟเฟอร์ในแต่ละเทคนิค ได้แก่ ชนิดและองค์ประกอบของตัวทำละลายอินทรีย์ใน CZE, ความเข้มข้นของ SDS และชนิดและองค์ประกอบของตัวทำละลายอินทรีย์ใน MEKC และชนิดและองค์ประกอบของ CD ใน CD-EKC เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีการแยกสารในเทคนิค CE โดยกลุ่มสารที่ทำการศึกษา ได้แก่ สารประกอบแอโรแมติกแอซิดที่มีหมู่แทนที่แตกต่างกันเป็นหมู่เมทิลหรือหมู่คลอโร

เอกสารอ้างอิง

Altria, K.D. "Background Theory and Applications of Microemulsion Electrokinetic Chromatography" *Journal of Chromatography A* **892** (2000) 171-186.

Grossman P.D. and Colburn J.C., *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*, Academic Pres, Inc. San Diego, 1992.

Kelly, K. A., Burns, S.T., and Khaledi, M. G., "Prediction of Retention in Micellar Electrokinetic Chromatography from Solute Structure. 1. Sodium Dodecyl Sulfate Micelles" *Analytical Chemistry* **73** (2001) 6057–6062.

Khaledi M.G., *High-Performance Capillary Electrophoresis*, John Wiley & Sons,Inc., USA, 1998.

Legido-Quigley C., Marlin N. D., Melin V., Manz A.and Smith N. W. "Advances in capillary electrochromatography and micro-high performance liquid chromatography monolithic columns for separation science" *Electrophoresis* **24** (2003) 917-944.

Li W., Fries D.P. and Malik A. "Sol-Gel Stationary Phases for Capillary Electrochromatography" *Journal of Chromatography A* **1044** (2004) 23.

Miyamoto K., Takeshi H., Kobayashi H., Morisaka H., Tokuda D., Horie K., Koduki K., Makino S., Núñez O., Yang C., Kawabe T., Ikegami T., Takubo H., Ishihama Y., and Tanaka N. "High-Efficiency Liquid Chromatography Separation Utilizing Long Monolithic Silica Capillary Columns" *Analytical Chemistry* **80** (2008) 8741-8750.

Neue U. D., *HPLC Columns: Theory, Technology, and Practice*, Wiley-VCH, Inc, Canada, 1997.

Núñez O., Ikegami T., Kajiwara W., Miyamoto K., Horie K., and Tanaka N. "Preparation of high efficiency and highly retentive monolithic silica capillary columns for reversed-phase chromatography by chemical modification by polymerization of octadecyl methacrylate" *Journal of Chromatography A* **1156** (2007) 35-44.

Poole C.F., *The Essence of Chromatography*, Elsevier, Netherlands, 2003, p. 32, 52, 667.

Pooutree, K., Soonthorntantikul, W., Leepipatpiboon, N. and Nhujak, T., "Comparison of Resolution in Microemulsion EKC and MEKC Employing Suppressed Electroosmosis: Application to Bisphenol-A-Diglycidyl Ether and Its Derivatives" *Electrophoresis* **28** (2007) 3705–3711.

Skoog, D. A. and Leary, J. J., *Principles of Instrumetnal Analysis*, 4th Edition, Saunders College Publishing, Orlando, 1992, Chapter 6.

Song, L., Ou, Q., Yu, W., and Li, G., "Separation of Six Phenylureas and

Chlorsulfuron Standards by Micellar, Mixed Micellar and Microemulsion Electrokinetic Chromatography" *Journal of Chromatography A* **699** (1995) 371–382.

Tanaka N., Nagayama H., Kobayashi H., Ikegami, T. Hosoya, K. Ishizuka, N. Minakuchi H., Nakanishi K., Cabrera K. and Lubda D. "Monolithic silica columns for HPLC, Micro-HPLC, and CEC" *Journal of High Resolution Chromatography* **23** (2000) 111-116.