

บทที่ 6

แบบจำลองทางทฤษฎีของค่าจำเพาะการแยกสำหรับสารที่มีประจุ ในเทคนิคไซโคลเดกซ์ทรินอิเล็กโตรโครมาโทกราฟี¹

6.1 คำนำ

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 1.1.3.2 ในบทที่ 1 ไซโคลเดกซ์ทรินอิเล็กโตรโครมาโทกราฟี (cyclodextrin electrokinetic chromatography, CD-EKC) เป็นเทคนิคหนึ่งใน CE ที่มีการเติมไซโคลเดกซ์ทริน (cyclodextrin, CD) ลงไปในบัฟเฟอร์เพื่อทำหน้าที่เป็นเฟสเทียม (pseudo stationary phase) และเกิด inclusion complex ระหว่างสารกับ CD ส่งผลให้เกิดความแตกต่างของค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ของสาร สำหรับค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารใน CD-EKC แสดงดังสมการ [Wren: 1993, Penn *et al.*: 1994, Chankvetadze: 1997]

$$\mu = \frac{\mu_0 + KC\mu_\infty}{1 + KC} \quad (6.1)$$

μ_0 คือ ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารใน CZE หรือภาวะที่ไม่มี CD

μ_∞ คือ ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารกับ CD

C คือ ความเข้มข้นของ CD ที่ไม่เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่ภาวะสมดุล ซึ่งมีค่าเท่ากับความเข้มข้น CD ที่เติมลงไปเมื่อความเข้มข้น CD มีค่ามากกว่าความเข้มข้นของสารมาก ๆ

K คือ ค่า binding constant ระหว่างสารกับ CD

เทคนิค CD-EKC นิยมใช้สำหรับการแยกไอออนิกโพลิเมอร์ [Cucinotta *et al.*: 2010, Fanali: 2009, Chankvetadze: 2009, Gübitz and Schmid: 2008, Al Azzam *et al.*: 2010, Kwarczak *et al.*: 2009, Yang *et al.*: 2008, Zhang *et al.*: 2008, Chankvetadze *et al.*: 2003] ซึ่งมีค่า μ_0 และ μ_∞ เท่ากัน แต่มีค่า K ต่างกัน กลไกการแยกของสารใน CD-EKC สำหรับสารที่มีค่า μ_0 เท่ากัน ขึ้นอยู่กับความแตกต่างของค่า K ระหว่างสารกับ CD เพียงอย่างเดียว นอกจากการแยกสารประกอบประเภทไครัลแล้ว CD-EKC ยังนิยมใช้สำหรับแยกสารประเภทอะไครัล [Epple *et al.*: 2010, Cheung *et al.*: 2008, Česla *et al.*: 2007, Tain *et al.*: 2006, Chen and Ding: 2004, Ferguson *et al.*: 1997, Luong

¹งานวิจัยนี้ได้นำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติที่ APCE2010HongKong และเขียนเพื่อส่งตีพิมพ์ในวารสารดังกล่าว 4

and Nguyen: 1997, Hsieh and Huang: 1996] เช่น สารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก และ positional isomers เป็นต้น

ในการแยกสารที่มีค่า μ_0 แตกต่างกัน กลไกการแยกสารใน CD-EKC จึงขึ้นกับทั้งความแตกต่างของค่า K ระหว่างสารกับ CD และความแตกต่างของ μ_0 ของสาร เมื่อเปรียบเทียบกับ CZE การเติม CD ลงไปในบัฟเฟอร์ใน CD-EKC อาจส่งผลทำให้ลำดับการออกของสารเหมือนหรือแตกต่างก็เป็นได้ และทำให้ค่าจำเพาะการแยกของบางคู่สารเพิ่มขึ้นหรือบางคู่สารลดลงได้ [Cheung *et al.*: 2008, Česla *et al.*: 2007, Chen and Ding: 2004, Ferguson *et al.*: 1997, Hsieh and Huang: 1996] ซึ่งผลของการเติม CD ที่มีต่อค่าจำเพาะการแยกและลำดับการออกของสารดังกล่าวให้ผลคล้ายคลึงกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ในกลุ่มวิจัย ได้แก่ การแยกสารไครลที่มีประจุด้วย CD ที่ไม่มีประจุสองชนิด [Nhujaik *et al.*: 2005] และการแยกสารที่มีประจุด้วย MEKC (ดังที่กล่าวในบทที่ 5) [Puangpila *et al.*: 2011] ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของค่าจำเพาะการแยกสารเมื่อเติมเฟสเทียม เช่น CD สองชนิดใน CD-EKC หรือ ไมเซลล์ใน MEKC ลงไป สามารถใช้แบบจำลองของค่าจำเพาะการแยกสำหรับสารที่มีประจุช่วยในการอธิบายได้

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้จัดรูปสมการให้สัมพันธ์กับตัวแปรที่ไม่มีหน่วยและสร้างแบบจำลองสำหรับค่าจำเพาะการแยกสารใน CD-EKC (α_{CD}) เพื่อใช้สำหรับอธิบายการเปลี่ยนแปลง α_{CD} และลำดับการเคลื่อนที่ของสารที่มีประจุที่มีค่า μ_0 แตกต่างกันและใช้ CD ที่ไม่มีประจุ นอกจากนี้ได้เปรียบเทียบค่าความจำเพาะการแยกที่ได้จากการทำนายและจากการทดลองที่ความเข้มข้นของ β -CD ต่างๆ (0-16 mM) โดยใช้สารทดสอบเป็นสารประกอบกลุ่มอนุพันธ์ของกรดเบนโซอิกและกรดฟีนอกซีอะซีติก

6.2 การทดลอง

6.2.1 สารเคมี

disodium tetraborate decahydrate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) และ sodium hydroxide ของบริษัท Fluka (Buchs, Switzerland), β -CD ของบริษัท Sigma (St. Louis, MO, USA), mesityl oxide ของบริษัท Aldrich (WI, USA), 3-chlorobenzoic acid (3C), 4-chlorobenzoic acid (4C) and 4-methylbenzoic acid (4M) ของบริษัท Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) และ 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid (MCPA) ของบริษัท Riedel de Haën (Seelze, Germany)

6.2.2 การเตรียมบัฟเฟอร์และสารทดสอบ

บัฟเฟอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น CZE และ CD-EKC สำหรับบัฟเฟอร์ที่ใช้ใน CZE ประกอบด้วย 10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ที่ pH 9.2 และบัฟเฟอร์ที่ใช้ใน CD-EKC ประกอบด้วย β -CD เข้มข้น 2-16 mM (16 mM เป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ β -CD ละลายน้ำได้) และ 10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ และ

สำหรับสารละลาย stock ของสารทดสอบแต่ละชนิดความเข้มข้น 5.0 mM เตรียมโดยละลายเมทานอลในปริมาณน้อยที่สุดและปรับปริมาณด้วยน้ำบริสุทธิ์ และสารละลายผสมที่นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง CE ประกอบด้วยสารทดสอบแต่ละชนิดเข้มข้น 0.1 mM และ 50 ppm mesityl oxide ที่เจือจางให้มี 1.0 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ จากนั้นนำสารละลายผสมและบัฟเฟอร์มา sonicated และกรองผ่าน 0.45 μm membrane filter ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง CE

6.2.3 ภาวะของ CE

เครื่อง CE ของบริษัท Beckman รุ่น MDQ, คัพลิตารีคอตัมน์เป็น uncoated fused silica capillary ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 50 μm ยาว 40.2 cm (30 cm ถึงเครื่องตรวจวัด) บรรจุสารด้วยความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 3 วินาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 °C ศักย์ไฟฟ้า 15 kV และตรวจวัดสารที่ความยาวคลื่น 214 nm

ก่อนการวิเคราะห์ในแต่ละวันล้างคัพลิตารีด้วย 0.1 M NaOH และบัฟเฟอร์อย่างละ 10 นาที และระหว่างการวิเคราะห์ในแต่ละครั้งล้างคัพลิตารีด้วย 0.1 M NaOH และบัฟเฟอร์อย่างละ 3 นาที แต่ละการทดลองทำซ้ำสองครั้ง

6.3 ผลการทดลองและวิจารณ์

6.3.1 แบบจำลองของค่าจำเพาะการแยกสำหรับสารที่มีประจุในเทคนิค CD-EKC

จากสมการค่าการแยกสาร ดังสมการที่ 1.3 หรือ 5.2 ค่าการแยกสารขึ้นกับเทอมของค่าจำเพาะการแยก ในที่นี้หมายถึงค่าจำเพาะการแยกของ CD-EKC (α_{CD}) ซึ่งคำนวณได้จากอัตราส่วนของค่า μ (สมการที่ 6.1) (μ_2/μ_1) ในกรณีแยกสารที่มีประจุชนิดที่ 1 และ 2 โดยกำหนดให้ $K_1 \geq K_2$ ได้สมการของค่าจำเพาะการแยกด้วย CD-EKC ที่จัดให้อยู่ในรูปที่สัมพันธ์กับตัวแปรที่ไม่มีหน่วย เช่น α_{CZE} , κ , β , γ และ KC ดังสมการ

$$\alpha_{\text{CD}} = \alpha_{\text{CZE}} \left(\frac{\beta_2 + K_2 C}{\beta_2 + \alpha_{\text{CZE}} \kappa K_2 C \gamma} \right) \left(\frac{1 + \kappa K_2 C}{1 + K_2 C} \right) \quad (6.2)$$

α_{CZE} คือ ค่าจำเพาะการแยกใน CZE คำนวณได้จากอัตราส่วนของ μ_0 ($\mu_{0,2}/\mu_{0,1}$)

κ คือ CD binding selectivity คำนวณได้จากอัตราส่วนของ K (K_1/K_2) โดยที่ $\kappa \geq 1.0$

β_2 คือ อัตราส่วนของ $\mu_{0,2}/\mu_{\infty,2}$

γ คือ อัตราส่วนของ $\mu_{\infty,1}/\mu_{\infty,2}$

จากตัวแปรในสมการที่ 6.2 เห็นได้ว่า กำหนดให้ค่าจำเพาะการแยก (α_{CZE} หรือ α_{CD}) จำนวนได้จากอัตราส่วนของ μ ของสารตัวที่ 2/1 ในขณะที่กำหนดให้ k จำนวนได้จากอัตราส่วนของ K ของสารตัวที่ 1/2 ทั้งนี้เนื่องจากใน CD-EKC ยิ่งสารมีค่า K มาก ส่งผลให้ $|\mu|$ ของสารที่เกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับ CD ลดลง

เมื่อใช้แนวคิดเกี่ยวกับงานวิจัยของกลุ่มวิจัยก่อนหน้านี้ที่ทำการสร้างแบบจำลองของค่าจำเพาะการแยกสารกลุ่มไครลที่มีประจุด้วย CD สองชนิดใน CD-EKC [Nhujaik *et al.*: 2005] และแบบจำลองค่าจำเพาะการแยกใน MEKC สำหรับสารที่มีประจุ [Puangpila *et al.*: 2011] ดังนั้นแบบจำลองค่าจำเพาะการแยกใน CD-EKC สำหรับสารที่มีประจุและใช้ CD ที่ไม่มีประจุ สามารถจำแนกได้ 4 แบบ แสดงดังตารางที่ 6.1 ซึ่งจำแนกได้โดยพิจารณาจาก selectivity ratio (ρ) กำหนดให้เป็นอัตราส่วนของ k/α_{CZE} และลำดับของ $|\mu_0|$ ใน CZE กับ K ใน CD-EKC ซึ่งลำดับของ $|\mu_0|$ ใน CZE กับ K ใน CD-EKC เหมือนกัน หมายถึง $K_1 > K_2$ และ $|\mu_{0,1}| > |\mu_{0,2}|$ ในขณะที่ลำดับทั้งสองสลับกันหมายถึง $K_1 > K_2$ และ $|\mu_{0,2}| > |\mu_{0,1}|$ สมการที่ 6.2 สามารถใช้สำหรับทำนายค่าความจำเพาะการแยกของสารใน CD-EKC ได้ทั้งในกรณีที่ $\mu_{0,1} \neq \mu_{0,2}$ หรือ $\mu_{0,1} = \mu_{0,2}$ ($\alpha_{CZE} > 1.0$, < 1.0 หรือ $= 1.0$) และ $k \geq 1.0$ เสมอ ในทางปฏิบัติ ค่าจำเพาะการแยกของสารมีค่าเท่ากับ $1/\alpha_{CZE}$ หรือ $1/\alpha_{CD}$ สำหรับค่าจำเพาะการแยกของสารทางทฤษฎีที่มี α_{CZE} หรือ $\alpha_{CD} < 1.0$ จากสมการที่ 6.2 และค่าของตัวแปรต่างๆ ดังตารางที่ 6.1 ได้แบบจำลองของค่าจำเพาะการแยกของสารใน CD-EKC แบบที่ 1 ถึง 3 ในช่วง K_2C ต่างๆ และมี ρ ต่างกัน แสดงดังรูปที่ 6.1 โดยที่ K_2C เท่ากับ 0 แสดงว่า α_{CD} หมายถึง α_{CZE}

จากแบบจำลองค่าจำเพาะการแยกของสารใน CD-EKC แบบที่ 1 ดังรูปที่ 6.1A ซึ่งเป็นการแยกสารด้วย CD-EKC ที่มี $k > \alpha_{CZE} \geq 1$ พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ CD ลงไปในบัฟเฟอร์ α_{CD} มีค่าเพิ่มขึ้นจนมีค่ามากที่สุดที่ K_2C ประมาณ 1 หลังจากนั้น α_{CD} มีค่าลดลงเรื่อยๆ เมื่อ K_2C มีค่าสูงขึ้น โดยที่ค่า K_2C ใดๆ ยิ่งค่า ρ มากขึ้น α_{CD} ยิ่งมากขึ้น จากแบบจำลองที่ได้ดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า เมื่อเปรียบเทียบกับสารที่แยกด้วย CZE การแยกสารด้วย CD-EKC ที่มีลักษณะตามแบบจำลองที่ 1 ช่วยเพิ่มค่าการแยกของสารที่ประจุได้ หรืออธิบายอย่างง่ายได้โดยเมื่อสารมี $|\mu_{0,2}| > |\mu_{0,1}|$ ใน CZE ($\alpha_{CZE} > 1$) แล้วสารตัวที่ 1 เกิด binding กับ CD ได้ดีกว่า ($K_1 > K_2$ และ $k > \alpha_{CZE}$) ส่งผลให้ค่า $|\mu_1| > |\mu_2|$ ดังนั้นจึงได้ α_{CD} มากขึ้นที่ K_2C เหมาะสม

ในทางกลับกันกับแบบจำลองที่ 1 การแยกสารด้วย CD-EKC ที่มี $\alpha_{CZE} \geq k \geq 1$ (รูปที่ 6.1B) ซึ่งเป็นแบบจำลองที่ 2 การแยกของสารมี α_{CD} ลดลงเมื่อเติม CD เพิ่มลงไปในบัฟเฟอร์ ยิ่ง ρ น้อย α_{CD} ยิ่งมีค่าน้อยลง แสดงให้เห็นว่าถ้าสารมีการแยกเหมือนแบบจำลองที่ 2 การแยกสารด้วย CD-EKC ส่งผลให้การแยกแย่งกว่าใน CZE

รูปที่ 6.1C แสดงแบบจำลองค่าจำเพาะการแยกสารในเทคนิค CD-EKC แบบที่ 3 โดยเป็นการแยกสารด้วย CD-EKC ที่มี $k \geq 1 > \alpha_{CZE}$ และลำดับของ $|\mu_0|$ ใน CZE กับ $|\mu|$ ใน CD-EKC จะ

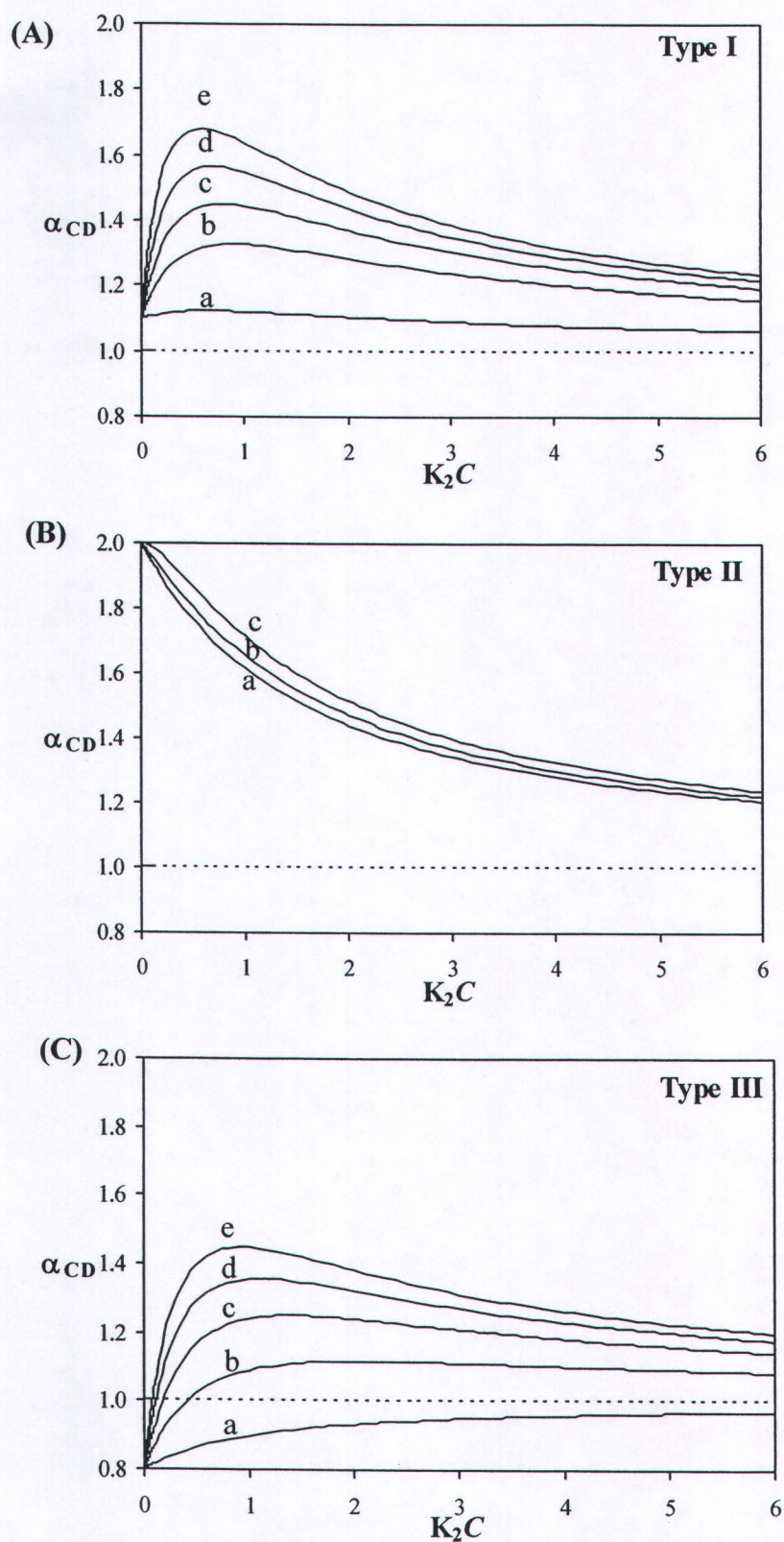
สลับกัน โดยเมื่อเดิม CD ลงไปในบัพเฟอ์การแยกสารลดลง เริ่มต้นจาก $1/\alpha_{CD} > 1$ ($\alpha_{CD} < 1$) ไปจนกระทั่ง α_{CD} มีค่าเท่ากับ 1 แล้วหลังจากนั้นการแยกสารจะดีขึ้น (α_{CD}) ที่ K_2C เพิ่มมากขึ้น จากสมการที่ 6.2 สามารถคำนวณ K_2C ที่ให้ α_{CD} มีค่าเท่ากับ 1 ได้ดังสมการ

$$K_2C = \frac{\beta(1 - \alpha_{CZE})}{\beta(\alpha_{CZE} \kappa - 1) + \alpha_{CZE}(1 - \kappa)} \quad (6.3)$$

เมื่อ $\alpha_{CZE} \kappa = 1$ หรือ $\kappa = 1/\alpha_{CZE}$ ดังรูปที่ 6.1C และ $\kappa = 1.25$ พบว่าลำดับของ $|\mu_0|$ ใน CZE กับ $|\mu|$ ใน CD-EKC ยังคงเหมือนเดิม และค่า K_2C ที่ให้ α_{CD} เท่ากับ 1 สามารถคำนวณได้เป็น $-\beta$ หมายความว่า α_{CD} อาจมีค่าเท่ากับ 1 ได้ เมื่อ K_2C มีค่ามากๆ สำหรับแบบจำลองที่ 3 ยิ่ง ρ มีค่ามากขึ้น K_2C ที่ให้ α_{CD} เท่ากับ 1 ยิ่งมีค่าลดลง และ K_2C ที่ให้ค่า α_{CD} สูงที่สุด จะมีค่าลดลงเมื่อค่า ρ มากขึ้น ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบกับการแยกสารด้วย CZE การแยกสารด้วย CD-EKC ที่เป็นไปตามแบบจำลองที่ 3 นี้ โดยเฉพาะที่ค่า κ สูงๆ ส่งผลให้ค่าการแยกสารดีขึ้นเมื่อ $\kappa > 1/\alpha_{CZE}$ และสำหรับแบบจำลองค่าจำเพาะการแยกสารแบบที่ 4 ซึ่งมี $\kappa = \alpha_{CZE} = 1$ จะไม่เกิดการแยกของสารทั้งใน CZE และ CD-EKC (ไม่ได้แสดงรูปของแบบจำลอง)

ตารางที่ 6.1 ประเภทของแบบจำลองของ α_{CD}

แบบที่	ลำดับของ $ \mu_0 $ ใน CZE และ K ใน CD-EKC	ลำดับของ $ \mu_0 $ ใน CZE และ $ \mu $ ใน CD-EKC	α_{CZE} ($\mu_{0,2}/\mu_{0,1}$)	κ (K_1/K_2)	ρ	ค่าสมมติ		
						α_{CZE}	κ	β
I	สลับกัน	เหมือนกัน	$\alpha_{CZE} \geq 1$	$\kappa > \alpha_{CZE} \geq 1$	$\rho > 1.0$	1.1	1.2-6.8	3.0
II	สลับกัน	เหมือนกัน	$\alpha_{CZE} > 1$	$\alpha_{CZE} \geq \kappa \geq 1$	$\rho \leq 1.0$	2.0	1.1-2.0	3.0
III	เหมือนกัน	เหมือนกันหรือสลับกัน	$\alpha_{CZE} < 1$	$\kappa \geq 1 > \alpha_{CZE}$	$\rho > 1.0$	0.8	1.25-6.2	3.0
IV	ออกพร้อมกัน	ออกพร้อมกัน	$\alpha_{CZE} = 1$	$\kappa = \alpha_{CZE} = 1$	$\rho = 1.0$	-	-	-



รูปที่ 6.1 แบบจำลองของค่าจำเพาะการแยกด้วย CD-EKC สำหรับสารที่มีประจุ ซึ่งคำนวณได้จากสมการที่ 6.2 และข้อมูลต่างๆ ในตารางที่ 6.1 และ a ถึง e หมายถึงค่า binding selectivity (κ) สำหรับรูป (A) มีค่าเท่ากับ 1.2, 2.4, 3.5, 4.9 และ 6.8 ตามลำดับ, รูป (B) มีค่าเท่ากับ 1.1, 1.4 และ 2.0 ตามลำดับ และรูป (C) มีค่าเท่ากับ 1.25, 2.3, 3.5, 4.8 และ 6.2 ตามลำดับ

6.3.2 ค่าจำเพาะการแยกสารของสารทดสอบที่ได้จากการทำนายและจากการทดลองในเทคนิค CD-EKC

การทำนายแบบจำลองค่าจำเพาะการแยกของสารที่มีประจุใน CD-EKC ที่ใช้ CD ไม่มีประจุ ต้องทราบค่า α_{CZE} , k , β และ γ ก่อน ช่วงเริ่มแรกของงานวิจัย ได้ศึกษาการแยกกรดอ่อนหลากหลายชนิดมาด้วย CD-EKC แล้วจึงเลือกสารทดสอบทั้งหมด 4 ตัว ได้แก่ 3C, 4C, 4M และ MCPA ซึ่งเป็นสารกลุ่มอนุพันธ์กรดเบนโซอิกและกรดฟีนอกซี เพื่อใช้เป็นตัวอย่างของการแยกสารตามแบบจำลองของค่าจำเพาะการแยกของสารแบบที่ 1 ถึง 3 สารทดสอบทั้ง 4 ชนิดที่เลือกใช้มีค่า $pK_a < 4.4$ [Dean: 1987, Cessna and Grover: 1978] สารแต่ละตัวจึงแตกตัวเป็นประจุลบได้สมบูรณ์เมื่ออยู่ในบัฟเฟอร์ pH 9.2

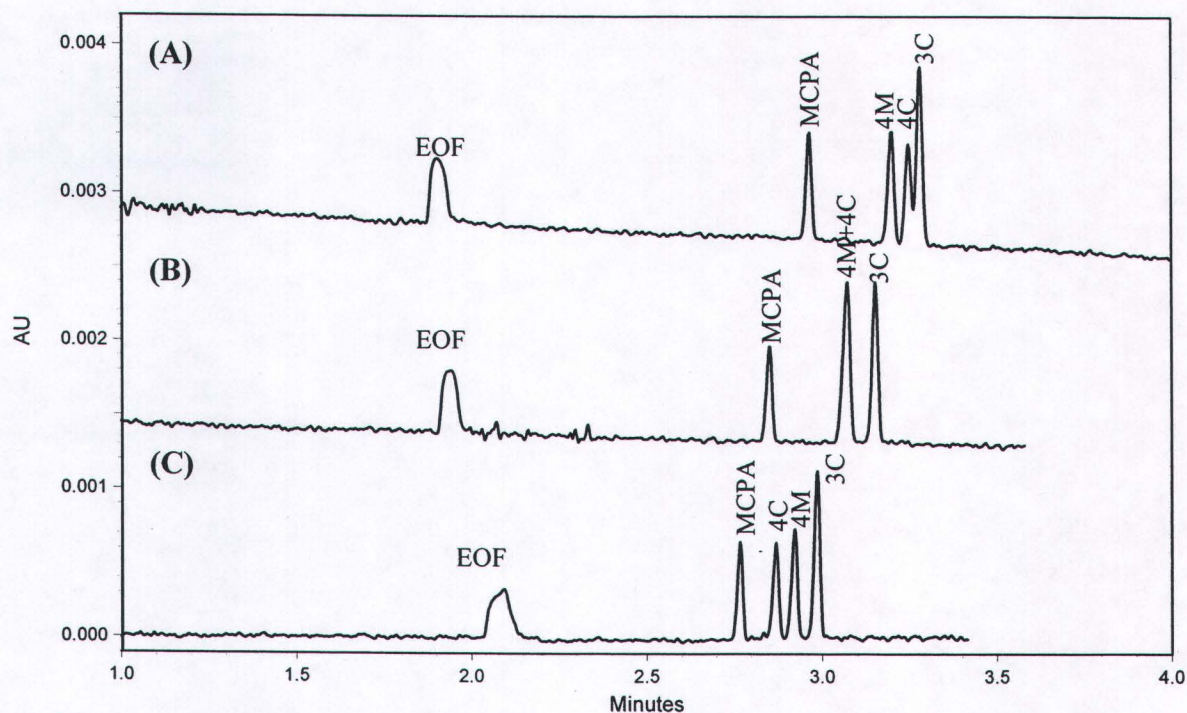
รูปที่ 6.2 แสดงตัวอย่างของอิเล็กโตรโฟโกราฟีของการแยก 3C, 4C, 4M และ MCPA ด้วยบัฟเฟอร์ของ CZE (0 mM β -CD, รูปที่ 6.2A) และบัฟเฟอร์ของ CD-EKC ที่มี β -CD เข้มข้น 2 mM (รูปที่ 6.2B) และ 12 mM (รูปที่ 6.2C) จากรูปที่ 6.2A ซึ่งเป็นการแยกสารด้วย CZE สารทดสอบที่มีประจุลบเคลื่อนที่ไปทิศทางตรงข้ามกับ EOF และมีลำดับของ $|\mu_0|$ เป็น $3C > 4C > 4M > MCPA$ ซึ่งขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของประจุต่อขนาดของสาร และจากรูปที่ 6.2B และ 6.2C ซึ่งเป็นการแยกสารด้วย CD-EKC ลำดับของ $|\mu|$ เป็นดังนี้ ที่ความเข้มข้น 2 mM β -CD (รูปที่ 6.2B) $3C > 4C \approx 4M > MCPA$ และที่ความเข้มข้น 12 mM β -CD (รูปที่ 6.2C) $3C > 4M > 4C > MCPA$ เมื่อเปรียบเทียบลำดับการเคลื่อนที่ของสารใน CZE กับ CD-EKC พบว่า 4C/3C, 4M/3C และ MCPA/4C มีลำดับการเคลื่อนที่เหมือนเดิมในช่วง 2-16 mM β -CD ในขณะที่เกิดสลับลำดับการเคลื่อนที่ของ 4C/4M ตั้งแต่ 2 mM β -CD ขึ้นไป ซึ่งพฤติกรรมการเคลื่อนที่ของสารทดสอบที่แตกต่างกันสามารถอธิบายได้โดยใช้แบบจำลองของค่าจำเพาะการแยกใน CD-EKC ดังที่ได้กล่าวไว้ในหัวข้อที่ 6.3.1

ตารางที่ 6.2 แสดง μ_0 , μ_∞ , α_{CZE} , K , k , p , β , γ และแบบของแบบจำลองค่าจำเพาะการแยก โดยค่า K และ μ_∞ สามารถคำนวณได้จากโปรแกรม CEfit ซึ่งหาจาก nonlinear least-square ของความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารที่ปรับแก้ตามการเปลี่ยนความหนืดของบัฟเฟอร์กับความเข้มข้นของ CD [Nhuja et al.: 2005, Nhuja and Goodall: 2001, Penn et al.: 1995] เมื่อใช้ข้อมูลจากตารางที่ 6.2 และคำนวณด้วยสมการที่ 6.2 ได้กราฟของ α_{CD} ใน CD-EKC ที่ได้จากการทดลอง (เส้น) และจากการทำนาย (จุด) ที่ K_2C ต่างๆ (รูปที่ 6.3A) และที่ความเข้มข้นของ β -CD ในช่วง 0-16 mM (รูปที่ 6.3B) ซึ่งกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง α_{CD} กับ K_2C สามารถใช้เปรียบเทียบค่าจำเพาะการแยกสารจากการทดลองและจากการทำนายได้โดยที่ไม่ทราบค่าความเข้มข้นของ CD ในขณะที่กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง α_{CD} กับความเข้มข้นของ β -CD สามารถใช้พิจารณาหาความเข้มข้นของ CD ที่เหมาะกับการแยกสารและการสลับลำดับการออกของสารด้วย จากรูปที่ 6.3 เห็นได้ว่า α_{CD} ที่ได้จากการทดลองสอดคล้องกับค่าที่ได้จากการทำนายอย่าง

ยัง แสดงให้เห็นว่าสมการที่ 6.2 สามารถใช้สำหรับทำนาย α_{CD} ที่ K_2C และที่ความเข้มข้นของ CD ต่างๆ ได้

เมื่อพิจารณารูปที่ 6.2 และข้อมูลดังตารางที่ 6.2 พบว่าลำดับของ $|\mu_0|$ ใน CZE และ K ใน CD-EKC สลับกันสำหรับ 4C/3C, 4M/3C และ MCPA/4C แต่ลำดับของ $|\mu_0|$ ใน CZE และ $|\mu|$ ใน CD-EKC เหมือนเดิม เมื่อเปรียบเทียบกับผลการแยกสารด้วย CZE การแยกของ 4C/3C และ 4M/3C ด้วย CD-EKC ให้ α_{CD} เพิ่มขึ้นเมื่อ K_2C และ C เพิ่มขึ้นและมี $\rho > 1.0$ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลง α_{CD} ของ 4C/3C และ 4M/3C สอดคล้องกับแบบจำลองที่ 1 ในทางตรงกันข้ามกับ 4C/3C และ 4M/3C การแยก MCPA/4C ด้วย CD-EKC ให้ α_{CD} ลดลงเมื่อ K_2C และ C เพิ่มขึ้นและมี $\rho < 1.0$ ซึ่ง สอดคล้องกับแบบจำลองที่ 2

สำหรับการแยก 4C/4M ด้วย CD-EKC มีลำดับของ $|\mu_0|$ ใน CZE และ K ใน CD-EKC เหมือนกัน มี $\alpha_{CZE} < 1.0$ และ $\rho > 1.0$ (ตารางที่ 6.2) และลำดับของ $|\mu_0|$ ใน CZE และ $|\mu|$ ใน CD-EKC สลับกันเมื่อใช้ K_2C และ C สูงขึ้น (รูปที่ 6.2) ดังนั้นการแยกของ 4C/4M ด้วย CD-EKC สอดคล้องกับแบบจำลองที่ 3 และ ที่ 2 mM β -CD และ K_2C เท่ากับ 0.170 ให้ α_{CD} ของ 4C/4M เท่ากับ 1 และเมื่อคำนวณ K_2C ที่ให้ α_{CD} เท่ากับ 1 โดยใช้สมการที่ 6.3 ได้ K_2C มีค่าเท่ากับ 0.166 ซึ่ง สอดคล้องกับ K_2C ที่ได้จากการทำนาย

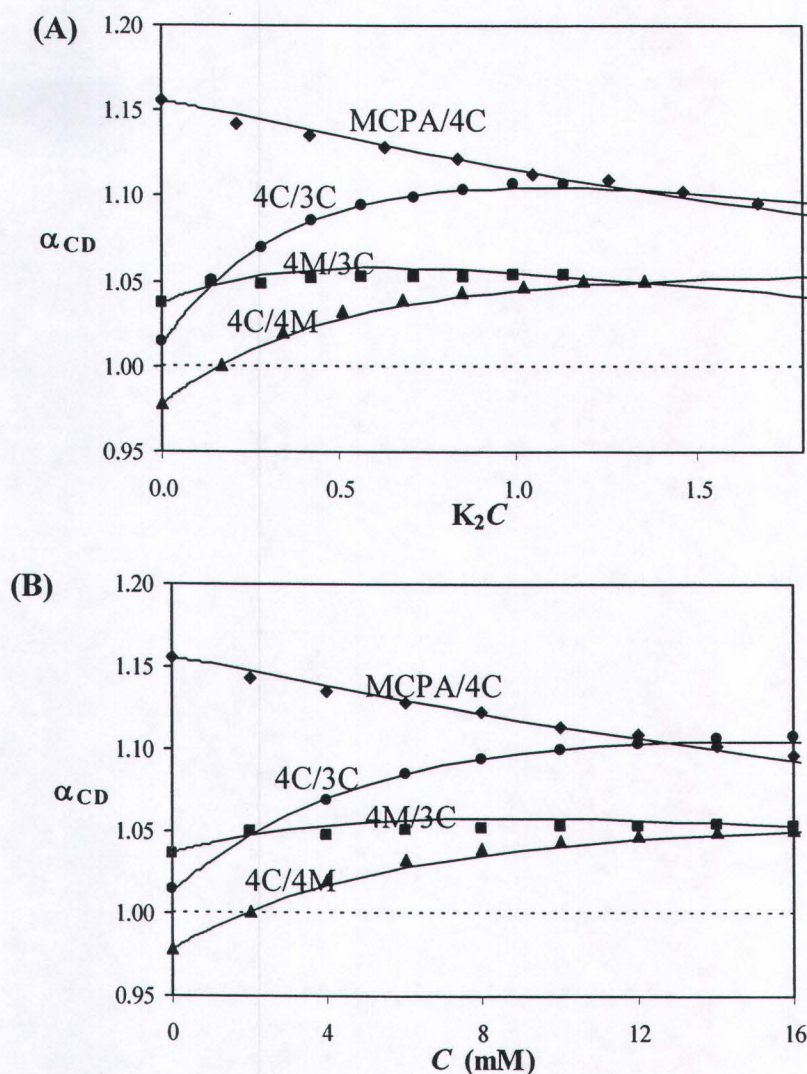


รูปที่ 6.2 อิเล็กโทรโฟโกราฟีของอนุพันธ์กรดเบนโซอิกและกรดฟีนอกซี โดยใช้บัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย (A) 0 mM (CZE), (B) 2 mM และ (C) 12 mM β -CD ใน 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ที่ pH 9.2 และภาวะอื่นๆ ของ CE ประกอบด้วย uncoated fused-silica capillary ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 50 μ m ความยาว 40.2 cm (30 cm ถึงเครื่องตรวจวัด), ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 $^{\circ}$ C, ศักย์ไฟฟ้า 15 kV, ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 214 nm และบรรจุสารด้วยความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 3 วินาที

ตารางที่ 6.2 ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร(μ , $10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$), ค่าจำเพาะการแยกใน CZE (α_{CZE}), binding constant (K , M^{-1}), binding selectivity (κ), selectivity ratio (ρ), อัตราส่วนของ $\mu_{0,2}/\mu_{\infty,2}$ (β), อัตราส่วนของ $\mu_{\infty,1}/\mu_{\infty,2}$ (γ) และแบบของแบบจำลอง α_{CD} สำหรับสารทดสอบ

สาร	μ_0	μ_{∞}	K	คู่สาร	α_{CZE}	κ	ρ	β	γ	แบบของแบบจำลอง α_{CD}
3C	-2.86	-0.81	70.8 ± 0.4	4C/3C ^a	1.01	1.48	1.47	3.53	1.08	I
4C	-2.82	-0.87	104.7 ± 0.6	MCPA/4C ^a	1.16	1.07	0.92	3.23	1.05	II
4M	-2.76	-0.89	84.8 ± 0.3	4C/4M ^a	0.98	1.23	1.26	3.11	0.98	III
MCPA	-2.44	-0.91	110.6 ± 1.3	4M/3C ^a	1.04	1.20	1.15	3.53	1.09	I

^a สารตัวที่ 2



รูปที่ 6.3 ค่าจำเพาะการแยกสารด้วย CD-EKC ที่ได้จากการทดลอง (สัญลักษณ์) และที่ได้จากการทำนาย (เส้น) สำหรับการแยกสารที่มีประจุด้วย β -CD ช่วงความเข้มข้น 0-16 mM ที่ (A) K_2C ต่างๆ และ (B) ความเข้มข้น β -CD ต่างๆ โดยค่าที่ได้จากการทำนายได้จากการคำนวณด้วยสมการที่ 6.2 และข้อมูลต่างๆ ที่แสดงดังตารางที่ 6.2

6.4 สรุปผลการทดลอง

สมการของ α_{CD} ที่ได้จัดรูปแบบให้สัมพันธ์กับตัวแปรที่ไม่มีหน่วย และแบบจำลองของ α_{CD} สำหรับแยกสารที่มีประจุโดยใช้ CD ที่ไม่มีประจุสามารถใช้อธิบายและทำนายการเปลี่ยนแปลง α_{CD} ของสารและลำดับการเคลื่อนที่ของสารได้ที่ความเข้มข้น CD และ K_2C ต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบกับ CZE การแยกสารด้วย CD-EKC อาจเพิ่มหรือลด α_{CD} สำหรับแยกสารที่มีประจุก็ได้ขึ้นกับว่าสารนั้นสอดคล้องกับแบบจำลองแบบใด และค่า α_{CD} ที่ได้จากการทำนายและจากการทดลองมีความสอดคล้องกันอย่างยิ่งที่ความเข้มข้นของ CD และ K_2C ต่างๆ สำหรับการแยกสารทดสอบที่เป็นอนุพันธ์ของกรดเบนโซอิกและกรดฟีนอกซีและใช้ β -CD

เอกสารอ้างอิง

- Al Azzam K. M., Saad B., Adnan R., and Aboul-Enein H. Y., "Enantioselective Analysis of Ofloxacin and Ornidazole in Pharmaceutical Formulations by Capillary Electrophoresis Using Single Chiral Selector and Computational Calculation of Their Inclusion Complexes" *Analytica Chimica Acta* **674** (2010) 249-255.
- Česla P., Fischer J., Tesařová E., Jandera P., and Staněk V., "Effects of Capillary Coating and β -Cyclodextrin Additive to the Background Electrolyte on Separation of Sulphonated Azodyes by Capillary Zone Electrophoresis" *Journal of Chromatography A* **1149** (2007) 358-367.
- Cessna A. J., and Grover R., "Spectrophotometric Determination of Dissociation Constants of Selected Acidic Herbicides" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **26** (1978) 289-292.
- Chankvetadze B., *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*, John Wiley & Sons, Chichester, 1997, pp. 29, 111.
- Chankvetadze B., Lomsadze K., Burjanadze N., Breitkreutz J., Pintore G., Chessa M., Bergander K., and Blaschke G., "Comparative Enantioseparations with Native β -Cyclodextrin, Randomly Acetylated β -Cyclodextrin and Heptakis-(2,3-di-O-Acetyl)- β -Cyclodextrin in Capillary Electrophoresis" *Electrophoresis* **24** (2003) 1083-1091.
- Chankvetadze B., "Separation of Enantiomers with Charged Chiral Selectors in CE" *Electrophoresis* **30** (2009) S211-S221.
- Chen M.-H., and Ding W.-H., "Separation and Migration Behavior of Positional and Structural Naphthalenesulfonate Isomers by Cyclodextrin-Mediated Capillary Electrophoresis" *Journal of Chromatography A* **1033** (2004) 167-172.
- Cheung H. -Y., and Zhang Q. -F., "Enhanced Analysis of Triterpenes, Flavanoids and Phenolic Compounds in *Prunella Vulgaris* L. by Capillary Zone Electrophoresis with the Addition of Running Buffer Modifiers" *Journal of Chromatography A* **1213** (2008) 231-238.
- Cucinotta V., Contino A., Giuffrida A., Maccarrone G., and Messina M., "Application of Charged Single Isomer Derivatives of Cyclodextrins in Capillary Electrophoresis for Chiral Analysis" *Journal of Chromatography A* **1217** (2010) 953-967.
- Dean J. A., *Lange's Handbook of Chemistry*, McGraw-Hill Book Co., Singapore, 13th Edition, 1987.
- Epple H., Blanes L., Beavis A., Roux C., and Doble P., "Analysis of Amphetamine-Type Substance by Capillary Zone Electrophoresis Using Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection" *Electrophoresis* **31** (2010) 2608-2613.
- Fanali S., "Chiral Separations by CE Employing CDs" *Electrophoresis* **30** (2009) S203-S210.
- Ferguson P. D., Goodall D. M., and Loran J. S., "Systematic Approach to Links between Separations in Capillary Electrophoresis and Liquid Chromatography IV. Application of Binding Constant-Retention Factor Relationship to the Separation of 2-, 3-, and 4-Methylbenzoate Anions Using β -Cyclodextrin as Selector" *Journal of Chromatography A* **768** (1997) 29-38.
- Gübitz G., and Schmid M. G., "Chiral Separation by Capillary Electromigration Techniques" *Journal of Chromatography A* **1204** (2008) 140-156.



- Hsieh Y. -Z., and Huang H. -Y., "Analysis of Chlorophenoxy Acid Herbicides by Cyclodextrin-Modified Capillary Electrophoresis" *Journal of Chromatography A* **745** (1996) 217-223.
- Kwaterczak A., Duszczek K., and Bielejewska A., "Comparison of Chiral Separation of Basic Drugs in Capillary Electrophoresis and Liquid Chromatography Using Neutral and Negatively Charged Cyclodextrins" *Analytica Chimica Acta* **645** (2009) 98-104.
- Luong J. H. T., and Nguyen A. L., "Achiral Selectivity in Cyclodextrin-Modified Capillary Electrophoresis" *Journal of Chromatography A* **792** (1997) 431-444.
- Nhujak T., and Goodall D. M., "Trace Analysis of γ -Cyclodextrin in a Sample of β -Cyclodextrin by Capillary Electrophoresis" *Journal of Chromatography A* **907** (2001) 313-320.
- Nhujak T., Sastravaha C., Palanuvej C., and Petsom A., "Chiral Separation in Capillary Electrophoresis Using Neutral Cyclodextrins: Theoretical Models of Electrophoretic Mobility Difference and Separation Selectivity" *Electrophoresis* **26** (2005) 3814-3823.
- Penn S. G., Bergström E. T., and Goodall D. M., "Capillary Electrophoresis with Chiral Selectors: Optimization of Separation and Determination of Thermodynamics Parameters for Binding of Ticonazole Enantiomers to Cyclodextrins" *Analytical Chemistry* **66** (1994) 2866-2873.
- Penn S. G., Bergström E. T., Knights I., Lui G., Ruddick A., and Goodall D. M., "Capillary Electrophoresis as a Method for Determining Binding Constants: Application to the Binding of Cyclodextrin and Nitrophenolates" *Journal of Physical Chemistry* **99** (1995) 3875-3880.
- Puangpila C., Petsom A., and Nhujak T., "Theoretical Models of Separation Selectivity for Charged Compounds in Micellar Electrokinetic Chromatography" *Electrophoresis*, **32** (2011) 203-209.
- Tian K., Zhang H., Chen X., and Hu Z., "Determination of Five Anthraquinones in Medicinal Plants by Capillary Zone Electrophoresis with β -Cyclodextrin Addition" *Journal of Chromatography A* **1123** (2006) 134-137.
- Wren S. A. C., "Theory of Chiral Separation in Capillary Electrophoresis" *Journal of Chromatography A* **636** (1993) 57-62.
- Yang J., Lu X., Pan L., Jiang K., and Cheng M., Li F., "Simultaneous Enantioseparation of Four- β -Agonists by Capillary Electrophoresis with Cyclodextrin Additives. Study of the Enantioselective Mechanism" *Journal of Separation Science* **31** (2008) 3749-3754.
- Zhang H., Shao H., A Y., and Zhang Z., "Optimized Conditions of Enantioseparation of β -blockers by CZE Using Carboxymethyl- β -Cyclodextrin as Chiral Selector" *Chromatographia* **68** (2008) 653-658.