



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาการทำซ้ำ และการประเมินคุณภาพการ
เตรียมวัสดุโครงสร้างพูนแบบต่อเนื่องในท่อแก้วอะพิลลารี
ขนาดเล็กสำหรับการแยกด้วยเทคนิคลิวิตโครมาโทกราฟีใน
ระดับไมโครลิตร

โดย พัชรินทร์ ชัยสุวรรณ และคณะ

เมษายน 2554

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาการทำซ้ำ และการประเมินคุณภาพการเตรียมวัสดุ
โครงสร้างพูนแบบต่อเนื่องในท่อแก้วอะพอลโลนาขนาดเล็กสำหรับการ
แยกด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีในระดับไมโครลิตร

คณะผู้วิจัย

1. ดร.พัชรินทร์ ชัยสุวรรณ
2. รศ.ดร. ประพัฒน์ วิไลรัตน์
3. ผศ.ดร.ดวงใจ นาคะปรีชา

สังกัด

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
มหาวิทยาลัยมหิดล
มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

หัวข้อ	เลขหน้า
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	1
บทคัดย่อภาษาไทย	2
Executive Summary	3
เนื้อหางานวิจัย	6
Output ที่ได้จากโครงการ	30
ภาคผนวก	31

Reproducibility and evaluation studies in *in situ* preparation of monolithic capillary columns for micro-liquid chromatography

Abstract

This work has performed on reproducibility study in preparation and application of monolithic capillary columns for micro-liquid chromatography (μ -LC) and capillary electrochromatography (CEC). C-18 monolithic columns were thermally synthesized by using GC oven, hot air oven and water bath for investigating repeatability in column preparation of the three heating apparatuses. Precision for retention time and capacity factor in term of %RSD for test compounds, were considered for repeatability comparison. The monolith were applied for separation by using μ -LC and CEC. It was found that the column could separate steroids and vitamin E isomers (TOHs) by both techniques however the CEC showed higher separation efficiency and complete separation of the TOHs was obtained. The SMA-EDMA column provided good selectivity to tocopherol homologues which could not be completely separated on C18-microparticulate or C18-silica based monolith. Successful separation of the tocopherol isomers on the SMA-EDMA monolith using CEC can be achieved within 30 min with good precision for retention time, peak area and efficiency with %RSD less than 5.38 and 12.5 for intra-day and inter-day repeatability, respectively. Capillary electrophoresis was also developed for separation of glucosamine in pharmaceutical drugs and serum sample without need of sample preparation or matrix removal. The method has applied to real sample with % recovery between 86.5 – 104.7%.

Keywords: Polymer-based monolith, column preparation, repeatability study, stearyl methacrylate, tocopherols

**การศึกษาการทำซ้ำ และการประเมินคุณภาพการเตรียมวัสดุโครงสร้างพูนแบบต่อเนื่อง
ในท่อแก้วอะพิลารีนขนาดเล็กสำหรับการแยกด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี
ในระดับไมโครลิตร**

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาความสามารถในการเตรียมซ้ำ และการประยุกต์โมโนลิธิคคอลัมน์ที่สังเคราะห์ขึ้น สำหรับการแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีระดับไมโครลิตรและเทคนิคอะพิลารีนเล็กโครมาโทกราฟี ในส่วนแรกของงานวิจัยเป็นการศึกษาความสามารถในการเตรียมซ้ำของโมโนลิธิคคอลัมน์ด้วยการให้ความร้อนจากอุปกรณ์ 3 ชนิด คือ เตาอบเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี เตาอบลมร้อน และอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ พบว่าความทั้งสามวิธีมีความสามารถในการเตรียมซ้ำใกล้เคียงกัน เมื่อนำโมโนลิธิคคอลัมน์ที่สังเคราะห์ขึ้นไปใช้ในการแยกสารประกอบกลุ่มสเตียรอยด์และไอโซเมอร์ของวิตามินอีด้วยเทคนิคการแยกทั้งสอง พบว่าเทคนิคอะพิลารีนเล็กโครมาโทกราฟีมีประสิทธิภาพการแยกที่ดีกว่าเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีระดับไมโครลิตร และพบว่า C18 คอลัมน์ที่สังเคราะห์ขึ้นมีความจำเพาะต่อการแยกไอโซเมอร์ของวิตามินอี (โทโคฟีรอล) ที่ดีกว่าคอลัมน์ C18 ชนิดดั้งเดิมที่มีลักษณะเป็นอนุภาคซึ่งไม่สามารถใช้ในการแยกไอโซเมอร์ของวิตามินอีอย่างสมบูรณ์ได้ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสามารถทำการแยกไอโซเมอร์ของวิตามินอีด้วยเทคนิคอะพิลารีนเล็กโครมาโทกราฟี ได้ในเวลา 30 นาที วิธีที่พัฒนามีความเที่ยงสำหรับค่าเวลาการคงอยู่ สัญญาณพื้นที่ใต้พีค และประสิทธิภาพของคอลัมน์ ในแง่ของค่าเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธิ์การแปรปรวนน้อยกว่า 5.38 และ 12.5 สำหรับการศึกษาในวันเดียวกันและระหว่างวันตามลำดับ ในส่วนของสองของงานวิจัยเป็นการพัฒนาเทคนิคการแยกระดับไมโครลิตรโดยอาศัยสนามไฟฟ้าสำหรับการวิเคราะห์กลูโคซามีนในตัวอย่างยาและตัวอย่างซีรัม โดยไม่ต้องมีขั้นตอนการเตรียมสารตัวอย่างหรือการกำจัดสิ่งเจือปน เทคนิคที่พัฒนาสามารถนำไปวิเคราะห์ตัวอย่างจริงและมีร้อยละการกู้คืนอยู่ระหว่าง 86.5 – 104.7%

คำสำคัญ : โมโนลิธิคพอลิเมอร์ การเตรียมคอลัมน์ การศึกษาการทำซ้ำ สเตียรอยด์ เมทาอะครายเลต โทโคฟีรอล

สัญญาเลขที่ MRG5280058

โครงการ: การศึกษาการทำซ้ำ และประเมินคุณภาพการเตรียมวัสดุโครงสร้างพูนแบบต่อเนื่องใน
ท่อแก้วเคปิลลารีขนาดเล็ก สำหรับการแยกด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีในระดับไมโครลิตร

(Repeatability and evaluation study of monolithic capillary column preparation
for micro-liquid chromatography)

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. ศึกษาการเตรียมวัสดุโครงสร้างพูนภายในท่อแก้วเคปิลลารีขนาดเล็กขึ้นใช้ในห้องปฏิบัติการ และ
การนำไปใช้ในการแยกโดยระบบลิควิดโครมาโทกราฟีในระดับไมโครลิตร
2. ศึกษาถึงสภาวะการทำซ้ำได้ในการเตรียมโมโนลิธคอลัมน์ซึ่งเป็นวัสดุที่มีโครงสร้างพูนแบบต่อ
เนื่องในท่อแก้วเคปิลลารีขนาดเล็ก
3. ศึกษาความสามารถในการแยกสารประกอบประเภทสเตียรอยด์ (steroids) หรือ ไอโซเมอร์ของ
วิตามินอี (tocopherols) บนโมโนลิธคอลัมน์ที่สังเคราะห์ขึ้น
4. พัฒนาระบบการแยกภายใต้สนามไฟฟ้าในท่อแก้วขนาดเล็กสำหรับการวิเคราะห์สารในระดับ
ไมโครลิตร

Executive Summary

โมโนลิธ (Monolith) เป็นวัสดุที่มีโครงสร้างพูนอย่างต่อเนื่อง และแสดงคุณสมบัติที่สำคัญต่องานวิจัยทางด้านโครมาโทกราฟีเป็นอย่างยิ่งทั้งสำหรับการแยกและสกัดสาร เนื่องจาก
ความเป็นรูพูนสูงของโมโนลิธทำให้เกิดความดันย้อนกลับต่ำเมื่อนำไปใช้งาน สามารถสังเคราะห์
ได้ง่ายและมีคุณสมบัติทางเคมีหลากหลาย สามารถเลือกใช้ให้เหมาะสมกับสารที่สนใจได้มากกว่า
คอลัมน์แบบดั้งเดิมที่มีลักษณะเป็นเม็ด จึงมีงานวิจัยที่ศึกษาการสังเคราะห์ และการนำคอลัมน์
ประเภทนี้ไปประยุกต์ใช้งานเป็นจำนวนมาก แม้ว่าจะมีงานวิจัยที่ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติและ
โครงสร้างของโมโนลิธรวมทั้งการใช้งานของวัสดุประเภทนี้ออกมามากมาย แต่พบว่าในส่วนของ
งานวิจัยที่สนใจศึกษาการทำซ้ำในการเตรียมโมโนลิธคอลัมน์นั้นยังมีอยู่เป็นจำนวนน้อย ซึ่งถือ
เป็นส่วนสำคัญที่ควรทำการศึกษาเพื่อควบคุมสภาวะและขั้นตอนการสังเคราะห์เพื่อให้ได้วัสดุที่มี
คุณสมบัติเหมือนเดิมหรือใกล้เคียงกันเมื่อมีการสังเคราะห์ซ้ำ

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการเตรียมและประเมินคุณภาพการเตรียมโมโนลิธคอลัมน์ซึ่ง
เป็นวัสดุที่มีโครงสร้างพูนแบบต่อเนื่องในท่อแก้วเคปิลลารีขนาดเล็ก เพื่อนำไปใช้ในระบบการ
แยกด้วยเทคนิคไมโครลิควิดโครมาโทกราฟีและเคปิลลารีอิเล็กโทโครมาโทกราฟี ซึ่งเป็นเทคนิค
การแยกที่ใช้สารน้อยมากในระดับไมโครลิตร โดยทำการเปรียบเทียบความสามารถในการเตรียมซ้ำ
จากอุปกรณ์ให้ความร้อนชนิดต่าง ๆ ที่มีในห้องปฏิบัติการทั่วไปคือ เตาอบของเครื่องแก๊สโครมาโท

กราฟ (Gas chromatography oven) เตาอบลมร้อน (Hot air oven) และอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) และพัฒนาเทคนิคการแยกบน C18-โมโนลิธคอลัมน์ที่สังเคราะห์สำหรับสารประกอบประเภท สเตียรอยด์ (steroids) และไอโซเมอร์ของวิตามินอี ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานการแยกบนคอลัมน์ที่จะทำการสังเคราะห์ในโครงการนี้ และศึกษาความเป็นไปได้ในการสังเคราะห์คอลัมน์ชนิดใหม่สำหรับการแยกแบบโครมาโทกราฟีระดับไมโครลิตร

จากผลการวิจัยเมื่อทำการสังเคราะห์โมลิธคอลัมน์ โดยการเตรียมคอลัมน์ทั้งแบบสั้น (ตามความยาวที่ต้องการ) และแบบยาว (ทำการตัดให้ได้ความยาวที่ต้องการ ภายหลังการเตรียม) คอลัมน์ทั้งหมดเตรียมจากองค์ประกอบเดียวกัน ที่ได้มีรายงานมาก่อนว่าเป็นองค์ประกอบที่เหมาะสมสำหรับการเตรียม C18 คอลัมน์ จากการเปรียบเทียบคุณสมบัติทางด้านโครมาโทกราฟี โดยการนำคอลัมน์มาแยกสาร 6 ชนิด คือ ไทโอยูเรีย ฟีนอล แอนนิโซล เบนซีน โทลูอิน และ แนฟทาลิน ซึ่งมีสภาพขั้วตั้งแต่มากไปหาน้อย พบว่าคอลัมน์ทั้งหมดสามารถแยกสารทั้ง 6 ชนิดได้ เมื่อทำการประเมินความสามารถในการทำซ้ำโดยพิจารณาจาก retention time (เวลาที่สารอยู่บนคอลัมน์) และ capacity factor (ความสามารถในการเกิดอันตรกิริยาของสารกับคอลัมน์) พบว่าการเตรียมคอลัมน์แบบสั้น ที่ให้ความร้อนโดยการใช้ hot air oven และ GC oven มีความแปรปรวนจากทั้งค่าเวลาในการคงอยู่ (retention time) น้อยกว่าการเตรียมจาก water bath แต่เมื่อพิจารณาความสามารถในการคงอยู่ (capacity factor) พบว่าการเตรียมทั้งสามวิธีให้โดยโมโนลิธคอลัมน์ที่มีคุณสมบัติไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าวิธีการเตรียมวัสดุโมโนลิธมีผลต่อคุณสมบัติด้านกายภาพแต่ไม่ส่งผลต่อสมบัติด้านเคมีสำหรับการเตรียมจากสารละลายเดียวกัน ในการศึกษาความสามารถในการเตรียมซ้ำที่เตรียมในวันเดียวกัน และระหว่างวัน (between batches) ด้วย GC oven พบว่ามีความสามารถในการทำซ้ำที่ดี (%RSD สำหรับค่า retention time น้อยกว่า 3 สำหรับการเตรียมคอลัมน์ในวันเดียวกัน และน้อยกว่า 10.5 สำหรับการเตรียมคอลัมน์คนละวัน) จากนั้นได้นำคอลัมน์ที่สังเคราะห์ขึ้นไปใช้ในการแยกสารประกอบสเตียรอยด์ ซึ่งสามารถแยกสารประกอบสเตียรอยด์ได้ 4 ชนิดคือ triamcinolone, prednisone, prednisolone และ dexamethasone ภายในเวลา 16 นาที และได้ทำการสังเคราะห์คอลัมน์ที่มีหมู่ฟังก์ชันผสมแบบมีขั้วและไม่มีขั้ว เพื่อทำการแยกสารประกอบวิตามินอี พบว่าสามารถแยกไอโซเมอร์หลักของวิตามินอีได้ 3 ไอโซ (δ-tocopherol, α-tocopherol and α-tocopherol acetate) ภายในเวลา 12 นาที ได้นำวิธีที่พัฒนาขึ้นไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างยา พบว่าได้ผลที่สอดคล้องกับค่าที่ระบุข้างฉลากและมีเปอร์เซ็นต์การวิเคราะห์กลับคืนที่ดีในช่วง 103-108% เพื่อปรับปรุงความสามารถในการแยกของคอลัมน์ที่สังเคราะห์ขึ้น ได้นำคอลัมน์มาทำการแยกไอโซเมอร์ของวิตามินอีด้วยเทคนิคการแยกที่มีประสิทธิภาพสูงคือเทคนิคอะพอลารีอีเล็กโทรโครมาโทกราฟี พบว่าสามารถแยกวิตามินอีไอโซเมอร์ทั้งหมด (6 ชนิด) ได้ภายในเวลา 30 นาที พบว่าโมโนลิธคอลัมน์นี้มีสมบัติในการแยกวิตามินอีที่ดีกว่าคอลัมน์แบบดั้งเดิม

ในส่วนที่สองของโครงการเป็นการพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์กลูโคซามีน (Glucosamine) ในระดับไมโครลิตรภายใต้สนามไฟฟ้าในท่อแก้วขนาดเล็ก เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคซามีนในตัวอย่างยาและตัวอย่างซีรัม นักวิจัยหลายคณะได้ทำการศึกษาหาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน เช่น ใช้เทคนิค HPLC ในการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคซามีนในตัวอย่างยา และของเหลวในร่างกาย (biological fluid) เป็นต้น อย่างไรก็ตามกลูโคซามีนเป็นสารที่ไม่สามารถดูดกลืนแสง จึงเป็นไม่สามารถตรวจวัดได้โดยตรงเมื่อใช้ยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์เป็นเครื่องตรวจวัด ดังนั้นก่อนนำกลูโคซามีนมาวิเคราะห์ด้วยตัวตรวจวัดชนิดดังกล่าวนี้จึงต้องผ่านการทำปฏิกิริยาเป็นสารอนุพันธ์ที่สามารถดูดกลืนแสงได้ หรือใช้ตัวตรวจวัดชนิดอื่นแทน เช่น แอมเพโรเมตริก ดีเทคชัน (amperometric detection) วัดค่าดัชนีหักเหของแสง (refractive index detection) หรือแมส สเปกโตรเมทรี (MS/MS) ซึ่งล้วนเป็นวิธีที่ค่อนข้างมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยากและใช้เวลานาน ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ตรวจวัดด้วย “คาพาซิทีฟลิคัปเปิล คอนแทกเลส คอนดัคทิวิตี ดีเทคชัน” หรือ “ซีโฟรีดี” สำหรับหาปริมาณกลูโคซามีนหลังการแยกด้วยเทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโตรโฟรีซิสซึ่งเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพการแยกสูงภายในเวลาอันสั้น และสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างปริมาณน้อยพบว่าสามารถแยกกลูโคซามีนทั้งในตัวอย่างยาและตัวอย่างซีรัมโดยไม่ต้องมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างหรือกำจัดสารอื่นๆในตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์โดยใช้ 20 mM MES/His (pH 6) เป็นสารละลายอิเล็กโตรไลต์

รายงานฉบับสมบูรณ์

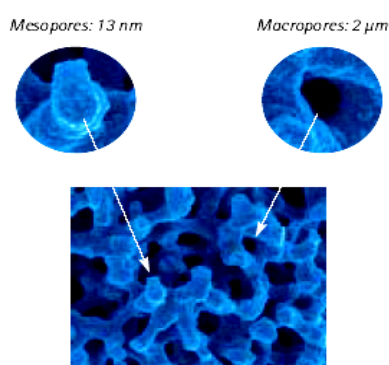
สัญญาเลขที่ MRG5280058

โครงการ: การศึกษาการทำซ้ำ และประเมินคุณภาพการเตรียมวัสดุโครงสร้างพรุนแบบต่อเนื่องในท่อแก้ว
อะทิลารีนขนาดเล็ก สำหรับการแยกด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีในระดับไมโครลิตร
(Repeatability and evaluation study of monolithic capillary column preparation
for micro-liquid chromatography)

บทนำ

โมนอลิธิคคอลัมน์ (Monolithic column) เป็นคอลัมน์ซึ่งภายในบรรจุด้วยวัสดุโครงสร้างพรุนชิ้นเดียวแบบต่อเนื่องที่กำลังเป็นที่นิยมใช้ในการแยกทางโครมาโทกราฟี เนื่องจากคุณสมบัติที่โดดเด่นหลายประการเช่น เป็นวัสดุที่มีความเป็นรูพรุนสูง มีช่วงการใช้งานในสภาวะที่เป็นกรด-ด่างกว้าง เมื่อเทียบกับคอลัมน์ที่บรรจุด้วยวัสดุประเภทเม็ดซิลิกาแบบดั้งเดิม มีความจำเพาะและประสิทธิภาพสูง และมีต้นทุนที่ต่ำหลายชนิดให้เลือกใช้ตามความเหมาะสม

โดยทั่วไปภายในโครงสร้างที่เป็นรูพรุนแบบต่อเนื่องนั้นจะประกอบด้วยรูพรุน 2 ชนิด (ภาพที่ 1) คือ Macropore หรือ throughpore ซึ่งเป็นรูพรุนระหว่างโครงสร้างหลักของโมนอลิธิ และเป็นรูพรุนที่ส่งผลต่อการไหลผ่านของสารในคอลัมน์ และ Mesopore ซึ่งเป็นรูพรุนบนโครงสร้างของโมนอลิธิ ที่มีผลต่อพื้นที่ผิวและประสิทธิภาพการแยกของโมนอลิธิคคอลัมน์ ด้วยข้อดีที่สำคัญของโมนอลิธิ จึงมีงานวิจัยที่ศึกษาการสังเคราะห์ และการนำคอลัมน์ประเภทนี้ไปประยุกต์เป็นจำนวนมาก แต่ในส่วนของงานวิจัยที่สนใจศึกษาการทำซ้ำโมนอลิธิคคอลัมน์นั้นยังมีอยู่เป็นจำนวนน้อย



ภาพที่ 1 แสดงลักษณะโครงสร้างรูพรุนชนิด Mesopore และ Macropore ภายในโมนอลิธิคคอลัมน์

ในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาการทำซ้ำ และประเมินคุณภาพการเตรียมวัสดุโครงสร้างพรุนแบบต่อเนื่องในท่อแก้วอะทิลารีนขนาดเล็ก เพื่อนำไปใช้ในระบบการแยกด้วยเทคนิคไมโครลิควิดโคร

มาโทกราฟีและเทคนิคอะพอลารีอิเล็กโทโครมาโทกราฟี ซึ่งเป็นเทคนิคการแยกที่ใช้สารปริมาณน้อยมากในระดับไมโครลิตร โดยวัสดุโครงสร้างพูนที่สังเคราะห์ขึ้น เป็นโมโนลิธที่สังเคราะห์ได้จากโพลีเมอร์ของสไตรียริด เมทาคริลิเตอทีลีนไกลคอล ไดเมทาคริเลต (Stearyl Methacrylate-Ethylene glycol dimethacrylate copolymer; SMA-EDMA copolymer) ภายในท่อแก้วอะพอลารีขนาดเล็ก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 100 ไมโครเมตร ซึ่งจะทำให้ได้วัสดุโครงสร้างพูนภายในที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็น C-18 และศึกษาการทำซ้ำด้วยวิธีการเตรียมคอลัมน์ใน 2 แบบคือ แบบขนาน (Multiple short columns filling method, MSCM) และ การเตรียมคอลัมน์แบบยาว (Single long column filling method, SLCM) และการให้ความร้อนที่แตกต่างกันด้วยเตาอบของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography oven) , เตาอบลมร้อน (Hot air oven) และอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) และประเมินคุณภาพทางโครมาโทกราฟีจากการแปรปรวนของค่า เวลาคงอยู่ (Retention time) และ ความสามารถคงอยู่ของสารในคอลัมน์ (Capacity factor)

วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1.1 ศึกษาการเตรียมวัสดุโครงสร้างพูนภายในท่อแก้วอะพอลารีขนาดเล็กขึ้นใช้ในห้องปฏิบัติการ และการนำไปใช้ในการแยกโดยระบบลิควิดโครมาโทกราฟีในระดับไมโครลิตรและอะพอลารีอิเล็กโทโครมาโทกราฟี
- 1.2 ศึกษาถึงสภาวะการทำซ้ำได้ในการเตรียมโมโนลิธคอลัมน์ซึ่งเป็นวัสดุที่มีโครงสร้างพูนแบบต่อเนื่องในท่อแก้วอะพอลารีขนาดเล็ก โดยการเปรียบเทียบคุณสมบัติด้านโครมาโทกราฟีด้วยเทคนิคไมโครลิควิดโครมาโทกราฟี
- 1.3 ศึกษาความสามารถในการแยกสารประกอบประเภทสเตียรอยด์ (steroids) และ ไอโซเมอร์ของวิตามินอี (tocopherols) บนโมโนลิธคอลัมน์ที่สังเคราะห์ขึ้น
- 1.4 พัฒนาระบบการแยกภายใต้สนามไฟฟ้าในท่อแก้วขนาดเล็กสำหรับการวิเคราะห์สารในระดับไมโครลิตร

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมโมโนลิธคอลัมน์

1.1. การดัดแปลงพื้นผิวภายในท่อแก้วอะพอลารีขนาดเล็ก (surface modification)

ทำการดัดแปลงพื้นผิวภายในของท่อแก้วก่อน การสังเคราะห์โมโนลิธ โดยการบรรจุท่อแก้วด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ แล้วอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน และเมทานอลเป็นเวลา 30 นาที เป่าให้แห้ง จากนั้นบรรจุด้วยสารละลาย 3-(ไตรเมทออกซีไซลิล) โพรพิล เมทาคริเลต (γ -MAPS) ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรในเมทานอล และอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยเมทานอล และน้ำปราศจากไอออน แล้วเป่าให้แห้ง

1. 2 การสังเคราะห์โพลิเมอร์ในท่อแก้ว

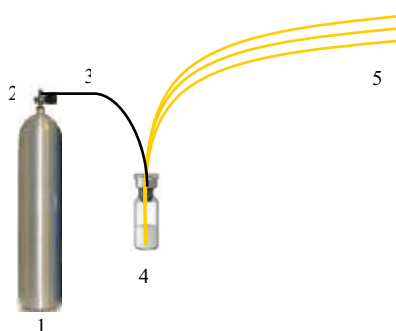
วิธีการในการสังเคราะห์คอลัมน์แบ่งเป็น 2 วิธี

1.2.1 การเตรียมคอลัมน์แบบขนาน (Multiple short column filling method, MSCM)

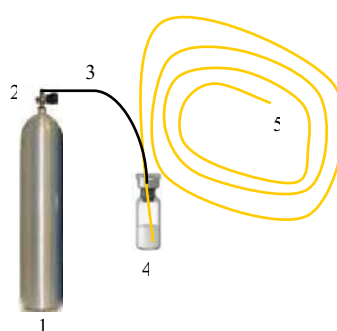
เตรียมโดยตัดท่อแก้วอะทาลาริขนาดเล็ก ที่ผ่านขบวนการดัดแปลงพื้นผิวภายในด้วย γ -MAPS (ข้อ 1.1) ให้มีความยาวเส้นละ 57 เซนติเมตร (แสดงในภาพที่ 1ก) แล้วจึงบรรจุสารละลายพอลิเมอร์ ซึ่งประกอบด้วย สารสเตรียลิต เมททาคริลิต, เอทิลีน ไกลคอล ไดเมททาคริลิต, 3-เมทิล-1-บิวทานอล, 1,4-บิวเทนไดออล และเอโซบิสไอโซบิวไทโรไนโตรล์ [1] แล้วอบในอุปกรณ์ให้ความร้อน 4 ชนิดคือ GC oven, Hot air oven และ Hot water bath ซึ่งตั้งอุณหภูมิที่ 55, 60 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วจึงล้างคอลัมน์ด้วยเมททานอล พร้อมทั้งทำหน้าที่ต่างตรวจวัด (detection window)

1.2.2 การเตรียมคอลัมน์แบบยาว (Single long column filling method, SLCM)

เป็นการเตรียมคอลัมน์ โดยบรรจุสารละลายโคพอลิเมอร์ลงในท่อแก้วอะทาลาริขนาดเล็ก ที่ผ่านขบวนการดัดแปลงพื้นผิวภายในแล้ว โดยในการทดลองจะเตรียมคอลัมน์จำนวน 3 เส้น (แสดงในภาพที่ 2ข) นำแต่ละเส้นไปบรรจุสารละลายพอลิเมอร์ (เหมือนข้อ 1.2.1) นำคอลัมน์แต่ละเส้นแยกเข้าอบในอุปกรณ์ให้ความร้อน 3 ชนิดคือ GC oven, Hot air oven และ Hot water bath ซึ่งตั้งอุณหภูมิที่ 55, 60 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ อบคอลัมน์เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ล้างคอลัมน์ด้วยเมททานอล แล้วจึงตัดคอลัมน์ที่สังเคราะห์แต่ละเส้นออกเป็น 3 เส้น พร้อมทั้งทำหน้าที่ต่างตรวจวัด (detection window)



(ก)



(ข)

ภาพที่ 2 แสดงวิธีการบรรจุสารละลาย พอลิเมอร์ (A) การเตรียมคอลัมน์แบบขนาน (Multiple short column filling method, MSCM และ (B) การเตรียมคอลัมน์แบบยาว (Single long column filling method, SLCM) โดย 1. ท่อ-แก๊สไนโตรเจนบริสุทธิ์, 2. วาล์วควบคุมแรงดันแก๊ส 3. สายนำแก๊สไนโตรเจนบริสุทธิ์, 4. ขวดแก้วเล็กบรรจุสารละลายพอลิเมอร์ และ 5. อะทาลาริที่ผ่านการดัดแปลงพื้นผิวภายในแล้ว

2. การทดสอบคุณสมบัติของโมโนลิธิคคอลัมน์

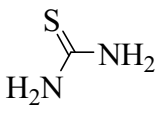
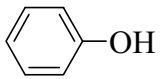
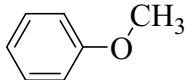
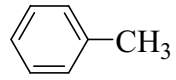
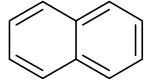
2.1 สมบัติด้านกายภาพ

นำวัสดุโมโนลิธิที่สังเคราะห์ขึ้นไปศึกษาลักษณะของโครงสร้างด้านกายภาพโดยการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์และเทคนิค Scanning Electron Microscope (SEM)

2.2 สมบัติทางโครมาโทกราฟี

นำโมโนลิธิคอลัมน์ที่สังเคราะห์ขึ้นไปทดสอบการแยกสารละลายมาตรฐานของผสมของ ไธโอยูเรีย, ฟีนอล, อะนิโซล, เบนซีน, โทลูอีน และแนพทาลีน (แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารที่แยกในตารางที่ 1) โดยมีเฟสเคลื่อนที่เป็นอะซีโทไนไตรล์กับน้ำปราศจากไอออนในอัตราส่วน 55 ต่อ 45 โดยปริมาตร ทำการฉีดสารละลายมาตรฐานจำนวน 10 ซ้ำ เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางโครมาโทกราฟีของคอลัมน์จากค่า เวลาคงอยู่ (Retention time) และความสามารถคงอยู่ของสารในคอลัมน์ (Capacity factor, k')

ตารางที่ 1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารที่ทำการแยก

Name	Structure	Polarity
Thiourea		สูง ↑ ต่ำ
Phenol		
Anisole		
Benzene		
Toluene		
Naphthalene		

3. วิธีการแยกสารด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี (micro-liquid chromatography, μ -LC)

ระบบไมโครลิควิดโครมาโทกราฟีสำหรับการแยกบนโมโนลิธคอลัมน์ประกอบด้วยส่วนของปั๊มของ Applied Biosystem รุ่น 400 Sovent Delivery System ซึ่งต่อกับตัวแบ่งส่วนเฟสเคลื่อนที่(Splitter)ของ Valco รุ่น ZT1M ก่อนเข้าสู่ ส่วนฉีดสารของ Rheodyne รุ่น 7520 ที่มีตัวกำหนดปริมาตรเข้าสู่คอลัมน์แบบภายในขนาด 200 นาโนลิตร ตรวจวัดสัญญาณด้วยเครื่องตรวจวัดการดูดกลืนแสงของ Applied Biosystem รุ่น 785A Programmable Absorbance Detector โดยสัญญาณที่ตรวจวัดได้จะถูกเปลี่ยนเป็นสัญญาณดิจิทัลด้วยเครื่อง E-corder รุ่น 201 และประมวลผลด้วยซอฟต์แวร์ eDAQ Chart ของ e-DAQ Pty. Ltd., UK ก่อนการฉีดสารที่ต้องการแยกสารเข้าไปในระบบ ทำการปั๊มสารละลายเฟสเคลื่อนที่ที่ศึกษานานประมาณ 20 นาที

4. วิธีการแยกไอโซเมอร์ของวิตามินอีด้วยเทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโทรโครมาโทกราฟี (capillary electrochromatography, CEC)

ในการแยกไอโซเมอร์ของวิตามินอี (tocopherol isomers) บนโมโนลิธคอลัมน์ที่สังเคราะห์ขึ้นด้วยเทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโทรโครมาโทกราฟี มีสภาวะการแยกดังนี้

Column : SMA-EDMA monolithic capillary column (100 μ m i.d., 23.5 cm effective length, 32 cm total length)

Mobile phase : 7:93 (v:v) 20 mM Tris buffer pH 9 : acetonitrile

Separation voltage : +30 kV

Injection : Electrokinetic injection (10 kV for 30 s)

Detection : 200 nm.

5. วิธีการแยกสารกลูโคซามีนด้วยเทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟเรซิส (capillary electrophoresis, CE)

การแยกกลูโคซามีนในตัวอย่างยาและตัวอย่างซีรัมด้วยระบบแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟเรซิสที่ประกอบขึ้นในห้องปฏิบัติการ มีสภาวะการแยกดังนี้

Capillary : 100/360 μ m i.d./o.d., 24 cm effective length, 35 cm total length

Background Electrolyte : 20 mM MES/His (pH 6)

Injection : Electrokinetic injection (1 kV for 3 s)

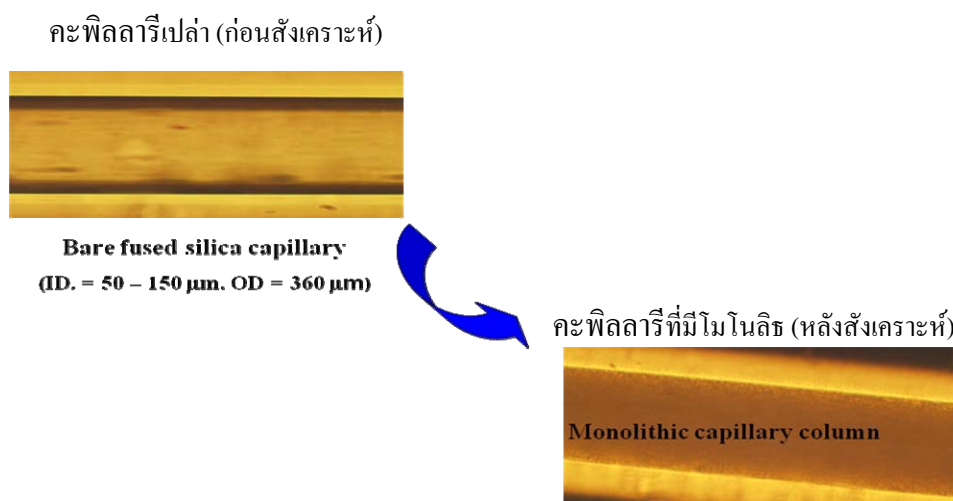
Detection : Capacitively coupled contactless conductivity detection

ผลการวิจัย

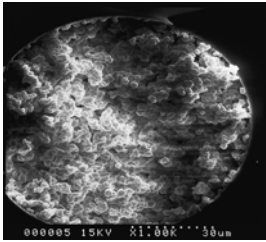
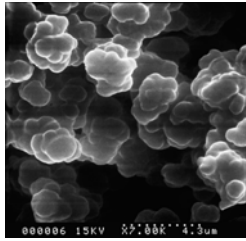
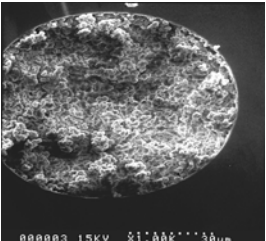
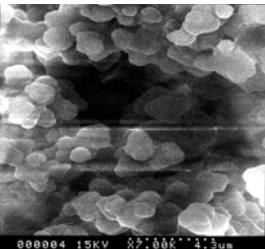
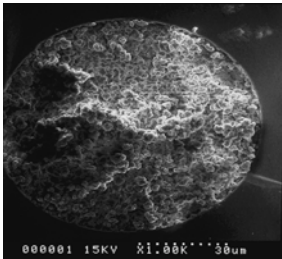
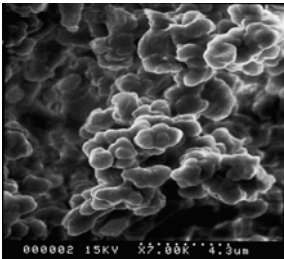
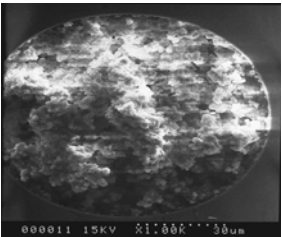
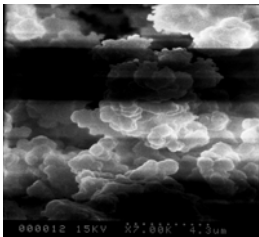
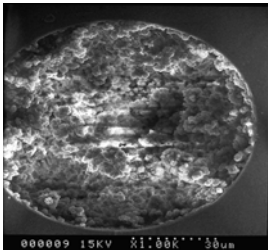
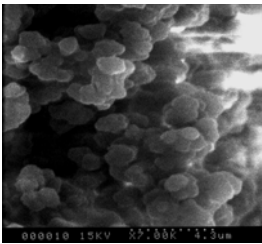
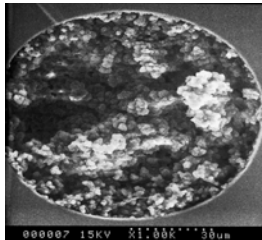
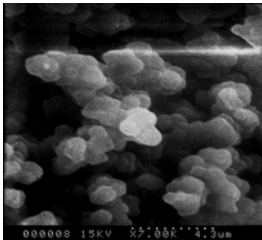
1. การสังเคราะห์ SMA-EDMA โมโนลิธในท่อแก้วอะพิลลารีขนาดเล็ก

1.1 ศึกษาลักษณะ โครงสร้างและความเป็นเนื้อเดียวกันของคอลัมน์ที่สังเคราะห์ขึ้น

หลังจากขั้นตอนการเตรียมโมโนลิธคอลัมน์ ได้ทำการศึกษาโครงสร้างและความเป็นเนื้อเดียวกันของโมโนลิธคอลัมน์ที่สังเคราะห์ขึ้น โดยการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ (ภาพที่ 3) และ scanning electron microscope (ภาพที่ 4) พบว่าโมโนลิธที่สังเคราะห์ได้มีความเป็นรูพรุนสูง และเป็นเนื้อเดียวกันตลอดท่อแก้วที่ทำการสังเคราะห์



ภาพที่ 3 แสดงรูปจุลทรรศน์ของวัสดุพูนโมโนลิธ ที่สังเคราะห์ในท่อแก้วอะพิลลารี

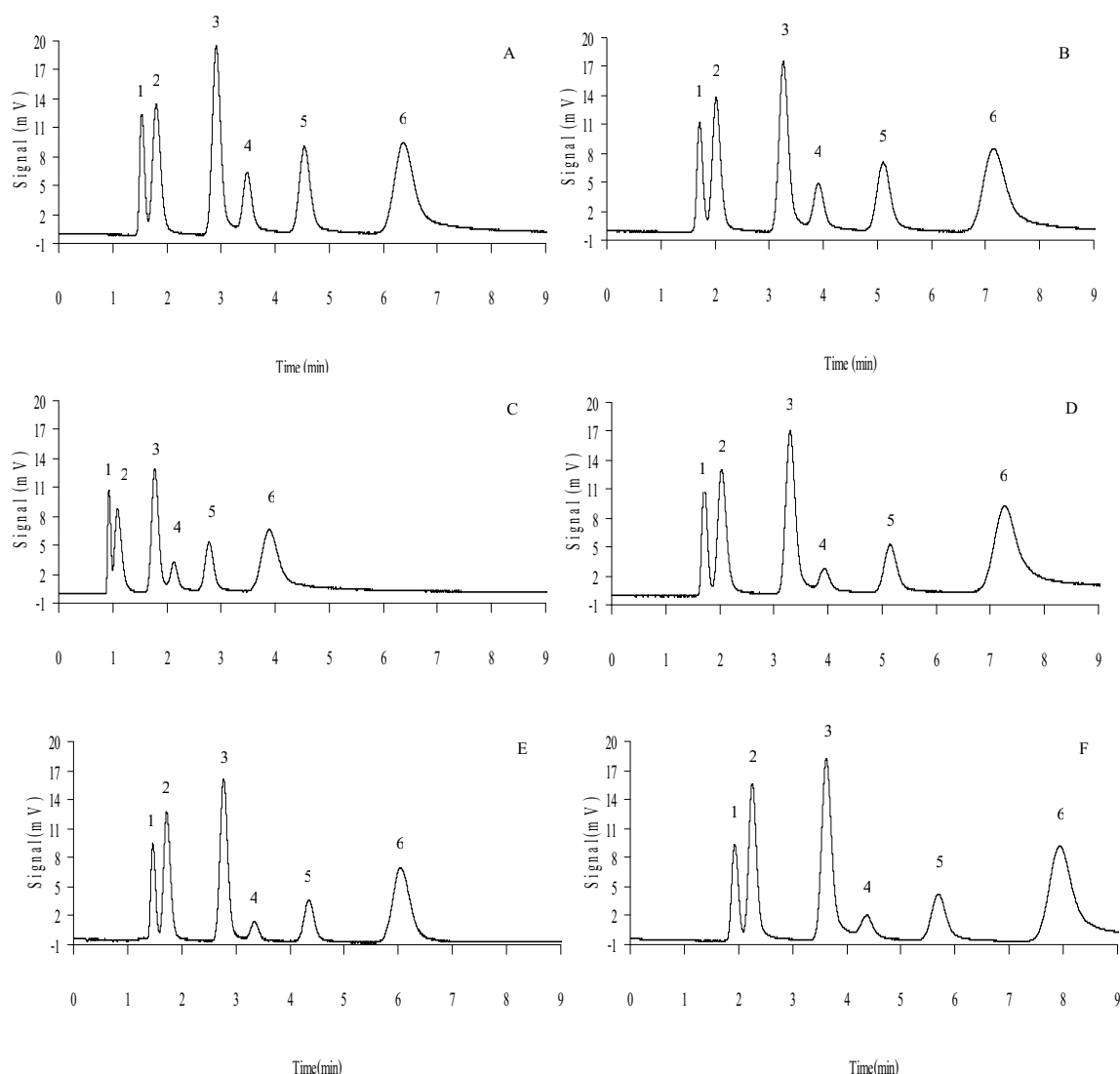
Column SMA-GCS-2	1X	7X
ส่วนหัว		
ส่วนกลาง		
ส่วนท้าย		
Column SMA-GCS-3	1X	7X
ส่วนหัว		
ส่วนกลาง		
ส่วนท้าย		

ภาพที่ 4 ตัวอย่างภาพถ่าย SEM ของวัสดุพูนโมโนลิธ ที่สังเคราะห์ในท่อแก้วอะพิลลารี

2. การประเมินคุณสมบัติคอลัมน์

2.1 การแยกสารผสมทดสอบด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีระดับไมโครลิตร

เมื่อทำการทดสอบคุณสมบัติด้านโครมาโทกราฟีของคอลัมน์ทั้งหมด โดยทำการแยก test mixture ซึ่งประกอบด้วย ไซโอยูเรีย, ฟีนอล, อะนิโซล, เบนซีน, โทลูอิน และแนพทาลีน จากผลการทดลองในภาพที่ 5 แสดงตัวอย่างโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานที่ได้จากการแยกด้วยคอลัมน์ที่สังเคราะห์ขึ้นตามกรรมวิธีของการทดลอง เมื่อพิจารณาค่าเวลาที่คงอยู่ของสารมาตรฐานในแต่ละคอลัมน์ที่สรุปไว้ในตารางที่ 1 และ 2 พบว่าการเตรียมคอลัมน์แบบขนาน มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเวลาคงอยู่ ระหว่าง 0.06 ถึง 0.71 ซึ่งต่ำกว่าแบบยาว (SLCM) ซึ่งมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานระหว่าง 0.30 ถึง 33.24



ภาพที่ 5 แสดงโครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน 1 = ไซโอยูเรีย, 2 = ฟีนอล, 3 = อะนิโซล, 4 = เบนซีน, 5 = โทลูอิน และ 6 = แนพทาลีน ที่สภาวะการทดลอง เฟสเคลื่อนที่ 55:45 (v/v) อะซีโทไนไตรล์ต่อน้ำ, คอลัมน์อะพิลลารี SMA-EDMA ที่สังเคราะห์ขึ้น; โดย A, C และ E เป็นคอลัมน์ที่ถูกเตรียมแบบขนาน (Multiple short column filling method, MSCM) และ B, D และ F เป็นคอลัมน์ที่ถูกเตรียมแบบยาว (Single long column filling method, SLCM) โดย A, B ให้ความร้อนด้วย GC oven, C, D ให้ความร้อนด้วย hot air oven และ E, F ให้ความร้อนด้วย water bath

ตารางที่ 1 แสดงค่าเวลาที่คงอยู่ของคอลัมน์ที่ถูกเตรียมแบบ Multiple short column filling method ด้วยวิธีการให้ความร้อน 3 แบบ (GC oven, GC oven และ Water bath)

สาร	GC oven		Hot air oven		Water bath		GC oven	
	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD
Thiourea	1.43	0.13	0.92	0.06	1.38	0.18	1.24	0.28
Phenol	1.68	0.16	1.08	0.07	1.62	0.21	1.46	0.33
Anisole	2.71	0.24	1.76	0.11	2.61	0.33	2.36	0.52
Benzene	3.25	0.29	2.11	0.14	3.14	0.40	2.83	0.63
Toluene	4.24	0.38	2.75	0.18	4.09	0.52	3.69	0.82
Naphthalene	5.93	0.53	3.86	0.25	5.70	0.71	5.16	1.13

ตารางที่ 2 แสดงค่าเวลาที่คงอยู่ของคอลัมน์ที่ถูกเตรียมแบบ Single long column filling method ด้วยวิธีการให้ความร้อน 3 แบบ (GC oven, GC oven และ Water bath)

สาร	GC oven		Hot air oven		Water bath		GC oven	
	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD
Thiourea	4.33	4.72	1.39	0.30	6.52	8.45	4.08	2.58
Phenol	5.09	5.55	1.64	0.36	7.52	9.70	4.75	2.95
Anisole	8.25	9.03	2.68	0.57	11.87	15.25	7.60	4.63
Benzene	9.89	10.82	3.21	0.68	14.22	18.29	9.10	5.55
Toluene	12.95	14.21	4.20	0.88	18.50	23.78	11.88	7.20
Naphthalene	18.28	20.19	5.92	1.25	25.86	33.24	16.69	10.06

2.2. ความสามารถในการคงอยู่ของสารบนโมลิตีคอลลัมน์ที่สังเคราะห์ (Capacity factor, k')

ค่า Capacity factor คำนวณได้จากค่าเวลาคงอยู่ของสารมาตรฐานทดสอบทั้ง 5 ชนิด โดยกำหนดให้ค่าเวลาคงอยู่ของไซโอยูเรียเป็น void time (สารที่ไม่มีการยึดติดบนคอลัมน์) ซึ่งค่า k' ถูกแสดงในตารางที่ 3 และ 4 และภาพที่ 5 โดยเมื่อเปรียบเทียบค่า k' ที่ได้จากวิธีการเตรียมคอลัมน์ทั้ง 2 แบบพบว่ามีความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าคอลัมน์แต่ละอันมีคุณสมบัติทางโครมาโทกราฟฟีที่ไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 3 แสดงค่า Capacity factor (k') ของคอลัมน์ที่ถูกเตรียมแบบ Multiple short column filling method ด้วยวิธีการให้ความร้อน 3 แบบ (GC oven, GC oven และ Water bath)

	GC oven		Hot air oven		Water bath	
	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD
Phenol	0.17	0.002	0.17	0.001	0.17	0.000
Anisole	0.90	0.010	0.92	0.004	0.89	0.005
Benzene	1.27	0.012	1.30	0.005	1.28	0.004
Toluene	1.96	0.021	2.00	0.007	1.97	0.007
Naphthalene	3.15	0.037	3.20	0.010	3.14	0.014

* เมื่อ Thiourea เป็น void marker

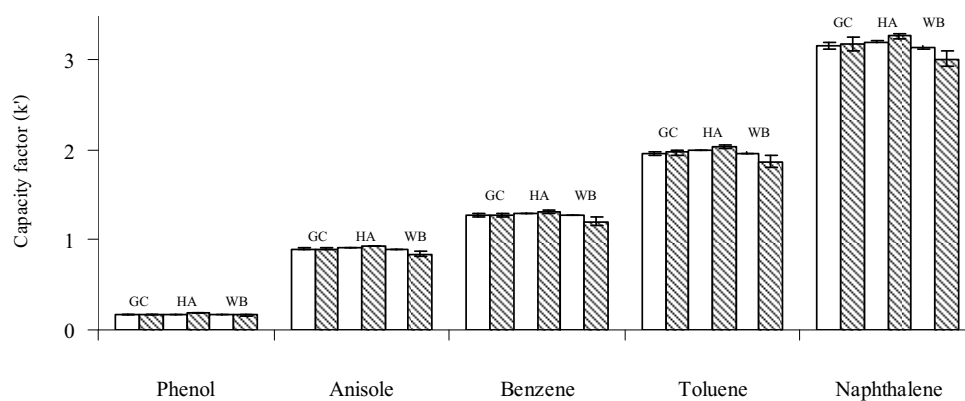
Capacity factor = $(t_r - t_0)/t_0$, t_r = เวลาที่สารใช้ในการเคลื่อนที่ออกจากหัวคอลัมน์ถึงตัวตรวจวัด

t_0 = เวลาที่ไซโอยูเรียใช้ในการเคลื่อนที่ออกจากหัวคอลัมน์ถึงตัวตรวจวัด

ตารางที่ 4 แสดงค่า Capacity factor (k') ของคอลัมน์ที่ถูกเตรียมแบบ Single long column filling method ด้วยวิธีการให้ความร้อน 3 แบบ (GC oven, GC oven และ Water bath)

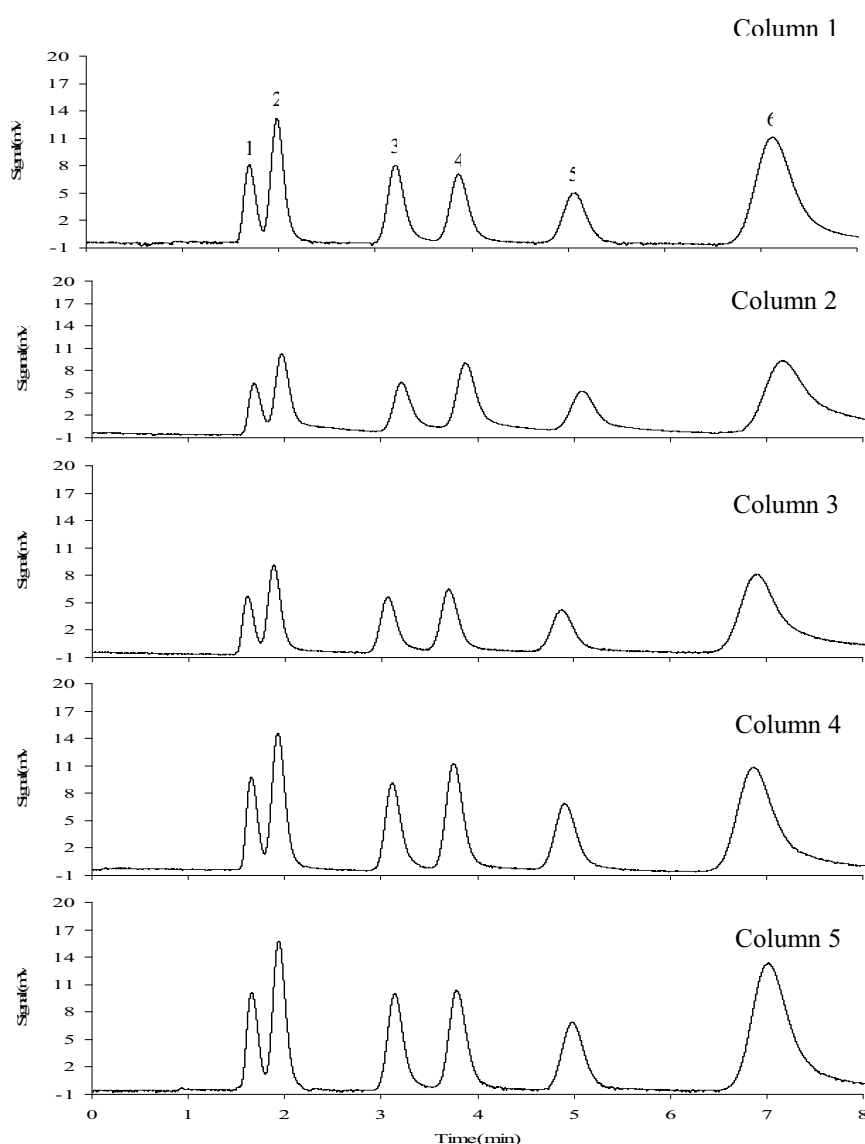
	GC oven		Hot air oven		Water bath	
	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD
Phenol	0.17	0.002	0.18	0.002	0.16	0.011
Anisole	0.90	0.012	0.93	0.007	0.84	0.032
Benzene	1.28	0.014	1.31	0.016	1.21	0.048
Toluene	1.97	0.028	2.03	0.022	1.87	0.065
Naphthalene	3.17	0.075	3.27	0.028	3.01	0.088

* เมื่อ Thiourea เป็น void marker

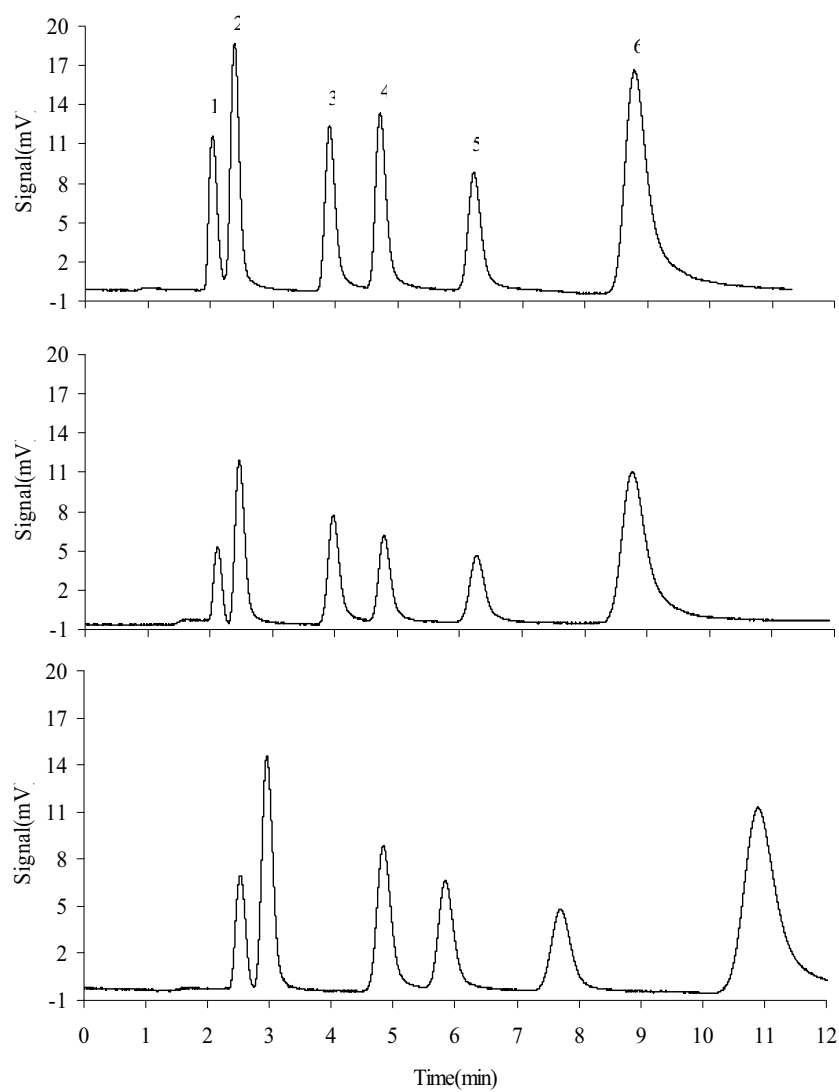


ภาพที่ 6 แสดงค่า Capacity factor (k') ของท่อแก้วอะพิลลารีขนาดเล็กที่สังเคราะห์ได้ โดยการเตรียมคอลัมน์แบบ Multiple short column filling method (▨) และ Single long column filling method (▩) โดย 1, 2 และ 3 เป็นการให้ความร้อนด้วย GC oven, Hot air oven และ Water bath ตามลำดับ

จากผลที่ได้ ทั้งจากค่า retention time และ capacity factor สามารถสรุปได้ว่า การเตรียมคอลัมน์แบบสั้น และให้ความร้อนในการสังเคราะห์โพลีโนลิธคอลัมน์ด้วย hot air oven และ GC oven ให้ความสามารถในการเตรียมซ้ำที่ดี แต่เนื่องจากการเตรียมจาก GC oven ให้ออกมาที่มีประสิทธิภาพการแยกที่ดีกว่า จึงเลือกการให้ความร้อนด้วย GC oven เป็นวิธีที่ดีที่สุดสำหรับการเตรียมโพลีโนลิธคอลัมน์ และได้ทำการศึกษาการเตรียมคอลัมน์จากองค์ประกอบที่เตรียมคนละครั้ง (between batch) ในวันเดียวกัน (intra-day) และระหว่างวัน (inter-day) พบว่าได้คอลัมน์ที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกันดังแสดงผลการแยกบนคอลัมน์ที่สังเคราะห์ได้ในภาพที่ 7 และ 8 ตามลำดับ



ภาพที่ 7 การแยกสารทั้ง 6 ชนิดบนคอลัมน์ที่เตรียมในวันเดียวกัน (5 คอลัมน์) โดยใช้ 55% (v/v) เมทานอล:น้ำ เป็น เฟสเคลื่อนที่ ติดตามสัญญาณการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร (1) ไธโอยูเรีย (2) ฟีนอล (3) แอนนิโซล (4) เบนซีน (5) โทลูอิน (6) แนฟทาลีน



ภาพที่ 8 การแยกสารทั้ง 6 ชนิด บนคอลัมน์ที่เตรียมคนละวัน (3 วัน) โดยใช้ 55% (v/v) เมทานอล:น้ำ เป็น เฟสเคลื่อนที่ ติดตามสัญญาณค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร (1) โซ โอยูเรีย (2) ฟีนอล (3) แอนนิโซล (4) เบนซีน (5) โทลูอิน (6) แนฟทาลีน

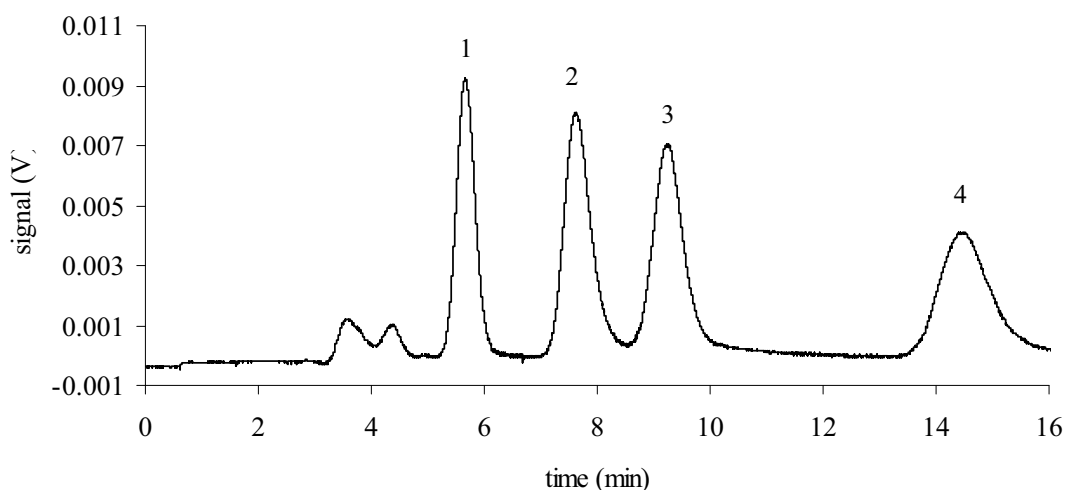
3. การประยุกต์โมนอลิธคอลัมน์ สำหรับการแยกสเตียรอยด์และวิตามินอี

3.1 การแยกสารสเตียรอยด์ บน C18 โมนอลิธคอลัมน์

ได้ทำการศึกษาการแยกสเตียรอยด์ 4 ชนิด (triamcinolone, prednisone, prednisolone และ dexamethasone) ชนิด บน C18 โมนอลิธคอลัมน์ที่สังเคราะห์ขึ้น พบว่า 10% (v/v) methanol : water เป็นองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมที่ทำให้ได้การแยกที่ดี ภายในเวลาอันสั้น คือ 16 นาที (แสดงในภาพที่ 9) สภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกสรุปได้ในตารางที่ 5 และสรุปประสิทธิภาพของวิธีในตารางที่ 6

ตารางที่ 5 แสดงสภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกสเตียรอยด์ทั้ง 4 ชนิด (triamcinolone, prednisone, prednisolone และ dexamethasone) ชนิด บน C18 โมนอลิธคอลัมน์ (SMA-EDMA)

Mobile phase	water : methanol (90 : 10 , (v/v))
Flow rate	2 μ L/min
Column	SMA-EDMA monolithic capillary column 100 μ m I.D. x 50 cm
Column temperature	25°C
Detection wavelength	241 nm
Injection volume	250 nL



ภาพที่ 9 การแยก (1) corticosteroid, (2) triamcinolone, (3) prednisone, และ (4) dexamethasone (สภาวะการแยก แสดงในตารางที่ 3)

ตารางที่ 6 แสดงประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้น สำหรับการแยก สเตียรอยด์ ทั้ง 4 ชนิด

Analytical parameter	Triamcinolone	Prednisone	Prednisolone	Dexamethasone
linearity rang (mg/L)	0.5-10.0	0.5-10.0	0.5-10.0	0.5-10.0
Calibration equation ^a	$y = 0.098x + 0.0127$	$y = 0.116x + 0.0171$	$y = 0.1002x + 0.0217$	$y = 0.1185x + 0.0104$
Linear regression (r^2)	0.999	0.999	0.998	0.999
Limit of detection ^b	0.009	0.007	0.008	0.007
Limit of quantitation ^c	0.029	0.024	0.028	0.024

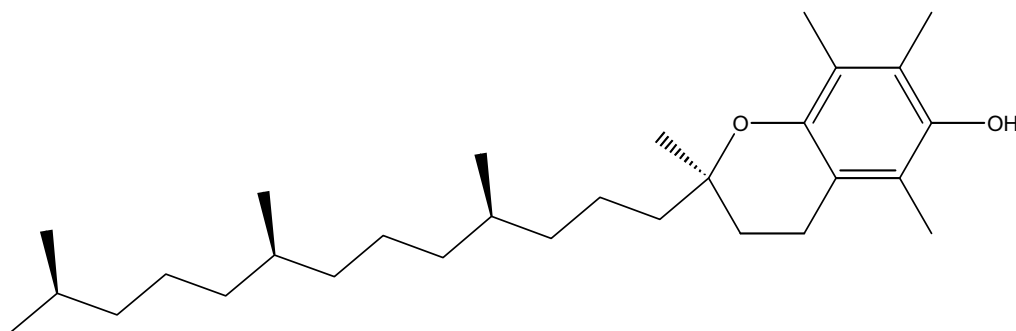
^ay is peak area (V.s), x is concentration (mg/L)

^bcalculate from $S/N = 3$, (S is peak area and N is noise signal)

^ccalculate from 3SD of blank/slop

3.2 การแยกไอโซเมอร์ของ วิตามินอี (โทโคเฟอรอล) บนโมโนลิธคอลัมน์

เนื่องจากโทโคเฟอรอล หรือวิตามินอี เป็นสารที่ไม่มีขั้ว ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอีแต่ละไอโซเมอร์มักจะทำได้โดยใช้เทคนิคคลิควิดโครมาโทกราฟี ซึ่งจำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาเทคนิคการแยกระดับไมโครลิตร เพื่อลดปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการวิเคราะห์วิตามินอี การแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีระดับไมโครลิตรที่ทำการศึกษาคือ เทคนิคไมโครคลิควิดโครมาโทกราฟี และอะพิลลารีโอเล็กโทร โครมาโทกราฟี



Homologues	R ¹	R ²	R ³
α -tocopherol	CH ₃	CH ₃	CH ₃
β - tocopherol	CH ₃	H	CH ₃
δ -tocopherol	H	CH ₃	CH ₃
γ -tocopherol	H	H	CH ₃

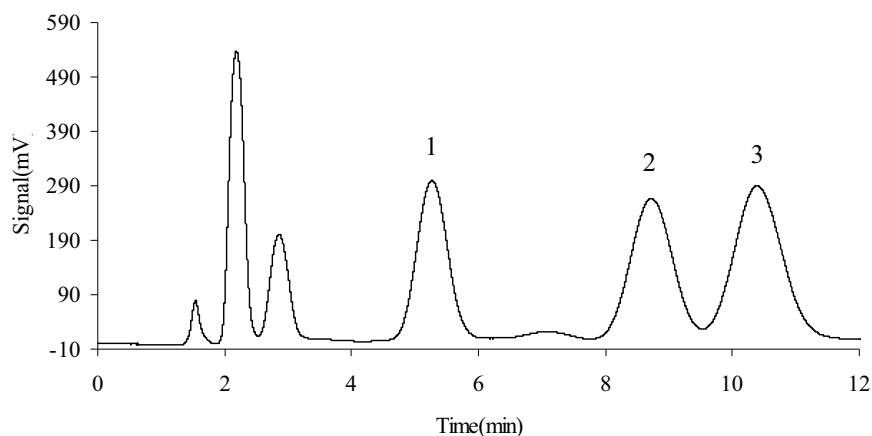
ภาพที่ 10 แสดงโครงสร้างไอโซเมอร์ของวิตามินอี

3.2.1 การแยกวิตามินอีด้วยเทคนิคไมโครลิควิดโครมาโทกราฟี

ในการแยกไอโซเมอร์ของวิตามินอีบนโมโนลิธคอลัมน์ 2 ชนิด คือ C18 SMA-EDMA และ PEDAS-EDMA (มีหมู่ฟังก์ชันเป็น OH และ C18) ด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี ผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่า คอลัมน์ PEDAS-EDMA ให้ผลการแยกที่ดีกว่า C18 คอลัมน์ จึงได้ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกบน PEDAS-EDMA ดังสรุปในตารางที่ 7 ตัวอย่างของโครมาโทแกรมที่ได้แสดงในภาพที่ 11 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม สามารถทำการแยกวิตามินอีทั้ง 3 ชนิด ได้ภายในเวลา 12 นาที

ตารางที่ 7 แสดงสภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกวิตามินอี บน PEDAS-EDMA โมโนลิธคอลัมน์ ด้วยเทคนิคไมโครลิควิดโครมาโทกราฟี

Mobile phase	water : methanol (5 : 95, (v/v))
Flow rate	3 μ L/min
Column	PEDAS-EDMA monolithic capillary column 100 μ m I.D. x 50 cm
Column temperature	25 $^{\circ}$ C
Detection wavelength	205 nm
Injection volume	250 nL



ภาพที่ 11 โครมาโทแกรมของ 1 = δ -tocopherol, 2 = α -tocopherol and 3 = α -tocopherol acetate เมื่อทำการแยกบน PEDAS-EDMA คอลัมน์ (สภาวะการแยก แสดงในตารางที่ 5)

จากนั้นได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้นในแง่ของ ช่วงการใช้งาน (Linearity rang) ความเป็นเส้นตรง (Linear regression) ขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of detection) สรุปได้ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้นสำหรับการวิเคราะห์ วิตามินอี ; δ -tocopherol, α -tocopherol และ α -tocopherol acetate

Analytical parameter	δ -tocopherol	α -tocopherol	α -tocopherol acetate
linearity rang (mg/L)	5.0-100.0	5.0-100.0	5.0-100.0
Calibration equation ^a	$y = 0.003x + 0.007$	$y = 0.003x + 0.002$	$y = 0.003x + 0.003$
Linear regression (r^2)	0.996	0.998	0.998
Limit of detection ^b (mg/L)	0.99	0.99	0.99
Limit of quantitation ^c (mg/L)	3.30	3.30	3.30

^ay is peak area (V.s), x is concentration (mg/L), ^bcalculate from $S/N = 3$, (S is peak area, N is noise calculate from 3SD of blank/slop

ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างยา ดังสรุปผลการวิเคราะห์ในตารางที่ 9 ซึ่งให้ผลที่ใกล้เคียงกับค่าที่ระบุ และมีเปอร์เซ็นต์การวิเคราะห์คืนกลับที่ดีในช่วง 103 – 108 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นถึงความถูกต้องและน่าเชื่อถือของวิธีที่พัฒนาขึ้น

ตารางที่ 9 ผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอี ด้วยเทคนิคที่พัฒนาเทียบกับค่าที่ระบุ และแสดงเปอร์เซ็นต์การวิเคราะห์กลับ

Sample	Quantity ^a				%Recovery
	δ -TOH	α -TOH	α -TOAc	Label claim	
Multivitamins tablet	-	-	24.13 ± 3.76	30 mg/tablet	107.0 ± 1.1
Multivitamins syrup	-	-	1.14 ± 0.02	1 mg/mL	108.3 ± 6.4
Natural vitamin E oil	-	-	100.86 ± 1.72	100 mg/5drops	105.2 ± 4.2
Natural mixed tocopherols capsule	-	264.74 ± 8.75	-	268 mg/capsule	103.7 ± 6.7
Natural Vitamin E capsule	-	-	142.71 ± 1.27	200 mg/capsule	103.1 ± 4.1

^aaverage vitamin E content $\pm$ SD, n = 3, δ -TOH = δ -tocopherol, α -TOH = α -tocopherol, α -TOAc = δ -tocopherol acetate

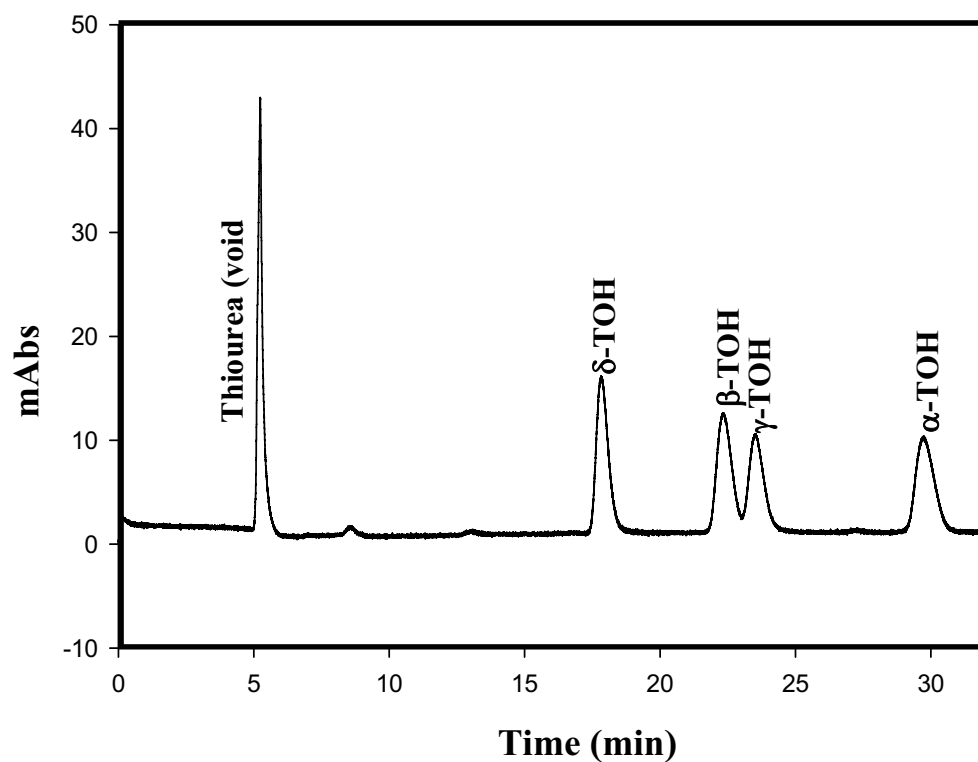
3.2.2 การแยกวิตามินอีด้วยเทคนิคอะพอลาร์รีโอโครมาโทกราฟี

เนื่องจากการแยกไอโซเมอร์ของวิตามินอีบนโมโนลิธคอลัมน์ที่สังเคราะห์ขึ้นทั้ง 2 ชนิดด้วยเทคนิคคลิควิดโครมาโทกราฟี ยังไม่สามารถแยกไอโซเมอร์ทั้งหมดของวิตามินอีได้ จึงได้ทำการพัฒนาเทคนิคอะพอลาร์รีโอโครมาโทกราฟีซึ่งมีประสิทธิภาพการแยกสูงเพื่อทำการแยกวิตามินอีทั้ง 4 ไอโซเมอร์ (แอลฟา เบต้า แกมมา และเดลต้าไอโซเมอร์) ซึ่งไม่สามารถแยกได้บน C18 คอลัมน์แบบดั้งเดิม หรือบนโมโนลิธชนิดซิลิกา จากงานวิจัยนี้พบว่า C18 SMA-EDMA คอลัมน์ที่สังเคราะห์แสดงคุณสมบัติที่ดีสำหรับการแยกไอโซเมอร์ของวิตามินอี โดยสามารถแยกไอโซเมอร์ของวิตามินอีทั้ง 4 ได้ภายในเวลา 30

นาที่ ดังแสดงโครมาโทแกรมในภาพที่ 12 และเปรียบเทียบความสามารถและเวลาที่ใช้ในการแยกกับผลงานวิจัยที่ได้มีการรายงานมาก่อนในตารางที่ 11

ตารางที่ 10 แสดงสภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกวิตามินอี บน SMA-EDMA โมโนลิธิคคอลัมน์ ด้วยเทคนิคแคปิลารีอิเล็กโตรโครมาโทกราฟี

Mobile phase	7:93 (v:v) 20 mM Tris buffer pH 9 : acetonitrile
Column	SMA-EDMA monolithic capillary column 100 μ m I.D. x 23.5 cm (total length 32 cm)
Column temperature	30 $^{\circ}$ C
Detection wavelength	200 nm
Injection	Electrokinetic injection, +10 kV, 30 s



ภาพที่ 12 แสดงการแยกไอโซเมอร์ทั้ง 4 ชนิดของวิตามินอี (สภาวะการแยกในตารางที่ 10)

ตารางที่ 11 Resolution between β - and γ -TOHs obtained from the SMA-EDMA column compare to other stationary phases.

Stationary phase	Type of column	$R_s(\beta-\gamma)^a$	Ref.
1. C8, C18	microparticulate	0.0 ^b	1-3
2. Monomeric C30	microparticulate	1.5	4
3. Pentafluorophenylsilica	microparticulate	- ^c	5
4. ULTIMA C18 ^d	microparticulate	1.2	6
5. Silica monolith ^e	monolith	- ^c	7
6. PEDAS-EDMA ^f	monolith	1.2	8
7. C18 SMA-EDMA	monolith	1.1	This work

^a resolution between β - and γ -TOH, $R_s = 2[(t_r)_\gamma - (t_r)_\beta]/(W_\beta + W_\gamma)$, t_r = retention time and W = peak width

^b cannot separate β - and γ -TOHs, ^c not reported

^d bifunctional groups of amide and C18

^e bifunctional groups of hydroxyl and C17

^f silica monolith coated with poly(octadecyl methacrylate)

ตารางที่ 12 แสดงความเที่ยงตรงของวิธีที่พัฒนาขึ้นในแง่ของค่า สัมประสิทธิ์การแปรปรวน ของค่าเวลาที่ใช้ในการคงอยู่ (t_R) สัญญาณพื้นที่ใต้พีค (Peak area) และประสิทธิภาพของคอลัมน์ (Efficiency) สำหรับสารทั้ง 5 ชนิด ที่ทำการแยกในวันเดียวกันและระหว่างวัน (3 วัน)

ตารางที่ 12 %RSD for retention time (t_R), peak area and efficiency (N) of the TOH's and thiourea (EOF maker) separated on SMA-EDMA column

Compounds	Intraday repeatability (n=7 injections)			Interday repeatability (3 days)		
	t_R	Peak area	Efficiency	t_R	Peak area	Efficiency
EOF	0.55	-	-	1.63	-	-
δ -TOH	0.74	3.1	3.0	3.00	9.3	7.6
β -TOH	0.78	6.4	2.4	2.73	7.9	7.6
γ -TOH	0.78	4.0	5.4	2.73	6.1	12.5
α -TOH	0.76	5.5	2.8	2.56	8.2	6.0

4.. การศึกษาการเตรียมโมโนลิธิคคอลลัมน์ชนิดใหม่

ได้ทำการศึกษาโมโนลิธิคคอลลัมน์ชนิดใหม่ ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นวงเบนซีน ซึ่งยังไม่มีผู้รายงานมาก่อน ได้ทำการเตรียมโมโนลิธิกชนิดนี้ ตามส่วนผสมที่แสดงด้านล่าง จากนั้นทำการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำคอลลัมน์ชนิดนี้ไปใช้ในการแยกแบบลิควิดโครมาโทกราฟี อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาเบื้องต้น พบว่าคอลลัมน์ที่สังเคราะห์ได้ ยังมีความเป็นรูพรุนที่ไม่ดีนัก จำเป็นต้องมีการปรับปรุงองค์ประกอบของสารที่ใช้ในการเตรียมต่อไป เพื่อให้ได้คอลลัมน์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการแยกสาร ทั้งสมบัติด้านกายภาพและสมบัติด้านเคมี

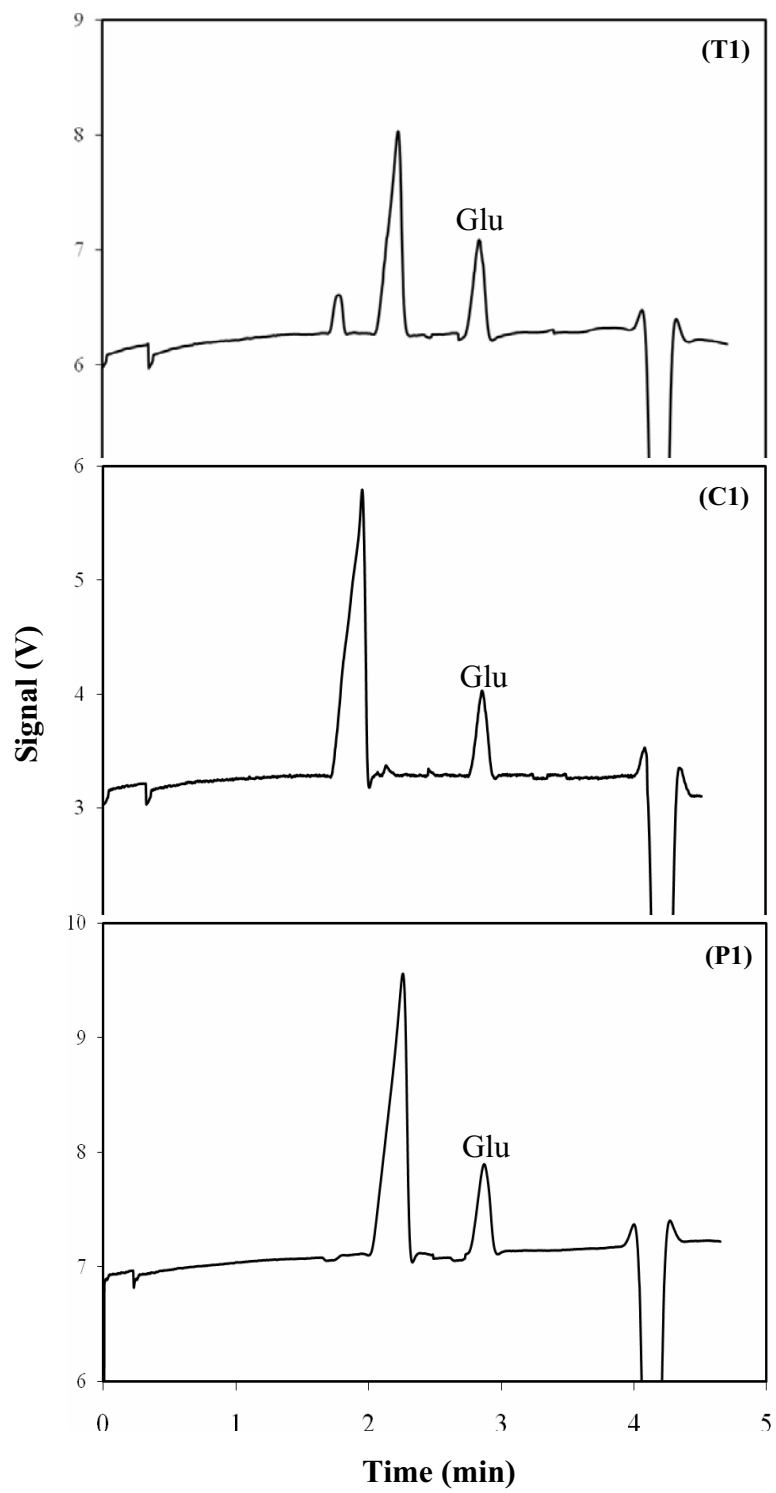
สารเคมี	น้ำหนัก (กรัม)
Monomer	0.1200
EDMA	0.1019
Isoamyl alcohol	0.2809
1,4-butane diol	0.0662
Toluene	0.0882
AIBN	0.0107

5. การพัฒนาวิธีการแยกกลูโคซามีนด้วยเทคนิคแคปิลารีอิเล็กโตรโฟรีซิส

ได้ทำการพัฒนาเทคนิคการแยกระดับไมโครลิตรภายใต้สนามไฟฟ้าในท่อแก้วขนาดเล็ก พบว่าสามารถทำการแยกและวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนในตัวอย่างยาและตัวอย่างซีรัมได้โดยตรง โดยไม่จำเป็นต้องมีขั้นตอนการเตรียมหรือกำจัดสารปนเปื้อนในตัวอย่าง สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์กลูโคซามีนด้วยเทคนิคแคปิลารีอิเล็กโตรโฟรีซิสสรุปในตารางที่ 13 แสดงผลการวิเคราะห์กลูโคซามีนในตัวอย่างที่มีลักษณะเป็นผง เม็ด และแคปซูล ในภาพที่ 13 และสรุปผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC กับผลที่ระบุข้างฉลากใน ตารางที่ 14

ตารางที่ 13 แสดงสภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์กลูโคซามีนด้วยเทคนิคแคปิลารีอิเล็กโตรโฟรีซิส

Electrolyte	20 mM MES/His pH 6
Capillary	Fused silica capillary 100 μ m I.D. x 23.5 cm (total length 32 cm)
Separation voltage	+7 kV
Detection	C4D
Injection	Electrokinetic injection, +1 kV, 3 s



ภาพที่ 13 ตัวอย่างโครมาโทแกรมของการแยกตัวอย่างยาชนิดผง (P1), capsule (C1) และยาเม็ด (T1) ภายใต้สภาวะที่สรุปในตารางที่ 13

ตารางที่ 14 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนในตัวอย่างยาเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC และค่าที่ระบุข้างฉลาก และร้อยละการกู้คืนของการวิเคราะห์

Samples	CE-C ⁴ D		HPLC	Lable claim
	%Recovery $\pm$ SD	Quantification	Quantification	
		(mg/sample) $\pm$ SD	(mg/ sample) $\pm$ SD	
T1	99.3 $\pm$ 5.9	1.44 $\pm$ 0.01	1.40 $\pm$ 0.00	1.50 ^a
C1	87.4 $\pm$ 5.2	0.54 $\pm$ 0.01	0.56 $\pm$ 0.01	0.50 ^b
C2	89.0 $\pm$ 5.5	0.53 $\pm$ 0.02	0.56 $\pm$ 0.01	0.50 ^b
C3	87.6 $\pm$ 2.8	0.27 $\pm$ 0.00	0.27 $\pm$ 0.00	0.25 ^b
C4	86.5 $\pm$ 3.3	1.08 $\pm$ 0.02	0.95 $\pm$ 0.00	1.00 ^b
P1	104.7 $\pm$ 3.0	1.55 $\pm$ 0.02	1.63 $\pm$ 0.03	1.50 ^c
P2	101.3 $\pm$ 7.2	1.53 $\pm$ 0.06	1.55 $\pm$ 0.00	1.50 ^c
P3	102.4 $\pm$ 0.7	1.52 $\pm$ 0.03	1.67 $\pm$ 0.01	1.50 ^c
P4	102.8 $\pm$ 5.1	1.53 $\pm$ 0.04	1.63 $\pm$ 0.01	1.50 ^c

n = 3, n is number of injection

^a mg/tablet, ^b mg/capsule, ^c mg/sachet

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาความสามารถในการเตรียมซ้ำของการสังเคราะห์โมโนลิธคอลัมน์ในท่อแก้วอะพิลลารี โดยการให้ความร้อนจากอุปกรณ์ 3 ชนิด คือ เตาอบเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี เตาอบลมร้อน และอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ พบว่าความทั้งสามวิธีมีความสามารถในการเตรียมซ้ำใกล้เคียงกัน แต่เตาอบเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี เป็นวิธีที่ทำให้ได้คอลัมน์ที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกันทั้งทางกายภาพและโครมาโทกราฟีมากที่สุด แสดงให้เห็นว่า เตาอบเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี น่าจะมีการควบคุมอุณหภูมิให้คงที่และสม่ำเสมอได้ดีกว่าการให้ความร้อนจากอุปกรณ์ที่เหลือ อย่างไรก็ตามคอลัมน์ที่ได้จากการเตรียมคอลัมน์แบบต่างแม้จะมีสมบัติด้านกายภาพ (ความเป็นรูพรุน) ที่แตกต่างกันแต่มีคุณสมบัติทางโครมาโทกราฟีที่เหมือนกันหรือใกล้เคียงกัน

เมื่อนำโมโนลิธที่สังเคราะห์ขึ้นไปใช้ในการแยกสารประกอบโดยเทคนิคคลิควิดโครมาโทกราฟี พบว่าสามารถแยกสารกลุ่มสเตียรอยด์และไอโซเมอร์ของวิตามินอี ได้โดยใช้ตัวทำละลายในปริมาณน้อยมากและใช้สารตัวอย่างในระดับไมโครลิตรเท่านั้น อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบการแยกไอโซเมอร์ของวิตามินอีกับเทคนิคอะพิลลารีเล็กโพรโครมาโทกราฟี พบว่าเทคนิคอะพิลลารีเล็กโพรโครมาโทกราฟีมีประสิทธิภาพการแยกที่ดีกว่า และพบว่า C18 คอลัมน์ที่สังเคราะห์ขึ้นมีความจำเพาะต่อการแยกไอโซเมอร์ของวิตามินอี (โทโคฟีรอล) ที่ดีกว่าคอลัมน์ C18 ชนิดดั้งเดิมที่มีลักษณะเป็นอนุภาคซึ่งไม่สามารถใช้ในการแยกไอโซเมอร์ของวิตามินอีอย่างสมบูรณ์ได้ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสามารถทำการแยกไอโซเมอร์ของวิตามินอีด้วยเทคนิคอะพิลลารีเล็กโพรโครมาโทกราฟีได้ในเวลา 30 นาที

ในส่วนที่สองของงานวิจัยเป็นการพัฒนาเทคนิคการแยกระดับไมโครลิตรโดยอาศัยสนามไฟฟ้าสำหรับการวิเคราะห์กลูโคซามีนในตัวอย่างยาและตัวอย่างซีรัม โดยไม่ต้องมีขั้นตอนการเตรียมสารตัวอย่างหรือการกำจัดสิ่งเจือปน เทคนิคที่พัฒนาสามารถนำไปวิเคราะห์ตัวอย่างจริงและมีร้อยละการกู้คืนอยู่ระหว่าง 86.5 – 104.7%

Output ที่ได้จากโครงการ

1. เทคโนโลยีเกี่ยวกับการสังเคราะห์โมโนลิธคอลัมน์ที่สามารถเตรียมขึ้นได้เองในห้องปฏิบัติการ ซึ่งถือเป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับงานวิจัยทางเคมีวิเคราะห์โดยเฉพาะทางด้านโครมาโทกราฟี นอกจากนี้ยังช่วยส่งเสริมให้งานวิจัยทางเคมีวิเคราะห์สามารถดำเนินก้าวหน้าไปได้อย่างรวดเร็วขึ้น
2. วิธีการทางเทคนิคโครมาโทกราฟีระดับไมโครลิตร สำหรับการแยกไอโซเมอร์ของวิตามินอี ซึ่งไม่สามารถแยกได้บน C8 หรือ C18 คอลัมน์แบบดั้งเดิมที่มีลักษณะเป็นอนุภาค
3. การเผยแพร่ผลงานในวารสารระดับนานาชาติ

3.1 ผลงานที่ได้รับการตอบรับให้ตีพิมพ์

Sirichai Kositarata, Norman William Smith, Duangjai Nacapricha, Prapin Wilairat, Patcharin Chaisuwan * “Repeatability in column preparation of a reversed-phase C18 monolith and its application to separation of tocopherol homologues” In press, Talanta (Impact factor 3.29)

3.2 ผลงานที่อยู่ระหว่างการพิจารณาให้ตีพิมพ์

Thitiya Kongprasertsak, Areeporn Sangcakul, Norman W Smith, Kanchana Uraisin, Duangjai Nachapricha, Prapin Wilairat and Patcharin Chaisuwan* “Direct injection of human serum and pharmaceutical formulations for glucosamine determination by CE-C⁴D method”, Submitted, J. Chromatogr B (Impact factor 2.79)

ภาคผนวก

1. นำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมระดับนานาชาติ “The 16th International Conference on Flow Injection Analysis, Including Related Techniques, 25-30th April 2010, Pattaya, Thailand. 3 เรื่อง (เอกสารแนบ 1-4)

- Monolithic Materials for Micro-Flow Analysis (Oral Presentation)
- Repeatability in Preparation of Capillary Monolithic Column (Poster Presentation)
- Micro-Separation of Vitamin E on Monolithic Column (Poster Presentation)

2. ได้รับเชิญให้เป็นอาจารย์พิเศษ บรรยาย เรื่อง A new type of stationary phase for chromatography; monolithic material โดยคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อวันที่ 14 มกราคม 2553 เวลา 09.00 – 11.00 น. (เอกสารแนบ 5)

3. การตีพิมพ์ผลงาน

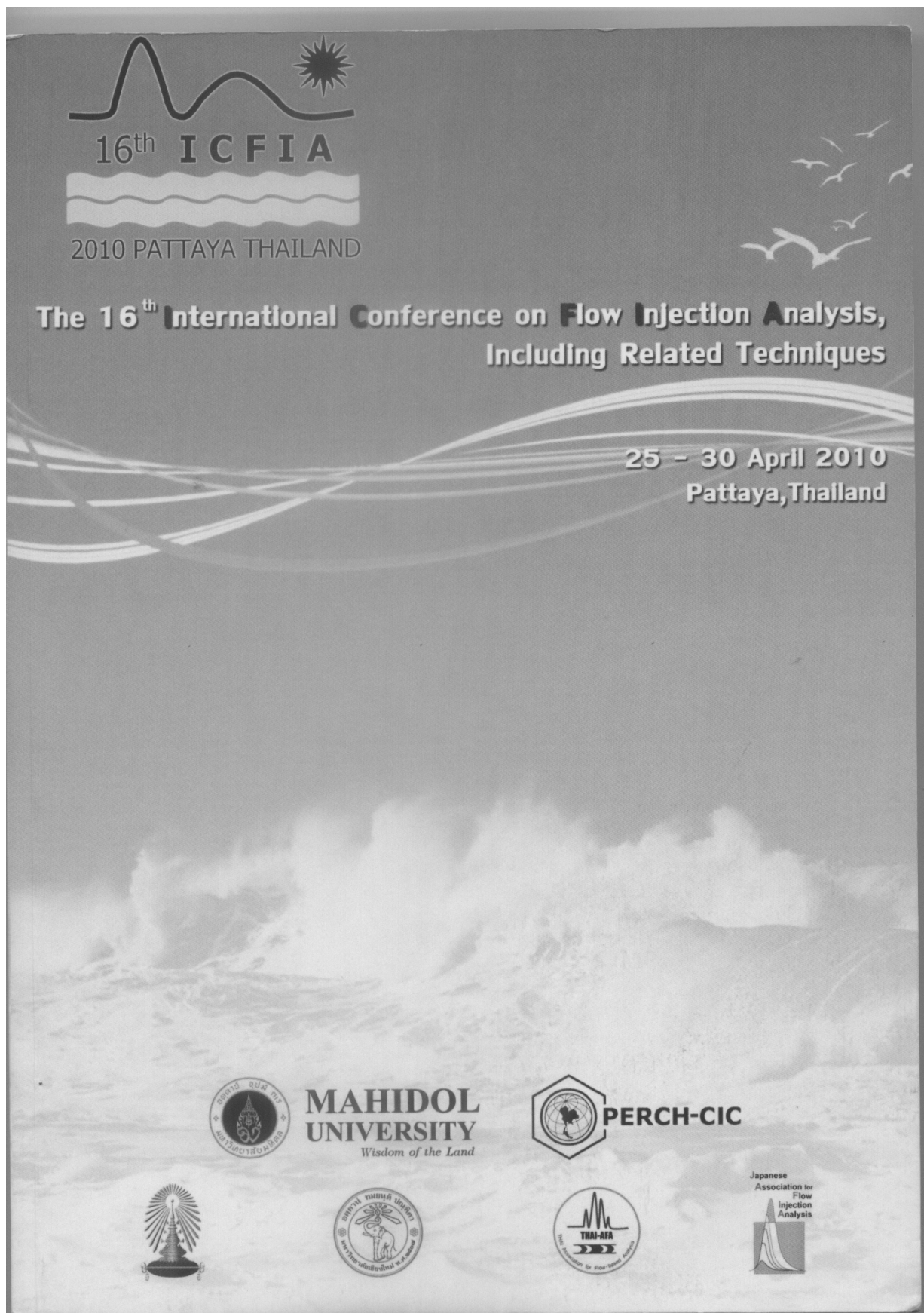
3.1 ผลงานที่ได้รับการตอบรับให้ตีพิมพ์

Sirichai Kositarata, Norman William Smith, Duangjai Nacapricha, Prapin Wilairat, **Patcharin**

Chaisuwan* “Repeatability in column preparation of a reversed-phase C18 monolith and its application to separation of tocopherol homologues” *In press*, Talanta (Impact factor 3.29)

3.2 ผลงานที่ยู่ระหว่างการพิจารณาให้ตีพิมพ์

Thitiya Kongprasertsak, Areeporn Sangcakul, Norman W Smith, Kanchana Uraisin, Duangjai Nacapricha, Prapin Wilairat and **Patcharin Chaisuwan*** “Direct injection of human serum and pharmaceutical formulations for glucosamine determination by CE-C⁴D method”, Submitted, J. Chromatogr B (Impact factor 2.79)



Monolithic materials for micro-flow analysis

Patcharin Chaisuwan,^{1,2*} Norman William Smith,³ Duangjai Nacapricha,^{1,4}
Prapin Wilairat^{1,4}

¹ Flow Innovation-Research for Science and Technology Laboratories (FIRST Labs)

² Department of Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Sukhumvit 23 Rd,
Bangkok 10110, Thailand

³ Pharmaceutical Science Research Division, King's College, London, SE1 9NH, UK

⁴ Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science,
Mahidol University, Rama VI Rd, Bangkok 10400, Thailand.

*e-mail: patcharin@swu.ac.th

Abstract

Monolithic material is a synthetic polymeric and porous material showing remarkable properties for using as stationary phase for either sample preparation or separation purpose. The main advantages of these materials are ease in preparation, having varieties for selection of stationary phase, and *in situ* preparation is possible. The high porosity of materials makes them ready to couple with both high pressure and low pressure systems. The material can be easily prepared *in situ* in a small glass channel or capillary such as fused-silica capillary and applied for analysis in micro scale. Presentation will be made on some applications of monolithic materials prepared in capillaries for micro-flow analyses such as micro-liquid chromatography, capillary electrochromatography and online-preconcentration for capillary electrophoresis.

Keywords: micro-separation, monolithic column, column preparation

References

- [1] Jiang Z., Smith NW., Ferguson PD., Taylor MR. J. Biochem. Biophys. Method 70 (2007) 39.
- [2] Chaisuwan P., Nacapricha D., Wilairat P., Jiang Z., Smith NW. Electrophoresis 29 (2008) 2301.
- [3] Chaisuwan P., Nacapricha D., Wilairat P., Jiang Z., Smith NW. Electrophoresis 29 (2008) 4008.

Acknowledgements: Financial supports from (i) the Thailand Research Fund (PC), (ii) the National Research Council of Thailand (BRCT) through the High Throughput Screening/Analysis: Tool for Drug Discovery, Disease Diagnosis and Health Safety Project (DN and PC) and (iii) the Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Commission on Higher Education, Ministry of Education (PW) are gratefully acknowledged.

Micro-Separation of vitamin E on monolithic column

Sirichai Kositarat,^{1,2} Patcharin Chaisuwan,^{1,3} Norman William Smith,⁴
Duangjai Nacapricha,^{1,2} Prapin Wilairat^{1,2*}

¹ Flow Innovation-Research for Science and Technology Laboratories (FIRST Labs)

² Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science,
Mahidol University, Rama VI Rd, Bangkok 10400, Thailand.

³ Department of Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Sukhumvit 23 Rd,
Bangkok 10110, Thailand

⁴ Pharmaceutical Science Research Division, King's College, London, SE1 9NH, UK

*e-mail: scpwr@mahidol.ac.th

Abstract

A monolithic column with mixed functional groups of polar hydroxyl and nonpolar C17 groups (PEDAS-EDMA) was prepared in a fused silica capillary (100 μm i.d. x 50 cm long). This column was tested for separation of vitamin E in a micro-separation system known as micro-liquid chromatography. Three vitamin E isomers (delta-tocopherol, alpha-tocopherol and tocopherol acetate) were separated on the monolithic column in 8 min by using 95%(v/v) methanol : water as a mobile phase and detected at 205 nm. The method showed good linearity range for quantitative analysis in the range of 5-100 ppm ($R^2 > 0.9960$). Limit of detection and quantification for the three compounds were 0.99 and 3.30, respectively. The method was successfully applied for pharmaceutical vitamin E samples.

Keywords: vitamin E, PEDAS, monolithic column, micro-liquid chromatography

References

- [1] Guiochon G. J. Chromatogr. A 1168 (2007) 101.
- [2] Geiser L., Eeltink S., Svec F., Freccia J.M.J. J. Chromatogr. A 1140 (2007) 140.
- [3] Jiang Z., Smith NW., Ferguson PD., Taylor MR. J. Biochem. Biophys. Method 70 (2007) 39.

Acknowledgements: Financial supports from the Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Commission on Higher Education, Ministry of Education (SK) and the Thailand Research Fund (PC) are gratefully acknowledged.

Repeatability in preparation of capillary monolithic column

**Patcharin Chaisuwan,^{1,3*} Sirichai Kositarat,^{1,2} Norman William Smith,⁴
Duangjai Nacapricha,^{1,2} Prapin Wilairat^{1,2}**

¹ Flow Innovation-Research for Science and Technology Laboratories (FIRST Labs)

² Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science,
Mahidol University, Rama VI Rd, Bangkok 10400, Thailand.

³ Department of Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Sukhumvit 23 Rd,
Bangkok 10110, Thailand

⁴ Pharmaceutical Science Research Division, King's College, London, SE1 9NH, UK

*e-mail: phatcharin@swu.ac.th

Abstract

Monolithic materials have been widely used for both sample preparation and separation due to their remarkable properties and ease in preparation. Since it has been shown that temperature is one of the most important parameters govern structure of the monolith, this work therefore aimed to evaluate repeatability in preparation of monolithic columns based on thermal polymerization. Various means of common heating apparatuses, which are available in most laboratories (i.e., hot air oven, gas chromatographic (GC) oven and water bath) were investigated for appropriate in situ preparation of the monolithic material. Reversed-phase monolithic columns with C18 as major functional group namely stearyl methacrylate with ethylene glycol dimethacrylate, (SMA-EDMA) was prepared in fused silica capillaries. After preparation, the columns were tested for separation of test solution comprised of thiourea, phenol, anisole, benzene, toluene and naphthalene. Chromatographic data in terms of retention time, capacity factor and column efficiencies were considered for the comparison of the prepared columns from the same batch and between batches. It was found that GC oven gave the best repeatability for preparation of the monolithic columns.

Keywords: monolithic column, column preparation

References

- [1] Guiochon G. J. Chromatogr. A 1168 (2007) 101.
- [2] Geiser L., Eeltink S., Svec F., Freccch J.M.J. J. Chromatogr. A 1140 (2007)140.
- [3] Jiang Z., Smith NW., Ferguson PD., Taylor MR. J. Biochem. Biophys. Method 70 (2007) 39.

Acknowledgements: Financial supports from the Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Commission on Higher Education, Ministry of Education (SK) and the Thailand Research Fund (PC) are gratefully acknowledged.



บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล
สาขาคณะวิทยาศาสตร์ ตึกวิจัย ชั้น 1
ถนนพระราม 6 เขตราชเทวี กทม. 10400

ที่ ศร 0517.02 (วท) / 0101
วันที่ 10 มกราคม 2553
เรื่อง ขอเรียนเชิญเป็นอาจารย์พิเศษ

เรียน อาจารย์ ดร. พชรินทร์ ชัยสุวรรณ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล และคณะกรรมการประจำหลักสูตรปริญญาโท สาขาวิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ ได้พิจารณาเห็นว่าท่านเป็นผู้ทรงความรู้และมีประสบการณ์ในการสอนวิชา PYPC 644: Advanced Drug Analysis II จำนวน 3 หน่วยกิต หัวข้อเรื่อง "A new type of stationary phase for chromatography; Monolithic material" จึงขอเรียนเชิญท่านบรรยายวิชาดังกล่าวแก่นักศึกษามหาวิทยาลัยมหิดล หลักสูตรปริญญาโท สาขาวิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จำนวน 4 คน ในวันที่ 14 มกราคม 2553 เวลา 09.00-11.00 น. ณ ห้อง 413 ชั้น 4 อาคารราชรัตน์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ทั้งนี้บัณฑิตวิทยาลัยได้ขออนุมัติผู้บังคับบัญชาของท่านแล้ว

จึงเรียนมาเพื่อทราบ และขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอแสดงความนับถือ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กัญชารัตน์ สุโพบูลย์วัฒน์)

รองคณบดีฝ่ายประชาสัมพันธ์และสื่อสารองค์กร

ปฏิบัติงานแทน คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ติดต่ออาจารย์ผู้รับผิดชอบวิชา: อาจารย์ ดร. ชุติมา เพชรกระจ่าง

โทร. 0-2644-8695

โทรสาร 0-2644-8695

e-mail: pycmt@mahidol.ac.th