



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ระบบการแยกระดับไมโครลิตรที่ทำการตรวจวัดค่าการนำไฟฟ้าแบบ  
ไม่สัมผัสสำหรับการแยกสารโครดที่ไม่ดูดกลืนแสง

โดย พัทรินทร์ ชัยสุวรรณ และคณะ

กรกฎาคม 2557

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ระบบการแยกระดับไมโครลิตรที่ทำการตรวจวัดค่าการนำไฟฟ้าแบบ  
ไม่สัมผัสสำหรับการแยกสารโครดที่ไม่ดูดกลืนแสง

คณะผู้วิจัย

สังกัด

ดร. พชรินทร์ ชัยสุวรรณ

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

รศ.ดร. ประพิน วิไลรัตน์

มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## สารบัญ

| เรื่อง                  | เลขหน้า |
|-------------------------|---------|
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ      | 1       |
| บทคัดย่อภาษาไทย         | 2       |
| Executive Summary       | 3       |
| เนื้อหางานวิจัย         | 5       |
| Output ที่ได้จากโครงการ | 31      |
| ภาคผนวก                 | 32      |

**qIn-house micro-separation with capacitively coupled contactless conductivity detection  
for analysis of non-absorbing chiral compounds**

**Abstract**

Two micro-separation systems based on chromatography and electrophoresis, have been constructed. A chiral monolithic capillary column has been synthesized using a chiral monomer and ethylene glycol methacrylate crosslink monomer with porogenic solvent. The synthesized monolith showed poor physical and chemistry properties for chromatographic separation. The preparation needs further optimization. A monolith synthesized from methacrylic acid provided excellent and fast separation of iohexol, a marker for glomerular filtration rate (GFR) which is an index refers to kidney function. Excellent and clear separation for iohexol in serum was achieved within only 4 minute. Another developed micro-separation system is based on electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. The electrophoresis method was successfully applied for analysis of collistin in pharmaceutical and serum samples. The samples can be directly analyzed within only 3 minutes and without need of any sample preparation step.

Keywords: In-house capillary electrophoresis, capacitively coupled contactless conductivity detection, collistin, iohexol

## ระบบการแยกระดับไมโครลิตรที่ทำการตรวจวัดค่าการนำไฟฟ้าแบบไม่สัมผัสสำหรับการแยกสารโครอลที่ไม่ดูดกลืนแสง

### บทคัดย่อ

ได้ทำการสร้างระบบการแยกระดับไมโครลิตรโดยอาศัยหลักการแบบโครมาโทกราฟีและอิเล็กโตรโฟรีซิส ในการแยกแบบโครมาโทกราฟีโดยใช้โมโนลิธคอลัมน์ที่สังเคราะห์ขึ้นจากมอโนเมอร์ชนิดโครอลและเอทิลีนไกลคอลเมทาอะคริเลตสำหรับการแยกสารโครอล พบว่าคอลัมน์ที่สังเคราะห์ขึ้นยังมีสมบัติทั้งทางด้านกายภาพและเคมีที่ไม่ดีนักและไม่เหมาะสมต่อการแยกสารโครอล จำเป็นต้องมีการศึกษาและพัฒนาต่อไป ในขณะที่คอลัมน์ชนิดเมทาอะคริลิก เอซิค แสดงคุณสมบัติที่ดีมากสำหรับการแยกสารไอโอเฮกซอลในตัวอย่างซีรัม ซึ่งเป็นสารที่ใช้ประเมินประสิทธิภาพการทำงานของไต จึงได้พัฒนาวิธีการแยกระดับไมโครลิตรสำหรับตรวจสอบปริมาณไอโอเฮกซอลในตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วย เพื่อประเมินการทำงานของไต วิธีการแยกที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพการแยกที่ดีมากและสามารถแยกไอโอเฮกซอลได้ภายในเวลาเพียง 4 นาที ระบบการแยกระดับไมโครลิตรอีกระบบที่พัฒนาขึ้นคือ ระบบการแยกแบบอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ติดตามสัญญาณโดยการตรวจวัดค่าการนำไฟฟ้าแบบไม่สัมผัส ระบบและวิธีที่พัฒนาขึ้นได้นำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณคอเลสเตอรอลในตัวอย่างยาและตัวอย่างซีรัม ตัวอย่างทั้งสองประเภทสามารถวิเคราะห์ได้ในเวลาเพียง 3 นาที และสามารถวิเคราะห์ได้โดยตรงโดยไม่ต้องมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

คำสำคัญ : อะพิลลารี อิเล็กโตรโฟรีซิส คาพาซิทีฟลี คัพเปิ้ล คอนแทคเลส คอนดัคทีวิตี ดีเทคชัน คอเลสเตอรอล ไอโอเฮกซอล

## สัญญาเลขที่ 5580244

โครงการ : ระบบการแยกระดับไมโครลิตรที่ทำการตรวจวัดค่าการนำไฟฟ้าแบบไม่สัมผัส  
สำหรับการแยกสารโครอลที่ไม่ดูดกลืนแสง

: In-house micro-separation with capacitively coupled contactless  
conductivity detection for analysis of non-absorbing chiral compounds

### วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อสร้างระบบการแยกแบบกะปิลารีโอเล็กโทรโฟรีซิส ที่ติดตามสัญญาณด้วยตัวตรวจวัดแบบวัดค่าการนำไฟฟ้าสำหรับการวิเคราะห์สารที่ไม่มีความสามารถในการดูดกลืนแสงสำหรับการวิเคราะห์สารคอลิสติน
2. เพื่อพัฒนาวิธีการแยกระดับไมโครลิตรสำหรับการแยกอีแนนทิโอเมอร์ของยาวันโรอีแทมบูทอล โดยอาศัยการแยกแบบอีเล็กโทรโฟรีซิสหรือโครมาโทกราฟี
3. พัฒนาโมโนลิธคอลัมน์สำหรับการแยกไอโอเฮกซอลด้วยเทคนิคคลิควิคโครมาโทกราฟีระดับไมโครลิตร

### Executive Summary

ได้ทำการศึกษาวิธีการสังเคราะห์โครอลมอนอเมอร์เพื่อเตรียม โมโนลิธคอลัมน์โครอลกะปิลารีโอคอลัมน์ จากปฏิกิริยาระหว่าง 4-vinylbenzoel chloride และ 2-amino-2-phenylacetic acid ใน tetrahydrofuran ตามวิธีของ Zharov และคณะ ผลจาก TLC และ NMR พบว่า ได้สารที่ต้องการเพียงเล็กน้อยและทำให้บริสุทธิ์ได้ยาก เมื่อทำการสังเคราะห์ด้วยวิธีของ Martin และคณะ ใน ไดคลอโรอีเทน และ  $\text{AlMe}_3$  พบว่าสารที่ต้องการไม่เสถียรภายใต้สภาวะที่ใช้ซึ่งมีสภาวะเป็นกรด เพื่อเพิ่มปริมาณสารที่สังเคราะห์ได้ ซึ่งทำการปรับสภาวะการสังเคราะห์ใหม่ตามวิธีที่ได้รายงานโดย Vujosevic และคณะ ซึ่งทำการสังเคราะห์ในสภาวะที่เป็นเบส เมื่อนำโครอลมอนอเมอร์ที่ได้ไปสังเคราะห์โมโนลิธคอลัมน์โครอลกะปิลารีโอคอลัมน์ พบว่าโครงสร้างของคอลัมน์ที่ได้ไม่สม่ำเสมอ และมีความเป็นรูพรุนน้อย และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพการแยกของคอลัมน์ด้วยสาร 4 ชนิด คือ ไทโอยูเรีย ฟีนอล แอนนิโซล และแนฟทาลีน พบว่าไม่สามารถแยกได้ จำเป็นต้องมีการปรับเปลี่ยนชนิดของโครอลมอนอเมอร์ และองค์ประกอบของสารที่ใช้ในการเตรียมคอลัมน์เพื่อให้ได้คอลัมน์ที่มีคุณสมบัติดีขึ้น

และได้ทำการสังเคราะห์โมโนลิธคอลัมน์ที่มีสมบัติเป็น HILIC สำหรับการแยกสาร ไอโอเฮกซอลซึ่งเป็นดัชนีบ่งบอกประสิทธิภาพการทำงานของไต ในการศึกษาชนิดของโมโนลิธคอลัมน์สำหรับการแยกไอโอเฮกซอล พบว่าคอลัมน์ชนิด C18 ที่ใช้ในการแยกสารโดยทั่วไปไม่สามารถทำการแยกไอโอเฮกซอลได้แม้ทำการแยกโดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นน้ำที่ปราศจากตัวทำละลายอินทรีย์ แสดงให้เห็นว่าคอลัมน์ประเภทนี้ไม่มีความจำเพาะต่อไอโอเฮกซอล เนื่องจากไอโอเฮกซอลเป็นสารที่มีขั้ว จึงสังเคราะห์โมโนลิธคอลัมน์ผสมที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็น -C18 (ไม่มีขั้ว) และหมู่ -OH (มีขั้ว) พบว่าแม้จะเพิ่มหมู่ฟังก์ชันที่มี

ชั้นบนพื้นผิวของคอลัมน์ คอลัมน์ที่ได้ก็ยังไม่มีความจำเพาะต่อไอโอเฮกซอล จึงเปลี่ยนชนิดของโมโนลิธ ที่สังเคราะห์เป็น HILIC คอลัมน์ ซึ่งมีหมู่ที่มีขั้ว คือ  $-\text{COOH}$  บนพื้นผิว จากมอนอเมอร์ชื่อ เมทาอะไครลิกเอซิด พบว่าคอลัมน์แสดงความจำเพาะที่ดีต่อทั้งสารที่มีขั้วน้อยและสารที่ไม่มีขั้ว รวมทั้งไอโอเฮกซอล โดยพบว่า เมื่อค่า pH ของเฟสเคลื่อนที่และชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการแยกไอโอเฮกซอล จากการศึกษาพบว่า 70 : 30 (v/v) อะซิโตนไนไตรล์ : 50 mM อะซิเทรตบัฟเฟอร์ pH 5 เป็นองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมที่ทำให้การแยกของไอโอเฮกซอลที่ดีภายในเวลาเพียง 3 นาที

งานส่วนสุดท้ายเป็นการสร้างและพัฒนาระบบการแยกแบบไมโครลิตรแบบอิเล็กทรอนิกส์ที่ติดตามสัญญาณด้วยการวัดค่าการนำไฟฟ้าแบบไม่สัมผัส สำหรับการวิเคราะห์สารที่ดูดกลืนแสงได้น้อยคือ คอลิสติน ในตัวอย่างยาและตัวอย่างซีรัม ได้วิธีที่สามารถแยกคอลิสตินจากในตัวอย่างภายในเวลาเพียง 2 นาที เมื่อทำการแยกโดยสารละลายผสมของ 5 mM 2-morpholinoethanesulfonic acid (MES) และ 5 mM histidine (His) pH 6 ทำการแยกภายใต้ศักย์ไฟฟ้า + 10 kV ในท่อแก้วที่ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 75 ไมโครเมตร ยาว 30 เซนติเมตร (ความยาวจากปลายท่อแก้วถึงตำแหน่งตรวจวัดเป็น 22.8 เซนติเมตร) เพื่อความสะดวก รวดเร็วในการวิเคราะห์ได้ประยุกต์เทคนิคการไหล (flow injection analysis) ช่วยในการนำสารตัวอย่างเข้าสู่ท่อแก้วเพื่อทำการแยกด้วยเทคนิคอะพิลลารีอิเล็กทรอนิกส์ ทำให้ได้เทคนิคที่มีความเป็นอัตโนมัติมากขึ้น วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างยาและซีรัมได้โดยไม่ต้องมีขั้นตอนการเตรียมสารตัวอย่าง และมีความถูกต้องจากค่าการวิเคราะห์คืนกลับในช่วง 94-99% สำหรับตัวอย่างยา และ 86-95% สำหรับตัวอย่างซีรัม

## รายงานฉบับสมบูรณ์

สัญญาเลขที่ MRG5580244

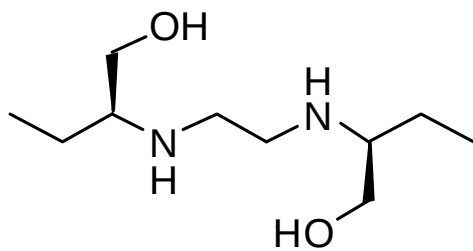
โครงการ : ระบบการแยกระดับไมโครลิตรที่ทำการตรวจวัดค่าการนำไฟฟ้าแบบไม่สัมผัสสำหรับการ  
แยกสารไครอลที่ไม่ดูดกลืนแสง

(In-house micro-separation with capacitively coupled contactless conductivity  
detection for analysis of non-absorbing chiral compounds)

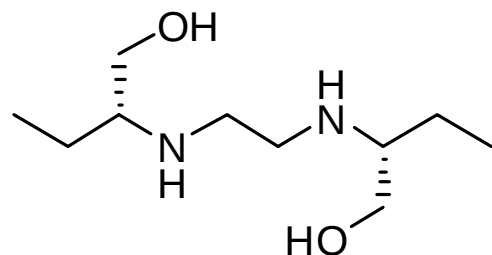
### บทนำ

#### อีแทมบูทอล (Ethambutol)

อีแทมบูทอลเป็นยาสังเคราะห์ที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี เสถียรต่ออุณหภูมิและมีฤทธิ์ในการรักษา  
โรควัณโรค อย่างไรก็ตามพบว่ามีเพียง (S,S)-form เท่านั้นที่มีฤทธิ์เป็นยา ในขณะที่ (R,R)-form อาจส่งผลให้  
เกิดอาการตาบอดได้ ในการผลิตยาอีแทมบูทอลนี้จึงต้องมีขั้นตอนที่ทำให้ได้อิแนนทิโอเมอร์ที่เป็น (S,S)-form  
เพียงอย่างเดียว และจำเป็นต้องมีเทคนิคทางเคมีวิเคราะห์ในการควบคุมคุณภาพยา รวมทั้งใช้ในการติดตาม  
ปริมาณอีแทมบูทอลในตัวอย่างของเหลวในร่างกายเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์



(S,S)-ethambutol  
(Active Form)



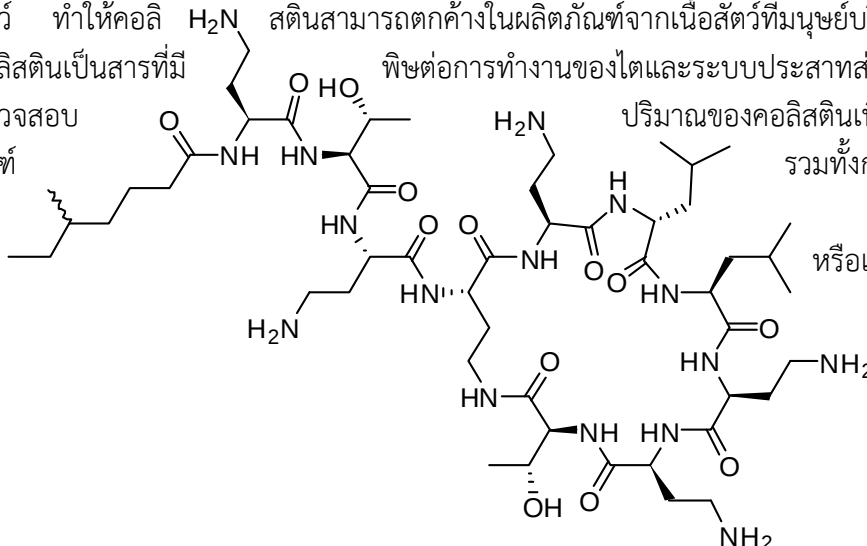
(R,R)- ethambutol  
(Toxic Form)

ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของอีแทมบูทอลทั้งสองอิแนนทิโอเมอร์

#### คอลิสติน (Colistin)

คอลิสติน หรือ โพลีไมซิน อี (polymyxin E (ภาพที่ 2)) เป็นยาปฏิชีวนะ (antibiotic) ที่สามารถต้าน  
เชื้อ gram-negative bacteria จึงเป็นยาที่นิยมใช้ในการรักษาและป้องกันการติดเชื้อของสัตว์โดยการผสม  
ในอาหารสัตว์ ทำให้คอลิสตินสามารถตกค้างในผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ที่มนุษย์บริโภคได้ และ  
เนื่องจากคอลิสตินเป็นสารที่มีพิษต่อการทำงานของไตและระบบประสาทส่วนกลาง ทำให้  
ต้องมีการตรวจสอบปริมาณของคอลิสตินเพื่อควบคุมคุณภาพ  
รวมทั้งการหาปริมาณคอลิสตินในร่างกาย  
ตัวอย่างในร่างกาย  
หรือเซรัม

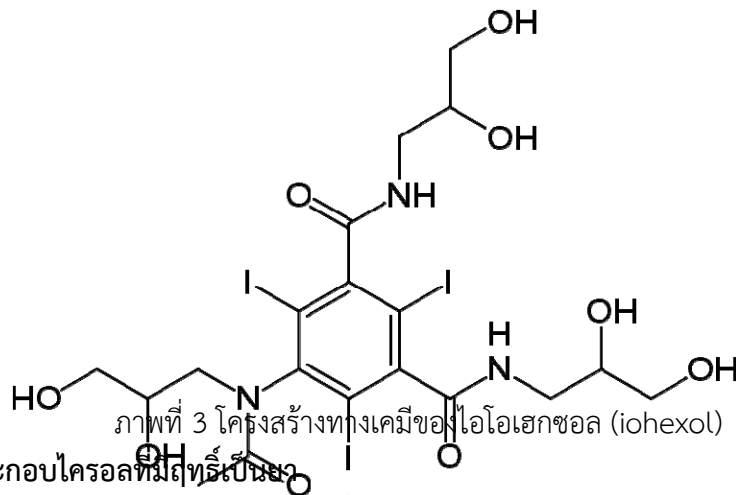
ของผลิตภัณฑ์  
สตินใน  
เช่น เลือด



ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของคอลิสติน (colistin)

### ไอโอเฮกซอล (iohexol)

เนื่องจากอัตราการเกิดโรคไตเรื้อรังระยะสุดท้าย (End-stage kidney disease, ESRD) เป็นปัญหาใหญ่ทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทย ระดับอัตราการกรองของไต (glomerular filtration rate, GFR) เป็นดัชนีชี้วัดที่บ่งชี้การทำงานของไตและสัมพันธ์กับปริมาณของเนื้อไต ค่า GFR นี้ทำให้แพทย์สามารถตัดสินใจให้สารน้ำ ประเมินระยะการดำเนินของโรค ทำนายแนวโน้มการดำเนินโรคเข้าสู่ภาวะ ESRD และระดับยาที่เหมาะสมแก่การขับออกทางไตได้อย่างเหมาะสม การวัด clearance ของสารบางชนิดที่ฉีดให้แก่ผู้ป่วย เช่น inulin หรือ iohexol จัดเป็นวิธีที่มีความถูกต้องและมีความไวต่อค่า GFR เนื่องจากความสำคัญของการหาปริมาณไอโอเฮกซอลในร่างกายมีความจำต่อการประเมินประสิทธิภาพการทำงานของไต จึงจำเป็นต้องมีวิธีวิเคราะห์ที่ถูกต้องและน่าเชื่อถือ



ในอุตสาหกรรมยา มีตัวยาจำนวนมากที่มีคุณสมบัติเป็นไครอลคือมีคู่อิแนนท์ไอเมอร์ที่มีโครงสร้างทางเคมีเหมือนกัน แต่ไม่สามารถซ้อนทับกันได้หรือเป็นเงาซึ่งกันและกัน คู่อิแนนท์ไอเมอร์นี้อาจมีความสามารถในการออกฤทธิ์ทางยาแตกต่างกัน เช่น ความสามารถในการออกฤทธิ์ อัตราการดูดซึม อัตราการขับออกจากร่างกาย และความจำเพาะต่อตัวจับในร่างกาย (receptor) ไอแนนท์ไอเมอร์หนึ่งอาจแสดงคุณสมบัติที่ดีในการออกฤทธิ์ตามที่ต้องการ ในขณะที่ไอเมอร์หนึ่งอาจแสดงผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย และในบางกรณีทั้งสองไอแนนท์ไอเมอร์อาจส่งเสริมให้มีการออกฤทธิ์ที่ดีขึ้น

ตารางที่ 1 แสดงตัวอย่างยาที่เป็นไครอลและคุณสมบัติของยาทั้งสองไอแนนท์ไอเมอร์

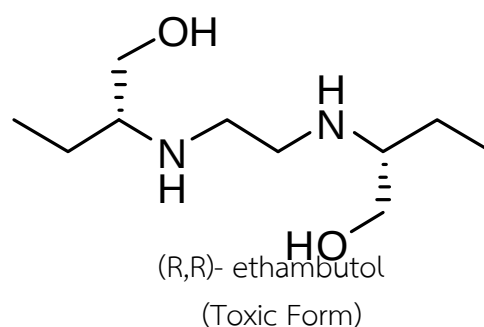
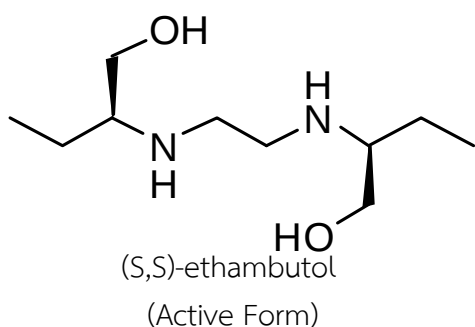
| ยา            | การออกฤทธิ์                                                                                      |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ethambutol    | S-form ออกฤทธิ์ในการรักษาโรควัณโรค<br>R-form เป็นอันตราย มีผลข้างเคียงให้ตาบอด                   |
| Levodopa      | L-form ออกฤทธิ์รักษาโรค Parkinson<br>D-form ทำให้เกิดผลข้างเคียงเป็นอันตรายต่อร่างกาย            |
| Penicillamine | S- form ออกฤทธิ์รักษาโรค<br>R-form เป็นอันตรายต่อร่างกาย                                         |
| Propanolol    | ยาลดความดันโลหิต<br>พบว่ามีเพียง S- form ที่มีสมบัติในการออกฤทธิ์                                |
| Propoxyphene  | L-isomer มีฤทธิ์เป็นยาแก้ไอ (antitussive (cough))<br>D-isomeris มีฤทธิ์แก้ปวด (analgesic (pain)) |
| Thalidomide   | S- form มีฤทธิ์เป็นยาแก้แพ้ (anti-histamine)<br>R-form มีผลทำให้ทารกที่เกิดมาพิการ (teratogenic) |

ยาที่มีขายกันอยู่ในท้องตลาดหลายชนิดมักอยู่ในรูปของ **ราซีเมต** คือ จะมีไอแนนทิโอเมอร์สองตัวมาผสมกันอยู่ในอัตราส่วนที่เท่ากัน (50:50) เนื่องจากโดยทั่วไปในขั้นตอนหรือกระบวนการสังเคราะห์ยาเหล่านี้ จะเกิดไอแนนทิโอเมอร์ทั้งสองในปริมาณที่เท่ากันเสมอ ในกรณีที่มีไอแนนทิโอเมอร์หนึ่งเป็นพิษ จำเป็นต้องมีการสังเคราะห์หรือแยกสารที่เป็นไอแนนทิโอเมอร์เดี่ยวออกมาเพื่อให้ได้ไอแนนทิโอเมอร์ที่ออกฤทธิ์เพียงตัวเดียว

จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาเทคนิคทางเคมีวิเคราะห์เพื่อควบคุมคุณภาพยาให้ปลอดภัยต่อผู้บริโภค และมีขนาดยาในปริมาณที่เหมาะสม และเพื่อติดตามปริมาณตัวยาในตัวอย่างของเหลวในร่างกาย เช่น พลาสมา ซีรัมหรือปัสสาวะ เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ เช่น ศึกษาการออกฤทธิ์ การดูดซึมและการขับออกของตัวยา

### อีแทมบูทอล (Ethambutol)

อีแทมบูทอลเป็นยาสังเคราะห์ที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี เสถียรต่ออุณหภูมิและมีฤทธิ์ในการรักษาโรควัณโรค อย่างไรก็ตามพบว่า มีเพียง (S,S)-form เท่านั้นที่มีฤทธิ์เป็นยา ในขณะที่ (R,R)-form อาจส่งผลให้เกิดอาการตาบอดได้ ในการผลิตยาอีแทมบูทอลนี้จึงต้องมีขั้นตอนที่ทำให้ได้ไอแนนทิโอเมอร์ที่เป็น (S,S)-form เพียงอย่างเดียว และจำเป็นต้องมีเทคนิคทางเคมีวิเคราะห์ในการควบคุมคุณภาพยา รวมทั้งใช้ในการติดตามปริมาณอีแทมบูทอลในตัวอย่างของเหลวในร่างกายเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์



## ภาพที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของอีแทมบูทอลทั้งสองอิแนนทิโอเมอร์

ในงานโครงการนี้ได้ศึกษาและพัฒนาวิธีวิเคราะห์ระดับไมโครลิตร สำหรับสารที่สำคัญทั้งสามชนิด คือ สารไครอล คอლისตินและไอโอเฮกซอล โดยอาศัยการแยกแบบอิเล็กโตรโฟรีซิส และโครมาโทกราฟีของเหลว บนโมโนลิธคอลัมน์ที่ทำการสังเคราะห์ขึ้น

### วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อสร้างระบบการแยกแบบแคปิลลารีอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่ติดตามสัญญาณด้วยตัวตรวจจับแบบวัดค่าการนำไฟฟ้าสำหรับการวิเคราะห์สารที่ไม่มีความสามารถในการดูดกลืนแสงสำหรับการวิเคราะห์สารคอไลสติน
2. เพื่อพัฒนาวิธีการแยกระดับไมโครลิตรสำหรับการแยกอิแนนทิโอเมอร์ของยาวันโรอีแทมบูทอล โดยอาศัยการแยกแบบอิเล็กโตรโฟรีซิสหรือโครมาโทกราฟี
3. พัฒนาโมโนลิธคอลัมน์สำหรับการแยกไอโอเฮกซอลด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีระดับไมโครลิตร

### วิธีการวิจัย

1 : การสังเคราะห์โมโนลิธคอลัมน์ สำหรับเทคนิคการแยกไมโครลิควิดโครมาโทกราฟี

#### 1.1. การดัดแปลงพื้นผิวภายในท่อแก้วแคปิลลารีขนาดเล็ก (surface modification)

การดัดแปลงพื้นผิวภายในของท่อแก้วก่อน การสังเคราะห์โมโนลิธ โดยการบรรจุท่อแก้วด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลลาร์ แล้วอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน และเมทานอลเป็นเวลา 30 นาที เป่าให้แห้ง จากนั้นบรรจุด้วยสารละลาย 3-(ไตรเมทอริกซีไลิล) โพรพิล เมทาคริเลต ( $\gamma$ -MAPS) ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในเมทานอล และอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยเมทานอล และน้ำปราศจากไอออน แล้วเป่าให้แห้ง

#### 1. 2 การสังเคราะห์โมโนลิธในท่อแก้วที่ผ่านการดัดแปลงพื้นผิวแล้ว

นำท่อแก้วแคปิลลารีขนาดที่ผ่านขบวนการดัดแปลงพื้นผิวภายในด้วย  $\gamma$ -MAPS มาบรรจุสารละลายพอลิเมอร์ แล้วนำไปอบใน oven ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วจึงล้างคอลัมน์ด้วยเมทานอล พร้อมทั้งทำหน้าตาต่างตรวจวัด

#### 1.3 การศึกษาและทดสอบคุณสมบัติของคอลัมน์ที่สังเคราะห์ได้

##### 1.3.1 สมบัติด้านกายภาพ

นำวัสดุโมโนลิธที่สังเคราะห์ในท่อแก้วไปศึกษาลักษณะของโครงสร้างด้านกายภาพด้วยเทคนิค Scanning Electron Microscope (SEM)

##### 1.3.2 สมบัติทางโครมาโทกราฟี

นำโมโนลิธิคคอลัมน์ที่สังเคราะห์ขึ้นไปทดสอบการแยกสารละลายมาตรฐานของผสมของ ไธโอยูเรีย ฟีนอล อะนิโซล เบนซีน โทลูอิน และแนพธา โดยมีเฟสเคลื่อนที่เป็นอะซีโทไนไตรล์กับน้ำปราศจากไอออนในอัตราส่วน 55 ต่อ 45 โดยปริมาตร

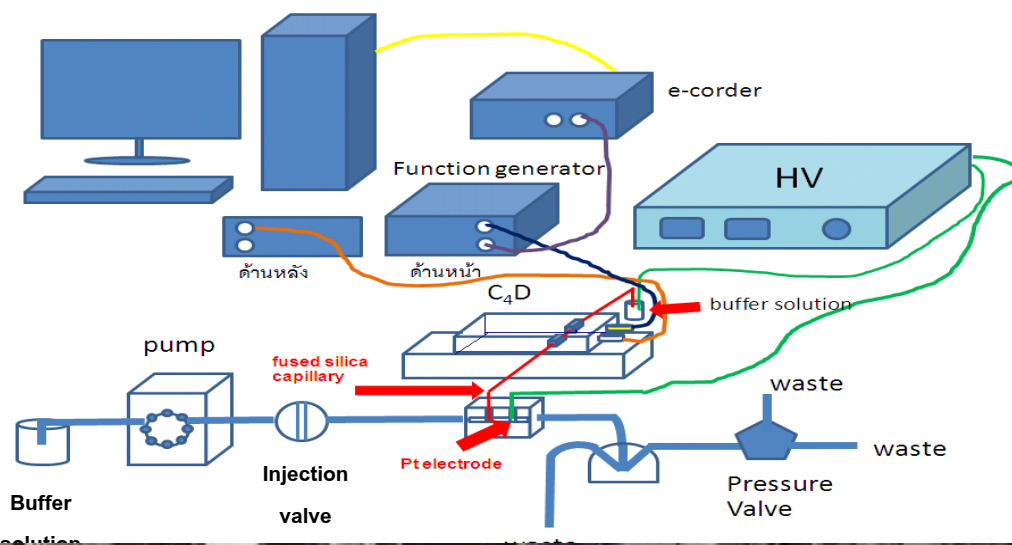
#### 1.4 การตกตะกอนโปรตีนในตัวอย่างเซรัมด้วยกรด perchloric

นำตัวอย่างพลาสมา 50  $\mu\text{L}$  ทำการเติม perchloric acid 800  $\mu\text{L}$  แล้วนำไป ultrasonic 15 นาที (เซนต์ปีฟรจ์ 13000 รอบ 15 นาที) เก็บสารละลายใสมาทำการวิเคราะห์

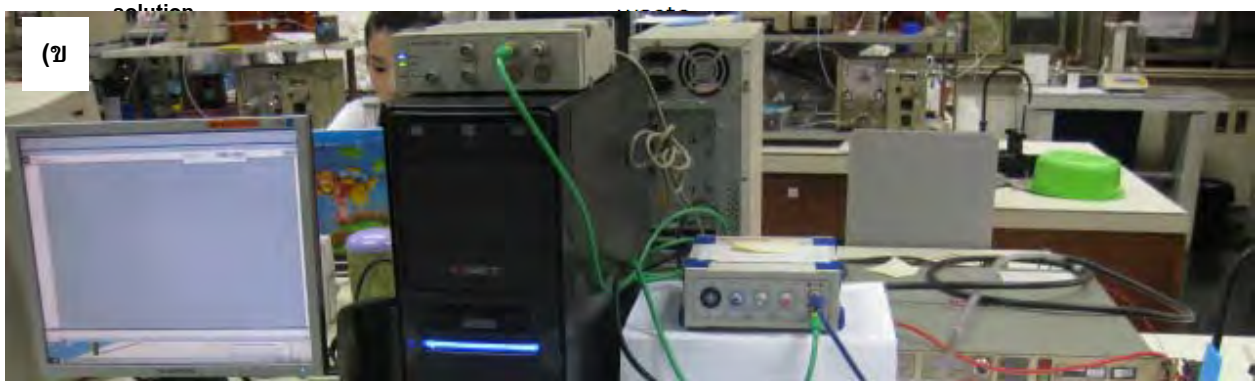
## 2 : การพัฒนาระบบการแยกระดับไมโครลิตรแบบอิเล็กโทรโฟริซิส ที่ตรวจวัดสัญญาณแบบไม่สัมผัส สำหรับการวิเคราะห์คอเลสเตอรอล

ได้ทำการสร้างระบบเทคนิคการวิเคราะห์แบบไหลควบคู่กับการแยกแบบแคพิลลารีอิเล็กโทรโฟริซิส และตรวจวัดด้วยตรวจวัดแบบวัดค่าการนำไฟฟ้า (FI-CE-C<sup>4</sup>D) สำหรับการวิเคราะห์สารที่ไม่มีความสามารถในการดูดกลืนแสงสำหรับการวิเคราะห์สารในภาพที่ 5

(ก)



(ข)



ภาพที่ 5 ระบบ FI-CE-C<sup>4</sup>D (ก) แผนภาพอย่างง่าย (ข) อุปกรณ์จริงสำหรับการสร้างระบบ  
รายละเอียดส่วนประกอบของระบบ FI-CE-C<sup>4</sup>D

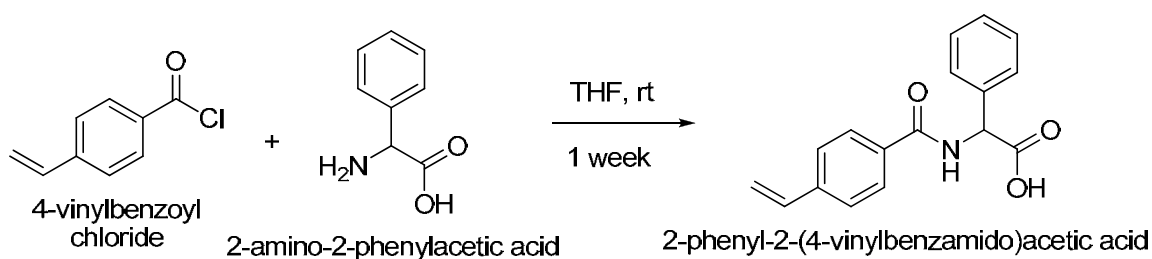
- Buffer solution : สารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่ใช้สำหรับแยกสาร
- Pump : ทำหน้าที่ผลักดันสารละลายให้ไหล
- Injection valve : อุปกรณ์สำหรับการฉีดสารเข้าสู่ระบบ เพื่อทำการแยก
- Fused silica capillary : ท่อแก้วขนาดเล็กสำหรับการแยกสาร (เส้นผ่าศูนย์กลาง 50-100 ไมโครเมตร)
- Pt electrode (platinum electrode) : จุ่มลงไปในสารละลายอิเล็กโทรไลต์เพื่อให้ศักย์ไฟฟ้าแก่ปลายท่อแก้วทั้งสองด้าน
- Pressure valve : ตำแหน่งที่ควบคุมการไหลของสารละลายด้านทางออก เพื่อเพิ่มความดันแก่ระบบเมื่อต้องการผลักดันให้เข้าไปในท่อแก้ว
- HV : power supply ทำหน้าที่ให้ศักย์ไฟฟ้าคร่อมปลายท่อแก้วทั้งสองด้าน
- C<sup>4</sup>D : ตัวตรวจวัดสัญญาณ
- Function generator : ให้ความถี่แก่ตัวตรวจวัด C<sup>4</sup>D

## ผลการวิจัย

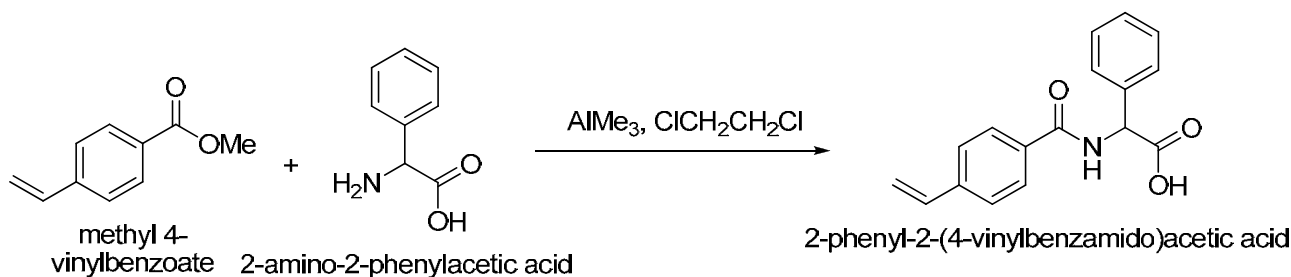
### ตอนที่ 1 : การสังเคราะห์โครอลโมโนลิธิคคอลลัมน์

#### 1 : การเตรียมโครอลมอนอเมอร์ 2-phenyl-2-(4-vinylbenzamido) acetic acid (PVBAA)

ได้ทำการสืบค้นข้อมูลเพื่อทำการสังเคราะห์โมโนเมอร์สำหรับการเตรียม 2-phenyl-2-(4-vinylbenzamido) acetic acid (PVBAA) ซึ่งเป็นโครอลโมโนเมอร์ที่คาดว่าจะสามารถแยกสารประกอบประเภทโครอลได้และยังไม่มีรายงานการสังเคราะห์คอลลัมน์ชนิดนี้มาก่อน จากผลการวิจัยที่ผ่านมาได้ศึกษาการเตรียม PVBAA ตามวิธีของ Zharov และคณะ<sup>1</sup> ดังปฏิกิริยาที่แสดง



**Procedure 1 :** ทำการสังเคราะห์จากปฏิกิริยาของ L-(+)- $\alpha$ -phenylglycine (2-amino-2-phenylacetic acid) 2.040 กรัม (13.46 mmol) และ 4-vinyl benzoyl chloride 2.00 กรัม (13.46 mmol) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นเติม dry tetrahydrofuran (THF) แล้วปั่นสารละลายเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นกำจัดตัวทำละลายที่เติมออกไปและละลายใหม่ใน 5%(v/v) NaHCO<sub>3</sub> แล้วล้างด้วย diethyl ether จากนั้นปรับสารละลายที่ได้ให้เป็นกรด มีค่า pH ประมาณ 5 แล้วทำการสกัดด้วย ethyl acetate ครั้งละ 100 mL รวม 3 ครั้ง นำสารละลายที่สกัดได้ไปกำจัดตัวทำละลาย ศึกษาความบริสุทธิ์และโครงสร้างทางเคมีของสารโดยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) และ Nuclear magnetic resonance (NMR) ผลจาก TLC และ NMR พบว่า ได้สารที่ต้องการเพียงเล็กน้อยและทำให้บริสุทธิ์ได้ยาก จึงทำศึกษาวิธีการสังเคราะห์ด้วยวิธีของ Martin และคณะ<sup>2</sup> ดังสมการ



**Procedure 2 :** ทำการสังเคราะห์จากปฏิกิริยาของ L-(+)- $\alpha$ -phenylglycine (2-amino-2-

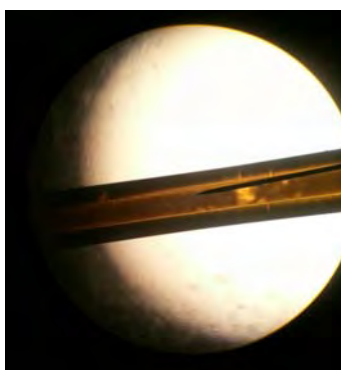
phenylacetic acid) 1.4 กรัม (9.2 mmol) ใน dichloroethane 38 มิลลิลิตร แล้วค่อยๆหยดสารละลาย 2.0 M  $\text{AlMe}_3$  ใน hexane (10.8 mL, 21.6 mmol) ปั่นสารละลายผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วเติมสารละลาย methyl 4-vinyl benzoate 0.50 g (3 mmol) ใน dichloroethane ปริมาตร 25 mL ทำการให้ความร้อนและ reflux ของผสมเป็นเวลา 10 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 0 °C และเจือจางด้วย dichloromethane ปริมาตร 50 mL และ 3 M HCl ปริมาตร 100 mL นำชั้นสารละลายอินทรีย์มาทำให้แห้งโดยการเติม  $\text{MgSO}_4$  ทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography พบว่าสารที่ต้องการไม่เสถียรภายใต้สภาวะที่ใช้ซึ่งมีสภาวะเป็นกรด แต่เมื่อเปลี่ยนสภาวะเป็นเบสพบว่าสารที่สังเคราะห์ได้มีปริมาณเพิ่มขึ้น

2. การเตรียมโครอลคอลัมน์ จาก 2-phenyl-2-(4-vinylbenzamido) acetic acid (PVBA) มอนอเมอร์ สำหรับการแยกด้วยเทคนิคคลิควิคโครมาโทกราฟีระดับไมโครลิตรเมื่อทำการเตรียมโครอลคอลัมน์ PVBAA-EDMA ตามองค์ประกอบด้านล่าง

#### คอลัมน์ PVBA-1

|           |   |                  |                         |
|-----------|---|------------------|-------------------------|
| มอนอเมอร์ | : | PVBA 0.0136 กรัม | EDMA 0.0147 กรัม        |
| Porogen   | : | DMSO 0.0500 กรัม | 1-Decanol 0.0512 กรัม   |
| Initiator | : | AIBN 0.0030 กรัม | สภาวะ : 70 °C overnight |

**ผลที่ได้ :** เมื่อนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์ คอลัมน์ที่ได้ไม่สม่ำเสมอ มีช่องอากาศภายในคอลัมน์ ดังแสดงในภาพที่ 6 บางบริเวณมีเนื้อโมโนลิทที่ค่อนข้างหนาแน่น ทำให้เกิดการตันของคอลัมน์ ไม่สามารถนำมาทดสอบได้ จึงลดเวลาในการเกิดปฏิกิริยาของมอนอเมอร์ลง



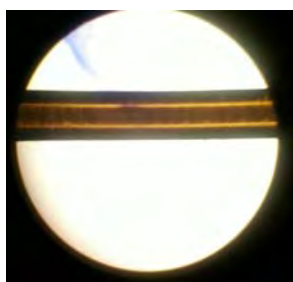
ภาพที่ 6 ภาพแสดงโมโนลิทที่ได้จากการเตรียมคอลัมน์ PVBA-1

#### คอลัมน์ PVBA-2

|           |   |                  |                  |
|-----------|---|------------------|------------------|
| มอนอเมอร์ | : | PVBA 0.0136 กรัม | EDMA 0.0147 กรัม |
|-----------|---|------------------|------------------|

|           |   |                        |                       |
|-----------|---|------------------------|-----------------------|
| Porogen   | : | DMSO 0.0500 กรัม       | 1-Decanol 0.0512 กรัม |
| Initiator | : | AIBN 0.0030 กรัม       |                       |
| สภาวะ     | : | 70 <sup>0</sup> C 4 hr |                       |

**ผลที่ได้ :** คอลัมน์โครงสร้างที่เป็นเนื้อเดียวกันมากขึ้น มีรูพรุนขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 7 แต่เมื่อนำไปทดสอบการแยกด้วย ไทโอยูเรีย ฟีนอล แอนนิโซล และ แนฟทาลีน พบว่าไม่สามารถแยกสารทั้ง 4 ชนิดได้ จำเป็นต้องมีการปรับองค์ประกอบของสารละลายในการเตรียม หรือเปลี่ยนชนิดของโครอลมอนอเมอร์



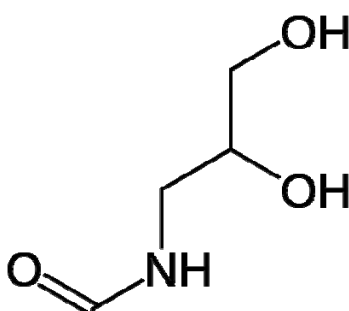
ภาพที่ 7 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ คอลัมน์ PVBAA-2

#### เอกสารอ้างอิง

1. J. Cichelli and I. Zharov, *J. Mater. Chem.*, 2007, **17**, 1870-1875.
2. S. F. Martin, M. P. Dwyer and C. L. Lynch, *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 1517-1520.
3. Z. T.-Vujosevic, G. Petrovic, B. Rakic, R. Matovic, and R. N. Saicic, *Synthetic Communications*, 2005, **35**, 435-447.

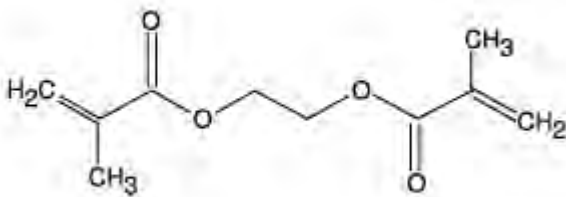
**ตอนที่ 2 :** การสังเคราะห์โมโนลิธคอลลัมน์สำหรับการแยกไอโอเฮกซอลด้วยเทคนิคไมโครลิควิดโครมาโทกราฟี

ได้ทำการเตรียมโมโนลิธคอลลัมน์หลายชนิด เพื่อหาคอลลัมน์ที่เหมาะสมต่อการแยกไอโซเมอร์ของไอโอเฮกซอล ซึ่งเป็นดัชนีบ่งบอกประสิทธิภาพการทำงานของไต (แสดงโครงสร้างไอโอเฮกซอลในภาพที่ 8)

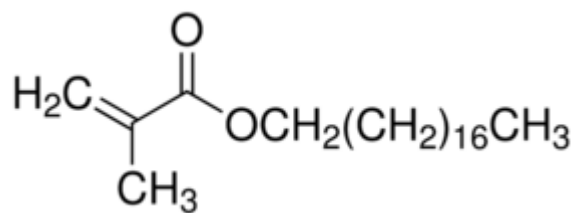


ภาพที่ 8 โครงสร้างทางเคมีของไอโอเฮกซอล

1. การแยกไอโอเฮกซอลด้วย stearyl methacrylate-ethylene dimethacrylate (SMA-EDMA) monolithic column ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีและองค์ประกอบการเตรียมดังแสดง



stearyl methacrylate



ethylene dimethacrylate

ภาพที่ 9 โครงสร้างทางเคมีของ stearyl methacrylate และ ethylene dimethacrylate องค์ประกอบการเตรียม SMA-EDMA คอลัมน์

มอนอเมอร์ SMA : 0.1914 กรัม

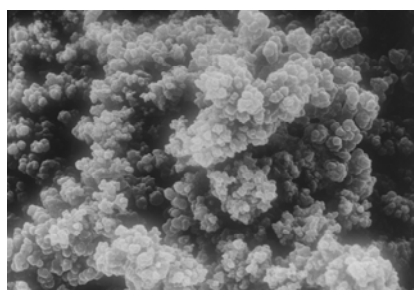
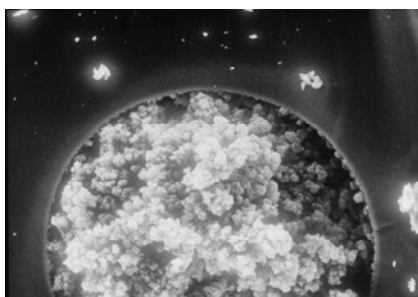
มอนอเมอร์ EDMA : 0.1075 กรัม

Porogen : isoamyl alcohol 0.5656 กรัม + 1-Decanol 0.1405 กรัม

Initiator : AIBN 0.0033 กรัม

สภาวะ : 60<sup>0</sup> C , 12 ชั่วโมง

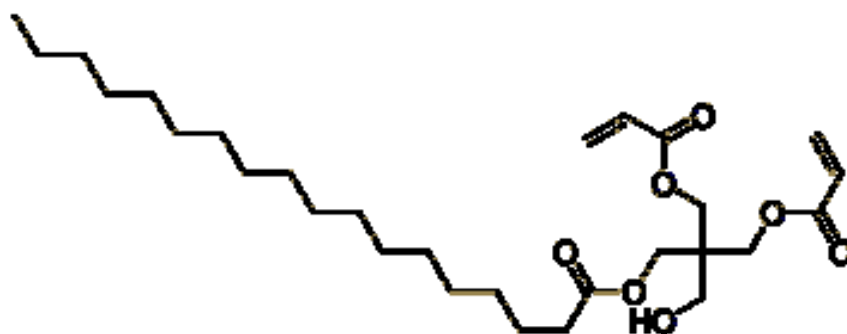
**ผลที่ได้** : ได้โมโนลิตที่มีโครงสร้างที่เป็นเนื้อเดียวกันที่สม่ำเสมอ และมีความเป็นรูพรุนเหมาะต่อการแยกด้วยเทคนิคคลิควิคโครมาโทกราฟีระดับไมโครลิตร ดังแสดงภาพโครงสร้างโมโนลิตจากเทคนิค scanning electron microscope (SEM) ดังภาพที่ 10



ภาพที่ 10 โครงสร้างจากเทคนิค scanning electron microscope (SEM) ของ SMA-EDMA คอลัมน์

แต่เมื่อนำ SMA-EDMA คอลัมน์ไปทดสอบคุณสมบัติการแยกต่อไอโอเฮกซอล พบว่าคอลัมน์ C18 โพลีเมอร์นี้ ไม่แสดงความจำเพาะต่อไอโอเฮกซอล แม้ว่าจะใช้ DI water 100% เป็นเฟสเคลื่อนที่ ยังพบว่าไอโอเฮกซอลมีการเคลื่อนที่เวลาเดียวกับ solvent แสดงให้เห็นว่า ไอโอเฮกซอลไม่เกิดอันตรกิริยากับคอลัมน์ อาจเนื่องจากเป็นสารที่ค่อนข้างมีขี้ เพื่อเพิ่มอันตรกิริยาของไอโอเฮกซอลบนคอลัมน์ จึงได้ทำการเตรียมคอลัมน์ PEDAS ซึ่งมีหมู่ C18 และ -OH เป็นหมู่ฟังก์ชัน

## 2. การแยกไอโอเฮกซอลด้วย pentaerythritol diacrylate monostearate monolithic column (PEDAS) ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีและองค์ประกอบการเตรียมดังแสดง



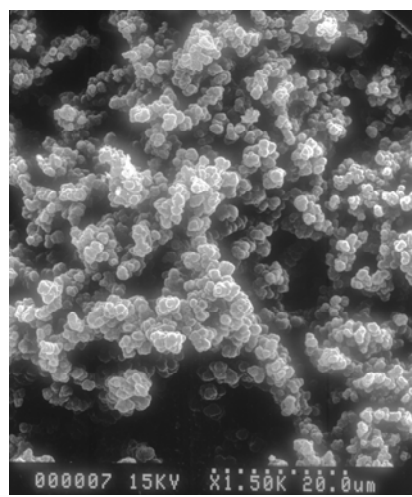
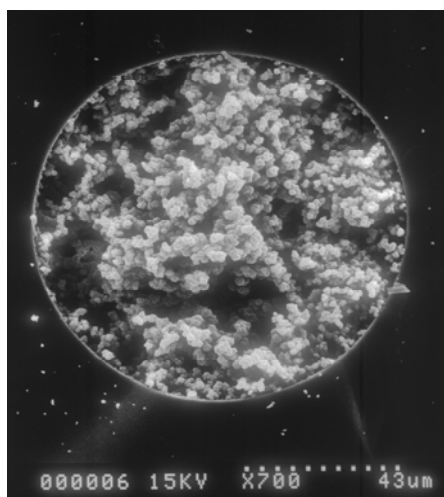
ภาพที่ 11 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ pentaerythritol diacrylate monostearate (PEDAS)

ในขั้นตอนการเตรียม พบว่า PEDAS-EDMA-4 เป็นสภาวะที่ดีที่สุดในการเตรียม อย่างไรก็ตามเมื่อนำไปทดสอบการแยก พบว่าไอโอเฮกซอลยังคงไม่เกิดอันตรกิริยากับคอลัมน์

องค์ประกอบและสภาวะที่ใช้ในการเตรียม คอลัมน์ PEDAS-EDMA :

|  |              |              |              |              |
|--|--------------|--------------|--------------|--------------|
|  | PEDAS-EDMA-1 | PEDAS-EDMA-2 | PEDAS-EDMA-3 | PEDAS-EDMA-4 |
|--|--------------|--------------|--------------|--------------|

|                 | Monomer :<br>Porogen (35:65) | Monomer :<br>Porogen (25:75) | Monomer :<br>Porogen (25:75)   | Monomer :<br>Porogen (20:70)   |
|-----------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| PEDAS           | 0.3475                       | 0.3280                       | 0.2398                         | 0.1908                         |
| EDMA            | 0.0210                       | 0.0171                       | 0.0166                         | 0.0108                         |
| Pentanol        | 0.5227                       | 0.8346                       | 0.5960                         | 0.0354                         |
| Ethylene glycol | 0.1418                       | 0.1781                       | 0.1330                         | 0.1378                         |
| DI water        | 0.0362                       | 0.0440                       | 0.0305                         | 0.0396                         |
| AIBN            | 0.0031                       | 0.0036                       | 0.0034                         | 0.0035                         |
| Condition       | 60°C overnight               | 60°C overnight               | 60°C 3 hr                      | 60°C 4 hr                      |
| คอลัมน์ที่ได้   | ตัน                          | ตัน                          | โครงสร้างสม่ำเสมอ<br>และไม่ตัน | โครงสร้างสม่ำเสมอ<br>และไม่ตัน |



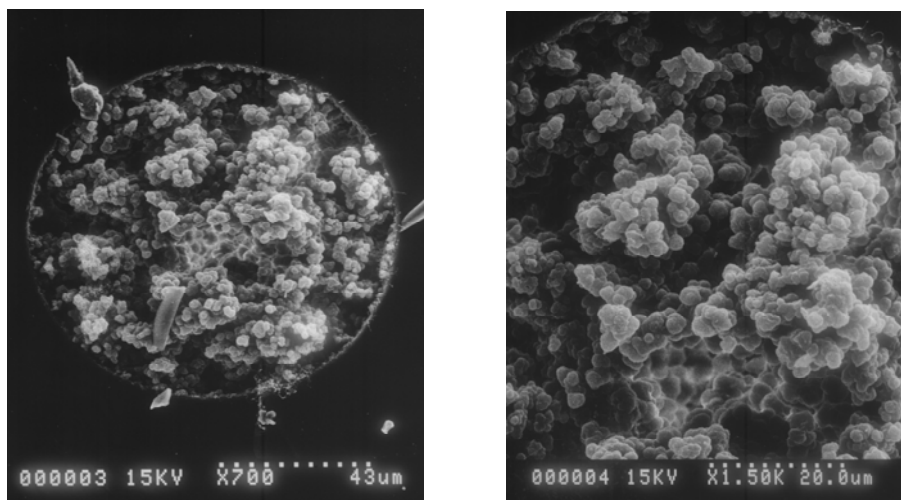
ภาพที่ 12 โครงสร้างจากเทคนิค SEM ของ PEDAS-EDMA-4 คอลัมน์

3. เพื่อเพิ่ม อันตรกิริยาของไอโอเฮกซอลบนคอลัมน์ จึงเปลี่ยนชนิดมอนอเมอร์เป็น เมทาอะคริลิกเอซิด (MAA-EDMA คอลัมน์) ซึ่งมีหมู่คาร์บอกซิลิกเป็นหมู่ฟังก์ชัน ดังแสดงสภาวะ

คอลัมน์ MAA-EDMA

มอนอเมอร์ : MAA 0.0525 กรัม EDMA 0.4285 กรัม  
 Porogen : Toluene 0.1174 กรัม 1-Decanol 0.8651 กรัม  
 Initiator : AIBN 0.0046 กรัม สภาวะ : 60<sup>0</sup> C overnight

**ผลที่ได้** : มีโครงสร้างเป็นเนื้อเดียวกัน ความเป็นรูพรุนเหมาะต่อการแยกด้วยเทคนิค  
 ลิควิดโครมาโทกราฟีระดับไมโครลิตร เมื่อนำไปศึกษาโครงสร้างทางกายภาพและทดสอบคุณสมบัติการแยก  
 ได้ผลดังนี้



ภาพที่ 13 โครงสร้างจากเทคนิค SEM ของ MAA-EDMA โมโนลิธคอลัมน์

**สภาวะที่ 1** : ศึกษากลไกการแยกของคอลัมน์ โดยการปรับสัดส่วนของ ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้ว  
 น้อย คือ acetonitrile ในเฟสเคลื่อนที่ และฉีดสารที่มีขั้วและไม่มีขั้ว คัด ฟีนอลและแนฟทาลิน เป็นสาร  
 ทดสอบ ได้ผลดังแสดงในตาราง และแสดงตัวอย่างโครมาโทแกรมดังในภาพที่ 14

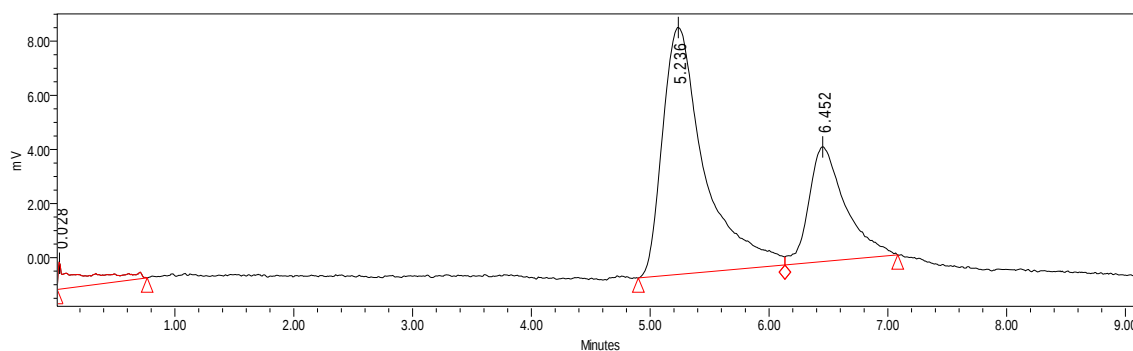
Column : MAA-EDMA

Mobile phase : 100% CAN

Flow rate : 0.1 mL/min (back pressure : 15 bar)

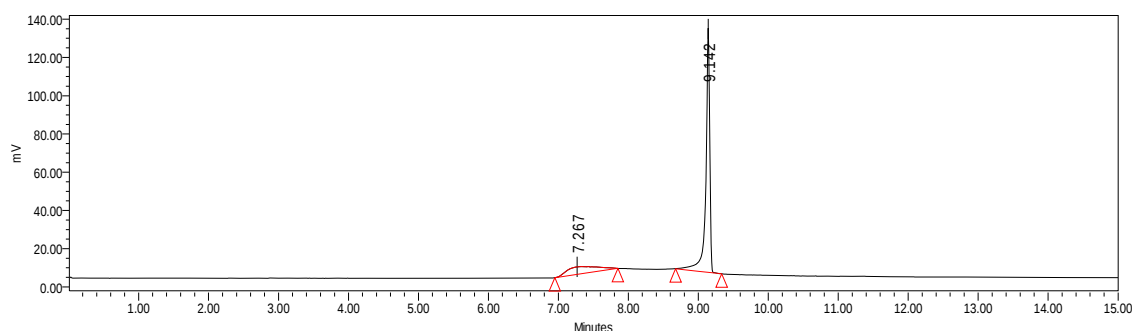
| เฟสเคลื่อนที่<br>ACN : H <sub>2</sub> O (v/v) | เวลาคงอยู่ / นาที (retention time) |                 |
|-----------------------------------------------|------------------------------------|-----------------|
|                                               | ฟีนอล                              | แนฟทาลิน        |
| 100 : 0                                       | 5.271                              | 5.546           |
| 80 : 20                                       | 5.736                              | 6.452           |
| 70 : 30                                       | 5.405                              | 7.960           |
| 60 : 40                                       | 5.336                              | 8.326           |
| 40 : 60                                       | 7.050                              | นานกว่า 20 นาที |

\* ACN = acetonitrile



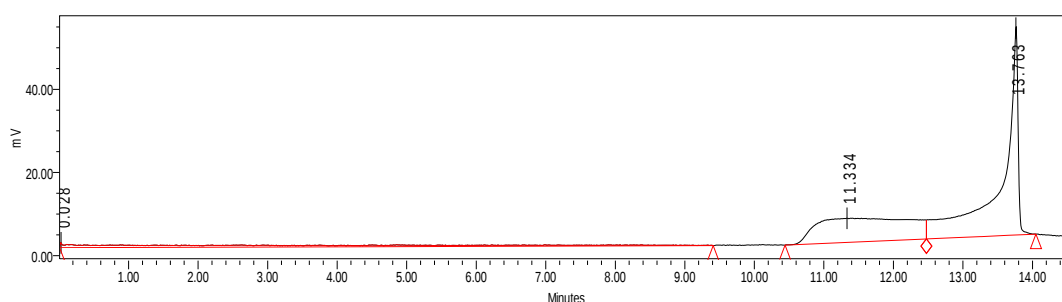
ภาพที่ 14 แสดงการแยกฟีนอล และแนฟทาลิน บน MAA-EDMA โมนอลิธคอลัมน์ เมื่อใช้ 80% (v/v) ACN : H<sub>2</sub>O เป็นเฟสเคลื่อนที่ ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 254 นาโนเมตร

ผลที่ได้พบว่าเมื่อสัดส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ซึ่งไม่มีขั้วในเฟสเคลื่อนที่เพิ่มขึ้น พบว่าทั้งฟีนอล และแนฟทาลินเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ได้เร็วขึ้น คือมีอันตรกิริยากับคอลัมน์ได้น้อยลง แสดงให้เห็นว่าการแยกเป็นแบบ reversed-phase chromatography อย่างไรก็ตาม ผลเบื้องต้นพบว่า คอลัมน์แสดงความจำเพาะต่อไอโอเฮกซอล แม้ว่าผลการแยกยังไม่ดีนัก ดังแสดงในภาพที่ 15

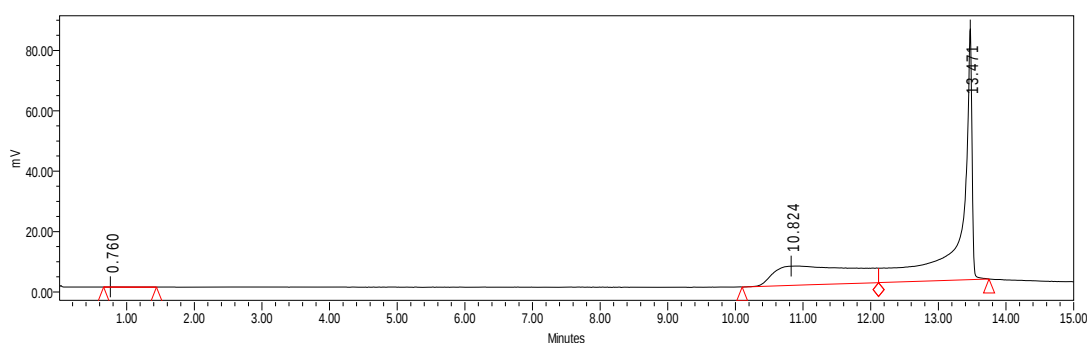


ภาพที่ 15 แสดงการไอโอเฮกซอล บน MAA-EDMA โมนอลิธคอลัมน์ เมื่อใช้ 70% (v/v) ACN : H<sub>2</sub>O เป็นเฟสเคลื่อนที่ ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 254 นาโนเมตร

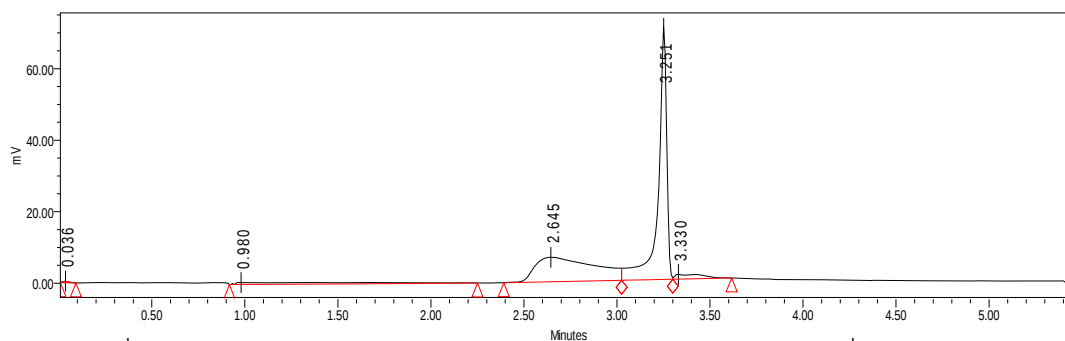
เมื่อทำการปรับองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่โดยการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของเฟสเคลื่อนที่เนื่องจากคอลัมน์มีหมู่ฟังก์ชันเป็น -COOH ซึ่งมีค่า pKa ประมาณ 4.2 ค่า pH จึงเป็นปัจจัยที่ควรศึกษา ได้ทำการศึกษามลของ pH ในช่วง 3-8 ได้ผลดังแสดง



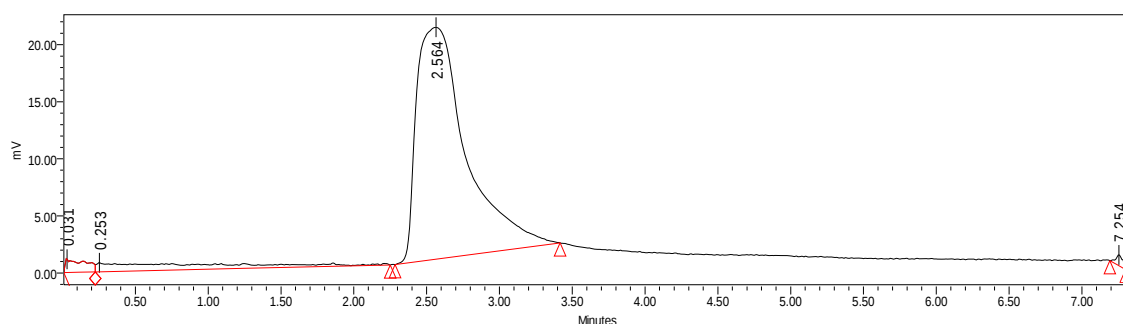
ภาพที่ 16 แสดงการไอโอเฮกซอล บน MAA-EDMA โมนอลิธิคคอลัมน์ เมื่อใช้ 70 : 30 (v/v) ACN : acetate buffer pH 3 เป็นเฟสเคลื่อนที่ ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 254 นาโนเมตร



ภาพที่ 17 แสดงการไอโอเฮกซอล บน MAA-EDMA โมนอลิธิคคอลัมน์ เมื่อใช้ 70 : 30 (v/v) ACN : acetate buffer pH 4 เป็นเฟสเคลื่อนที่ ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 254 นาโนเมตร

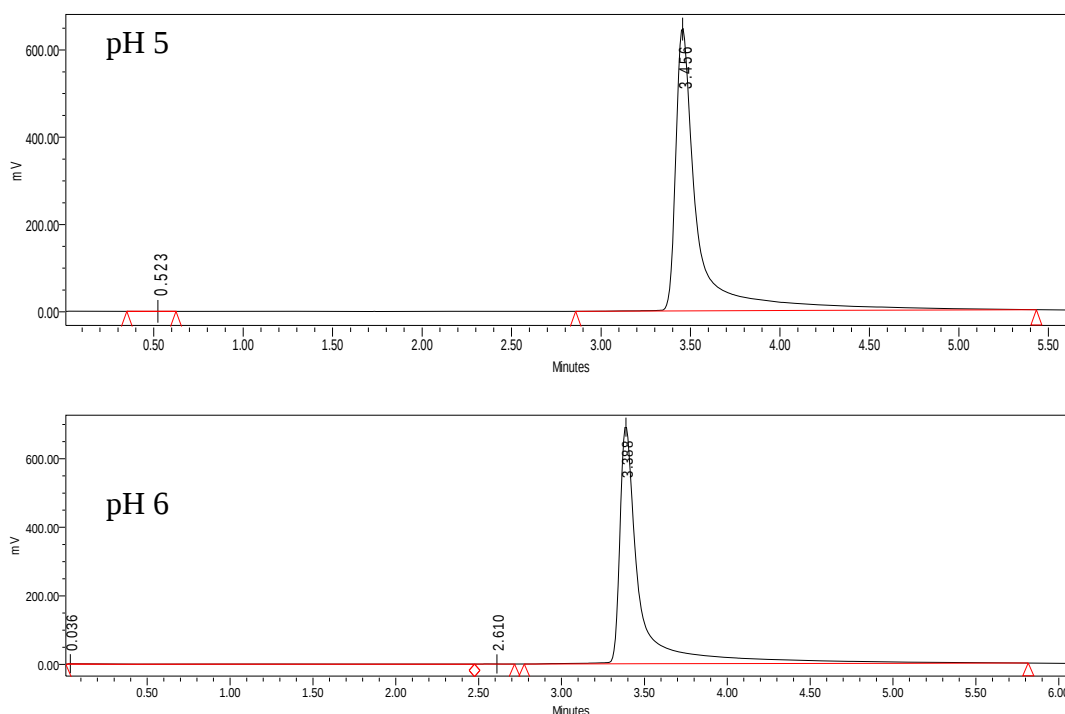


ภาพที่ 18 แสดงการไอโอเฮกซอล บน MAA-EDMA โมนอลิธิคคอลัมน์ เมื่อใช้ 70 : 30 (v/v) ACN : acetate buffer pH 5 เป็นเฟสเคลื่อนที่ ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 254 นาโนเมตร



ภาพที่ 19 แสดงการแยกไอโอเฮกซอล บน MAA-EDMA โมนอลิธคอลัมน์ เมื่อใช้ 70 : 30 (v/v) ACN : acetate buffer pH 6 เป็นเฟสเคลื่อนที่ ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 254 นาโนเมตร

ผลของ pH พบว่า เมื่อเพิ่ม pH จาก 3 เป็น 4 และ 5 แม้ว่าจะยังไม่สามารถแยกไอโซเมอร์ของไอโอเฮกซอลได้อย่างสมบูรณ์ แต่การแยกที่ได้มีแนวโน้มที่ดีขึ้น แต่เมื่อค่า pH เพิ่มมากกว่า 5 พบว่าได้พีคการแยกเพียงพีคเดียว และมีประสิทธิภาพการแยกที่แย่ ในขณะที่การแยกของคาเฟอีนซึ่งเป็นสารที่มีขั้วเช่นกัน ยังมีการแยกที่ดีไม่เปลี่ยนแปลงตาม pH มากนัก (แสดงผลในภาพที่ 20) ผลที่ได้อาจเนื่องมาจากการเกิด isomerization ของไอโอเฮกซอลบนคอลัมน์ ทำให้การแยกเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์



ภาพที่ 20 แสดงการแยกคาเฟอีน บน MAA-EDMA โมนอลิธคอลัมน์ เมื่อใช้ 70 : 30 (v/v) ACN : acetate buffer pH 5 (ก.) และ pH 6 (ข.) เป็นเฟสเคลื่อนที่ ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 254 นาโนเมตร

## สรุปผลการแยกสารบน MAA-EDMA ที่ pH ต่างๆดังในตาราง

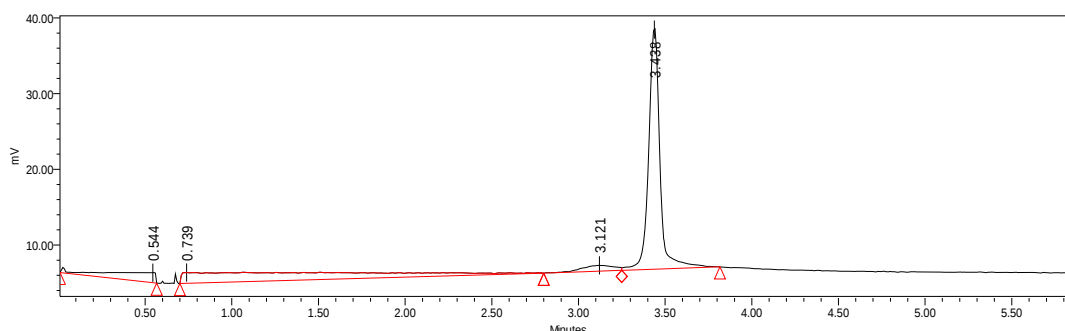
Column : MAA-EDMA

Mobile phase : 70 : 30 (v/v) ACN : buffer

Flow rate : 0.1 mL/min (back pressure : 15 bar)

| pH ของเฟสเคลื่อนที่ | เวลาคงอยู่ / นาที (retention time) |         |        |          |
|---------------------|------------------------------------|---------|--------|----------|
|                     | ไอโอเฮกซอล                         | คาเฟอีน | ฟีนอล  | แนฟทาลีน |
| 3                   | 11.334/13.763                      | 13.592  | 16.041 | 23.650   |
| 4                   | 11.112/13.476                      | 14.111  | 14.801 | 21.969   |
| 5                   | 2.643/3.270                        | 3.455   | 3.531  | 5.143    |
| 6                   | 2.548                              | 3.388   | 3.374  | 4.657    |
| 7                   | 2.604                              | 3.409   | 3.265  | 4.698    |
| 8                   | 2.585                              | 3.339   | 3.432  | 4.698    |

จากผลที่ได้ พบว่าที่ pH 5 ให้การแยกที่ดีที่สุด และเมื่อเปลี่ยนตัวทำละลายอินทรีย์ในเฟสเคลื่อนที่จาก อะซิโตนไตรัล เป็น เมทานอล (MeOH) พบว่าได้ผลการแยกของไอโอเฮกซอลที่ดีขึ้นในเวลาเพียง 4 นาทีดังแสดงในภาพที่ 21



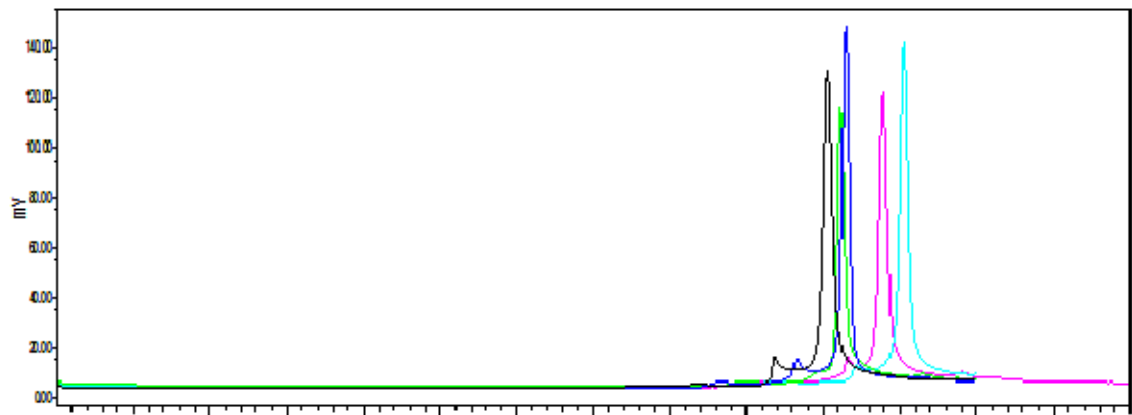
ภาพที่ 21 แสดงการแยกไอโอเฮกซอลบน MAA-EDMA โมโนลิธคอลัมน์ เมื่อใช้ 70 : 30 (v/v) MeOH : acetate buffer pH 5 เป็นเฟสเคลื่อนที่ ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 254 นาโนเมตร

เมื่อนำสภาวะที่เหมาะสมนี้ไปใช้ในการแยกไอโอเฮกซอลที่สกัดจากตัวอย่างเข้มข้น พบว่าได้ผลการแยกที่ไม่เที่ยงตรง ซึ่งอาจเกิดจากการเสถียรภาพการรักษา pH ของเฟสเคลื่อนที่ เมื่อทำการฉีดตัวอย่างเข้มข้นที่สกัดด้วยกรดแก่ perchloric เข้มข้น 5% จึงทำการศึกษาสภาวะต่างๆดังนี้

### สภาวะที่ 2 ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ในเฟสเคลื่อนที่ :

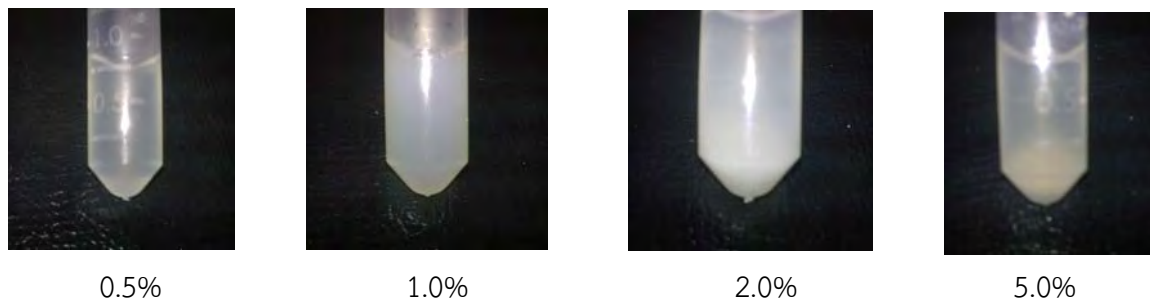
ทำการแยกเข้มข้นที่สกัดด้วย 5% perchloric acid ด้วยเฟสเคลื่อนที่ที่มี acetate buffer pH 5

เข้มข้น 50, 100, และ 200 mM ผสมกับ เมทานอลอัตราส่วน 30:70 โดยปริมาตร พบว่าความเข้มข้นของ บัฟเฟอร์ที่เพิ่มขึ้นยังไม่สามารถแก้ปัญหา irreproducibility ของการแยกได้ จึงเลือกใช้บัฟเฟอร์เข้มข้น 50 mM ในการศึกษาปัจจัยอื่นต่อไป



ภาพที่ 22 แสดงการแยกไอโอเฮกซอลในตัวอย่างเซรัม, PAA-EDMA คอลัมน์, 70 : 30 (v/v) MeOH : 50 mM acetate buffer pH 5 เป็นเฟสเคลื่อนที่ ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 254 นาโนเมตร

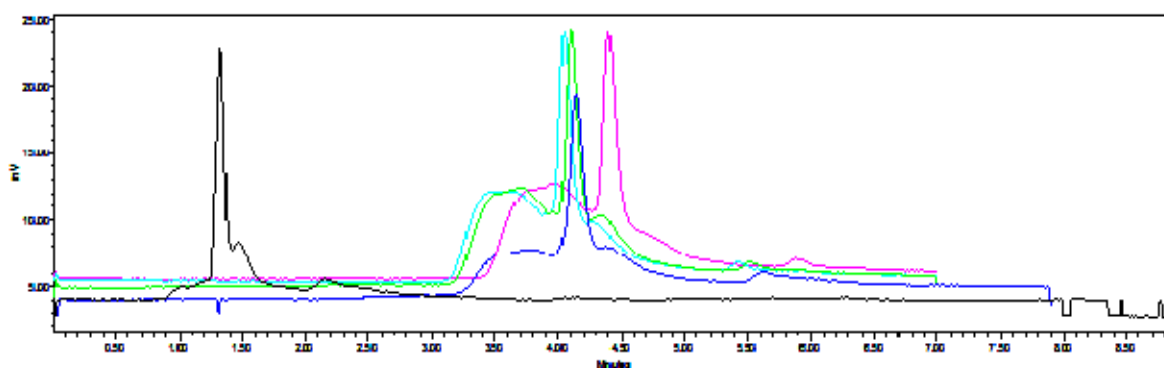
สถานะที่ 3 ผลของความเข้มข้นของกรด perchloric ที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีนตัวอย่างเข้มข้น เพื่อลดผลของการทำลายความเป็นบัฟเฟอร์ของเฟสเคลื่อนที่เมื่อฉีดสารตัวอย่างที่ถูกสกัดด้วย perchloric ได้ศึกษาผลของ ความเข้มข้นของกรด perchloric ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0, และ 5.0%



พบว่าที่ 2% perchloric acid ทำให้มีการตกตะกอนของโปรตีนใกล้เคียงกับ 5% จึงเลือกใช้ความเข้มข้น 2% ซึ่งนำไปสกัดด้วยวิธีดังนี้

- นำตัวอย่างพลาสมา 50  $\mu\text{L}$
- เติม 2% perchloric acid 800  $\mu\text{L}$
- นำไป ultrasonic 15 นาที
- เซนติฟิวจ์ 13000 รอบ 15 นาที เก็บสารละลายไปวิเคราะห์

แต่ยังพบว่าเมื่อทำการฉีดตัวอย่างเข้มข้นเข้า เวลาที่ไอโอเฮกซอลเคลื่อนที่ออกมาจะมีเวลานานขึ้น ซึ่งอาจเนื่องจากปัญหาการอุดตันจากการตกตะกอนโปรตีนไม่สมบูรณ์ จึงเลือกใช้ 5% perchloric acid เป็นสารละลายในการตกตะกอนโปรตีนเช่นเดิม แต่ทำลายความเป็นกรดของสารที่สกัดได้โดยการเติมสารละลายเบส NaOH แต่พบว่าทำให้ได้การแยกที่ไม่ดี และผลการแยกที่ไม่เที่ยง ดังแสดงในภาพที่ 23



ภาพที่ 23 แสดงการแยกไอโอเฮกซอลในตัวอย่างเข้มข้นที่สกัดด้วย 5% perchloric acid และปรับให้เป็นกลางด้วย 5 M NaOH, MAA-EDMA คอลัมน์, 70 : 30 (v/v) MeOH : 50 mM acetate buffer pH 5 เป็นเฟสเคลื่อนที่ ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 254 นาโนเมตร

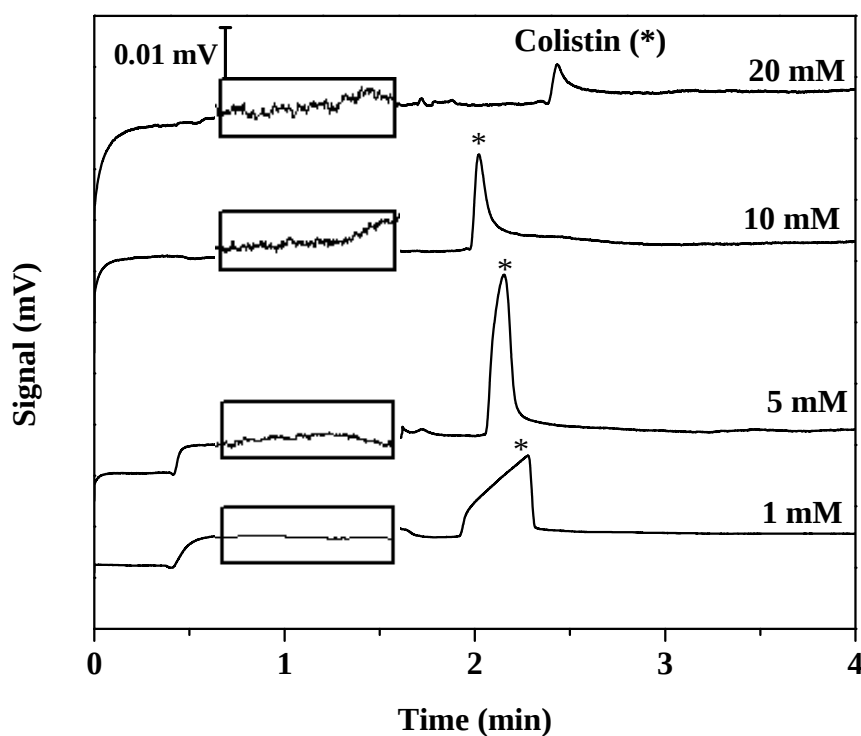
สถานะที่ 4 : การตกตะกอนโปรตีนด้วย อะซิโทรไนไตรล์

เพื่อแก้ปัญหการเสียสภาพความเป็นบัฟเฟอร์ของเฟสเคลื่อนที่เมื่อฉีดสารตัวอย่างที่ตกตะกอนด้วยกรด จึงตกตะกอนโปรตีนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถละลายไอโอเฮกซอลได้ คือ อะซิโตนไนไตรล์ พบว่าได้การแยกที่ดี แต่ยังไม่สามารถตกตะกอนโปรตีนได้สมบูรณ์

จากผลการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ไอโอเฮกซอลซึ่งเป็นดัชนีที่บ่งบอกการทำงานของไต โดยอาศัยการแยกแบบลิควิดโครมาโทกราฟีระดับไมโครลิตร ด้วยโมโนลิธคอลัมน์ที่สังเคราะห์ขึ้น สามารถแยกไอโอเฮกซอลได้ภายใน 4 นาที เป็นพบปัญหาเมื่อทำการวิเคราะห์ไอโอเฮกซอลในตัวอย่างจริง คือ เซรั่ม พบว่าการตกตะกอนโปรตีนที่ไม่สมบูรณ์จะทำให้เกิดการอุดตันของคอลัมน์ ทำให้ได้การแยกที่ไม่เที่ยง และหากใช้กรดในการตกตะกอนโปรตีนจะทำให้ความเป็นบัฟเฟอร์ของเฟสเคลื่อนที่เสียสภาพ เพื่อแก้ปัญหานี้แนวทางต่อไปคือการแยกโปรตีนในตัวอย่างเซรั่มโดยใช้ membrane ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่จำเป็นต้องมีการใช้ตัวทำละลาย จึงน่าจะแก้ปัญหที่พบได้

ตอนที่ 3 : การสร้างและพัฒนาระบบการแยกระดับไมโครลิตรแบบอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ติดตามสัญญาณด้วยการวัดค่าการนำไฟฟ้าแบบไม่สัมผัส สำหรับการวิเคราะห์ คอลิสติน

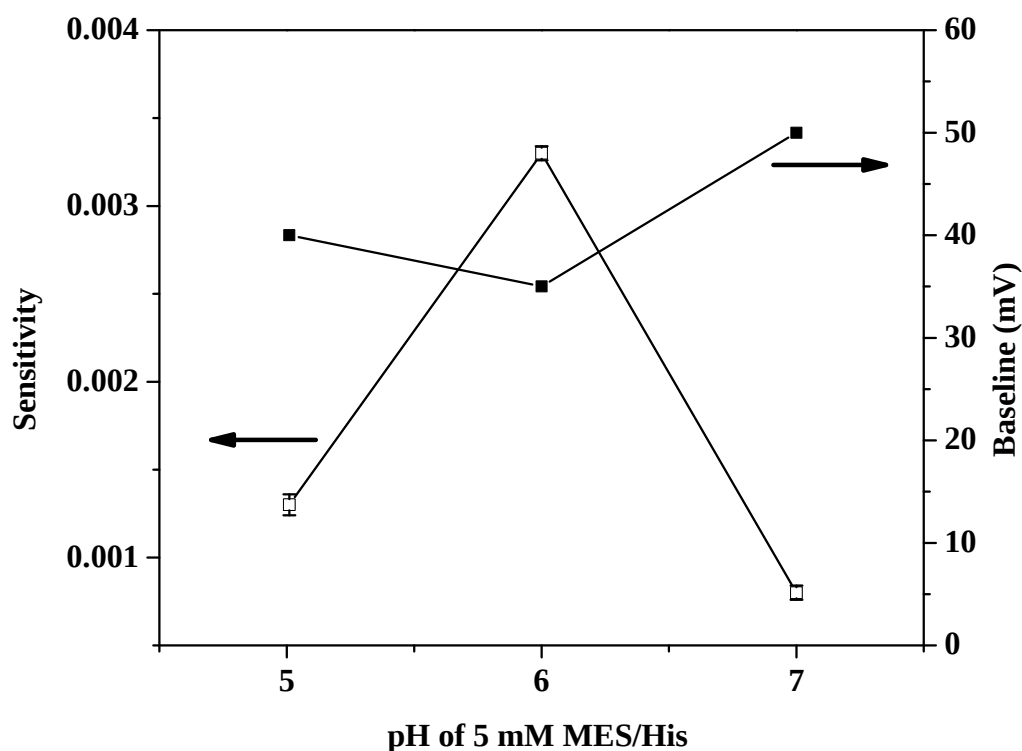
ในการหาสภาวะที่เหมาะสมได้ศึกษาชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการแยกหลายชนิด คือ 20 mM MES/His pH 6, 70 mM acetic acid/10 mM His pH 4, 20 mM tris-acetate pH 7, 1.7 M acetic acid/2% (v/v) polyethylene glycol (PEG) pH 3, 70 mM acetic acid/40% (v/v) MeOH pH 3 และ 20 mM boric acid/2% (v/v) PEG pH 3 พบว่า 20 mM MES/His pH 6 ให้การแยกที่ดีที่สุด และได้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของ 20 mM MES/His pH 6 เพิ่มปรับปรุงการแยกและความไวของเทคนิค พบว่าความเข้มข้นของบัฟเฟอร์มีผลต่อการแยกดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงการแยกของ colistin เมื่อใช้บัฟเฟอร์ความเข้มข้นต่างๆ  
จากรูปที่ 2 ความเข้มข้นที่ได้ผลดีที่สุดคือ 5 mM เนื่องจากให้สัญญาณสูงและ baseline noise ต่ำ

และเมื่อศึกษาผลของ pH ในช่วง 5-7 ซึ่งเป็นช่วงที่ colistin เป็นประจุบวก ( $pK_a = 12.01$ ) ทำให้สามารถแยกออกจากสารอื่นที่ไม่มีประจุและ EOF ได้ พบว่า pH ที่ให้ความไวที่ดีและ baseline signal ต่ำ

ที่สุดคือ pH 5 เนื่องจากเป็นค่า pH ที่บัฟเฟอร์ไม่ต้องเติมกรดหรือเบสเพื่อปรับค่า pH ทำให้มีค่าการนำไฟฟ้าที่ต่ำ ส่งผลทำให้ baseline signal ต่ำและมีความไวที่สูง (รูป 3)



รูปที่ 3 แสดงการแยกของ colistin เมื่อใช้บัฟเฟอร์ความเข้มข้นต่างๆ

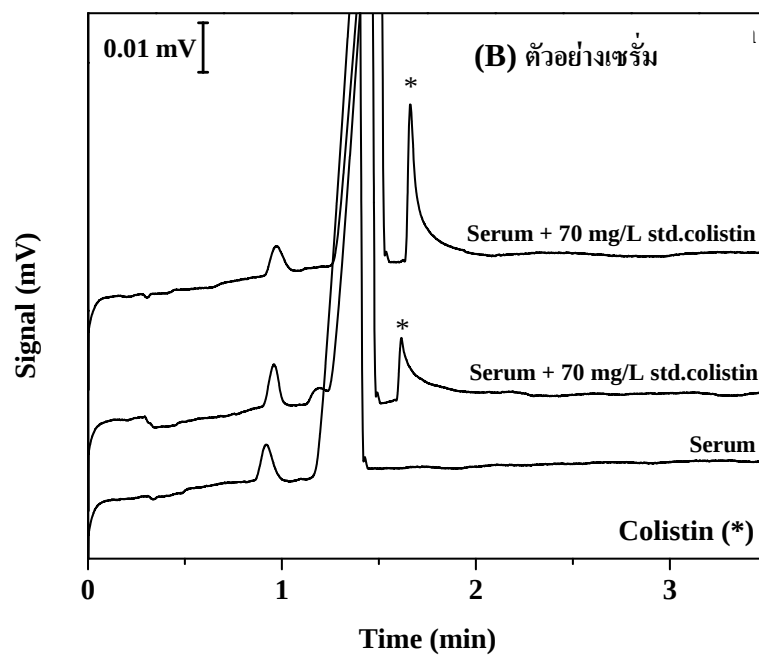
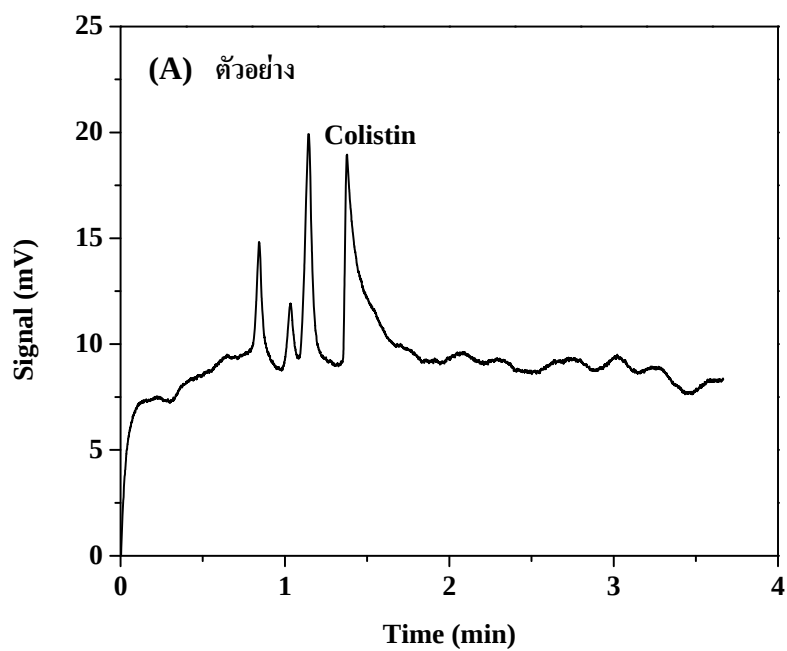
และได้ทำการประเมินประสิทธิภาพความแม่นยำของวิธีที่พัฒนาขึ้น ได้ผลดังสรุปในตารางที่ 1

Intra-day และ inter-day precisions จากค่า migration time ( $t_m$ ) และ peak area (PA) ของ colistin.

| Colistin 50 mg/L | Intra-day (n = 10) |      | Inter-day (3 days, n = 30) |      |
|------------------|--------------------|------|----------------------------|------|
|                  | Mean±SD            | %RSD | Mean±SD                    | %RSD |
| $T_m$ (min)      | 1.58±0.06          | 4.1  | 1.54±0.08                  | 5.1  |
| Peak area (mV.s) | 0.29±0.01          | 4.5  | 0.29±0.01                  | 4.5  |

#### การวิเคราะห์ตัวอย่างจริง

ได้นำวิธีที่พัฒนาไปวิเคราะห์ปริมาณ colistin ในตัวอย่างยาและตัวอย่างเซรัม ได้การแยกดังแสดงในรูปที่ 4 (A) และ 4(B) และสรุปผลการวิเคราะห์ตัวอย่างยาและเซรัมในตารางที่ 2 และ 3



รูปที่ 4 Electropherograms การวิเคราะห์ตัวอย่าง (A) ยา และ 4(B) เซรั่ม

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ colistin ในตัวอย่างอย่าง (Quantification), ร้อยละการคืนกลับ (percent recovery) และค่าที่ระบุข้างฉลาก (label claim)

| Sample | FI-CE with C <sup>4</sup> D |                       | Label claim<br>(mg/kg) |
|--------|-----------------------------|-----------------------|------------------------|
|        | Quantification<br>±SD       | (mg/kg) %Recovery ±SD |                        |

|    |             |           |        |
|----|-------------|-----------|--------|
| P1 | 18,596 ±222 | 93.7 ±5.0 | 19,510 |
| P2 | 24,953 ±857 | 98.6 ±6.8 | 24,388 |
| P3 | 17,887 ±47  | 98.1 ±6.5 | 19,510 |

ร้อยละการคืนกลับการวิเคราะห์ pooled และ single human serums (mean ± SD).

| Human serum  | Spiked concentration (mg/L) | %Recovery |
|--------------|-----------------------------|-----------|
| Single serum | 50                          | 86.4±4.4  |
|              | 70                          | 87.3±0.5  |
| Pooled serum | 50                          | 94.5±8.5  |
|              | 70                          | 85.9±1.4  |

### สรุปผลการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ได้ศึกษาการเตรียมโมโนลิธคอลัมน์สำหรับการแยกสารโครอล พบว่ายังมีปัญหาเรื่องการสังเคราะห์โครอลคอลัมน์ที่มีคุณสมบัติที่ดี จึงได้ปรับแผนการวิจัยใหม่เป็นพัฒนาวิธีการแยกสารระดับไมโครลิตรสำหรับการวิเคราะห์ไอโอเฮกซอลในตัวอย่างเซรัมซึ่งเป็นดัชนีบ่งบอกประสิทธิภาพการทำงานของไต และสำหรับการวิเคราะห์คอเลสเตอรอลโดยอาศัยการแยกแบบลิควิดโครมาโทกราฟีและอิเล็กโตรโฟรีซิสตามลำดับ พบว่าโมโนลิธคอลัมน์ชนิดเมทาอะคริลิกเอซิคผสมเอทิลีนไกลคอล ไดเมทาอะคริลท (methacrylic acid-ethylene glycol dimethacrylate) ให้ผลการแยกที่ดีมากทั้งในแง่ของประสิทธิภาพการแยกและเวลาที่ใช้ในการแยกไอโอเฮกซอลในตัวอย่างยา

สำหรับการสร้างและพัฒนาระบบการแยกระดับไมโครลิตรแบบอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ติดตามสัญญาณด้วยการวัดค่าการนำไฟฟ้าแบบไม่สัมผัส สำหรับการวิเคราะห์สารที่ดูดกลืนแสงได้น้อย คือ คอเลสเตอรอล ใน

ตัวอย่างยาและตัวอย่างเซรัม ได้วิธีที่สามารถแยกโคเลสเตอรอลจากในตัวอย่างภายในเวลาเพียง 2 นาที วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างยาและเซรัมได้โดยไม่ต้องมีขั้นตอนการเตรียมสารตัวอย่าง และมีความถูกต้องจากการวิเคราะห์คืนกลับในช่วง 94-99% สำหรับตัวอย่างยา

## Output ที่ได้จากโครงการ

1. เทคโนโลยีเกี่ยวกับการสังเคราะห์โมโนลิธิคคอลัมน์ ซึ่งเป็นเทคโนโลยีที่ส่งเสริมความก้าวหน้าของการวิจัยด้านเคมีวิเคราะห์ และส่งเสริมการพัฒนากิจการวิจัยแบบพึ่งตนเองเนื่องจากทำให้ลดค่าใช้จ่ายในการซื้อคอลัมน์จากต่างประเทศ
2. ได้องค์ความรู้ในการพัฒนาวิธีเคพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณไอโอเฮกซอล
3. ได้ระบบการวิเคราะห์ flow injection capillary electrophoresis- capacitively coupled contactless conductivity detection (FI-CE-C4D)
4. ได้องค์ความรู้ในการพัฒนาวิธีเคพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณคอลิสติน
5. การเผยแพร่ผลงานในวารสารระดับนานาชาติ

Patcharin Chaisuwan<sup>a,b,c</sup>, Thararat Moonta<sup>a,d</sup>, Areeporn Sangcakul<sup>e</sup>, Duangjai Nacapricha<sup>a,d</sup>, Prapin Wilairat<sup>a,f</sup>, and Kanchana Uraisin<sup>a,d\*</sup> “Determination of colistin in human serum and pharmaceutical products using an in-house flow injection-capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity” in preparation process, J. Pharm. Biomed. Anal.

## ภาคผนวก

1. โปสเตอร์การนำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมระดับนานาชาติ “The 18<sup>th</sup> international Conference on Flow Injection Analysis, Including Related Techniques, 15-20<sup>th</sup> September 2013, Porto, Portugal.
2. Manuscript ผลงานวิจัยเรื่อง “Determination of colistin in human serum and pharmaceutical products using an in-house flow injection-capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity” ซึ่งอยู่ระหว่างการเตรียมสำหรับส่งตีพิมพ์วารสาร J.Pharm.Biomed.Anal.

ภาคผนวก 1 : โปสเตอร์การนำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมระดับนานาชาติ “The 18<sup>th</sup> international Conference on Flow Injection Analysis, Including Related Techniques, 15-20<sup>th</sup> September 2013, Porto, Portugal.

## Micro-liquid chromatography on a monolithic stationary phase with in-channel graphene-based amperometric detector for $\alpha$ - and $\beta$ -dihydroartemisinin detection

Chanpen Karuwan,<sup>a,b</sup> Duangjai Nacapricha,<sup>a</sup> Patcharin Chaisuwan,<sup>a,c</sup>  
Anurat Wisitsoraat,<sup>b</sup> and Adisorn Tuantranont<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Flow Innovative Research for Science and Technology laboratories (FIRST Labs.), Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Rd, Bangkok 10400, Thailand.

<sup>b</sup>Nanoelectronics and MEMS Laboratory, National Electronics and Computer Technology Center, Phahonyothin Rd, Pathumthani 12120, Thailand.

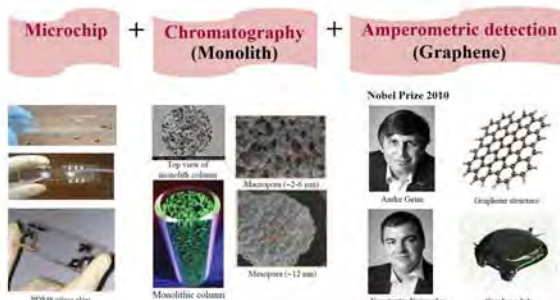
<sup>c</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Bangkok, Thailand

### Abstract

This work presents a micro liquid chromatographic device with monolith-based stationary phase and in-channel screen-printed graphene electrochemical detector. The monolith was synthesized in micro-channel by *in-situ* photopolymerization. In-channel electrochemical detection was constructed including silver/silver chloride paste electrode (reference electrode) and graphene paste electrodes as working and counter electrode. Electrode paste material were screened on top of a glass substrate by screen printing technique before bonding the PDMS to the glass substrate. The developed micro-liquid chromatographic device was investigated and optimized for separation and detection of  $\alpha$ - and  $\beta$ -dihydroartemisinin.

### LC-ECD microfluidic chip with monolithic separation

In this work, development of a microfluidic chip for liquid chromatography (LC) with an electrochemical detection (ECD) is described. Investigation on *in situ* synthesis of a monolithic LC column and a fabrication of a screen printed graphene paste for ECD detector was carried out.



### Fabrication process

- I. Graphene and silver were screened onto a substrate by a screen printing technology.
- II. The substrate was then bonded to a piece of poly (dimethylsiloxane) (PDMS) that has a microchannel on it using oxygen plasma treatment.
- III. The fabricated microfluidic chip was then filled with the polymerization composition to synthesize the monolithic stationary phase. The microchip was then irradiated under UV lamp.

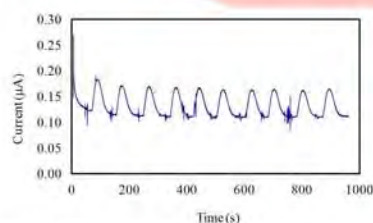
### Preliminary results

Investigation of surface treatment on PDMS/glass surface for *in situ* polymerization of buthyl methacrylate (BMA) monolith in PDMS/glass microchannel was carried out using adsorbed coating by 2,2-dimethoxy-2-phenyl-acetophenone.



Monolith synthesized *in-situ* inside microchannel, obtained from microscope (left) and scanning electron microscope (right)

In order to study the loss of monolith from microchannel, replicate injections of 0.5 mM standard dopamine were carried out to measure the precision in the term of relative standard deviation (RSD). The developed system gave an acceptable repeatability with RSD of 3.3% (n = 10).



Acceptable precision from replicate injections of dopamine standard (0.5 mM).

### Conclusions

We demonstrated the fabrication of microfluidic chip integrated with graphene electrochemical detector and possibility of *in situ* synthesis of BMA monolith in PDMS/glass microchannel.

### Acknowledgement:

The research was co-sponsored by the Office of Higher Education Commission and Mahidol University under the National Research Universities Initiative chaired by Prof. Manat Pohmakotr and the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Commission on Higher Education, Ministry of Education.

### Selected References:

- [1] Kang, Q.-S.; Li, Y.; Xu, J.-Q.; Su, L.-J.; Li, Y.-T.; Huang, W.-H. *Electroanalysis*, **2010**, *31*, 3028-3034.
- [2] Wana, Y.; Tuantranont A.; Wisitsoraat, A.; et al ; *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **2006**, *6*, 3893-3896.



ภาคผนวก 2 : Manuscript ผลงานวิจัยเรื่อง “Determination of colistin in human serum and pharmaceutical products using an in-house flow injection-capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity”

**Determination of colistin in human serum and pharmaceutical products using an in-house flow injection-capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity**

Patcharin Chaisuwan<sup>a,b,c</sup>, Thararat Moonta<sup>a,d</sup>, Areeporn Sangcakul<sup>e</sup>, Duangjai Nacapricha<sup>a,d</sup>, Prapin Wilairat<sup>a,f</sup>, and Kanchana Uraisin<sup>a,d\*</sup>

<sup>a</sup> *Flow Innovation-Research for Science and Technology Laboratories (FIRST Labs.)*

<sup>b</sup> *Department of Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Sukhumvit 23 Rd, Bangkok 10110, Thailand*

<sup>c</sup> *School of Chemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, 111 University Avenue, Muang District, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand*

<sup>d</sup> *Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Rd, Bangkok 10400, Thailand*

<sup>e</sup> *Research Center, Ramathibodi Hospital, Faculty of Medicine, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand*

<sup>f</sup> *National Doping Control Centre, Mahidol University, Bangkok, Thailand*

\* Author for correspondence; e-mail: kanchana.ura@mahidol.ac.th, Tel. +66 2 2015125, Fax. +66 2 2015127

## **Abstract**

An in-house flow injection-capillary electrophoresis (FI-CE) with capacitively coupled contactless conductivity detection (C<sup>4</sup>D) was developed for determination of colistin in human serum and pharmaceutical products. Colistin was successfully separated from sample matrix within 2 min by using a mixture of 5 mM 2-morpholinoethanesulfonic acid (MES) and 5 mM histidine (His) pH 6 as background electrolyte. Due to lacking in chromophore of the colistin, contactless conductivity detection on-capillary was performed. The samples can be directly injected into the FI-CE-C<sup>4</sup>D without any sample preparation. Calibration curve of colistin was constructed from 20 to 150 mg/L with linear regression of 0.9967. Limit of detection and limit of quantitation were 6 mg/L and 20 mg/L, respectively. Recoveries were 86.4% to 94.5% and 93.7% to 98.6 % for human serum and pharmaceutical samples, respectively. The developed method provides satisfied precision, simplicity and short analysis time.

**Keywords:** Colistin, Polymyxin E, Flow injection-capillary electrophoresis, Capacitively coupled contactless conductivity detection, Human serum, Pharmaceutical sample

## Introduction

Colistin or polymyxin E (Fig. 1) is a cationic cyclic polypeptide antibiotic which is synthesized by *Bacillus polymyxa* subspecies *colistinus* Koyama [1]. It is frequently used as human medicines for multidrug-resistance infections; for treatment of pulmonary or systemic infections and therapy of patients with cystic fibrosis caused by gram-negative bacteria [2-3]. However, it was found to reveal high toxicity on kidney and central nervous system [4]. In addition, colistin is applied to animals in treatment and prevention of bacterial infections by addition of drug to animal feed. Nevertheless, colistin can be remained in tissues product of animals and thus be harmful to human via food chains [5]. Therefore, quality control of colistin is important in pharmaceutical productions and clinical study in biological samples.

Many research groups have developed analytical methods for quantitative of colistin in human biological fluids, animal tissues and pharmaceutical samples. Enzyme-linked immunoabsorbent assay was proposed as screening method for colistin in milk samples from cows [6] and quantitative analysis of residual drugs in fish tissue [7]. Classical separation technique, thin-layer chromatography, was also applied for analysis of colistin [8]. Modern separation approach, high performance liquid chromatography (HPLC), with different detection systems have been reported for quantification of colistin. Mass spectrometry (MS) is extensively used for detection of colistin in biological samples [9-12]. Although MS technique is sensitive, the method required expensive instruments and specialist operator. The most conventional detections in HPLC are measurement of absorption or emission of light. Nevertheless, colistin has lack of chromophore and fluorophore in its structure; therefore, poor sensitivity was achieved for analysis of colistin by spectrophotometric and fluorometric measurement [13-15]. In order to overcome, HPLC with pre- and post- column derivatization of colistin is carried out. Ortho-phthalaldehyde with 2- mercaptoethanol [16-19], 9-fluorenylmethyl chloroformate [20-21] and dansyl chloride [22] have been employed as derivatizing agent for fluorometric detection of colistin in plasma, serum, bovine tissue and animal feeds.

Currently, capillary electrophoresis (CE) is extensively utilized in pharmaceutical and biological analysis because of its less sample and reagent consuming with high separation efficiency and short separation time. The method is considerable attention to separate positive and negative charged analytes in complicated matrix samples. Analysis of biological fluids such as serum, plasma, saliva and urine by CE has been extensively reported from many research groups [23-24]. Furthermore, CE with direct and indirect UV detection [25-26] has been employed for analysis of colistin in pharmaceutical preparation with

satisfactory results. However, the methods were time-consuming which required the separation time of 15 min and 6 min, respectively.

Recently, capacitively coupled contactless conductivity detector ( $C^4D$ ) is an attractive detection system in CE due to its universal distinctive for detecting of non-chromophore ionic compounds and also ease in integration.  $C^4D$  can detect analytes in native state without any sample derivatization steps which requires in fluorescence and absorption photometric detection. Charged species provides relatively high conductance which is a sensitive response in  $C^4D$  greater than neutral molecules. Analysis of ionic compounds in biological samples by CE- $C^4D$  therefore has been extensively concerned. [27-28]. Moreover, combination of CE and  $C^4D$  is simple, inexpensive and easy for in-house construction. However, the challenge of utilization of in-house CE is reproducible sample injection in nano-liter scale.

In order to improve sample injection in in-house CE, in 1997, Kuban et al. [29] and Fang et al. [30] proposed flow injection (FI) for utilizing as a tool for sample and solvent introduction. The FI-CE system allows automatic on-line sample transportation and separation. The method was successfully developed for various applications such as determination of inorganic ions [31-32], alkaline earth metals [33]. FI-CE system has been presented and attributed to separation sciences since its advantages of high throughput analysis with good accuracy and precision.

This work, a simple and fast method for analysis of colistin using in-house FI-CE with capacitively coupled contactless conductivity detection was developed. Colistin was directly analyzed without any derivatization and sample preparation processes. The method was applicable for determination of colistin in pharmaceutical products and also for complex matrix sample such as human serum without interfering effect.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Chemicals and reagents**

Colistin sulfate salt (purity 99%) was purchased from Sigma-Aldrich (USA). L-histidine (His) (purity  $\geq 99\%$ ) was obtained from Fluka (Japan). 2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid (MES) (purity  $>99\%$ ) was purchased from Acros Organic (USA). Glacial acetic acid and methanol were supplied by Lab scan (Thailand). Boric acid, sodium hydroxide and Tris (hydroxyl methyl) aminometane were purchased from Merck (Germany).

Polyethylene glycol (PEG) 600 was purchased from Fluka (Switzerland). Deionized-distilled water (DI water) was obtained from a Milli-Q-system.

## **2.2 Instrument of FI-CE with C<sup>4</sup>D and operational steps**

Simple diagram of the constructed in-house FI-CE-C<sup>4</sup>D system is illustrated in Fig. 2. The FI and CE systems were connected via a piece of acrylic interface. A T-way valve (pressure valve) is placed at the outlet of the FI system to generate pressure for hydrodynamic injection and filling of solutions through the capillary. Background electrolyte (BGE) was filled and flowed through the system by mean of a low pressure pump, peristaltic pump (ISM875, ISMATEC, Switzerland) at flow rate of 1 mL/min. The CE separations were performed in a fused silica capillary (100  $\mu$ m i.d., 363 $\mu$ m o.d., Agilent Technologies., USA) by using 5 mM 2-morpholinoethanesulfonic acid (MES) and 5 mM histidine (His) pH 6 as BGE. Effective and total length of the capillary were 22.4 cm and 30 cm, respectively. Before separation, the capillary was conditioned with 0.1 M NaOH, DI water and BGE for 30 min each. A high-voltage power supply used is SL15P30 model (Spellman, USA). For the detection part, an eDAQ C<sup>4</sup>D detector was used for applied voltage (peak-to-peak) of 100 volt and frequency of 400 kHz by using a capillary headstage (365  $\mu$ m, o.d., ET 120, Australia), a C<sup>4</sup>D Amp (ET 120, Australia). An E-corder (ED201, Australia) was employed for recording of output dc voltage. The data recording was analyzed by eDAQ Chart (eDAQ, Australia). The diagram for FI-CE-C<sup>4</sup>D is shown in Fig. 2.

## **2.3 Sample preparation**

Pooled human serum provided by Ramathibodi Hospital (from ten volunteers) was stored at -20 °C. Before analysis, the sample was thawed and prepared by pipetting 0.05 mL of the serum and diluting with DI water to obtain final volume of 10.00 mL. Pharmaceutical samples were weighted and dissolved with DI water. The solutions were then sonicated for 15 min and filtered through 0.2  $\mu$ m disposable syringe filter membrane (CN-CA, Chromex Scientific, UK). Recovery studies for pharmaceutical and human serum samples were performed by spiking standard colistin into the samples to obtain a concentration of 50 and 70 mg/L. All samples were filtered through 0.2  $\mu$ m filter membranes before injected into the FI-CE-C<sup>4</sup>D system.

## **3. Results and discussion**

### 3.1 Operation and FI-CE-C<sup>4</sup>D set up

A FI system can be coupled with CE to facilitate sample and solvent introduction by means of many approaches [29-33]. We connected the two systems by using an acrylic interface. At the outlet end of the FI, the transfer line was splitted and a valve used as pressure valve was placed for building up small pressure for hydrodynamic injection and filling of solvents. By this set up, both kinetic and hydrodynamic injections can be performed. The electrokinetic injection can be performed by injecting sample into stream of BGE with applying injection voltage of 10 kV for 2 second. The remaining sample zone was removed by flowing of BGE (no applying high voltage). The high voltage for 10 kV was then applied to achieve CE separation. For hydrodynamic injection, after injection via the injection valve, when the inlet end of the CE capillary was at the middle of the sample zone (about 6 second after injection), the pressure valve at the outlet was then closed for 4 second to achieve hydrodynamic injection due to generated pressure. The BGE was then flowed through the capillary to remove the sample zone. The pump was stopped and high voltage of 10 kV for CE separation was applied. Injection volume for both injection methods can be tuned by changing injection voltage or injection time. The two approaches provided similar observed peak shapes (Fig. 3) and acceptable precision (Table 1). However, slightly better precision was observed from electrokinetic injection with simpler operational steps.

### 3.2 Selection of CE condition

Background electrolyte (BGE) is one of the most important parameters for CE. Type, concentration and pH of the BGE were investigated. The criteria for selecting a suitable BGE are separation, sensitivity and analysis time. Separation by various BEGs including MES/His pH 6, acetic acid/His pH 4, tris-acetate pH 7, acetic acid/2% (v/v) PEG pH 3, acetic acid/4% (v/v) MeOH pH 3 and boric acid/2% (v/v) PEG pH 3 were performed. Among the studied BGEs, MES/His pH 6 provided the most satisfied results according to the selecting criteria (data not shown).

Effect of MES/His concentration was further studied to improve sensitivity and analysis time. The investigation was carried out in the concentration range of 1 to 20 mM (Fig. 4). Buffer concentration of 5 mM showed the highest signal with lower background noise. In addition, longer separation time was observed at higher buffer concentration. The solution of 5 mM MES/His therefore was chosen as an optimal BGE. Another important key, pH of the BGE which is a parameter governing magnitude of EOF and also ionic charge of the analytes. Since the colistin are almost protonated at pH lower than 9 (colistin's pKa =

12.01), in order to separate the colistin from the EOF, pH lower than 9 were thus investigated. In C<sup>4</sup>D, the main effect of pH does not only on the driving force EOF and electromobility of the analytes but also sensitivity of the method as shown in Fig. 5. Higher baseline and lower sensitivity were observed from MES/His pH 5 and 7 which could due to the higher conductivity from adding acid or base to adjust pH of the BGE from its original pH. As expected, the original pH of MES/His of 6 provided lowest baseline signal and highest sensitivity with short separation time for only 2 min.

### 3.3 Analytical performance

Linear regressive equation, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ) and relative standard deviation (RSD) of precision were studied. Linear regressive equation was obtained from five concentration levels of standard colistin solution in the range of 20-150 mg/L. Linear regressive equation and linear regression were  $y = (0.0033 \pm 0.001)x - (0.0411 \pm 0.0098)$  and 0.9967, respectively. The LOD and LOQ values were calculated by using signal-to-noise (S/N) ratio. The LOD and LOQ values were concentration of standard colistin that provided signal to noise ratio of three and ten, respectively. The obtained LOD and LOQ of the developed method were found to be 6 mg/L and 20 mg/L, respectively.

Relative standard deviation values for repeatability or intra-day precision (n=10) and reproducibility or inter-day precision (3 days, n=30) of the developed method were investigated by repeated injecting a standard colistin. The %RSD values obtained for peak area and migration time were calculated and summarized in Table 2.

### 3.4 Application to real samples

#### 3.4.1 Human serum sample

The developed method was applied for colistin analysis in pooled human serum which typically requires protein precipitation order to remove macromolecules causing blocking in chromatographic separation columns. In this method, the analyte was separated in an open tubular of a bare fused silica capillary, only sample dilution and filtration were thus performed before analysis. The colistin in spiked serum sample was completely separated from the serum matrix within 2 min (Fig. 6). Percent recoveries of the serum sample obtained at spiked concentration level of 50 and 70 mg/mL were 86.4% - 94.5%.

### 3.4.2. Pharmaceutical sample

The developed method was also applied for colistin analysis in three commercial pharmaceutical powder samples. The colistin obtained were compared with label claim by using t-test and found not significantly different at 95% confidence. The analysis results, percent recovery and label claim are summarized in Table 2.

## 4. Conclusion

Coupling of FI with in-house CE provided the method semi-automatic by facilitating sample and solvent loading. The developed FI-CE-C<sup>4</sup>D method showed simplicity and fast analysis with acceptable precision and accuracy for analysis of colistin which contains weak chromophore for UV detection. The method was capable for colistin assay in pharmaceutical and human serum samples without any sample preparation steps, only dilution and filtration were required before injecting into the FI-CE-C<sup>4</sup>D system.

## Acknowledgments

This research was financially supported by (i) the Thailand Research Fund (PC, grant code MRG5580244) (ii) the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Commission on Higher Education, Ministry of Education (TM), (iii) Srinakharinwirot University (PC) and (iv) the Office of Higher Education Commission and Mahidol University under the National Research Universities Initiative chaired by Prof. Manat Pohmakotr.

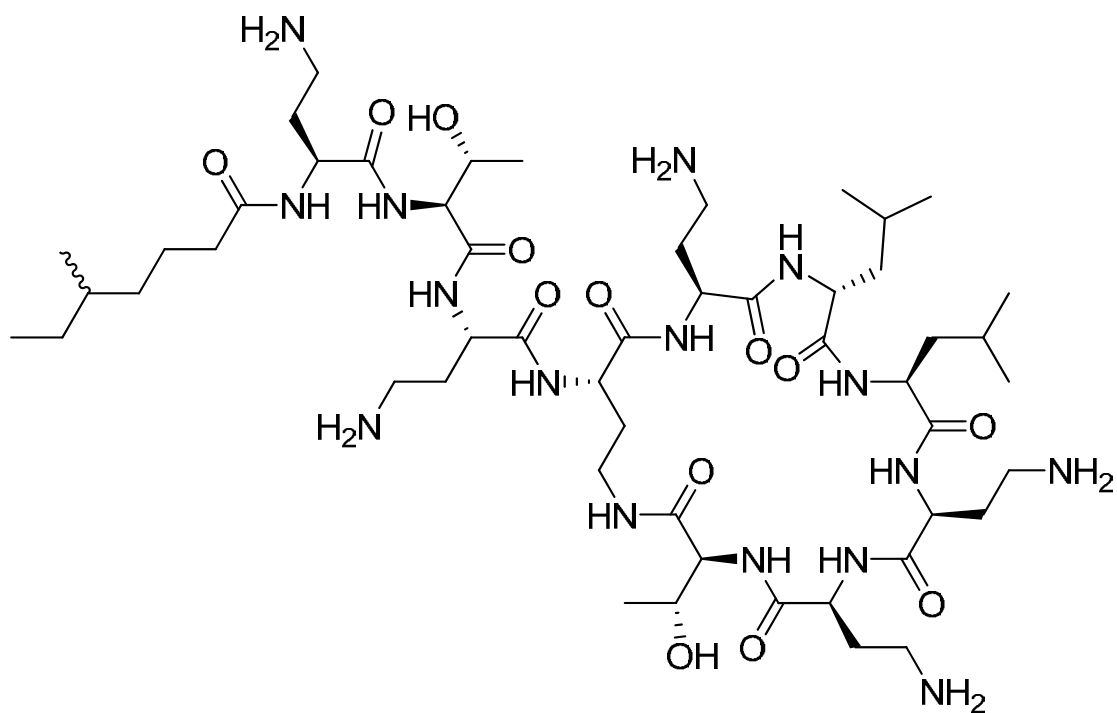
## References

- [1] M.E. Falagas, S.K. Kasiakou, Colistin: The revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections, *Clin. Infect. Dis.* 40 (2005) 1333–1341.
- [2] S.P. Conway, M.N. Pond, A. Watso, C. Etherington, H.L. Robey, M.H. Goldman, Intravenous colistin sulphomethate in acute respiratory exacerbations in adult patients with cystic fibrosis, *Thorax*. 52 (1997) 987–993.
- [3] S. Cunningham, A. Prasad, L. Collyer, S. Carr, I.B. Lynn, C. Wallis, Bronchoconstriction following nebulised colistin in cystic fibrosis, *Arch. Dis. Child* 84 (2001) 432–433.
- [4] M.E. Evans, D.J. Feola, R.P. Rapp, Polymyxin B sulfate and colistin: Old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria, *Annals of Pharmacotherapy* 33 (1999) 960–967.

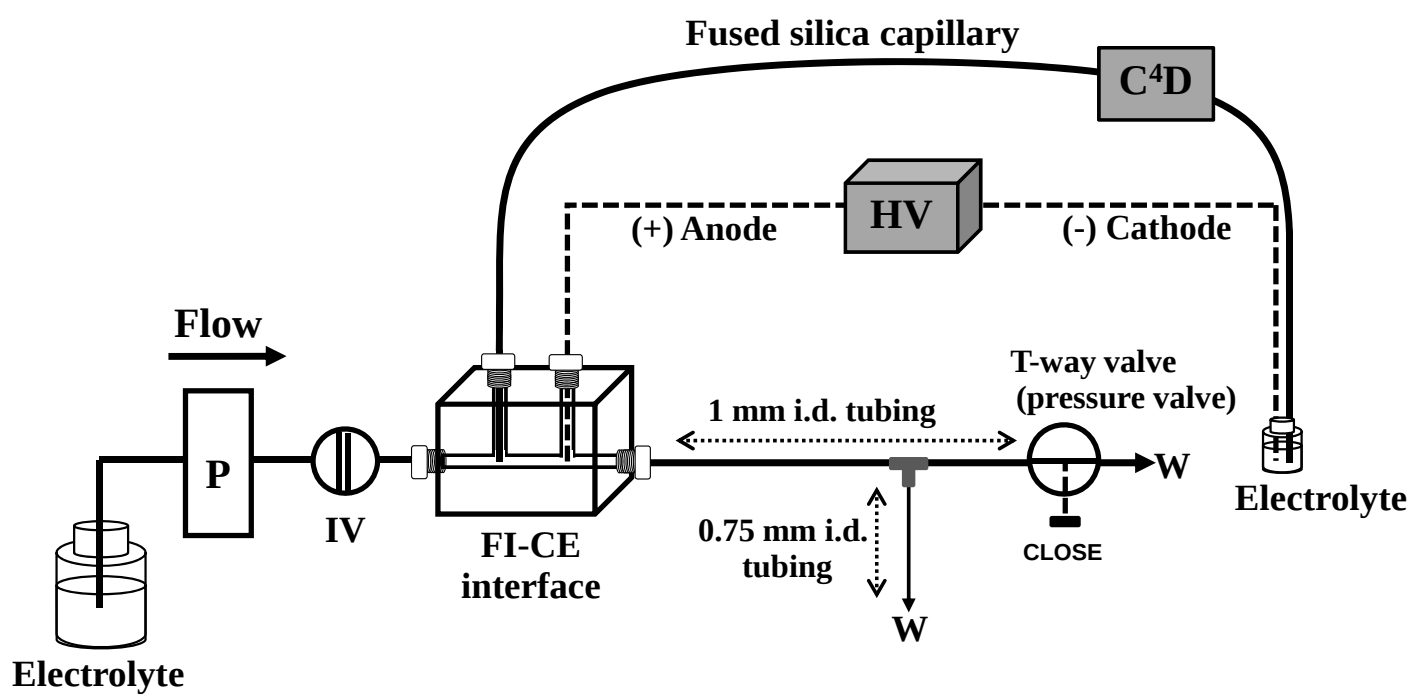
- [5] D.W. Sin, C. Ho, Y. Wong, S. Ho, A.C. Ip, Analysis of major components of residual bacitracin and colistin in food samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 535 (2005) 23-31.
- [6] G. Suhren, K. Knappstein, Detection of colistin in spiked and incurred milk samples by LC- and ELISA-technique, *Anal. Chim. Acta* 529 (2005) 97-101.
- [7] T. Kitagawa, W. Ohtani, Y. Maeno, K. Fujiwara, Y. Kimura, Sensitive enzyme immunoassay of colistin and its application detect residual colistin in rainbow trout tissue, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 68 (1985) 661-664.
- [8] A.H. Thomas, J.M. Thomas, I. Holloway, Microbiological and chemical analysis of polymyxin B and polymyxin E (Colistin) sulphates, *Analyst* 105 (1980) 1068-1075.
- [9] Y. Dotsikas, C.K. Markopoulou, J.E. Koundourellis, Y.L. Loukas, Validation of a novel LC-MS/MS method for the quantitation of colistin A and B in human plasma, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 37-45.
- [10] C. Cheng, S. Liu, D. Xiao, J. Hollembaek, L. Yao, J. Lin, S. Hansel, LC-MS/MS method development and validation for the determination of polymyxins and vancomycin in rat plasma, *J. Chromatogr. B*, 878 (2010) 2831-2838.
- [11] P. Gobin, F. Lemaitre, S. Marchand, W. Couet, J.C. Olivier, Assay of colistin and colistin methanesulfonate in plasma and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Antimicrob. Agents Chemother.* 54 (2010) 1941-1948.
- [12] B. Jansson, M. Karvanen, O. Cars, D. Plachouras, L.E. Friberg, Quantitative analysis of colistin A and colistin B in plasma and culture medium using a simple precipitation step followed by LC/MS/MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 760-767.
- [13] J. A. Orwa, A. Van Gerven, E. Roets, J. Hoogmartens, Development and validation of a liquid chromatography method for analysis of colistin sulphate, *Chromatographia*, 51 (2000) 433-436.
- [14] E. Caudron, S. Baghriche, P. Prognon, D. Pradeau, Simultaneous quantification of gentamicin and colistin sulfate in pharmaceuticals using ion-pairing and polarity gradient chromatography with low-UV detection, *Chromatographia* 76 (2013) 747-755.
- [15] B. Cancho Grande, M.S. García Falcón, C. Pérez-Lamela, M. Rodríguez Comesaña, J. Simal Gándara, Quantitative analysis of colistin and tiamulin in

- liquid and solid medicated premixes by HPLC with diode-array detection, *Chromatographia* 53 (2001) S460-S463.
- [16] B. Cancho-Grande, M. Rodríguez-Comesaña, J. Simal-Gándara, Simple HPLC determination of colistin in medicated feeds by pre-column derivatization and fluorescence detection, *Chromatographia* 54 (2001) 481-484.
  - [17] S. Morales-Muñoz, M.D. Luque de Castro, Dynamic ultrasound-assisted extraction of colistin from feeds with on-line pre-column derivatization and liquid, *J. Chromatogr. A*, 1066 (2005) 1–7.
  - [18] P.P. Le Brun, A.I. de Graaf, A.A. Vinks, High-performance liquid chromatographic method for the determination of colistin in serum, *Ther. Drug Monit.* 22 (2000) 589-593.
  - [19] D. Decolin, P. Leroy, A. Nicolas, Hyphenated liquid chromatographic method for the determination of colistin residues in bovine tissues, *J. Chromatogr. Sci.* 35 (1997) 557-564.
  - [20] J. Li, R.W. Milne, R.L. Nation, J.D. Turnidge, K. Coulthard, D.W. Johnson, A simple method for the assay of colistin in human plasma, using pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate in solid-phase extraction cartridges and reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 761 (2001) 167-175.
  - [21] L. Jin, J. Li, R.L. Nation, J.A. Nicolazzo, Brain penetration of colistin in mice assessed by a novel high-performance liquid chromatographic technique, *Antimicrob. Agents and Chemother.* 53 (2009) 4247-4251.
  - [22] D.J. Gmur, C.R. Bredl, S.J. Steele, S. Cai, D.R. VanDevanter, P.A. Nardella, Determination of polymyxin E1 in rat plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 789 (2003), 365-372.
  - [23] B. Jung, J. Caslavská, W. Thormann, Determination of ethyl glucuronide in human serum by capillary zone electrophoresis and an immunoassay, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 3497 – 3506.
  - [24] L. Song, Z. Guo, Y. Chen, One-pot labeling-based capillary zone electrophoresis for separation of amino acid mixture and assay of biofluids, *Anal. Chim. Acta* 703 (2011) 257– 263.

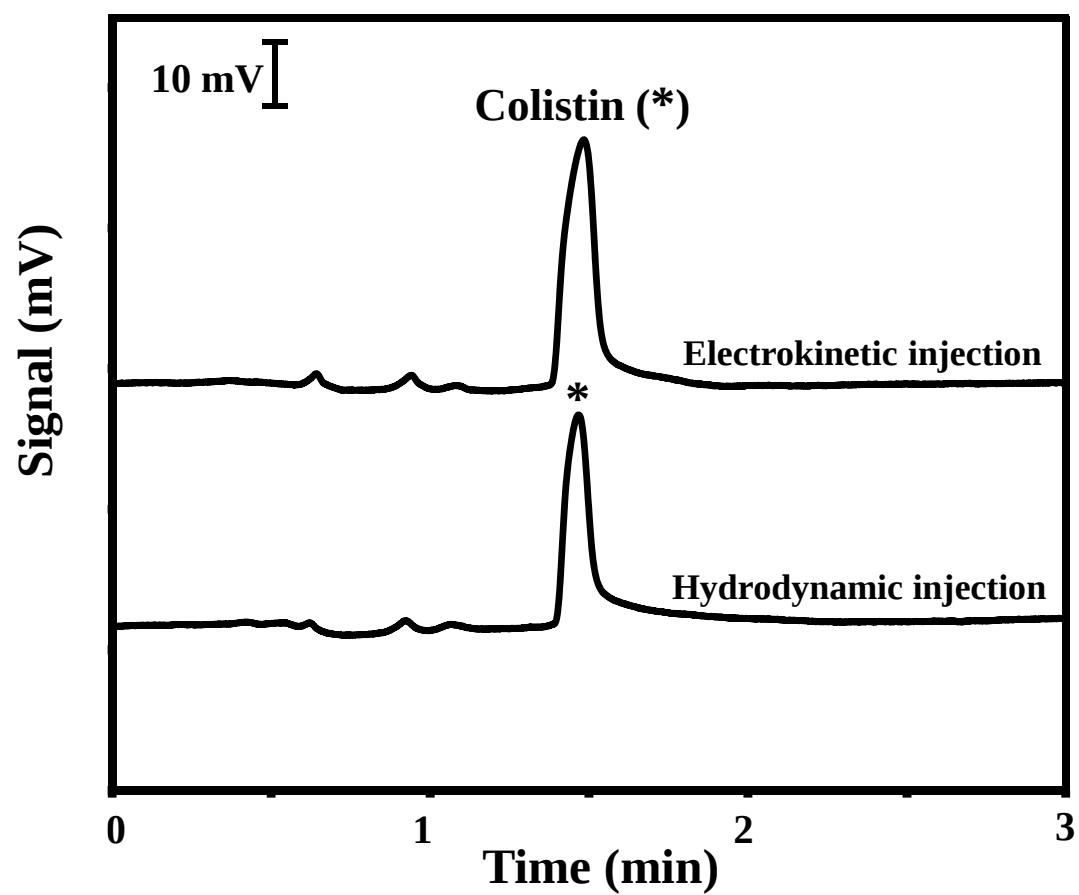
- [25] J.W. Kang, T. Vankeirsbilck, A. Van Schepdael, J. Orwa, E. Roets, J. Hoogmartens, Analysis of colistin sulfate by capillary zone electrophoresis with cyclodextrins as additive, *Electrophoresis* 21 (2000), 3199-3204.
- [26] P. Srisom, B. Liawruangrath, S. Liawruangrath, J. M. Slater, S. Wangkarn, Simultaneous determination of neomycin sulfate and polymyxin B sulfate by capillary electrophoresis with indirect UV detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 1013–1018.
- [27] P. Kubáň, P. Durc, M. Bittova, F. Foret, Separation of oxalate, formate and glycolate in human bodyfluid samples by capillary electrophoresis with contactlessconductometric detection, *J. Chromatogr. A* 1325 (2014) 241– 246.
- [28] P. Chaisuwan, T. Kongprasertsak, A. Sangcakul, N.W. Smith, D. Nachapricha, P. Wilairat, K. Uraisin, Direct injection of human serum and pharmaceutical formulations for glucosamine determination by CE-C<sup>4</sup>D method, *J. Chromatogr. B* 879 (2011) 2185– 2188.
- [29] P. Kubáň, A. Engström, J.C. Olsson, G. Thorsén, R. Tryzell, B. Karlberg, B., New interface for coupling flow-injection and capillary electrophoresis, *Anal. Chim. Acta* 337 (1997) 117–124.
- [30] Z. L. Fang, Z.S. Liu, Q. Shen, Combination of flow injection with capillary electrophoresis. Part I. The basic system, *Anal. Chim. Acta* 346 (1997) 135–143.
- [31] P. Kubáň, V. Kubáň, Flow injection-capillary electrophoresis system with contactless conductivity detection and hydrostatic pressure generated flow. Application to the quantitative analysis of inorganic anions in water samples, *Electrophoresis*, 24 (2003) 1935-1943.
- [32] P. Kubáň, M. Reinhardt, B. Müller, P.C. Hauser, On-site simultaneous determination of anions and cations in drainage water using a flow injection-capillary electrophoresis system with contactless conductivity detection. *J. Environ. Monit.* 6 (2004) 169-174.
- [33] J. Wang, P. Cai, J. Mo, Z. Chen, A sample introduction method based on negative pressure in flow injection-capillary electrophoresis system and its application to the alkaline-earth metal cation separation. *Anal. Lett.* 38 (2005) 857-867.



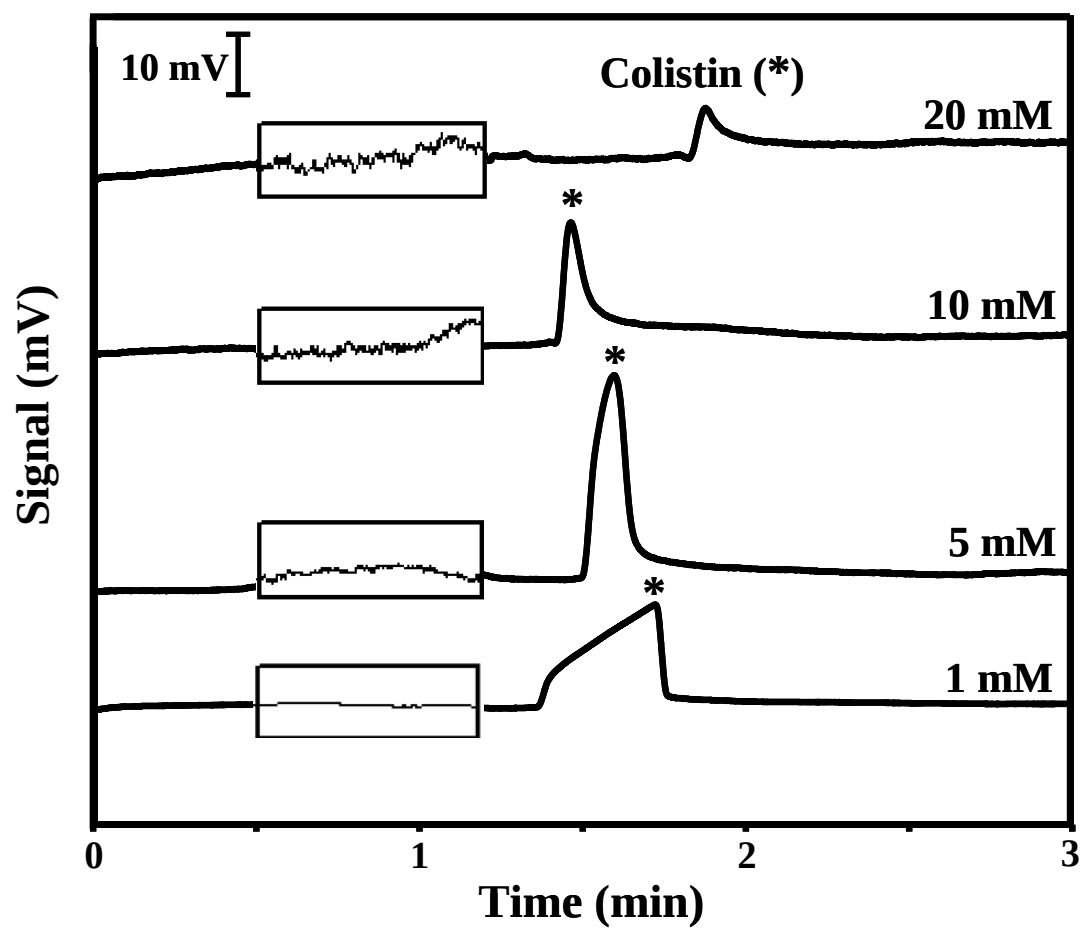
**Fig. 1**



**Fig. 2**



**Fig. 3**



**Fig. 4**

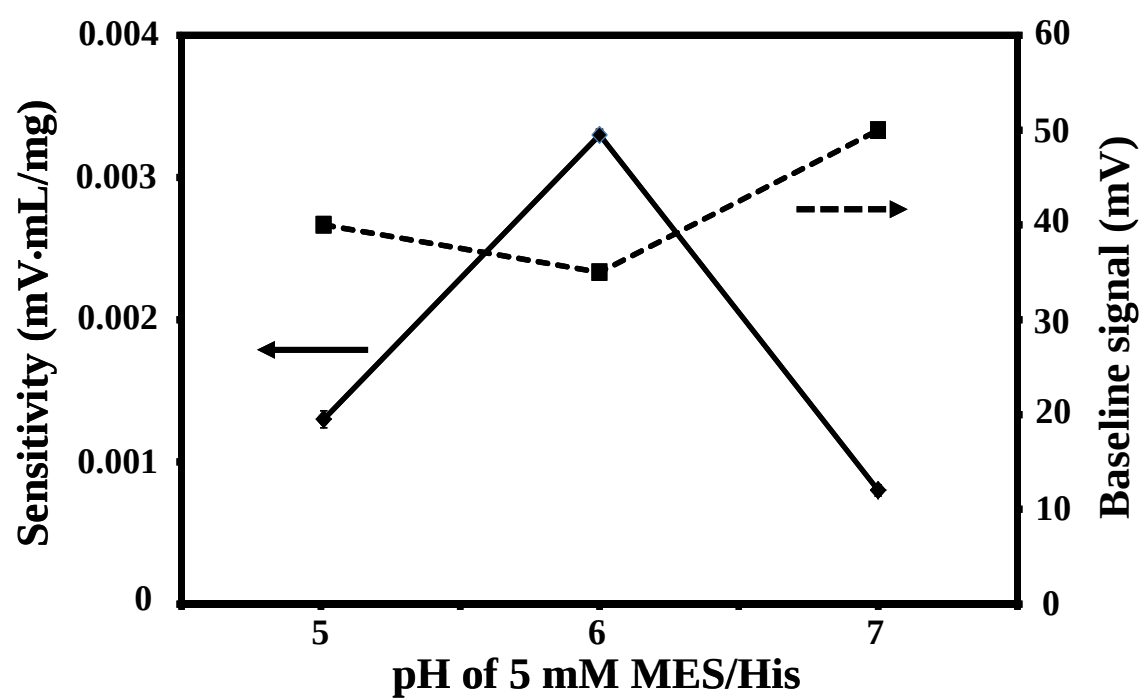


Fig. 5

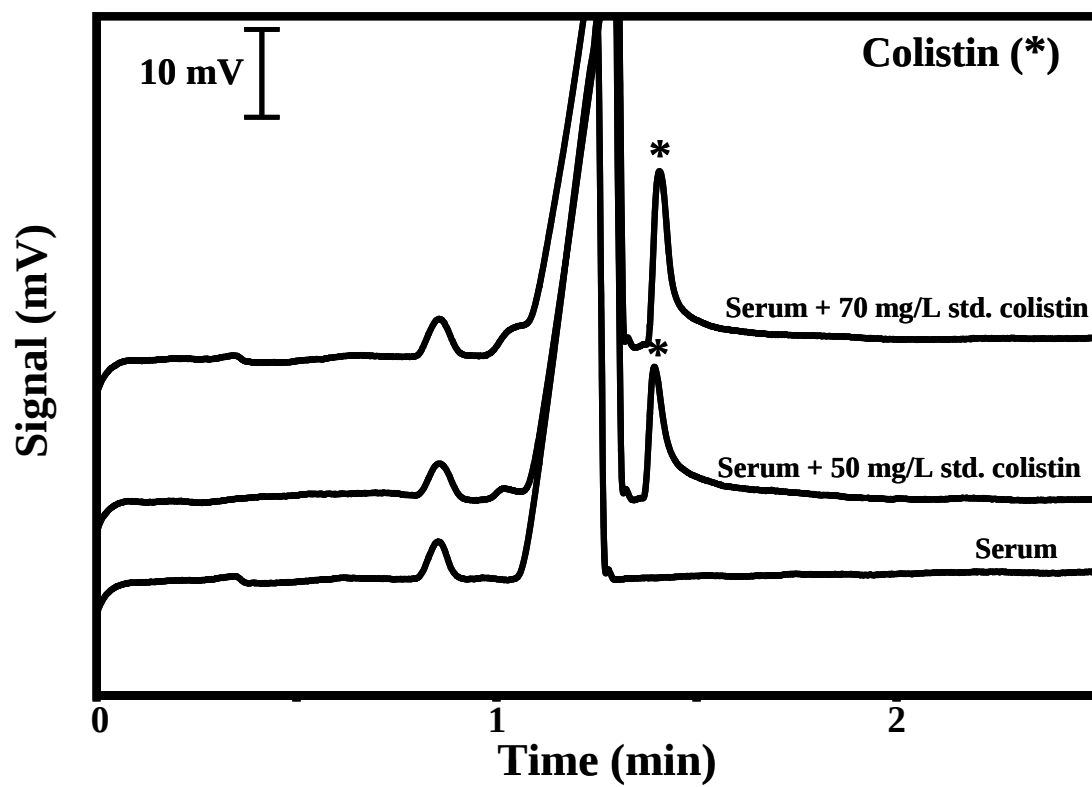


Fig. 6

**Table 1** Repeatability of migration times ( $t_m$ ) and peak areas of colistin from hydrodynamic and electrokinetic injections (5 replicate injections).

| Sample introduction      | $t_m$ (min)     |      | Peak area (mV.s) |      |
|--------------------------|-----------------|------|------------------|------|
|                          | Mean $\pm$ SD   | %RSD | Mean $\pm$ SD    | %RSD |
| Hydrodynamic injection   | 1.47 $\pm$ 0.03 | 3.40 | 0.19 $\pm$ 0.01  | 5.37 |
| Electrokinetic injection | 1.49 $\pm$ 0.03 | 2.31 | 0.29 $\pm$ 0.01  | 4.53 |

**Table 2** Intra-day and inter-day precisions for migration time and peak area of 50 mg/L standard colistin (mean  $\pm$ SD (%RSD)).

|                      | Intra-day              | Inter-day              |
|----------------------|------------------------|------------------------|
| Migration time (min) | 1.58 $\pm$ 0.06 (4.12) | 1.54 $\pm$ 0.08 (5.07) |
| Peak area (mV.s)     | 0.11 $\pm$ 0.01 (7.34) | 0.11 $\pm$ 0.01 (5.09) |

**Table 3** Quantification of colistin, percent recovery and lable claim for pharmaceutical sample analysis.

| Sample | FI-CE with C <sup>4</sup> D        |                    | Label claim<br>(mg/kg) |
|--------|------------------------------------|--------------------|------------------------|
|        | Quantification<br>(mg/kg) $\pm$ SD | %Recovery $\pm$ SD |                        |
| S1     | 18,596 $\pm$ 222                   | 93.7 $\pm$ 5.0     | 19,510                 |
| S2     | 24,953 $\pm$ 857                   | 98.6 $\pm$ 6.8     | 24,388                 |
| S3     | 17,887 $\pm$ 47                    | 98.1 $\pm$ 6.5     | 19,510                 |

**Fig. 1** Chemical structure of colistin.

**Fig. 2** Simple diagram of the in-house FI-CE-C<sup>4</sup>D system (IV = injection valve, w= waste, HV = high voltage).

**Fig. 3** Separations of colistin observed from sample introduction using (A) hydrodynamic injection and (B) electrokinetic injection. FI condition; flow rate 1 mL/min, sample loop 20 µL, CE condition; 5 mM MES/His pH 6, 10 kV separation voltage.

**Fig. 4** Electropherograms of 50 mg/L standard colistin obtained from various concentrations of MES/His using electrokinetic injection. Other conditions are in Fig. 3.

**Fig. 5** Sensitivity and baseline signal of colistin obtained from various pHs of 5 mM MES/His using electrokinetic injection. Other conditions are in Fig. 3.

**Fig. 6** Electropherograms of blank serum and spiked serum. The conditions are in Fig. 3 (electrokinetic injection).

**Table 1** Repeatability obtained from hydrodynamic injection and electrokinetic injection (5 replicate injections)

**Table 2** Intra-day and inter-day precisions for migration time and peak area (mean ±SD (%RSD)) of 50 mg/L standard colistin

**Table 3** Quantification of colistin, percent recovery and label claim for pharmaceutical sample analysis.