



รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการการแยกสารที่มีประสิทธิภาพสูงในอะพอลารีอิเล็กโตรโครมาโทกราฟีและ
ไมโครไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโทกราฟีโดยใช้เฟสอยู่กับที่ประเภทมอนอลิท

รองศาสตราจารย์ ดร. ธรรมนุญ หนูจักร

มิถุนายน 2553

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการการแยกสารที่มีประสิทธิภาพสูงในอะพอลารีอิเล็กโตรโครมาโทกราฟีและ
ไมโครไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโทกราฟีโดยใช้เฟสอยู่กับที่ประเภทมอนอลิท

รองศาสตราจารย์ ดร. ธรรมนุญ หนูจักร
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

ชื่อโครงการ: การแยกสารที่มีประสิทธิภาพสูงในอะฟิลาไรอิเล็กโตรโครมาโทกราฟีและ

ไมโครไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีโดยใช้เฟสอยู่กับที่ประเภทมอนอลิธ

รหัสโครงการ: RMU5080054

ระยะเวลาโครงการ: 26 มิ.ย. 50 ถึง 24 มิ.ย. 53

ชื่อนักวิจัย: รองศาสตราจารย์ ดร. ธรรมนุญ หนูจักร

อีเมล: thumnoon.n@chula.ac.th

สถาบัน: ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาค่าความจำเพาะของการแยกสารและรีเทนชันในเทคนิคการแยกสารด้วยอะฟิลาไรขนาดไมโครเมตรของเทคนิคอะฟิลาไรอิเล็กโตรฟอริซิส (CE) และไมโครไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (μHPLC) เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพของการแยกสารที่ดี

ได้เปรียบเทียบค่าจำเพาะการแยกของเฟสคงที่สำหรับสารประกอบกลุ่มแอลกอฮอล์ในรีเวิร์สเฟส μHPLC โดยใช้ซิลิกามอนอลิธอะฟิลาไรคอลลัมน์ที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยหมู่พอลิออกตะเดคซิล (ODM) และหมู่ C18 (ODS) พบว่าสารทดสอบอนุพันธ์เบนซีนที่มีหมู่แทนที่เป็นแอลกอฮอล์รีเทนชันบน ODM ได้ดีกว่าทั้งในเฟสเคลื่อนที่ที่เป็นเมทานอล/น้ำ และอะซิโตไนไตรล์/น้ำ ค่าจำเพาะการแยกสารสำหรับสารประกอบกลุ่มแอลกอฮอล์บน ODM มีค่ามากกว่าบน ODS ทั้งนี้เนื่องจากอันตรกิริยาที่เป็น dispersive ที่มากกว่าโดยหมู่พอลิออกตะเดคซิลที่หนาแน่นกว่าบนคอลลัมน์ ODM ที่เป็นการเคลือบแบบพอลิเมอร์ รวมทั้งผลของหมู่คาร์บอนิลในสายโซ่ของ ODM นอกจากนี้คอลลัมน์ ODM ยังเป็นทางเลือกที่ดีกว่าคอลลัมน์ ODS สำหรับแยกสารกลุ่มคลอโรฟีนอล

ได้พบว่ารีเทนชันอินเดกซ์ (I) เป็นตัวแปรที่ดีกว่ารีเทนชันแฟกเตอร์ (k) สำหรับเปรียบเทียบแอฟฟินิตีสัมพัทธ์ของอนุพันธ์เบนซีนที่มีหมู่แทนที่สองหมู่ในไมโครอิมัลชันอิเล็กโตรโครมาโทกราฟี (MEEKC) และไมเซลล์อิเล็กโตรโครมาโทกราฟี (MEKC) ทั้งนี้เนื่องจากค่า I ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว ค่า I ที่ได้จาก MEEKC และ MEKC อาจใกล้เคียงกันหรือแตกต่างกันขึ้นอยู่กับหมู่แทนที่ นอกจากนี้ทฤษฎีหลักการเดิมยังสามารถใช้ทำนายค่า I ของเบนซีนที่มีหมู่แทนที่สองหมู่ต่างจากที่มีหมู่แทนที่สองหมู่เหมือนกัน อย่างไรก็ตามผลของอิเล็กโตรนิคและ/หรืออันตรกิริยาภายในโมเลกุลอาจทำให้ค่าจากการทดลองแตกต่างจากการทำนาย

ได้นำเสนอสมการและแบบจำลองทางทฤษฎีสำหรับค่าจำเพาะการแยกใน MEKC (α_{MEKC}) เพื่ออธิบายการเปลี่ยนแปลงการแยกและลำดับการเคลื่อนที่ของสารที่มีประจุใน MEKC ซึ่ง α_{MEKC} สัมพันธ์กับตัวแปรที่ไม่มีหน่วยของค่าความจำเพาะของ μ (ความสามารถในการเคลื่อนที่) ในอะฟิลาไรอิเล็กโตรฟอริซิส (α_{CZE}) และค่าความจำเพาะของรีเทนชันใน MEKC (α_k) โดยที่ α_{CZE} นิยามเป็นอัตราส่วนของ μ ใน CZE และ α_k นิยามเป็นอัตราส่วนของค่า k ใน MEKC สำหรับสองสารมีประจุ เมื่อใช้อัลคิลพาราเบนเป็นสารทดสอบ พบว่า α_{MEKC} จากการทดลองสอดคล้องกับค่าทำนายจากแบบจำลองทางทฤษฎี

จากแบบจำลองทางทฤษฎีของ MEKC ได้นำเสนอสมการและแบบจำลองทางทฤษฎีของค่าจำเพาะการแยกในไฮโดรเจลอิเล็กโตรโครมาโทกราฟี (α_{CD}) ที่สัมพันธ์กับตัวแปรที่ไม่มีหน่วยของค่าจำเพาะ ได้แก่ α_{CZE} และ binding selectivity (K) เพื่ออธิบายการเปลี่ยน α_{CD} สำหรับสารสองชนิดที่มีประจุและใช้ไฮโดรเจลอิเล็กโตรนิคที่ไม่มีประจุ โดยนิยาม K เป็นอัตราส่วนของ binding constant จากการแยกอนุพันธ์กรดเบนโซอิกและกรดฟีนอกซี ด้วย β -CD พบว่าการเปลี่ยนแปลงค่า α_{CD} จากการทดลองสอดคล้องกับค่า α_{CD} จากทางทฤษฎี

ในการเปรียบเทียบค่าจำเพาะการแยกใน CZE, MEKC และ CD-EKC สำหรับคู่ของสารที่เป็นมอนอคลอโรเบนโซเอตกับมอนอเมทิลเบนโซเอต (C^-/M^-) หรือคู่ของไดคลอโรเบนโซเอตกับไดเมทิลเบนโซเอต (DC^-/DM^-) ซึ่งมี μ ใกล้เคียงกันนั้น พบว่าค่า α_{CD} มีค่ามากกว่า α_{CZE} และ α_{MEKC} ทั้งนี้เนื่องจาก CD มี K สูง นอกจากนี้ได้ทดลองแยกกรดฟีนอกซี 10 ชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง 2,4-DB/MCPB และ 2,4-D/MCPA ที่มีหมู่แทนที่บนวงเบนซีนแตกต่างกันเพียงหมู่คลอโรและหมู่เมทิลเท่านั้น พบว่าสามารถแยกกรดฟีนอกซีได้ในคราวเดียวกันได้โดยใช้บัฟเฟอร์ของ CD-EKC ประกอบด้วย 3 mM DM- β -CD ดังนั้น CD-MEKC เป็นทางเลือกที่ดีกว่า CZE และ MEKC สำหรับแยกสารประกอบที่มีหมู่แทนที่ที่แตกต่างกันเพียงหมู่คลอโรและเมทิล

คำสำคัญ: อะฟิลาไรอิเล็กโตรฟอริซิส, ไมโครไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี, ค่าความจำเพาะของการแยกสาร, มอนอลิธ, รีเทนชัน,

Project Title: High Efficiency Separation in Capillary Electrochromatography and

Micro High-Performance Liquid Chromatography Using Monolithic Stationary Phase

Project Code: RMU5080054

Project Period: 25th June 2007 to 24th June 2010

Investigator: Associate Professor Thumnoon Nhujak, Ph.D. **Email:** thumnoon.n@chula.ac.th

Affiliation: Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Abstract

In order to obtain high efficiency of microseparation in capillary electrophoresis (CE) and micro high-performance liquid chromatography (μ HPLC), selectivity and retention in these techniques were investigated.

Stationary phase selectivities for halogenated compounds in reversed-phase μ HPLC were compared using C18 monolithic silica capillary columns modified with poly(octadecyl methacrylate) (ODM) and octadecyl moieties (ODS). The preferential retention of halogenated benzenes on ODM was observed in methanol/water and acetonitrile/water mobile phases. Greater selectivities for halogenated compounds on ODM column were obtained, due to the greater dispersive interactions by more densely packed octadecyl groups on the ODM polymer coated column together with the contribution of carbonyl groups in ODM side chains. The ODM column also showed a better alternative to the ODS column for the separation of chlorophenols.

Retention index (I), rather than retention factor (k), was found to be a more reasonable parameter for comparison of the relative affinity of disubstituted benzenes in microemulsion electrokinetic chromatography (MEEKC) and micellar electrokinetic chromatography (MEKC), due to independent of I with the surfactant concentration. MEKC and MEEKC may give similar or different I values, depending on types of moieties. In addition, a group additive approach can be used to predict I for disubstituted benzenes with different moieties from the average observed I for the disubstituted benzenes with same moieties. However, electronic effects and/or intramolecular interaction may result in the different observed I from prediction.

Equations and theoretical models for MEKC separation selectivity (α_{MEKC}) were established to explain a change in separation and migration order of fully charged analytes, in which α_{MEKC} is related to the dimensionless values of electrophoretic mobility (μ) selectivity in capillary zone electrophoresis (α_{CZE}) and retention selectivity (α_k) in MEKC, and where α_{CZE} and α_k are defined as the ratio of μ in CZE and the ratio of k in MEKC for two charged analytes, respectively. Using four alkylparabens as test analytes, excellent agreement was found between the observed MEKC and the proposed α_{MEKC} models of test analytes in MEKC.

According to those of MEKC, equations and theoretical models of cyclodextrin-EKC selectivity (α_{CD}) related to the dimensionless values of selectivities, α_{CZE} and binding selectivity (κ), were also proposed in order to explain a change in α_{CD} for two charged analytes using neutral CD, where κ are defined as the ratio of binding constant. Using substituted benzoic acids and phenoxyacetic acid as test analytes with β -CD, the changes in the observed α_{CD} values were found to be in good agreement with the theoretical α_{CD} models.

In comparison of separation selectivities in CZE, MEKC and CD-EKC for a pair of monochlorobenzoates/monomethylbenzoates (C^-/M^-) or dichlorobenzoates/dimethylbenzoates (DC^-/DM^-), having similar μ , the higher α_{CD} than α_{CZE} and α_{MEKC} was obtained due to high κ . In addition, simultaneous separation of ten phenoxy acid herbicides, especially 2,4-DB/MCPB and 2,4-D/MCPA having the difference in chloro and methyl substituents on a benzene ring, was also obtained using the CD-EKC buffer containing 3.0 mM DM- β -CD. Therefore, in comparison with CZE and MEKC, CD-EKC can be used as the better alternative to separate compounds having the different substituents only by chloro and methyl groups.

Keywords: Capillary electrophoresis, High-Performance Liquid Chromatography
Separation selectivity, Monolith, Retention

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลงด้วยดี โดยได้รับการสนับสนุน คำแนะนำและความช่วยเหลือจากบุคคล และหน่วยงานดังต่อไปนี้

ขอขอบพระคุณอย่างยิ่งสำหรับแหล่งทุนสนับสนุนหลักจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ที่ให้ทุนเพิ่มขีดความสามารถด้านการวิจัยของ อาจารย์ในสถาบันอุดมศึกษา (RMU5080054) และขอบคุณแหล่งทุนเสริมเพิ่มเติม ได้แก่ ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช) โครงการมหาวิทยาลัยนำร่องจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และโครงการมหาวิทยาลัยจาก สกอ.

ขอขอบคุณกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้การสนับสนุนหน่วยปฏิบัติการวิจัยการแยกสารและโครมาโทกราฟี ขอขอบคุณโครงการกระตุ้นเศรษฐกิจจากรัฐบาลไทย (SP2) ภายใต้โครงการก่อตั้งศูนย์เชี่ยวชาญทางนวัตกรรมอาหาร ผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพและการเกษตร สำหรับทุนสนับสนุนด้านเครื่องมือการวิจัย ขอขอบคุณการสนับสนุนจากศูนย์เชี่ยวชาญทางปิโตรเลียม ปิโตรเคมี และวัสดุขั้นสูง และขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับสถานที่เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐชนน ลิขิตพัฒน์ ไพบูลย์ อาจารย์ ดร.มนพิชา ศรีสะอาด Professor Nobuo Tanaka และ Associate Professor Tohru Ikegami ที่ให้คำแนะนำและคำปรึกษาที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

ขอขอบคุณนิสิตปริญญาเอก นางสาวสุรา สุนทรตันติกุล และนางสาวชนิดา พวงพิลา และนิสิตปริญญาโท นางสาวศิริพร อังคณาศิริพร สำหรับผู้ช่วยวิจัยของโครงการวิจัยย่อยต่างๆ และขอบคุณลูกศิษย์อื่นๆ ที่ให้ความช่วยเหลืออื่นๆ

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณบิดามารดาและพี่น้องทุกคนเป็นอย่างสูงที่เป็นกำลังใจตลอดเวลาในการทำงานวิจัย

สารบัญ

บทคัดย่อ	ก
Abstract	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	ฉ
สารบัญตาราง	ญ
สัญลักษณ์และคำย่อ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การเตรียมและทดสอบประสิทธิภาพของอะพอลารีคอลลอยด์ประเภทซิลิกาอนอติค และหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับแยกสารกลุ่มฟีนอกซีแอซิด และบิสฟีนอลเอ ไดโกล ซิลอีเทอร์ บิสฟีนอลเอฟไดโกลซิลอีเทอร์ และอนุพันธ์	13
2.1 คำนำ	13
2.2 การทดลอง	16
2.3 ผลการทดลองและวิจารณ์	19
2.4 สรุปผลการทดลอง	32
เอกสารอ้างอิง	33
บทที่ 3 การเปรียบเทียบค่าจำเพาะการแยกสารของอะพอลารีคอลลอยด์ประเภทอนอติคที่ ปรับปรุงพื้นผิวด้วยพอลิออกตะเดคซิลเมทิลและหมู่พอลิออกตะเดคซิลสำหรับ การแยกสารประกอบกลุ่มเฮโลเจนในลิควิดโครมาโทกราฟีแบบรีเวอร์สเฟส	36
3.1 คำนำ	36
3.2 การทดลอง	37
3.3 ผลการทดลองและวิจารณ์	38
3.4 สรุปผลการทดลอง	46
เอกสารอ้างอิง	47
บทที่ 4 การเปรียบเทียบและการทำงานรีเทนชันของสารประกอบแอโรแมติกที่มี หมู่แทนที่สองหมู่ในอะพอลารีอิลิกโครมาโทกราฟี	49
4.1 คำนำ	49
4.2 การทดลอง	51
4.3 ผลการทดลองและวิจารณ์	52
4.4 สรุปผลการทดลอง	60
เอกสารอ้างอิง	61

บทที่ 5	แบบจำลองทางทฤษฎีของค่าจำเพาะการแยกสำหรับสารที่มีประจุ	64
	ในไมเซลล์ารีโอเล็กโตรโครมาโทกราฟี	
5.1	คำนำ	64
5.2	การทดลอง	66
5.3	ผลการทดลองและวิจารณ์	67
5.4	สรุปผลการทดลอง	75
	เอกสารอ้างอิง	75
บทที่ 6	แบบจำลองทางทฤษฎีของค่าจำเพาะการแยกสำหรับสารที่มีประจุ	78
	ในเทคนิคไฮโครเด็กซ์ทรินอเล็กโตรโครมาโทกราฟี	
6.1	คำนำ	78
6.2	การทดลอง	79
6.3	ผลการทดลองและวิจารณ์	80
6.4	สรุปผลการทดลอง	89
	เอกสารอ้างอิง	90
บทที่ 7	การเปรียบเทียบค่าจำเพาะการแยกในเทคนิคอะฟิลลารีโอเล็กโตรโฟรีซิสสำหรับสาร	92
	กลุ่มแอมโฟเทอริกแอซิดที่มีหมู่แทนที่เป็นคลอโรและเมทิล	
7.1	คำนำ	92
7.2	การทดลอง	93
7.3	ผลการทดลองและวิจารณ์	94
7.4	สรุปผลการทดลอง	107
	เอกสารอ้างอิง	108
บทที่ 8	บทสรุปและข้อเสนอแนะ	109
ภาคผนวก 1	ผลงานวิจัยตีพิมพ์ใน Journal of Chromatography A 1216 (2009), 5868-5874	115
ภาคผนวก 2	ผลงานวิจัยตีพิมพ์ใน Electrophoresis 31 (2010), 695-701	123
ภาคผนวก 3	ผลงานวิจัยตีพิมพ์ใน Electrophoresis 32 (2011), 203-209	131
ภาคผนวก 4	ผลงานวิจัยเตรียมส่งตีพิมพ์ในวารสาร	139
ภาคผนวก 5	ผลงานวิจัยเตรียมส่งตีพิมพ์ในวารสาร	146
ภาคผนวก 6	สรุป Output จากโครงการวิจัย	156

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1 ภาพตัดขวางของ packed และ monolithic column	3
1.2 การแยกสารของเทคนิค CE ประเภทต่างๆ (a) CZE, (b) MEKC, (c) MEEKC และ (d) CD-EKC	4
1.3 โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวและไมเซลล์	6
1.4 หยคน้ำมันที่มีสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวรวมมาล้อมรอบ	6
1.5 โซโคเลเด็กทรินซมีน้ำตาล 6, 7, 8 หน่วย สำหรับ α -, β - และ γ -CD ตามลำดับ โดยที่ x, y, z เป็น H สำหรับ native CD และ หมู่แทนที่สำหรับอนุพันธ์ เช่น หมู่เมทิล เป็นต้น	7
2.1 สูตรโครงสร้างของสารในกลุ่มฟีนอกซีแอซิด	13
2.2 สูตรโครงสร้างของ BADGEs และ BFDGEs	14
2.3 ส่วนประกอบอย่างง่ายของเครื่อง HPLC	16
2.4 ส่วนประกอบอย่างง่ายของเครื่อง μ HPLC แบบ split flow/injection	16
2.5 ค่ารีเทนชันแฟกเตอร์ของสารทดสอบที่ความเร็วเชิงเส้นต่างๆ ของเฟสเคลื่อนที่ (a) 80% เมทานอล และ (b) 80% อะซิโตนไนโตรล์ โดยที่ในรูป a1 และ b1 ใช้คอลัมน์ ODS100 (ยาว 40 cm) และ ODS200 (ยาว 30 cm) และสารทดสอบเป็น โทลูอิน (สัญลักษณ์โปร่ง) และเฮกซิลเบนซีน (สัญลักษณ์ทึบ) ส่วนรูป a2, a3, b2 และ b3 ใช้คอลัมน์ ODS200 (ยาว 40 cm) และ ODM200 (40 cm) และสารทดสอบเป็น โทลูอิน (a2, b2) และเพนทิลเบนซีน (a3, b3)	22
2.6 ความสัมพันธ์ระหว่าง $\log k$ กับ z ที่ใช้เฟสเคลื่อนที่ ($u = 1.0$ mm/s) ที่เป็น (a) 80% เมทานอล และ (b) 80% อะซิโตนไนโตรล์ สำหรับคอลัมน์ ODS100, ODS200 และ ODM200	23
2.7 van Deemter plot สำหรับคอลัมน์ ODS100 และ ODS200 ยาว 40 cm ที่ใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็น (a) 80% เมทานอล และ (b) 80% อะซิโตนไนโตรล์ โดยที่สารทดสอบเป็นยูราซิล (a1, b1), โทลูอิน (a2, b2), เฮกซิลเบนซีน (a3, b3)	24
2.8 van Deemter plot สำหรับคอลัมน์ ODS200 ยาว 40 cm และ ODM200 ยาว 30 cm ที่ใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็น (a) 80% เมทานอล และ (b) 80% อะซิโตนไนโตรล์ โดยที่สารทดสอบเป็นยูราซิล (a1, b1), โทลูอิน (a2, b2), เพนทิลเบนซีน (a3, b3)	25
2.9 โครมาโทแกรมการแยกสารมาตรฐานของ phenoxy acids และ acidic herbicides ด้วย conventional HPLC โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็น อะซิโตนไนโตรล์:สารละลาย	27

- กรดอะซิติกที่ pH 2.5 (B :A) ด้วย gradient profile ที่ช่วงเวลาต่างๆปรับ % B
 ดังนี้ 0-1.5 นาที (15% B), 2.0 นาที (20% B), 8 นาที (30% B), 18 นาที (35% B),
 22 นาที (38% B), 25-30 นาที (60% B) ภาวะอื่นๆของ HPLC: เครื่อง HPLC
 Agilent 1100 series, คอลัมน์ เป็น eclipse XDB-C8 ขนาด 5 μ m, 4.6 mm),
 อุณหภูมิ 30 °C, อัตราไหล 1 mL/min, ตรวจวัดด้วย UV photodiode array และ
 แสดงผลที่ความยาวคลื่น 280 nm, ปริมาณสารที่ฉีด 10 μ L
- 2.10 โครมาโทแกรมการแยกสารมาตรฐานของ phenoxy acids และ acidic herbicides 27
 บางชนิดด้วย conventional HPLC โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น เมทานอล: สารละลาย
 กรดอะซิติกที่ pH 2.5 (B:A) ด้วย gradient profile ที่เวลาต่างๆปรับ % B ดังนี้ 0-
 2 นาที (20% B), 4 นาที (40% B), 12 นาที (50% B), 12.1-35 นาที (55% B)
- 2.11 โครมาโทแกรมของ phenoxy acid herbicides ด้วย μ HPLC โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ 29
 เป็น 0.1% formic acid ในน้ำ:0.1% formic acid ในเมทานอล (A:B) ด้วย gradient
 elution ดังนี้ a) 20-80%B (0-40 min) และ b) 45-44%B (0-3 min), 55%B (3-25
 min), 55-60%B (25-26 min), 60%B (26-30 min), 60-80%B (30-35 min),80%B
 (35-40 min) ภาวะอื่นๆ : คอลัมน์ ODS200a (ยาว 40 cm) และอัตราไหล 0.351
 mL/min ($u = 2.5$ mm/s และ split ratio ประมาณ 75:1) และตรวจวัดที่ความยาว
 คลื่น 280 nm
- 2.12 โครมาโทแกรมของ phenoxy acid herbicides ด้วย μ HPLC โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ 30
 เป็น 0.1% กรดฟอร์มิกในน้ำ:0.1% กรดฟอร์มิกในอะซิโตนไทรล์ (A:B) ด้วย
 gradient elution ดังนี้ a) 20-80%B (0-40 min) และ b) 32-40%B (0-3 min),
 40%B (3-18 min), 40-42%B (18-19 min), 42%B (19-25 min), 42-60%B (25-30
 min) และ 60%B (30-40min) ภาวะอื่นๆ : คอลัมน์ ODS200 (ยาว 40 cm) และ
 อัตราไหล 0.369 mL/min ($u = 2.5$ mm/s และ split ratio 78:1) และตรวจวัดที่
 ความยาวคลื่น 280 nm
- 2.13 โครมาโทแกรมของ BADGE, BFDGE และอนุพันธ์ ด้วย μ HPLC โดยใช้ภาวะ 31
 แยกดังนี้: เฟสเคลื่อนที่เป็น น้ำ:เมทานอล (A:B) ด้วย gradient elution ดังนี้
 50%B (0-25 min), 50-80%B (25-45 min)
 ภาวะอื่นๆ : คอลัมน์ ODS200 ยาว 40 cm และอัตราไหล 0.426 mL/นาที ($u = 2.5$
 mm/s และ split ratio ประมาณ 90:1) และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 220 nm
- 2.14 โครมาโทแกรมของ BADGE, BFDGE และอนุพันธ์ด้วย μ HPLC โดยใช้ 31
 ภาวะการแยกดังนี้: เฟสเคลื่อนที่เป็น น้ำ:อะซิโตนไทรล์ (A:B) ด้วย gradient
 elution ดังนี้ 40-50%B (0-2 min), 50 (2-3 min), 50-60%B (3-5 min), 60%B (5-

- 15 min) ภาวะอื่นๆ : คอลัมน์ ODS200b (ยาว 40 cm) และอัตราไหล 0.344 mL/min ($u = 2.5$ mm/s และ split ratio ประมาณ 73:1) และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 220 nm
- 3.1 โครมาโทแกรมของ monohalogenated benzenes และ monoalkylbenzenes โดยใช้คอลัมน์ ODM และ ODS ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 200 μ m ยาว 28 cm และใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็น (a) 70% MeOH และ (b) 70% ACN และภาวะอื่นๆ ได้แก่ $u = 1.0$ mm/s ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 214 nm และควบคุมอุณหภูมิที่ 30 $^{\circ}$ C 40
 - 3.2 ค่ารีเทนชันแฟกเตอร์ของ chlorobenzene และ toluene ในเฟสเคลื่อนที่ที่มีอัตราส่วนตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ ในช่วง 50-80% โดย a) MeOH และ b) ACN บนคอลัมน์ ODM และ ODS 41
 - 3.3 ค่า $\log k$ ของ monosubstituted benzenes บนคอลัมน์ ODM เทียบกับค่า $\log k$ ของสารบนคอลัมน์ ODS และใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็น (a) 70% MeOH และ (b) 70% ACN 41
 - 3.4 ความสัมพันธ์ระหว่าง $\log \alpha(\text{CH}_2)$ กับ % organic solvent ในเฟสเคลื่อนที่ในช่วง 50-80% 41
 - 3.5 อัตราส่วน selectivity ของสารบน ODM เทียบกับ ODS โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีอัตราส่วนของ organic solvent ในช่วง 50-80% โดย a) MeOH และ b) ACN ซึ่งจุดเทียบเป็นการเปรียบเทียบระหว่างสารทดสอบที่เป็นอัลคิลเบนซีนที่มีหมู่ CH_2 ต่างกัน 1 หน่วย และ จุดโปร่งเป็นการเปรียบเทียบระหว่างสารทดสอบที่เป็นแฮโลเจนเบนซีนเทียบกับโทลูอิน 43
 - 3.6 โครมาโทแกรมของ dihalogenated benzenes และ dialkylbenzenes โดยใช้คอลัมน์ ODM และ ODS ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 200 μ m ยาว 28 cm และใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็น (a) 70% MeOH และ (b) 70% ACN 44
 - 3.7 ค่า $\log k$ ของ disubstituted benzenes บนคอลัมน์ ODM เทียบกับค่า $\log k$ ของสารบนคอลัมน์ ODS และใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็น (a) 70% MeOH และ (b) 70% ACN 45
 - 3.8 โครมาโทแกรมของ chlorophenols ทั้งหมด 17 ชนิด โดยใช้คอลัมน์ ODM และ ODS ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 200 μ m ยาว 28 cm และใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็น (a) 70% MeOH และ (b) 70% ACN 46
 - 4.1 กราฟแสดงค่า $\log k$ (a และ c) และ I (b และ d) ของสารประกอบเบนซีนที่มีหมู่แทนที่สองหมู่ที่ได้จาก MEEKC เปรียบเทียบกับ MEKC 54
 - 4.2 กราฟเปรียบเทียบค่า I จากการทำนายและการทดลองของอนุพันธ์เบนซีนที่มีหมู่ 58

- แทนที่สองหมู่ต่างกัน (เส้นตรงปะแสดงสมการ $Y = X$)
- 5.1 แบบจำลองทางทฤษฎีของ α_{MEKC} ที่ได้จากการทำนายสำหรับสารที่มีประจุสองตัว 70
 คำนวณโดยใช้สมการที่ 5.7 และข้อมูลในตารางที่ 5.1 ตัวแปร a-e แทนค่าของ α_k
 สำหรับ (a) 1.2, 1.4, 1.7, 2.2 และ 3.3 ตามลำดับ (b) 1.0, 1.2 และ 1.5 ตามลำดับ
 และ (c) 1.0, 1.6, 3.2, 4.8 และ 6.4 ตามลำดับ
 - 5.2 อิเล็กโตรฟีโรแกรมของพาราเบนภายใต้ภาวะ (a) 0 CZE, (b) 20, (c) 40, และ 60 72
 mM SDS ใน 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ที่ปรับ pH ด้วย 1.0 M NaOH ภาวะอื่น ๆ
 ของ CE: uncoated fused-silica capillary 50 μm i.d. $\times$ 40.2 cm (30 cm ถึงเครื่อง
 ตรวจวัด) อุณหภูมิคอลัมน์ 25 $^{\circ}\text{C}$, ศักย์ไฟฟ้า 15 kV, ตรวจวัดที่ 220 nm การ
 บรรจุสารแบบอัดความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 3 วินาที
 - 5.3 α_{MEKC} ที่ได้จากการทดลอง (สัญลักษณ์) และจากการทำนาย (เส้นทึบ) สำหรับสาร 74
 ที่มีประจุสองตัวใน MEKC (a) ที่ [SDS] ต่าง ๆ (b) ที่ค่า k_1 ต่าง ๆ สำหรับค่าที่ได้
 จากการทำนายคำนวณโดยใช้สมการที่ 5.7 และข้อมูลในตารางที่ 5.2
 - 6.1 แบบจำลองของค่าจำเพาะการแยกด้วย CD-EKC สำหรับสารที่มีประจุ ซึ่ง 84
 คำนวณได้จากสมการที่ 6.2 และข้อมูลต่างๆ ในตารางที่ 6.1 และ a ถึง e หมายถึง
 ค่า binding selectivity (k) สำหรับรูป (A) มีค่าเท่ากับ 1.2, 2.4, 3.5, 4.9 และ 6.8
 ตามลำดับ, รูป (B) มีค่าเท่ากับ 1.1, 1.4 และ 2.0 ตามลำดับ และรูป (C) มีค่า
 เท่ากับ 1.25, 2.3, 3.5, 4.8 และ 6.2 ตามลำดับ
 - 6.2 อิเล็กโตรฟีโรแกรมของอนุพันธ์กรดเบนโซอิกและกรดฟีนอกซี โดยใช้บัฟเฟอร์ 87
 ที่ประกอบด้วย (A) 0 mM (CZE), (B) 2 mM และ (C) 12 mM β -CD ใน 10 mM
 บอเรตบัฟเฟอร์ที่ pH 9.2 และภาวะอื่นๆ ของ CE ประกอบด้วย uncoated fused-
 silica capillary ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 50 μm ความยาว 40.2 cm (30 cm
 ถึงเครื่องตรวจวัด), ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 $^{\circ}\text{C}$, ศักย์ไฟฟ้า 15 kV, ตรวจวัดที่ความ
 ยาวคลื่น 214 nm และบรรจุสารด้วยความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 3 วินาที
 - 6.3 ค่าจำเพาะการแยกสารด้วย CD-EKC ที่ได้จากการทดลอง (สัญลักษณ์) และที่ได้ 89
 จากการทำนาย (เส้น) สำหรับการแยกสารที่มีประจุด้วย β -CD ช่วงความเข้มข้น
 0-16 mM ที่ (A) $K_2\text{C}$ ต่างๆ และ (B) ความเข้มข้น β -CD ต่างๆ โดยค่าที่ได้จาก
 การทำนายได้จากการคำนวณด้วยสมการที่ 6.2
 - 7.1 อิเล็กโตรฟีโรแกรมของอนุพันธ์ benzoic acid ที่มีหมู่แทนที่เป็นคลอโรหรือ 96
 เมทิลในแต่ละไอโซเมอร์ ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CZE ที่มี BGE
 ประกอบด้วย 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2 และไม่มีการเติมตัวทำละลาย
 อินทรีย์

- 7.2 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ MeOH ต่อ α และ R_s ของ C^- และ M^- ใน CZE (A1, B1) และ MEKC (A2, B2): (A1) mobility selectivity in CZE (α_{CZE}), (B1) resolution in CZE ($R_{s, CZE}$), (A2) mobility selectivity in MEKC (α_{MEKC}) and (B2) resolution in MEKC ($R_{s, MEKC}$) โดย BGE ใน CZE ประกอบด้วย 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2 และ MEKC ประกอบด้วย 40 mM SDS และ 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2 98
- 7.3 การแยก C^- และ M^- ทุกไอโซเมอร์ในคราวเดียวกันด้วยเทคนิค CE แบบต่างๆ: 104
 (A) CZE ประกอบด้วย 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2, (B) MEKC ประกอบด้วย 40 mM SDS และ 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2, (C) CD-EKC ประกอบด้วย 20 mM α -CD และ 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2, (D) CD-EKC ประกอบด้วย 16 mM β -CD และ 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2, และ (E) CD-EKC ประกอบด้วย 5 mM DM- β -CD และ 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2 สำหรับ C^-/M^- ; (F) CD-EKC ประกอบด้วย 60 mM α -CD และ 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2, (G) CD-EKC ประกอบด้วย 12 mM β -CD และ 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2, และ (H) CD-EKC ประกอบด้วย 40 mM DM- β -CD และ 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2 สำหรับ DC^-/DM^- [2,3DC $^-$ (1C), 2,4DC $^-$ (2C), 2,5DC $^-$ (3C), 2,6DC $^-$ (4C), 3,4DC $^-$ (5C), 3,5DC $^-$ (6C), 2,3DM $^-$ (1M), 2,4DM $^-$ (2M), 2,5DM $^-$ (3M), 2,6DM $^-$ (4M), 3,4DM $^-$ (5M), 3,5DM $^-$ (6M)]
- 7.4 สูตรโครงสร้างของสารกลุ่ม phenoxy acid herbicides 106
- 7.5 การแยก phenoxy acid herbicides ด้วยเทคนิค CE แบบต่างๆ (A) CZE ประกอบด้วย 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2, (B) MEKC ประกอบด้วย 40 mM SDS และ 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2, (C) CD-EKC ประกอบด้วย 2 mM α -CD และ 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2 (D) CD-EKC ประกอบด้วย 3 mM DM- β -CD และ 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2 107

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้าที่
2.1	ค่า H , $\alpha(\text{CH}_2)$, และความดันในการขับเคลื่อนเฟสเคลื่อนที่	23
4.1	ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างค่า $\log k$ และ z ที่หาค่าได้จาก homologous series ของอัลคิลเบนซีนในเทคนิค MEEKC และ MEKC	53
4.2	ค่า $\log K_{ow}$ ที่ได้จากการทำนายและค่าอ้างอิงของอนุพันธ์เบนซีนที่มีหมู่แทนที่สองหมู่ใน MEKC และ MEEKC	56
4.3	ค่าการทดลองและการทำนายของ $\log k$ สำหรับเคอร์คูมินอย์ที่ประกอบด้วยหมู่แทนที่ R ต่างกัน ($-\text{OCH}_3$, $-\text{H}$)	59
4.4	ค่าการทดลองและการทำนายของ $\log k$ สำหรับ BADGE และ BADGE.HCl ที่ประกอบด้วยหมู่แทนที่ R ต่างกัน	60
5.1	แสดง แบบจำลองทางทฤษฎี ของ separation selectivity ใน MEKC (α_{MEKC})	68
5.2	Mobility selectivity (α_{CZE}), retention selectivity (α_k), retention factor (k_1), selectivity ratio (ρ), และชนิดของแบบจำลอง α_{MEKC}	73
6.1	ประเภทของแบบจำลองของ α_{CD}	83
6.2	ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร (μ , $10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$), ค่าจำเพาะการแยกใน CZE (α_{CZE}), binding constant (K , M^{-1}), binding selectivity (κ), selectivity ratio (ρ), อัตราส่วนของ $\mu_{0,2}/\mu_{\infty,2}$ (β), อัตราส่วนของ $\mu_{\infty,1}/\mu_{\infty,2}$ (γ) และแบบของแบบจำลอง α_{CD} สำหรับสารทดสอบ	88
7.1	Mobilities (μ), mobility selectivities (α_{CZE} หรือ α_{MEKC}) และ retention selectivities (α_k) สำหรับ C^- , M^- , DC^- และ DM^- ใน CZE และ MEKC ที่ไม่มีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์	97
7.2	Mobilities (μ), binding constants (K), binding selectivities (κ), mobility selectivities ที่มากที่สุด ($\alpha_{\text{m, CD, max}}$) สำหรับ C^-/M^- , DC^-/DM^- , 2,4-DB/MCPB และ 2,4-D/MCPA ใน CD-EKC	102

สัญลักษณ์และคำย่อ

$\Delta\mu$	ความแตกต่างของค่า μ ของสาร
ΔP	ความดันในการขับเคลื่อนเฟสเคลื่อนที่ (back pressure)
α	Selectivity
α_{CD}	mobility selectivity ใน CD-EKC
α_{CZE}	mobility selectivity ใน CZE
α_k	retention selectivity
α_{MEKC}	mobility selectivity ใน MEKC
$\alpha(CH_2)$	methylene selectivity
α_m	mobility selectivity
β	อัตราส่วนของ $\mu_{0,1}/\mu_{mc}$
β_2	อัตราส่วนของ $\mu_{0,2}/\mu_{\infty,2}$
γ	อัตราส่วนของ $\mu_{\infty,1}/\mu_{\infty,2}$
κ	CD binding selectivity
μ	ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า (electrophoretic mobility)
μ_{∞}	ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารกับ CD
μ°	ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าที่ความแรงของไอออนิกใกล้ศูนย์ (absolute electrophoretic mobility)
μ_0	ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารใน CZE หรือสถานะที่ไม่มี CD
μ_{eff}	effective electrophoretic mobility
μ_{eo}	ความสามารถในการเคลื่อนที่ของอิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmotic mobility)
$\mu HPLC$	micro high-performance liquid chromatography
v_{eo}	ความเร็วอิเล็กโทรออสโมซิส
v_{mc}	ความเร็วของไมเซลล์
C	ความเข้มข้นของ CD ที่ไม่เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่ภาวะสมดุล
H	ความสูงของเพลตเชิงทฤษฎี (total theoretical plates height)
I	รีเทนชันอินเดก
k	รีเทนชันแฟกเตอร์ (retention factor)
K	ค่าคงที่ของการกระจาย (distribution constant)
K	binding constant ระหว่างสารกับ CD
K_{ow}	ค่าคงที่การกระจายตัวของออกทานอล-น้ำ
L	ความยาวคอลัมน์

N	ประสิทธิภาพการแยกของสาร (efficiency หรือ theoretical plates)
$\bar{N}$	ค่าเฉลี่ยของประสิทธิภาพของพีค (peak efficiency)
R_s	ค่าการแยกของสาร (resolution)
t_{eo}	ไมเกรชั่นไทม์ของ EOF marker
t_m	ไมเกรชั่นไทม์ของสาร
t_{mc}	ไมเกรชั่นไทม์ของเฟสคงที่เทียม marker
t_o	รีเทนชันไทม์ของ unretained compound
t_R	รีเทนชันไทม์ (retention time) ของสาร
u	ความเร็วเชิงเส้น (linear velocity)
V_{aq}	ปริมาตรของเอควียสเฟส
V_m	ปริมาตรของเฟสคงที่เทียม
z	จำนวนคาร์บอนในสายโซ่ตรงของอัลคิลเบนซีน
2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
2,4-DB	4-(2,4-dichlorophenoxy) butyric acid
2,4,5-T	(2,4,5-trichlorophenoxy) acetic acid
ACN	acetonitrile
AFF	acifluorfen
AIBN	α, α' -azobis-isobutyronitrile
BADGE	bisphenol-A-diglycidyl ether
BFDGE	bisphenol-F-diglycidyl ether
BGE	background electrolyte
BZ	alkylbenzene
CD	cyclodextrin
CD-EKC	cyclodextrin electrokinetic chromatography
CE	capillary electrophoresis
CPR	clopyralid
CZE	capillary zone electrophoresis
CEKC	capillary electrokinetic chromatography
CMC	critical micellar concentration
DB	1-phenyldodecane
DCB	dicamba
DM- β -CD	dimethyl- β -cyclodextrin

EKC	electrokinetic chromatography
EOF	electroosmotic flow
FXP	fluroxypyr
HPLC	high-performance liquid chromatography
LC	liquid chromatography
MCPA	4-Chloro-2-methylphenoxyacetic acid
MCPB	4-(2-methyl-4-chlorophenoxy) butyric acid
MEEKC	microemulsion electrokinetic chromatography
MeOH	methanol
MEKC	micellar electrokinetic chromatography
MOP	3-methacryloxypropyltrimethoxysilane
MCPP	mecoprop
MS	mass spectrometer
MTMS	methyltrimethoxysilane
ODM	มอนอลิติกซิลิกาคอลัมน์ที่ปรับปรุงผิวของเฟสคงที่ด้วย poly(octadecyl methacrylate)
ODS	มอนอลิติกซิลิกาคอลัมน์ที่ปรับปรุงผิวของเฟสคงที่ด้วย ODS-DEA
ODS-Cl	octadecyldimethyl-chlorosilane
ODS-DEA	octadecyldimethyl- <i>N,N</i> -diethylaminosilane
PCR	picloram
PEG	poly(ethyleneglycol)
PSP	pseudo-stationary phase
QCR	quinclorac
RPLC	reversed-phase liquid chromatography
RSD	ค่าส่วนเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ (relative standard deviation)
SDS	sodium dodecyl sulfate
TCP	triclopyr
TMOS	tetramethoxysilane

บทที่ 1

บทนำ

1.1 เทคนิคการแยกสารในคอลัมน์ขนาดเล็กในระดับไมโครเมตร (Micro-Separation Techniques)

เทคนิคการแยกสารในคอลัมน์ขนาดเล็กในระดับไมโครเมตร เช่น ไมโครไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโทกราฟี (micro high-performance liquid chromatography, μ HPLC) หรือ คัพิลลารีอิเล็กโทรโฟเรซิส (capillary electrophoresis, CE) เป็นที่สนใจในปัจจุบัน เนื่องจากใช้เฟสเคลื่อนที่หรือบัฟเฟอร์และปริมาณสารตัวอย่างในการวิเคราะห์น้อย ทำให้ลดค่าใช้จ่ายของสารเคมี ลดปริมาณของเสียที่จะเกิดขึ้น และลดค่าใช้จ่ายในการกำจัดของเสีย มีประสิทธิภาพสูงในการแยกสาร และสามารถต่อเข้ากับเครื่องตรวจวัดแบบแมสสเปกโตรมิเตอร์ (mass spectrometer, MS) ได้ดี [Legido-Quigley *et al.*: 2003]

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

ลิกวิดโครมาโทกราฟี (liquid chromatography, LC) เป็นเทคนิคการแยกสารที่อาศัยสมดุลระหว่างเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นของเหลว และเฟสคงที่ (stationary phase) เป็นของแข็ง หรือของเหลวที่เคลือบอยู่บนของแข็ง เมื่อสารผสมเคลื่อนที่เข้าไปในคอลัมน์ที่บรรจุเฟสคงที่โดยอาศัยเฟสเคลื่อนที่ที่เป็นของเหลวพาเข้าไปในคอลัมน์ สารแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่ภายในคอลัมน์ได้เร็วช้าแตกต่างกันขึ้นกับอันตรกิริยาระหว่างสารกับเฟสคงที่และเฟสเคลื่อนที่

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

ในปัจจุบันได้มีพัฒนาเทคนิค HPLC ที่ใช้คอลัมน์ขนาดเล็กหรือคัพิลลารีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระดับไมโครเมตรที่บรรจุด้วยเฟสคงที่ เรียกว่า ไมโครไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโทกราฟี (micro-high performance liquid chromatography, μ HPLC) ซึ่ง μ HPLC มีข้อได้เปรียบคือ อนุภาคนาโนขนาดเล็กของเฟสคงที่ที่ทำให้มีความสม่ำเสมอของการบรรจุและลดความแตกต่างของระยะทางที่สามารถเคลื่อนที่ในคอลัมน์ (ลด eddy diffusion) จึงทำให้เกิดการกระจายของโครมาโทแกรม

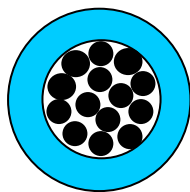
น้อยกว่า ดังนั้นฟลักของสารที่ได้จึงแคบและประสิทธิภาพของการแยกสารใน μ HPLC จึงดีกว่า HPLC ทั่วไป

ในปัจจุบันได้มีคำว่า nano-HPLC ซึ่งหมายถึง HPLC ที่ใช้คอลัมน์ขนาดเล็กไมโครเมตรที่มีอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็นนาโนลิตรต่อนาที ซึ่งทำให้ μ HPLC อาจหมายถึงอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ในระดับไมโครลิตรต่อนาที ทั้ง nano-HPLC และ μ HPLC อาจใช้คอลัมน์เดียวกัน เพียงแต่อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ต่างกัน แต่ในงานวิจัยนี้ μ HPLC หมายถึง HPLC ที่ใช้คอลัมน์ขนาดเล็กไมโครเมตรและมีอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ในระดับไมโครลิตรหรือนาโนลิตรต่อนาที

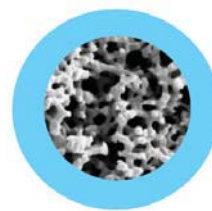
1.1.2 คอลัมน์มอนอลิธเบื้องต้น [Neue: 1997]

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

วัสดุที่เป็นเฟสคงที่ประเภทมอนอลิธใน μ HPLC แบ่งได้ออกเป็น 2 ประเภท คือ มอนอลิธประเภทพอลิเมอร์ที่เป็นสารอินทรีย์ (organic polymer-based monolith) และมอนอลิธประเภทพอลิเมอร์ที่เป็นสารอนินทรีย์ (inorganic polymer-based monolith) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นซิลิกา [Poole: 2003] มอนอลิธทั้งสองประเภทสามารถเตรียมได้ง่ายในคอลัมน์ (*in situ*) ด้วยปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันของสารตั้งต้น มอนอลิธประเภทซิลิกามีข้อดี คือ มีผิวเหมือนอนุภาคที่นิยมบรรจุใน packed column ซึ่งเป็นซิลิกา จึงดัดแปรหมู่ฟังก์ชันได้ง่ายโดยใช้วิธีเดียวกันกับการดัดแปรหมู่ฟังก์ชันของเฟสคงที่ใน packed column ที่ใช้กันทั่วไปใน HPLC สำหรับมอนอลิธประเภทพอลิเมอร์ที่เป็นสารอินทรีย์มีข้อดี คือ สามารถเลือกชนิดต่างๆ ของพอลิเมอร์ได้ และทน pH ได้ในช่วงกว้าง



Packed column



Monolithic column

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

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

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

เทคนิค CE แบ่งออกได้เป็นหลายประเภท ตามกลไกการแยกสาร ได้แก่

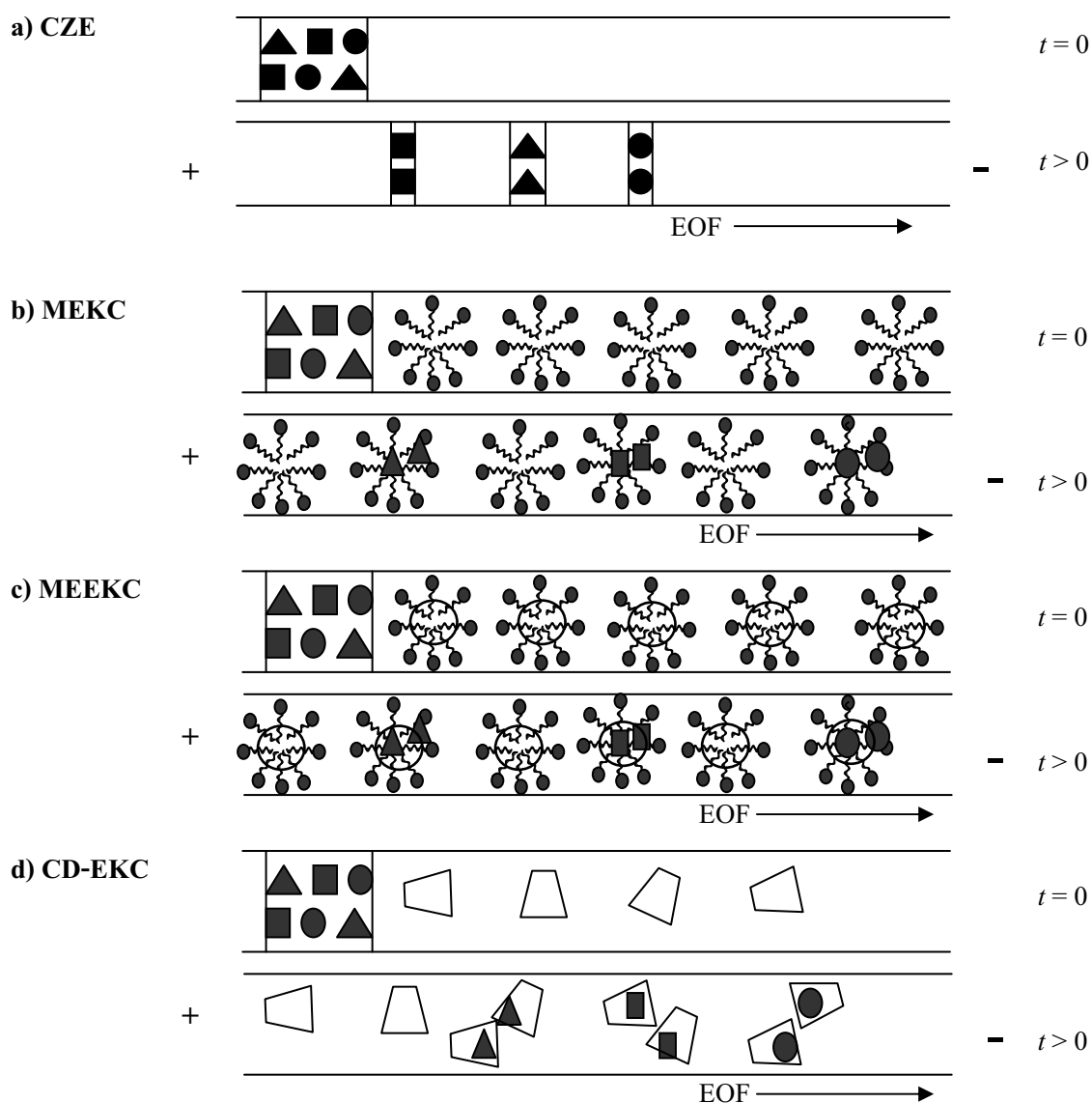
- 1) capillary zone electrophoresis (CZE)
- 2) capillary electrokinetic chromatography (CEKC) เช่น micellar electrokinetic chromatography (MEKC), microemulsion electrokinetic chromatography (MEEKC) และ cyclodextrin electrokinetic chromatography (CD-EKC)
- 3) capillary electrochromatography
- 4) capillary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

สำหรับงานวิจัยนี้เกี่ยวข้องกับเทคนิค CZE และ CEKC ในบทนี้จึงขอลำเลียงรายละเอียดของเทคนิคทั้งสองประเภทนี้

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

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

pH มากกว่า 2 จะเกิดการแตกตัวของหมู่ซิลานอลที่ผิวอะพอลาร์ได้เป็นประจุลบ เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าเพื่อแยกสาร จึงเกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า อิเล็กโทรออสโมซิส และการไหลของอิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmotic flow, EOF) มีทิศทางไปด้านขั้วแคโทด (ขั้วลบ) ในการแยกทุกๆ ไป ขั้วไฟฟ้าทางด้านเครื่องตรวจวัดมักเป็นขั้วแคโทด ดังนั้นสารที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปด้านขั้วแคโทดด้วยความเร็วในการเคลื่อนที่ของสารรวมกับ EOF สารที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปด้านขั้วแอโนด (ขั้วบวก) ซึ่งมีทิศทางตรงกันข้ามกับ EOF แต่ผลของ EOF มีมากกว่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร จึงเคลื่อนที่ไปด้านเครื่องตรวจวัดได้ ส่วนในกรณีที่เป็นสารที่ไม่มีประจุจะเคลื่อนที่ออกมาพร้อมกับ EOF เทคนิคประเภทนี้จึงเหมาะสำหรับการแยกสารที่มีประจุและละลายน้ำได้ดี ส่วนสารที่ไม่มีประจุไม่เกิดการแยกขึ้น



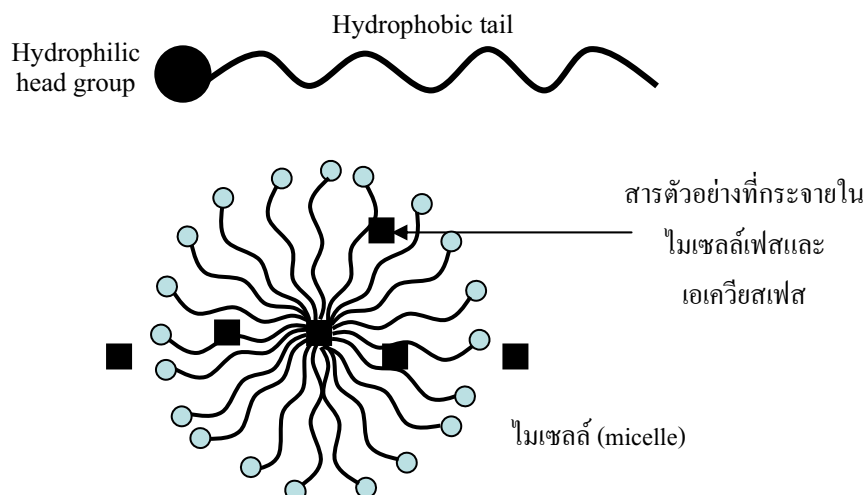
รูปที่ 1.2 การแยกสารของเทคนิค CE ประเภทต่างๆ (a) CZE, (b) MEKC, (c) MEEKC และ (d) CD-EKC: ดัดแปลงจาก [Grossman and Colburn: 1992, Altria: 2000]

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

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

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

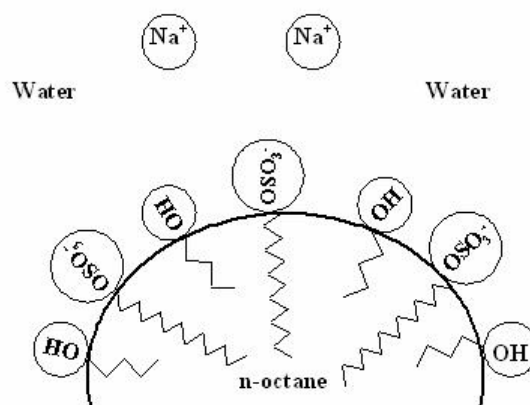
บัฟเฟอร์ของ MEKC ประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ซึ่งโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวประกอบด้วยส่วนหัวที่มีประจุหรือมีขั้วที่ชอบน้ำ (hydrophilic head group) และส่วนหางที่ไม่มีขั้วซึ่งไม่ชอบน้ำ (hydrophobic tail) เมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวลงไปในปริมาณที่มากกว่า critical micellar concentration (CMC) สารลดแรงตึงผิวจะรวมตัวกันเป็นไมเซลล์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



รูปที่ 1.3 โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวและไมเซลล์: ดัดแปลงจาก [Khaledi: 1998]

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

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

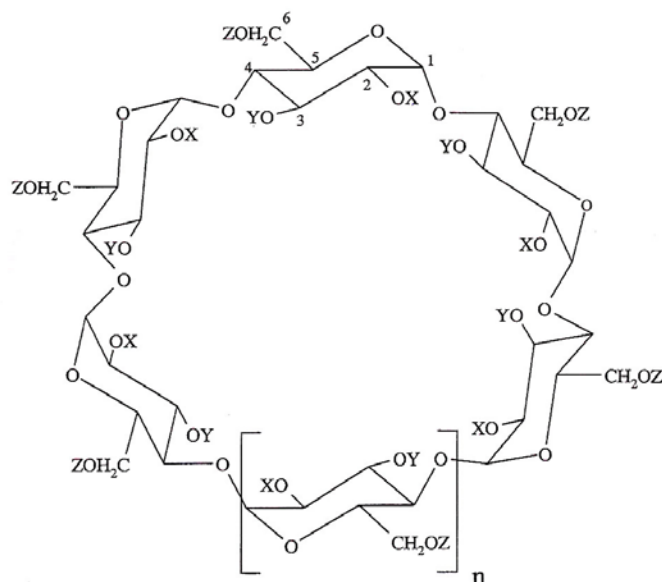


รูปที่ 1.4 หยดน้ำมันที่มีสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมมาล้อมรอบ : ดัดแปลงจาก [Altria: 2000]

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

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

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



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

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

ค่าการแยกของสาร (Resolution, R_s) ใน HPLC มีความสัมพันธ์กับตัวแปรต่างๆ คือ

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

เมื่อ k เป็น retention factor ของสาร

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

$\bar{N}$ ค่าเฉลี่ยของประสิทธิภาพของพีค (peak efficiency) หรือจำนวนเพลททางทฤษฎี (number of theoretical plate)

ในขณะที่ค่าการแยกของสารใน CE มีความสัมพันธ์กับตัวแปรต่างๆ ดังสมการ

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{\Delta\mu}{\bar{\mu} + \mu_{eo}} \quad (1.2)$$

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

เมื่อจัดรูปสมการที่ 1.2 ให้มีความสัมพันธ์กับเทอมของประสิทธิภาพการแยก, selectivity และ mobility คล้ายคลึงกับใน HPLC ได้ดังสมการ

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

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

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

1.3 วัตถุประสงค์และขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้เน้นศึกษาเชิงทฤษฎีของ retention และ selectivity รวมถึงหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับแยกกลุ่มสารที่สนใจด้วยเทคนิค μ HPLC และ CE โดยวัตถุประสงค์ของงานวิจัยแบ่งออกเป็น 6 หัวข้อหลัก ได้แก่

- 1) เปรียบเทียบประสิทธิภาพการแยก และหาภาวะที่เหมาะสมของการแยกสารกลุ่มที่สนใจใน HPLC กับ μ HPLC
- 2) ศึกษาพฤติกรรมและการเคลื่อนที่และการแยกของสาร รวมถึงเปรียบเทียบ selectivity ของสารใน μ HPLC ด้วยคอลัมน์ประเภทซิลิกามอนอลิตที่มีเฟสคงที่ต่างกัน

- 3) เปรียบเทียบและทำนายการรีเทนของสารในเทคนิค MEKC และ MEEKC
- 4) สร้างแบบจำลองของ separation selectivity สำหรับสารที่มีประจุในเทคนิค MEKC
- 5) สร้างแบบจำลองของ separation selectivity สำหรับสารที่มีประจุในเทคนิค CD-EKC
- 6) เปรียบเทียบ separation selectivity ของสารในเทคนิค CZE, MEKC และ CD-EKC

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยแรก (บทที่ 2) เป็นการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการแยก และหา ภาวะที่เหมาะสมของการแยกสารกลุ่มที่มีลักษณะสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกันด้วย HPLC ด้วย packed column กับ μ HPLC ด้วยคอลัมน์ประเภทมอนอลิต สารกลุ่มที่สนใจ ได้แก่ ฟีนอกซีแอซิด (phenoxy acids) ซึ่งเป็นสารปราบวัชพืช และสารกลุ่มบิสฟีนอลเอไดโกลซิไดลอีเทอร์ (bisphenol-A-diglycidyl ether, BADGE) บิสฟีนอลเอฟไดโกลซิไดลอีเทอร์ (bisphenol-F-diglycidyl ether, BFDGE) และอนุพันธ์ ซึ่งเป็นสารปนเปื้อนในอาหารที่บรรจุกระป๋อง งานวิจัยนี้ได้เตรียมและ ทดสอบประสิทธิภาพของอะพิลลารีคอลัมน์ประเภทซิลิกามอนอลิตที่ปรับปรุงพื้นผิวแบบ reversed-phase และนำคอลัมน์ที่เตรียมได้ใช้แยกและวิเคราะห์สารทั้งสองกลุ่มดังกล่าว โดยทำการ ปรับเปลี่ยนเฟสคงที่ และชนิดและองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ จากนั้นเปรียบเทียบการแยกที่ได้ ใน μ HPLC ด้วยคอลัมน์ประเภทมอนอลิต กับ HPLC ด้วย packed column

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยที่สอง (บทที่ 3) คือ ศึกษาพฤติกรรมการณ์เคลื่อนที่และการแยก ของสาร รวมถึงเปรียบเทียบ selectivity ของสารใน μ HPLC ด้วยคอลัมน์ประเภทซิลิกามอนอลิตที่ ปรับปรุงพื้นผิวแบบ reversed-phase ที่แตกต่างกัน เน้นศึกษาการแยกของสารประกอบที่มีเฮโลเจน เป็นองค์ประกอบซึ่งสารประกอบประเภทนี้มีสารหลากหลายกลุ่ม แต่ละกลุ่มประกอบด้วย homologues และ isomers มากมาย ในการศึกษาและเปรียบเทียบการรีเทนและ selectivity ของสาร ได้เตรียมและใช้คอลัมน์ประเภทซิลิกาที่ปรับปรุงพื้นผิวให้มีเฟสคงที่ต่างกันตามที่มีรายงานก่อน หน้านี้ ได้แก่ คอลัมน์ที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยหมู่ C18 ซึ่งนิยมใช้ใน reversed phase ทั่วไป [Miyamoto *et al.*: 2008] และ poly(octadecyl methacrylate) ซึ่งได้พัฒนาขึ้นมาใหม่เมื่อไม่นานนี้ [Núñez *et al.*: 2007] โดยได้ทำการปรับเปลี่ยนชนิดและองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ในการแยกสารด้วยเฟส คงที่แต่ละประเภท ในการศึกษาข้อมูลเปรียบเทียบ selectivity ของเฟสคงที่ที่จะทำให้เข้าใจอันตร กิริยาจะที่เกิดขึ้นระหว่างสารกับเฟสคงที่ทั้งสอง เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการเลือกเฟสคงที่ที่เหมาะสม กับการวิเคราะห์สารที่สนใจในการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์

สำหรับงานวิจัยเรื่องที่สาม (บทที่ 4) เป็นการเปรียบเทียบและทำนายการรีเทนของสารใน เทคนิค MEKC และ MEEKC นั้น เห็นได้ว่าเทคนิคทั้งสองมีความคล้ายคลึงกันต่างกันเพียงเฟสคงที่ เทียมเป็นไมเซลลีนใน MEKC และไมโครอิมัลชันสำหรับ MEEKC จึงมีหลายงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ ศึกษาและเปรียบเทียบพฤติกรรมการณ์รีเทนของสารต่างๆ ในเทคนิค MEKC และ MEEKC เช่น กลุ่ม BADGE และอนุพันธ์ [Pooutree *et al.*: 2007] ยาปราบศัตรูพืช [Song *et al.*: 1995] เป็นต้น

นอกจากนี้งานวิจัยก่อนหน้านี้ [Kelly *et al.*: 2001] ได้มีรายงานสมการและวิธีการทำนายค่ารีเทนชันของสารประกอบเอโรแมติกที่มีหมู่แทนที่ในเทคนิค MEKC โดยพบว่า ค่า $\log k$ ที่ทำนายได้ของสารประกอบเอโรแมติกที่มีหมู่แทนที่สองหมู่ซึ่งเป็นไอโซเมอร์โครงสร้างกันมีค่าเท่ากัน ในขณะที่ค่าที่ได้จากการทดลองไม่เท่ากัน ในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษา เปรียบเทียบและทำนายการรีเทนของสารประกอบเอโรแมติกที่มีหมู่แทนที่สองหมู่แตกต่างกันและเป็นไอโซเมอร์โครงสร้างกันใน MEKC และ MEEKC โดยคำนึงถึงตำแหน่งของไอโซเมอร์โครงสร้างด้วย หมู่แทนที่บนวงเอโรแมติกที่ได้ทำการศึกษา ได้แก่ หมู่เมทิล เมทอกซี แอลดีไฮด์ และเฮไลเจน

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

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

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

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

เอกสารอ้างอิง

- Altria, K.D. "Background Theory and Applications of Microemulsion Electrokinetic Chromatography" *Journal of Chromatography A* **892** (2000) 171-186.
- Grossman P.D. and Colburn J.C., *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*, Academic Pres, Inc. San Diego, 1992.
- Kelly, K. A., Burns, S.T., and Khaledi, M. G., "Prediction of Retention in Micellar Electrokinetic Chromatography from Solute Structure. 1. Sodium Dodecyl Sulfate Micelles" *Analytical Chemistry* **73** (2001) 6057-6062.
- Khaledi M.G., *High-Performance Capillary Electrophoresis*, John Wiley & Sons, Inc., USA, 1998.
- Legido-Quigley C., Marlin N. D., Melin V., Manz A. and Smith N. W. "Advances in capillary electrochromatography and micro-high performance liquid chromatography monolithic columns for separation science" *Electrophoresis* **24** (2003) 917-944.
- Li W., Fries D.P. and Malik A. "Sol-Gel Stationary Phases for Capillary Electrochromatography" *Journal of Chromatography A* **1044** (2004) 23.
- Miyamoto K., Takeshi H., Kobayashi H., Morisaka H., Tokuda D., Horie K., Koduki K., Makino S., Núñez O., Yang C., Kawabe T., Ikegami T., Takubo H., Ishihama Y., and Tanaka N. "High-Efficiency Liquid Chromatography Separation Utilizing Long Monolithic Silica Capillary Columns" *Analytical Chemistry* **80** (2008) 8741-8750.
- Neue U. D., *HPLC Columns: Theory, Technology, and Practice*, Wiley-VCH, Inc, Canada, 1997.
- Núñez O., Ikegami T., Kajiwarra W., Miyamoto K., Horie K., and Tanaka N. "Preparation of high efficiency and highly retentive monolithic silica capillary columns for reversed-phase chromatography by chemical modification by polymerization of octadecyl methacrylate" *Journal of Chromatography A* **1156** (2007) 35-44.
- Poole C.F., *The Essence of Chromatography*, Elsevier, Netherlands, 2003, p. 32, 52, 667.
- Pooutree, K., Soonthorntantikul, W., Leepipatpiboon, N. and Nhujak, T., "Comparison of Resolution in Microemulsion EKC and MEKC Employing Suppressed Electroosmosis: Application to Bisphenol-A-Diglycidyl Ether and Its Derivatives" *Electrophoresis* **28** (2007) 3705-3711.
- Skoog, D. A. and Leary, J. J., *Principles of Instrumental Analysis*, 4th Edition, Saunders College Publishing, Orlando, 1992, Chapter 6.
- Song, L., Ou, Q., Yu, W., and Li, G., "Separation of Six Phenylureas and

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

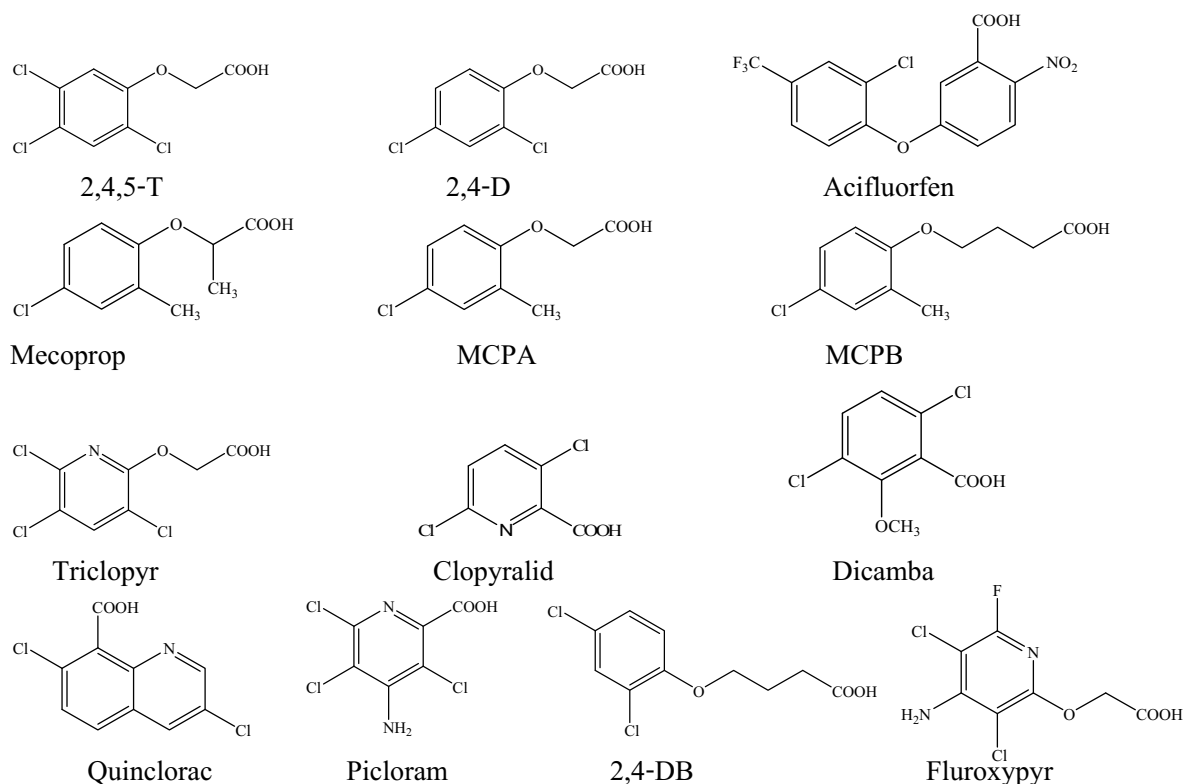
Tanaka N., Nagayama H., Kobayashi H., Ikegami, T. Hosoya, K. Ishizuka, N. Minakuchi H., Nakanishi K., Cabrera K. and Lubda D. “Monolithic silica columns for HPLC, Micro-HPLC, and CEC” *Journal of High Resolution Chromatography* **23** (2000) 111-116.

บทที่ 2

การเตรียมและทดสอบประสิทธิภาพของอะพิดาไรคอดัมน์ประเภทฟีนอกซีแอซิด และหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับแยกสารกลุ่มฟีนอกซีแอซิด และบิสฟีนอลเอไดโกลซิดิลอีเทอร์ บิสฟีนอลเอฟไดโกลซิดิลอีเทอร์ และอนุพันธ์

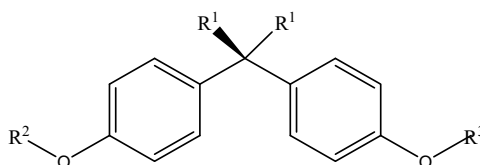
2.1 คำนำ

ฟีนอกซีแอซิด (phenoxy acids) สูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2.1 เป็นสารประเภทหนึ่งในกลุ่มของยาปราบวัชพืชที่นิยมใช้ในงานทางด้านเกษตรกรรม เพื่อช่วยควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ไม่ต้องการ หลังจากการฉีดพ่นสารเหล่านี้แล้วอาจทำให้ตกค้างอยู่บนพืชผัก หรือเกิดการปนเปื้อนลงในพื้นที่ลุ่มทั้งในดินและน้ำได้ ดังนั้นการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอกซีแอซิดจึงเป็นสิ่งจำเป็นที่ผ่านมีรายงานวิจัยการแยกและวิเคราะห์สารในกลุ่มฟีนอกซีแอซิดด้วยเทคนิค GC, HPLC และ CE แต่่วิธีการวิเคราะห์ที่ผ่านมาทำการแยกและวิเคราะห์ฟีนอกซีแอซิดพร้อมกันครั้งละไม่เกิน 10 ชนิด ยกเว้น Kuang *et al.* ที่ทำการวิเคราะห์สารในกลุ่มฟีนอกซีแอซิดพร้อมกัน 13 ชนิดด้วยเทคนิค GC แต่ฟีกของสารบางคู่ยังแยกออกจากกันไม่สมบูรณ์ ในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาวิธี μ HPLC ให้สามารถวิเคราะห์สารในกลุ่มฟีนอกซีแอซิดประมาณ 13 ชนิด เพื่อให้ครอบคลุมยิ่งขึ้นและใช้เวลาในการวิเคราะห์สารที่รวดเร็ว



รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างของสารในกลุ่มฟีนอกซีแอซิด

บิสฟีนอลเอไดโกลซิดิลอีเทอร์ (bisphenol-A-diglycidyl ether, BADGE) และบิสฟีนอลเอฟไดโกลซิดิลอีเทอร์ (bisphenol-F-diglycidyl ether, BFDGE) ดังสูตรโครงสร้างในรูปที่ 2.2 เป็นสารตั้งต้นของการเตรียม อีพอกซีเรซินที่ใช้เป็นสารเคลือบภายในกระป๋องบรรจุอาหาร ซึ่งสาร BADGE และ BFDGE ที่ตกค้างอยู่ในสารเคลือบกระป๋องอาจเปลี่ยนไปเป็นอนุพันธ์อื่นในระหว่างขั้นตอนการผลิต และอาจปนเปื้อนในอาหารที่บรรจุกระป๋องได้ สหภาพยุโรปได้กำหนดปริมาณของ BADGE, BFDGE และอนุพันธ์ในอาหารไม่เกิน 1 mg/kg ซึ่งเมื่อเร็วๆ นี้ [Leepipapiboon et al.](#) ได้รายงานวิธีการวิเคราะห์สารเหล่านี้ด้วยเทคนิค HPLC อย่างไรก็ตามยังมีสารบางคู่ที่แยกจากกันไม่สมบูรณ์ และใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จึงสนใจที่จะต่อยอดงานวิจัยโดยพัฒนาวิธีของ μ HPLC และ CEC เพื่อให้ได้ค่าการแยกที่ดีขึ้นและใช้เวลาน้อยลง



สาร	R ¹	R ²	R ³
BADGE	CH ₃		
BADGE.H ₂ O	CH ₃		CH ₂ CH(OH)CH ₂ OH
BADGE.2H ₂ O	CH ₃	CH ₂ CH(OH)CH ₂ OH	CH ₂ CH(OH)CH ₂ OH
BADGE.HCl.H ₂ O	CH ₃	CH ₂ CH(Cl)CH ₂ OH	CH ₂ CH(OH)CH ₂ OH
BADGE.2HCl	CH ₃	CH ₂ CH(Cl)CH ₂ OH	CH ₂ CH(Cl)CH ₂ OH
BADGE.HCl	CH ₃		CH ₂ CH(Cl)CH ₂ OH
BFDGE	H		
BFDGE.H ₂ O	H		CH ₂ CH(OH)CH ₂ OH
BFDGE.2H ₂ O	H	CH ₂ CH(OH)CH ₂ OH	CH ₂ CH(OH)CH ₂ OH
BFDGE.HCl.H ₂ O	H	CH ₂ CH(Cl)CH ₂ OH	CH ₂ CH(OH)CH ₂ OH
BFDGE.2HCl	H	CH ₂ CH(Cl)CH ₂ OH	CH ₂ CH(Cl)CH ₂ OH
BFDGE.HCl	H		CH ₂ CH(Cl)CH ₂ OH

รูปที่ 2.2 สูตรโครงสร้างของ BADGEs และ BFDGEs

งานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาแยกและวิเคราะห์สารในกลุ่มฟีนอกซีแอซิด BADGEs และ BFDGEs ด้วยเทคนิคต่างๆ ดังรายละเอียดต่อไปนี้

เนื่องจากฟีนอกซีแอซิดเป็นสารที่มีขี้วและกลายเป็นไอได้ยาก ในการแยกและวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค GC จึงต้องมีขั้นตอนการเตรียมอนุพันธ์ของสารก่อนการวิเคราะห์ ซึ่งสามารถเตรียมอนุพันธ์ได้หลายวิธี เช่น เตรียมผ่านปฏิกิริยาไซลิเลชัน [Rodriguez *et al.*: 2005, Pereiro *et al.*: 2004] เอสเทอร์ริฟิเคชัน [Catalina *et al.*: 2000, Hirahara *et al.*: 1997, Nilsson *et al.*: 1998, Kuang *et al.*: 2006] หรือแอลคิลเลชัน [Rimmer *et al.*: 1996] ทำให้ขั้นตอนยุ่งยากและใช้เวลานาน เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาเหล่านี้จึงได้มีการพัฒนาวิธีการแยกและวิเคราะห์ฟีนอกซีแอซิดด้วยเทคนิค HPLC และ CE ในการวิเคราะห์สารกลุ่มนี้ด้วยเทคนิค HPLC นิยมใช้คอลัมน์แยกสารเป็น C18 และใช้เฟสเคลื่อนที่ต่างๆ กัน เช่น อะซิโตนไตรล์-น้ำ [Cappiello *et al.*: 1997], เมทานอล-กรดฟอสฟอริก [Rosales-Conrado *et al.*: 2002], เมทานอล-แอมโมเนียมอะซิเตต [Wu *et al.*: 2005] เป็นต้น และใช้เครื่องตรวจวัดประเภทต่างๆ ได้แก่ ยูวี-วิสิเบิล [Rosales-Conrado *et al.*: 2002, Wu *et al.*: 2005] และแมสสเปกโตรเมทรี [Takino *et al.*: 2001, Cappiello *et al.*: 1997] และสำหรับการวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค CE ได้มีการนำเทคนิค CE ประเภทต่างๆ มาใช้สำหรับการแยกฟีนอกซีแอซิด ได้แก่ เทคนิคอะพอลาร์ไอออนอิเล็กโตรโฟรีซิส (capillary zone electrophoresis, CZE) โดยใช้บัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 35 mM บอเรตบัฟเฟอร์-60 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 6.5 ที่มีการเติม 2 mM เมทิลเลดเบตาไซโคลเด็กซ์ทริน [Kruaysawat *et al.*: 2001] นอกจากนี้ยังมีรายงานของเทคนิคไมเซลล์าร์อิเล็กโตรไคเนติกโครมาโทกราฟี (micellar electrokinetic chromatography, MEKC) โดยใช้บัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 39 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 7, 42 mM SDS, 1670 mM ยูเรีย และ 22.2 % (v/v) เมทานอล และทำการตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดประเภทฟลูออเรสเซนซ์ [Jung and Brumley: 1995] อย่างไรก็ตามยังไม่พบว่ามียารงานการวิเคราะห์สารกลุ่มนี้ด้วย μ HPLC ที่คอลัมน์ประเภทมอนอลิตที่เป็นซิลิกา

สำหรับการวิเคราะห์ BADGEs และ BFDGEs ส่วนใหญ่นิยมวิเคราะห์ด้วยเทคนิค reversed phase HPLC โดยใช้คอลัมน์เป็น C18 และมีเฟสเคลื่อนที่เป็นอะซิโตนไตรล์ผสมกับน้ำ และใช้เครื่องตรวจวัดประเภทต่างๆ ได้แก่ ฟลูออเรสเซนซ์ [Lintschinger and Rueter: 2000, Berger *et al.*: 2001, Nerin *et al.*: 2002, Leepipatpiboon *et al.*: 2005] และแมสสเปกโตรเมทรี [Cottier *et al.*: 1997, Garcia and Losada: 2004] เป็นต้น อย่างไรก็ตามยังไม่ปรากฏว่ามีรายงานการวิเคราะห์สารกลุ่มนี้ด้วย μ HPLC ที่ใช้คอลัมน์ประเภทมอนอลิตที่เป็นซิลิกา

2.2 การทดลอง

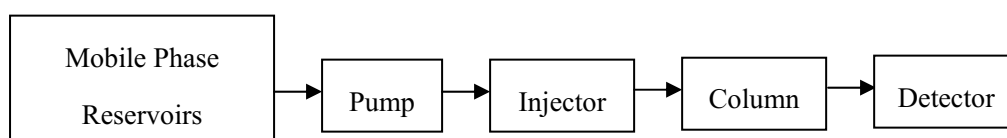
2.2.1 เครื่องมือและสารเคมี

1) สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับเตรียมคอลัมน์มอนอลิต

fused-silica capillary ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 100 และ 200 μm , tetramethoxysilane (TMOS), methyltrimethoxysilane (MTMS), 3-methacryloxypropyltrimethoxysilane (MOP), octadecyldimethyl-chlorosilane (ODS-Cl), urea, pyridine, poly(ethyleneglycol) (PEG, MW=10,000), octadecyl methacrylate, hexane, toluene, acetic acid (1M), diethylamine, α, α' -azobis-isobutyronitrile (AIBN), acetonitrile (ACN), methanol (MeOH), sodium hydroxide และ hydrochloric acid

2) เครื่อง HPLC และอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ด้วย conventional HPLC

ระบบที่ใช้วิเคราะห์ใน conventional HPLC เป็นของบริษัท Agilent Technologies รุ่น Hewlette Packard 1100 series ประกอบด้วย automatic degasser, binary pump, autosampler, column thermostat, diode array detector

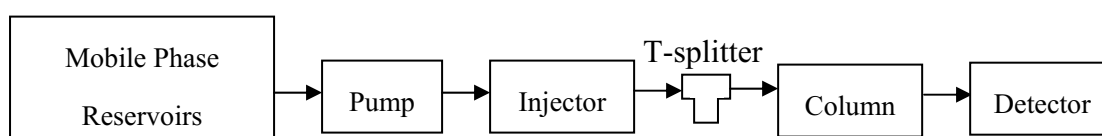


รูปที่ 2.3 ส่วนประกอบอย่างง่ายของเครื่อง HPLC: ดัดแปลงจาก [Synder *et al.*: 1979]

3) เครื่อง HPLC และอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ด้วย μHPLC

ระบบที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่เตรียมได้เป็นระบบ HPLC แบบ split flow/injection ประกอบด้วยเคมีไมโครปั๊ม (บริษัท Jasco รุ่น 3085PU), 7725 injector (บริษัท Rheodyne) ที่มี splitting T-joint และ on- or off-column UV detector (บริษัท Jasco รุ่น CE-1575)

ระบบที่ใช้หาภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารเป็นระบบ HPLC แบบ split-flow/injection ประกอบด้วยปั๊ม (บริษัท Shimadzu รุ่น LC-10AD), 7725 injector (บริษัท Rheodyne) ที่มี splitting T-joint, UV detector (บริษัท GL Sciences รุ่น MU701) และ capillary flow cell (GL Sciences, cell volume 6 nL)



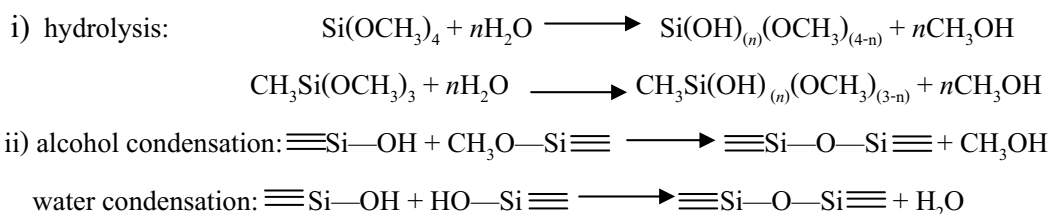
รูปที่ 2.4 ส่วนประกอบอย่างง่ายของเครื่อง μHPLC แบบ split flow/injection

2.2.2 การเตรียมซิลิกาอมอนอลิทิกเคพิลลารีคอลัมน์ [Miyamoto *et al.*: 2008, Núñez *et al.*: 2008]

เคพิลลารีคอลัมน์ประเภทซิลิกาอมอนอลิทสามารถเตรียมได้แบบ *in situ* โดยเกิดปฏิกิริยาผ่านกระบวนการ sol-gel เป็นซิลิกาอมอนอลิทภายในเคพิลลารีได้เลย โดยก่อนเตรียมอมอนอลิทซิลิกาคอลัมน์ นำ fused-silica capillary (ความยาวประมาณ 3 เมตร) มาปรับสภาพพื้นผิวภายในโดยการล้างผิวด้านในเคพิลลารีด้วย 1.0 M NaOH, น้ำ, 1.0 M HCl, น้ำ และอะซิโตน จากนั้นอัดอากาศเพื่อไล่อะซิโตนออก แล้วนำเคพิลลารีไปอบให้แห้งในตู้อบที่ 40 °C

เตรียมซิลิกาอมอนอลิทคอลัมน์โดยปิเปตสารละลายไซเลนที่ประกอบด้วย TMOS:MTMS (ในอัตราส่วน 3:1 โดยปริมาตร) ปริมาตร 9.0 mL ลงในสารละลายที่ประกอบด้วย PEG 0.9000 g, ยูเรีย 2.0250 g และ 10 mM กรดอะซิติก ปริมาตร 20.0 mL แล้วกวนให้เป็นเนื้อเดียวกันที่อุณหภูมิ 0 °C จากนั้นบรรจุสารละลายผสมดังกล่าวเข้าไปในเคพิลลารีที่แช่ไว้ในอ่างน้ำ (water bath) ที่อุณหภูมิ 40 °C แล้วปล่อยให้เกิดเจลและบ่มเจลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเคพิลลารีไปเพิ่มอุณหภูมิในตู้อบขึ้นจนถึง 80 °C คงไว้ 10 ชั่วโมง แล้วเพิ่มอุณหภูมิเป็น 120 °C คงไว้ 4 ชั่วโมง หลังจากลดอุณหภูมิลง นำเคพิลลารีที่มีเจลออกมาล้างด้วยเมทานอลโดยใช้ปั๊มของ HPLC เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นนำเคพิลลารีไปอบในเตาอบที่อุณหภูมิ 330 °C เป็นเวลา 30 ชั่วโมง จะได้อมอนอลิทซิลิกาคอลัมน์โดยตัดเคพิลลารีให้ได้ความยาวตามต้องการ

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในกระบวนการซอลเจลมีดังนี้ [Legigo-Quigley *et al.*: 2003]

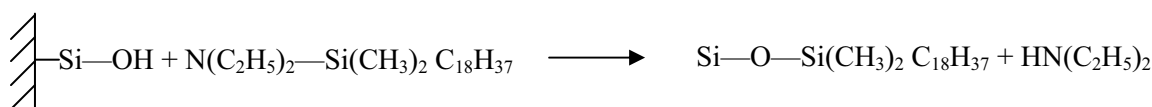


จากผลการเตรียมอมอนอลิทซิลิกาคอลัมน์หลายครั้งด้วยกัน ได้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 100 μm ยาว 40 cm ประมาณ 20 คอลัมน์ และ 200 μm ยาวประมาณ 30 หรือ 40 cm ประมาณ 40 คอลัมน์ แล้วนำไปทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ด้วย μHPLC โดยใช้สารทดสอบเป็นยูราซิลและเฟสเคลื่อนที่เป็น 80% เมทานอล เฉพาะคอลัมน์ที่มีความสูงของเพลตน้อยกว่า 8 μm หรือจำนวนเพลตมากกว่า 1.25×10^5 เพลต/เมตร แสดงว่ามีประสิทธิภาพสูงและจะนำไปปรับปรุงพื้นผิวซิลิกาอมอนอลิทที่มีเฟสคงที่ต่างๆ ต่อไป

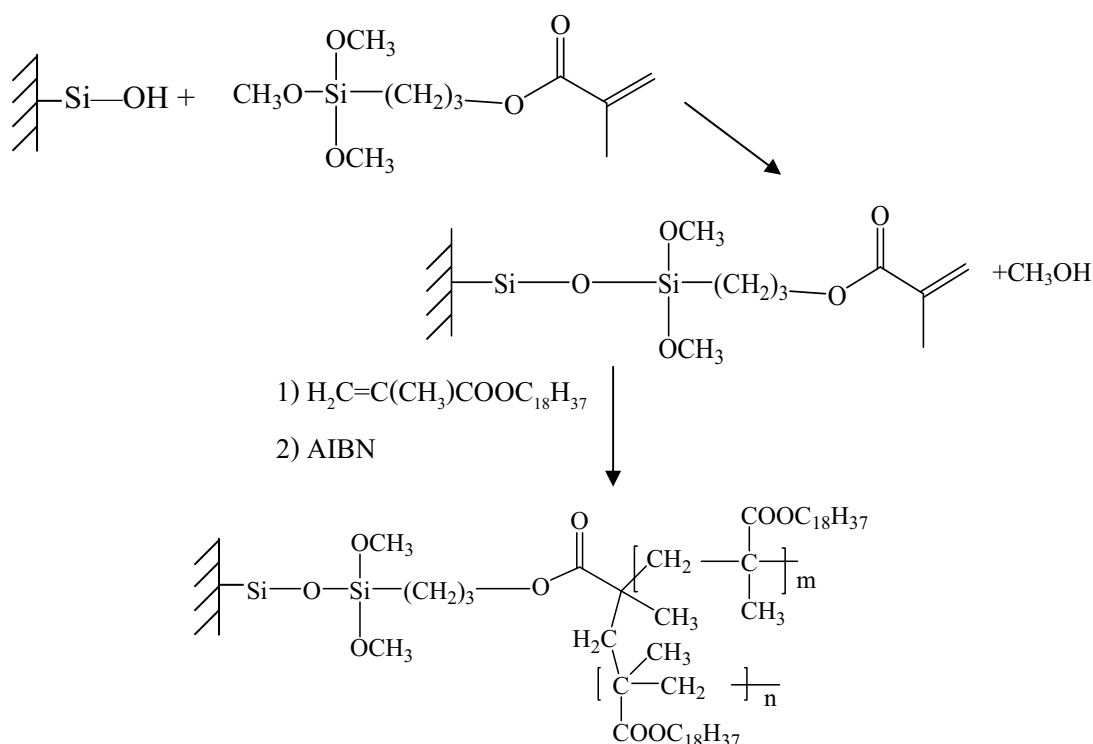
2.2.3 การปรับปรุงพื้นผิวซิลิกาเมอนอลิตให้แสดงสมบัติเป็นรีเวิร์สเฟส

2.2.3.1 การเตรียมคอลัมน์ ODS [Motokawa *et al.*: 2002]

การปรับปรุงพื้นผิวของซิลิกาเมอนอลิตให้มีเฟสคงที่เป็น ODS (C_{18}) หรือ คอลัมน์ ODS ทำได้โดยผ่านสารละลาย 20% ODS-DEA ในโทลูอีน เข้าไปในมอนอลิทิกซิลิกาคอลัมน์ด้วยความดันจากแก๊สไนโตรเจนที่ 5 bar ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำคอลัมน์ที่ได้มาล้างด้วย โทลูอีน และ THF อย่างละ 1 ชั่วโมง ตามด้วยเมทานอล 24 ชั่วโมง จากนั้นนำคอลัมน์ไปทดสอบประสิทธิภาพด้วย μ HPLC โดยใช้สารทดสอบเป็นยูราซิลและอัลคิลเบนซีน และเฟสเคลื่อนที่เป็น 80% เมทานอล



2.2.3.2 การเตรียมคอลัมน์ ODM [Núñez *et al.*: 2007]



การปรับปรุงพื้นผิวของซิลิกาเมอนอลิตให้ให้มีเฟสคงที่เป็น ODM หรือเรียกว่าคอลัมน์ ODM ทำได้ด้วยการใช้ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันของ ODM ที่มี AIBN เป็นสารเริ่มปฏิกิริยา (initiator) ในขั้นตอนเริ่มจากเกิดพันธะระหว่างหมู่ซิลานอลบนพื้นผิวซิลิกาเมอนอลิตกับ MOP ก่อน โดยนำมอนอลิทิกซิลิกาคอลัมน์มาบรรจุด้วยสารละลายผสมของ MOP: พิริดีน (1:1 โดยปริมาตร) และทิ้งไว้ในตู้อบที่ 80 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างคอลัมน์ด้วยเมทานอล หลังจากนั้นนำไป

ทดสอบคอลัมน์โดยใช้สารทดสอบเป็นยูราซิลและเฮกซิลเบนซีน และเฟสเคลื่อนที่เป็น 80% เมทานอล คอลัมน์ที่ได้ค่ารีเทนชันแฟกเตอร์ (k) ของเฮกซิลเบนซีน $k_{\text{hexylbenzene}} \geq 0.3$ สามารถนำไปทำการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันในขั้นต่อไป แต่ถ้าได้ค่า $k_{\text{hexylbenzene}} < 0.3$ ให้นำไปทำการเกิดพันธะกับ MOP ซ้ำอีกครั้ง สำหรับขั้นการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันของ ODM เริ่มจากบรรจุสารละลายที่ประกอบด้วย ODM และ AIBN (ความเข้มข้น 20 mg/mL ในโทลูอีน) ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร เข้าไปในคอลัมน์ MOP แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาในตูบที่ 80 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำคอลัมน์ที่ได้มาล้างด้วยโทลูอีน 24 ชั่วโมง แล้วตามด้วยเมทานอลอีก 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำคอลัมน์ที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพด้วย μ HPLC โดยใช้สารทดสอบเป็นยูราซิลและอัลคิลเบนซีน และเฟสเคลื่อนที่เป็น 80% เมทานอล

ในงานวิจัยนี้เมื่อกล่าวถึงคอลัมน์ ODS หมายถึง มอนอลิทิกซิลิกาคอลัมน์ที่ปรับปรุงผิวของเฟสคงที่ด้วย ODS-DEA และคอลัมน์ ODM หมายถึง มอนอลิทิกซิลิกาคอลัมน์ที่ปรับปรุงผิวของเฟสคงที่ด้วย poly(octadecyl methacrylate) และระบุขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของกะปิลารีคอลัมน์ต่อท้าย เช่น ODS100a หมายถึง คอลัมน์ ODS ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 μm โดยที่ a หรือ b หมายถึงลำดับของคอลัมน์

2.3 ผลการทดลองและวิจารณ์

2.3.1 ทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์

เตรียมมอนอลิทิกซิลิกาคอลัมน์หลายครั้งด้วยกัน และได้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 μm ยาว 40 cm ประมาณ 20 คอลัมน์ และ 200 μm ยาวประมาณ 30 หรือ 40 cm ประมาณ 40 คอลัมน์ นำไปทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ด้วย μ HPLC ใช้สารทดสอบเป็นยูราซิลและเฟสเคลื่อนที่เป็น 80% เมทานอล เฉพาะคอลัมน์ที่มีความสูงของเพลตเชิงทฤษฎี (total theoretical plates height, H) $H < 8 \mu\text{m}$ หรือจำนวนเพลตเชิงทฤษฎี (number of theoretical plates, N) $N > 1.25 \times 10^5$ เพลต/เมตร (ใช้ $u = 1.0 \text{ mm/s}$, $u = L/t_0$ ตลอดจนงานวิจัยนี้ t_0 เป็นรีเทนชันไทม์ของยูราซิลซึ่งเป็น unretained compound และ L คือ ความยาวคอลัมน์) แสดงว่ามีประสิทธิภาพสูงและนำคอลัมน์ที่ได้ไปปรับปรุงพื้นผิวเฟสคงที่ต่างๆ ต่อไป

สำหรับคอลัมน์ที่มีประสิทธิภาพสูงได้ปรับปรุงพื้นผิวเฟสคงที่เป็น RPLC โดยเตรียมคอลัมน์ ODS ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 และ 200 μm (ดังหัวข้อ 2.2.3.1) และคอลัมน์ ODM ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 200 μm (ดังหัวข้อ 2.2.3.2) ยาว 30 cm และนำคอลัมน์ที่ได้มาทดสอบประสิทธิภาพด้วยเฟสเคลื่อนที่เป็น 80% เมทานอลและ 80% อะซิโตนไทรล์ สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ ODS ใช้สารทดสอบเป็นยูราซิลและอัลคิลเบนซีนที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 1-6 (C1-C6) ในขณะที่การทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ ODM ใช้สารทดสอบเป็นยูรา

ซิลและแอลคิลเบนซีน C1-C5 (เนื่องจากเฮกซิลเบนซีนใช้เวลาวิเคราะห์นาน) โดยใช้ u ต่ำๆ ตั้งแต่ 0.2 mm/s ไปจนถึงอัตราไหลสูงสุดของเข็มโครมาโทกราฟีที่ใช้งานได้ คือ 2.0 mL/min

รูปที่ 2.5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง k กับ u ของคอลัมน์ ODS100, ODS200 และ ODM200 ในเฟสเคลื่อนที่ 80% เมทานอลและ 80% อะซิโตไนไตรล์ (คำนวณจากข้อมูลของ t_R ของอัลคิลเบนซีนและ t_0 ของยูราซิลในโครมาโทแกรม (ไม่ได้แสดงไว้ในที่นี้)) โดยค่า k สามารถคำนวณได้ดังสมการ

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (2.1)$$

t_R และ t_0 คือ รีเทนชันไทม์ (migration time) ของสารและ unretained compound ตามลำดับ

ค่า k ของแอลคิลเบนซีนใน reversed-phase บ่งบอกได้ถึงอัตราส่วนปริมาตรของเฟสคงที่ต่อเฟสเคลื่อนที่ [Núñez *et al.*: 2007] **รูปที่ 2.6** แสดงกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่าง $\log k$ และ z (z คือ จำนวนคาร์บอนในสายโซ่ตรงของอัลคิลเบนซีน) โดยที่ความชันของเส้นตรงเท่ากับ $\log \alpha(\text{CH}_2)$ ถ้า $\log \alpha(\text{CH}_2)$ หรือ $\alpha(\text{CH}_2)$ มีค่ามากกว่า แสดงถึงความไฮโดรโฟบิกของเฟสคงที่ที่มากกว่า [Núñez *et al.*: 2007]

จาก**รูปที่ 2.5** แสดงค่า k เฉพาะอัลคิลเบนซีนบางสาร พบว่าค่า k ของสารชนิดเดียวกันไม่ขึ้นกับ u ซึ่งเป็นไปตามทฤษฎีโดยทั่วไป และเมื่อเปรียบเทียบคอลัมน์ ODS ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางต่างกัน คือ ODS100 และ ODS200 (**รูปที่ 2.5.a1** และ **2.5.b1**) ODS100 ให้ค่า k ของโทลูอินและเฮกซิลเบนซีนที่สูงกว่าเล็กน้อย และค่า $\alpha(\text{CH}_2)$ ที่มากกว่า (**ตารางที่ 2.1**) บ่งบอกถึงความไฮโดรโฟบิกของคอลัมน์ ODS100 ที่มากกว่าหรือพื้นผิวของเฟสคงที่ที่เกิดพันธะกับ ODS-DEA ที่มากกว่า เมื่อเปรียบเทียบการใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นเมทานอลและอะซิโตไนไตรล์ของ ODS100 และ ODS200 (**รูปที่ 2.5.a** และ **2.5.b**) พบว่า k ของอะซิโตไนไตรล์มีค่าน้อยกว่าเป็นผลจาก solvent strength ของอะซิโตไนไตรล์ที่มากกว่า [Synder *et al.*: 1997]

เมื่อเปรียบเทียบ k ของคอลัมน์ ODS200 และ ODM200 (**รูปที่ 2.5.a2, 2.5.a3, 2.5.b2, 2.5.b3**) โดยใช้สารทดสอบเป็นโทลูอิน (a2, b2) และเพนทิลเบนซีน (a3, b3) พบว่า k ของสารทั้งสองในคอลัมน์ ODM มีค่ามากกว่า และเมื่อพิจารณาค่า $\alpha(\text{CH}_2)$ (**ตารางที่ 2.1**) คอลัมน์ ODM200 ให้ค่า $\alpha(\text{CH}_2)$ ใกล้เคียงกับ ODS200 ทั้งในเฟสเคลื่อนที่เป็น 80% เมทานอลและ 80% อะซิโตไนไตรล์ ส่วนในเฟสเคลื่อนที่เป็น 80% อะซิโตไนไตรล์ การรีเทนของสารใน ODM จะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับ ODS เนื่องจากอะซิโตไนไตรล์จะเกิด solvation บน ODM ได้ดีกว่าเมทานอล ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับที่ได้รายงานไว้ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ [Núñez *et al.*: 2007] จากการที่คอลัมน์ ODM มีความไฮโดรโฟบิกมากทำให้สารรีเทนในคอลัมน์ได้นาน จึงเลือกใช้ความยาวคอลัมน์ ODM เพียง 30 cm เพื่อให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์ไม่นานมากนัก

จากตารางที่ 2.1 แสดงค่า H ของยูราซิลและแอลคิลเบนซีนที่ใช้เป็นสารทดสอบของคอลัมน์ ODS และ ODM ทั้งในเฟสเคลื่อนที่เป็น 80% เมทานอลและ 80% อะซิโตนไทรล์ ซึ่ง H คำนวณได้จาก $H = L/N$ พบว่าที่ $u = 1.0$ mm/s แอลคิลเบนซีนที่มีความยาวสายโซ่คาร์บอนเพิ่มขึ้นมีแนวโน้มของ H เพิ่มขึ้นเนื่องจากสารรีเทนในคอลัมน์นานขึ้นทำให้เกิดการกระจายของโซนสารมาก เมื่อพิจารณา van Deemter plot (ความสัมพันธ์ระหว่าง H กับ u) ของคอลัมน์ ODS100 และ ODS200 (รูปที่ 2.7) โดยแสดงเฉพาะสารทดสอบเป็นยูราซิล โทลูอินและเฮกเซน ทั้งในเฟสเคลื่อนที่เป็น 80% เมทานอล และ 80% อะซิโตนไทรล์ สำหรับเฟสเคลื่อนที่ที่เป็นอะซิโตนไทรล์ (รูปที่ 2.7b) ให้ประสิทธิภาพของการแยกสารดีกว่าเมทานอล (จุดต่ำสุดของ H มีค่าน้อยกว่าเลื่อนไปตำแหน่งที่ u สูงกว่า) นอกจากนี้ที่ u มาก ก็มีการเพิ่ม H ไม่มากนักเมื่อเทียบกับเฟสเคลื่อนที่ที่เป็นเมทานอล (รูปที่ 2.7a) เนื่องจากอะซิโตนไทรล์มีความหนืดน้อยกว่าทำให้สารมี diffusion coefficient ในเฟสเคลื่อนที่มาก [Ishizuka *et al.*: 2002]

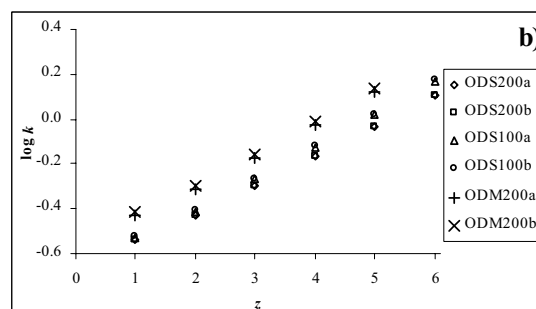
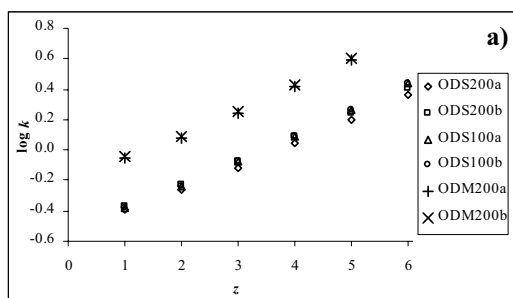
เมื่อเปรียบเทียบ van Deemter plot ของคอลัมน์ ODS และ ODM (รูปที่ 2.8) พบว่ามีลักษณะแนวโน้มของกราฟที่คล้ายกัน แต่คอลัมน์ ODS ให้ H น้อยกว่าคอลัมน์ ODM (เช่น H เท่ากับ 8.6-8.9 μm และ 11.1 μm สำหรับคอลัมน์ ODS และ ODM ตามลำดับ ที่ใช้สารทดสอบเป็น C5 ในเฟสเคลื่อนที่ 80% เมทานอล) แสดงว่า คอลัมน์ ODS ที่เตรียมได้มีประสิทธิภาพดีกว่าเล็กน้อย ในขณะที่งานวิจัยก่อนหน้านี้ได้มีรายงานว่าสามารถเตรียมคอลัมน์ ODM ดีกว่าคอลัมน์ ODS (H เท่ากับ 13.8 μm และ 12.9 μm สำหรับคอลัมน์ ODS และ ODM ตามลำดับ ที่ใช้สารทดสอบเป็น C5 ในเฟสเคลื่อนที่ 80% เมทานอล [Núñez *et al.*: 2007 รูปที่ 3]) อย่างไรก็ตาม คอลัมน์ที่เตรียมได้ในงานวิจัยนี้มีประสิทธิภาพที่ดีกว่าเมื่อเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้านี้

ค่าความดันในการขับเคลื่อนเฟสเคลื่อนที่ (back pressure, ΔP) ของคอลัมน์ที่เตรียมได้แสดงดังตารางที่ 2.1 ซึ่งความดันจะขึ้นอยู่กับความยาวของคอลัมน์ L และความเร็วเชิงเส้นของเฟสเคลื่อนที่ u ดังนั้นจึงเปรียบเทียบเป็นค่าความดันต่อความยาวคอลัมน์ ($\Delta P/L$) ที่ค่า $u = 1.0$ mm/s พบว่าค่า $\Delta P/L$ ของคอลัมน์ต่างๆ ที่ได้อยู่ในช่วง 10.8-11.8 และ 10.9-13.5 MPa/m สำหรับคอลัมน์ ODS และ ODM ตามลำดับ ในเฟสเคลื่อนที่ที่เป็น 80% เมทานอล และ 5.2-5.5 และ 5.9-6.4 MPa/m สำหรับคอลัมน์ ODS และ ODM ตามลำดับ ในเฟสเคลื่อนที่ที่เป็น 80% อะซิโตนไทรล์ ซึ่งค่าที่ได้จากงานวิจัยนี้สอดคล้องกับผลงานวิจัยที่เคยรายงานไว้ก่อนหน้านี้ (10.3 และ 10.4 MPa/m สำหรับคอลัมน์ ODS และ ODM ตามลำดับในเฟสเคลื่อนที่ที่เป็น 80% เมทานอล และ 5.2 และ 5.7 MPa/m สำหรับคอลัมน์ ODS และ ODM ตามลำดับในเฟสเคลื่อนที่ที่เป็น 80% อะซิโตนไทรล์ สำหรับที่ค่า $u = 1.0$ mm/s [Núñez *et al.*: 2007 รูปที่ 4])

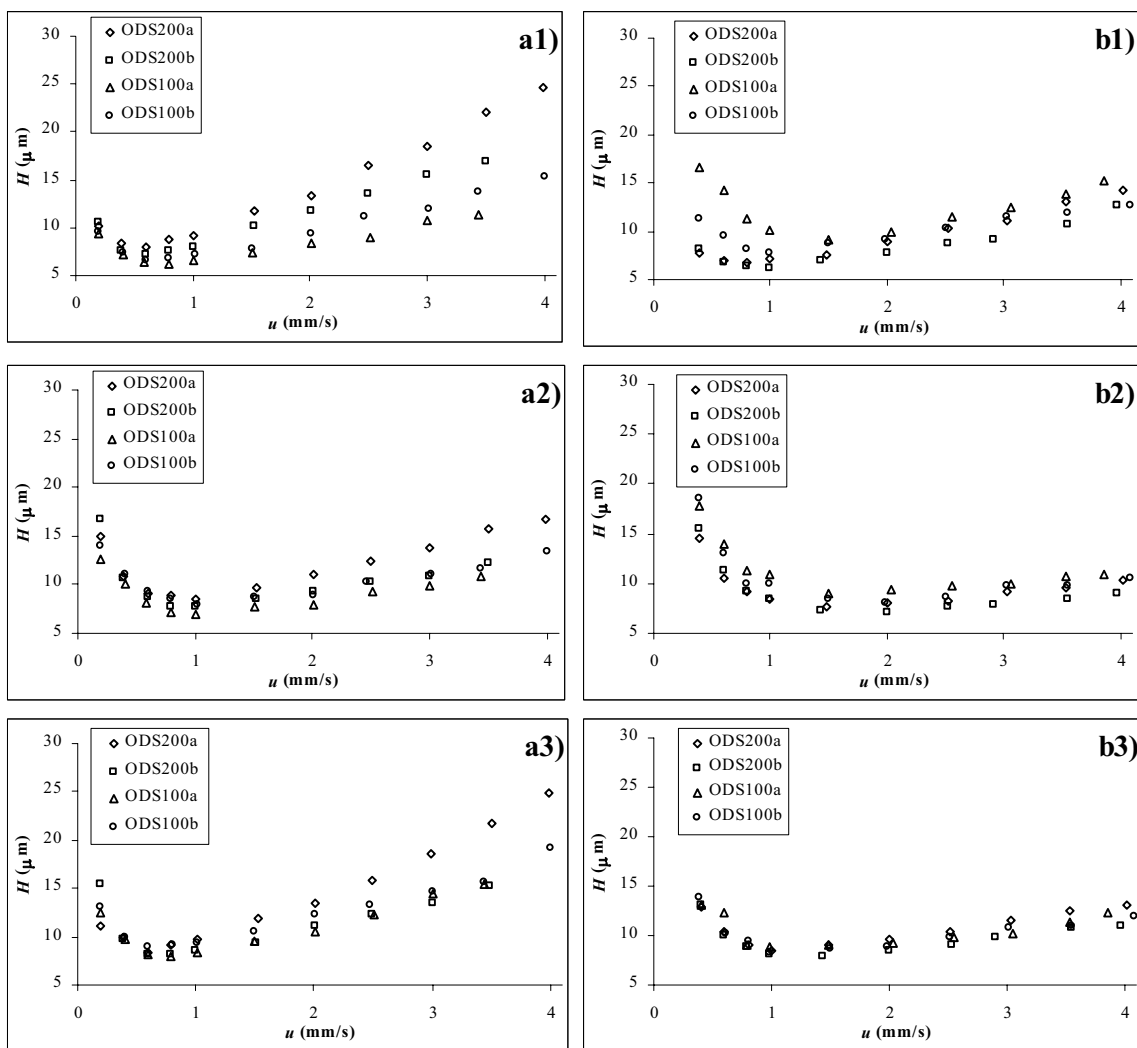
ตารางที่ 2.1 ค่า H , $\alpha(\text{CH}_2)$, และความดันในการขับเคลื่อนเฟสเคลื่อนที่

เฟสเคลื่อนที่	คอลัมน์	$H(\mu\text{m})$ ที่ได้จากการทดสอบที่เป็น							$\alpha(\text{CH}_2)$	ความดัน (ΔP , MPa)	$\Delta P/L$ (MPa/m)
		uracil	C1	C2	C3	C4	C5	C6			
80% MeOH	ODS100a	6.6	7.0	7.5	7.2	7.6	8.4	8.3	1.46	5.1	12.8
	ODS100b	7.1	8.0	8.0	8.1	8.5	8.6	9.4	1.46	4.2	10.5
	ODS200a	9.2	8.6	8.8	9.0	9.5	8.9	9.8	1.42	4.3	10.8
	ODS200b	8.0	7.7	7.8	8.1	8.6	8.6	8.5	1.43	4.7	11.8
	ODM200a	10.2	9.8	10.2	10.4	10.9	11.1	-	1.46	3.2	10.9
	ODM200b	12.4	10.7	11.1	11.1	11.1	11.1	-	1.46	4.0	13.5
80% ACN	ODS100a	10.1	10.9	10.2	10.0	9.8	8.9	8.8	1.38	2.5	6.2
	ODS100b	7.8	10.0	9.4	9.8	9.1	8.5	8.3	1.38	1.7	4.2
	ODS200a	7.1	8.4	8.4	8.2	8.4	8.7	8.5	1.34	2.0	5.5
	ODS200b	6.1	8.4	8.1	7.8	8.0	8.1	8.1	1.35	2.2	5.2
	ODM200a	7.2	7.7	7.8	7.8	8.2	8.5	-	1.37	1.7	5.9
	ODM200b	7.8	8.1	8.2	8.1	8.1	8.4	-	1.37	1.8	6.4

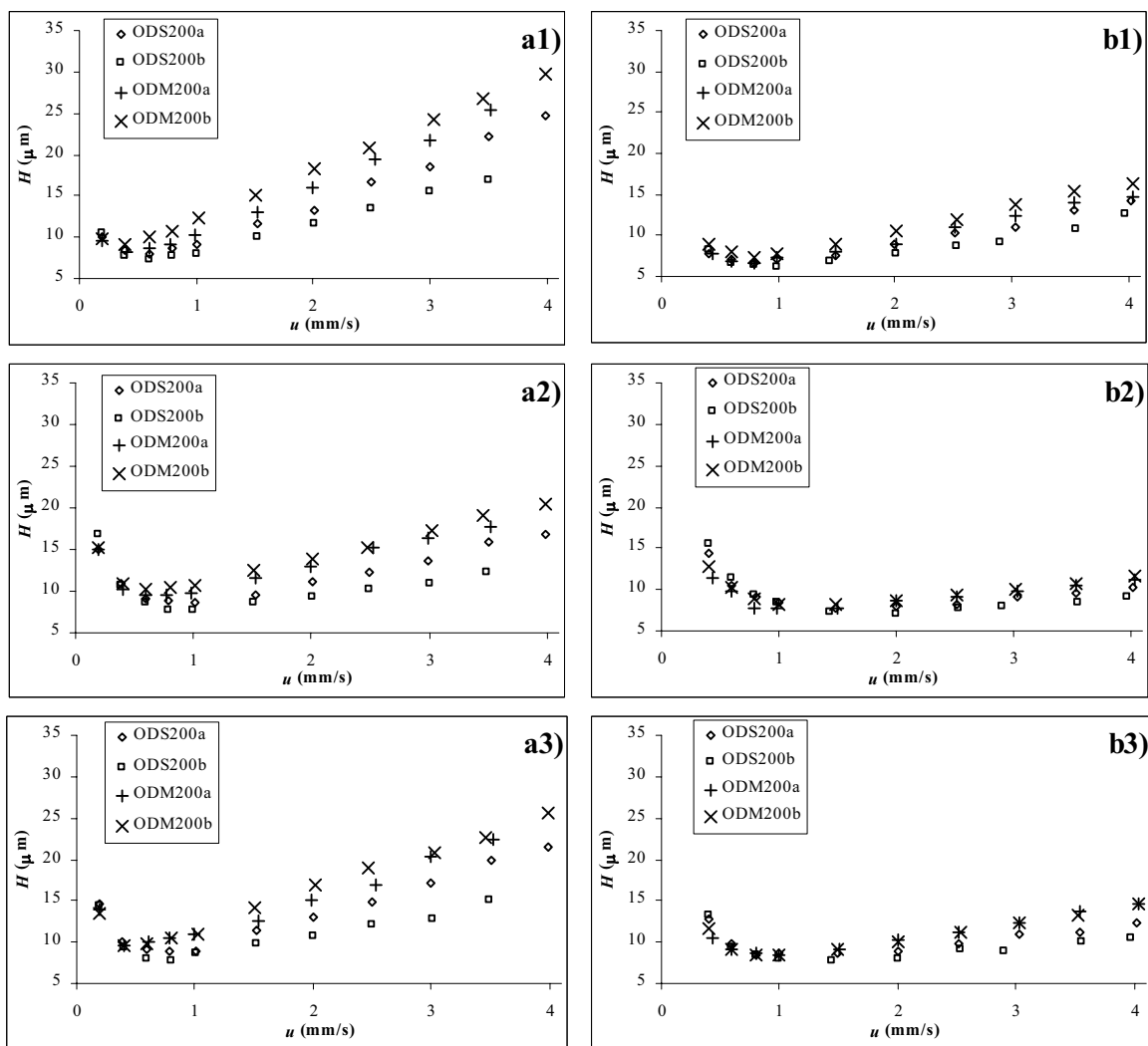
$\alpha(\text{CH}_2)$ คำนวณจากความชันของกราฟรูปที่ 2 ซึ่งมีค่าเท่ากับ $\log \alpha(\text{CH}_2)$, ΔP ที่ $u = 1.0 \text{ mm/s}$



รูปที่ 2.6 ความสัมพันธ์ระหว่าง $\log k$ กับ z ที่ใช้เฟสเคลื่อนที่ ($u=1.0 \text{ mm/s}$) (a) 80% เมทานอล และ (b) 80% อะซิโตนไทรล์ สำหรับคอลัมน์ ODS100, ODS200 และ ODM200



รูปที่ 2.7 van Deemter plot สำหรับคอลัมน์ ODS100 และ ODS200 ยาว 40 cm ที่ใช้เฟสเคลื่อนที่ เป็น (a) 80% เมทานอล และ (b) 80% อะซิโตนไทรล์ โดยที่สารทดสอบเป็นยูราซิล (a1, b1), โทลูอิน (a2, b2), เฮกซิลเบนซีน (a3, b3)



รูปที่ 2.8 van Deemter plot สำหรับคอลัมน์ ODS200 ยาว 40 cm และ ODM200 ยาว 30 cm ที่ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น (a) 80% เมทานอล และ (b) 80% อะซิโตนไทรล์ โดยที่สารทดสอบเป็นยูราซิล (a1, b1), โทลูอีน (a2, b2), เพนทิลเบนซีน (a3, b3)

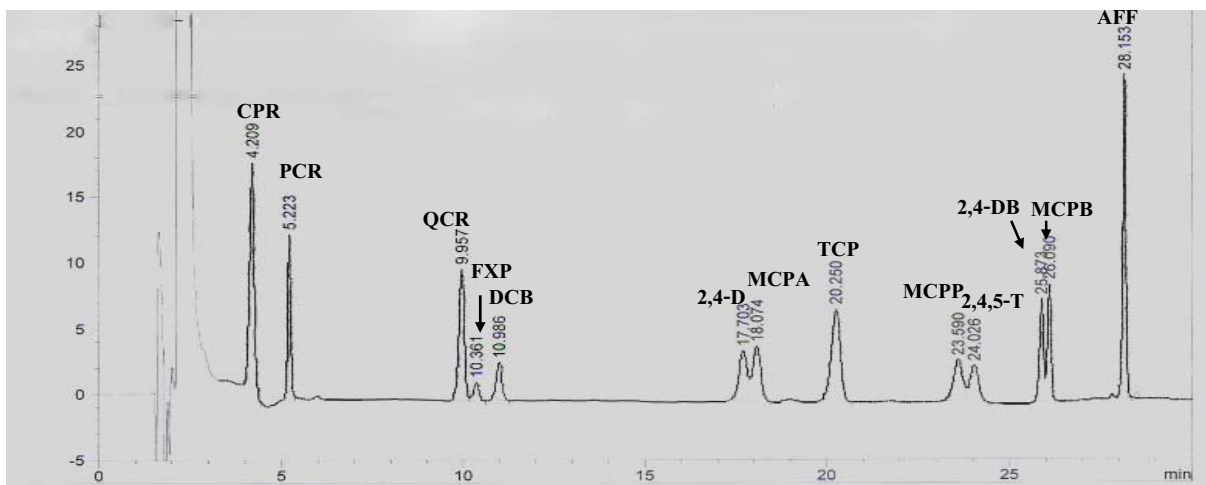
2.3.2 การแยก phenoxy acid herbicides 13 ชนิด ด้วย HPLC และ μ HPLC

ได้ทำการศึกษาพฤติกรรมการเคลื่อนที่ของสาร และหาภาวะที่เหมาะสมของการแยกสารใน HPLC ด้วย conventional column เพื่อการแยกสารในเบื้องต้น พร้อมทั้งได้ทำการเตรียมมอนอลิติกซิลิกาคอลัมน์ และปรับปรุงพื้นผิวเฟสคงที่ให้เป็น RPLC รวมถึงทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ได้ และนำมาใช้ศึกษาพฤติกรรมการเคลื่อนที่และหาภาวะที่เหมาะสมของการแยกสารใน μ HPLC

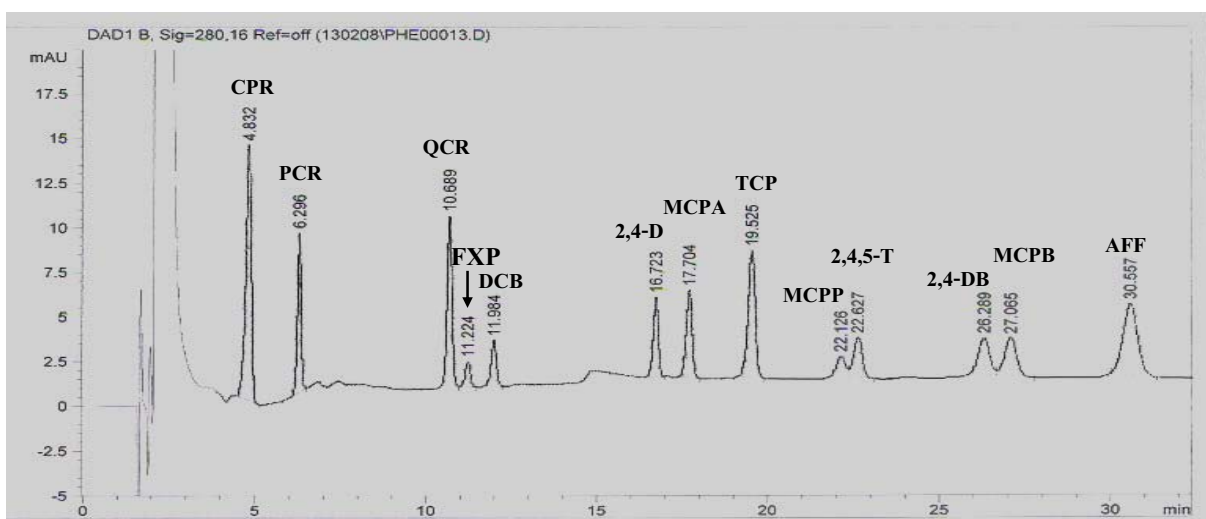
2.3.2.1 ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยก phenoxy acid herbicides ด้วย conventional HPLC

ได้ทำการศึกษาพฤติกรรมการแยกและหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับแยกสารกลุ่ม phenoxy acids และ acidic herbicides รวมทั้ง 13 ชนิด สูตรโครงสร้างของสารแสดงดังรูปที่ 2.1 โดยทำการปรับเปลี่ยนชนิดและอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่แบบ gradient elution (ช่วงเวลาต่างๆปรับส่วนผสมของตัวทำละลายอินทรีย์) ซึ่งเฟสเคลื่อนที่ในการทดลองนี้เป็นอะซิโตนไทรล์: สารละลายกรดอะซิติกที่ปรับเป็น pH 2.5 หรือ เมทานอล: สารละลายกรดอะซิติกที่ปรับเป็น pH 2.5 ได้ภาวะของ gradient elution ที่เหมาะสมที่สุดดังโครมาโทแกรมในรูปที่ 2.9 และ 2.10 ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบภาวะการแยกที่ดีที่สุดของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นอะซิโตนไทรล์กับเมทานอล พบว่าเมทานอลให้การแยกที่ดีกว่าอะซิโตนไทรล์แต่ระยะเวลาในการแยกสารจะนานกว่าจากโครมาโทแกรมในรูปที่ 2.10 พีกของสารบางพีกยังแยกออกจากกันไม่สมบูรณ์ ถึงแม้ว่าการแยกสารละลายมาตรฐานของ phenoxy acids และ acidic herbicides ที่ได้จะเพียงพอต่อการทำปริมาณวิเคราะห์แล้ว แต่ในกรณีที่วิเคราะห์ในตัวอย่างจริง เมทริกซ์อาจไปรบกวนการวิเคราะห์สาร ทำให้ปริมาณวิเคราะห์ผิดพลาดได้ จึงมีความสนใจศึกษาการแยกสารด้วย μ HPLC โดยใช้มอนอลิติกซิลิกาคอลัมน์แบบ reversed-phase HPLC ต่อไป เพื่อให้ได้การแยกสารที่สมบูรณ์และใช้ระยะเวลาวิเคราะห์สารที่รวดเร็ว



รูปที่ 2.9 โครมาโทแกรมการแยกสารมาตรฐานของ phenoxy acids และ acidic herbicides ด้วย conventional HPLC โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น อะซิโตรไนไทรล์:สารละลายกรดอะซิติกที่ pH 2.5 (B:A) ด้วย gradient profile ที่ช่วงเวลาต่างๆปรับ % B ดังนี้ 0-1.5 นาที (15% B), 2.0 นาที (20% B), 8 นาที (30% B), 18 นาที (35% B), 22 นาที (38% B), 25-30 นาที (60% B) ภาวะอื่นของ HPLC: เครื่อง HPLC Agilent 1100 series, คอลัมน์ เป็น eclipse XDB-C8 ขนาด 5 μ m, 4.6 mm), อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$ C, อัตราไหล 1 mL/min, ตรวจวัดด้วย UV photodiode array และแสดงผลที่ความยาวคลื่น 280 nm, ปริมาณสารที่ฉีด 10 μ L



รูปที่ 2.10 โครมาโทแกรมการแยกสารมาตรฐานของ phenoxy acids และ acidic herbicides บางชนิดด้วย conventional HPLC โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น เมทานอล: สารละลายกรดอะซิติกที่ pH 2.5 (B:A) ด้วย gradient profile ที่เวลาต่างๆปรับ % B ดังนี้ 0-2 นาที (20% B), 4 นาที (40% B), 12 นาที (50% B), 12.1-35 นาที (55% B) ส่วนภาวะอื่นของ HPLC ดังรูปที่ 2.9

2.3.2.2 ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารด้วย μ HPLC-UV detection

1) ภาวะที่เหมาะสมสำหรับแยกสาร phenoxo acid herbicides ด้วยคอลัมน์ ODS

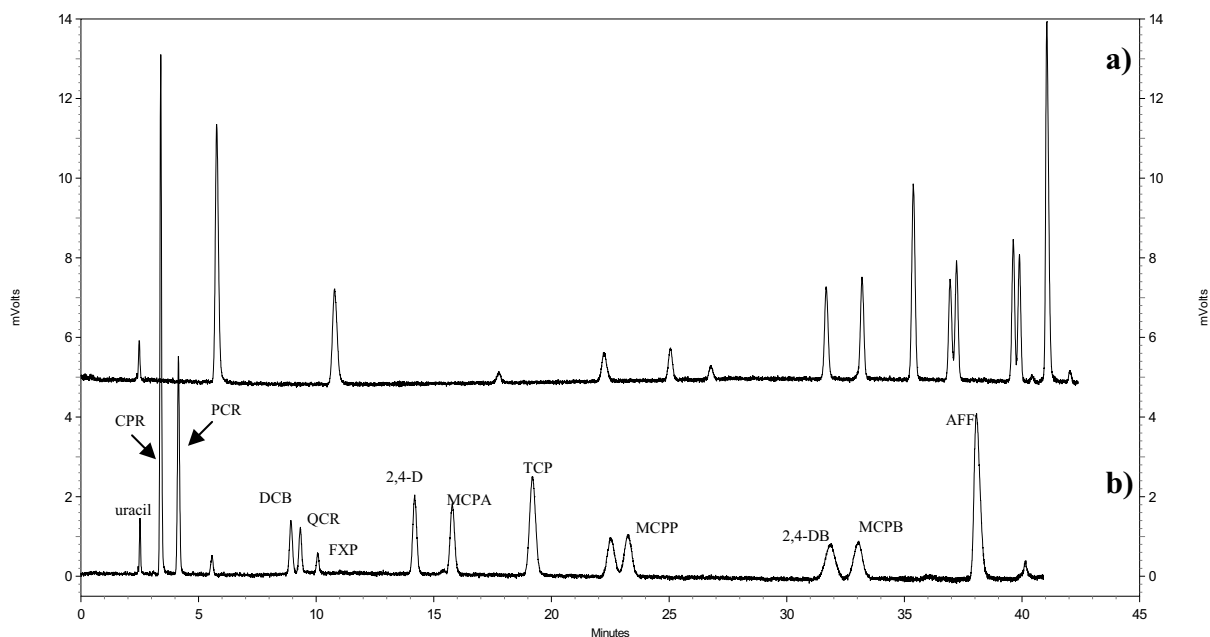
ได้ศึกษาพฤติกรรมของการเคลื่อนที่และการแยกของ phenoxo acid herbicides ด้วย μ HPLC ที่มีเครื่องตรวจวัดเป็น UV โดยนำคอลัมน์ ODS200 ที่เตรียมได้มาใช้เป็นคอลัมน์แยกสาร เนื่องจากคอลัมน์ ODS100 และ ODS200 ให้ประสิทธิภาพพอๆ กัน แต่คอลัมน์ ODS200 ให้ sample loading ที่มากกว่าจึงเลือกใช้คอลัมน์ ODS200 และใช้เฟสเคลื่อนที่ในภาวะที่เป็นกรด ประกอบด้วย 0.1% กรดฟอร์มิกในน้ำ:0.1% กรดฟอร์มิกในเมทานอล โดยในที่นี้ใช้กรดฟอร์มิกแทนกรดอะซิติก เนื่องจากในตอนนี้ได้ลองหาภาวะที่ใช้ในการแยกสารเบื้องต้นโดยใช้เครื่องตรวจวัด UV เพื่อจะนำภาวะที่ได้เป็นแนวทางไปใช้สำหรับเครื่องตรวจวัด MS สำหรับกรดที่นิยมเติมลงไปในเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ใน LC-MS ควรเป็นกรดกลายเป็นไอได้ง่าย เช่น กรดอะซิติก หรือ กรดฟอร์มิก แต่ส่วนใหญ่นิยมเลือกใช้กรดฟอร์มิกเนื่องจากแตกตัวให้โปรตอนได้ดีกว่า แต่อย่างไรก็ตามเมื่อทำการทดลองใน μ HPLC-MS จะศึกษาถึงผลของกรดอะซิติก หรือกรดฟอร์มิกที่มีต่อการวิเคราะห์สารอีกครั้งหนึ่ง

ในการแยกสารเบื้องต้นได้ปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ที่เป็นแบบ gradient elution (อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่เปลี่ยนไปในช่วงเวลาต่างๆ) เริ่มจากการปรับเพิ่มอัตราส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ (0.1% กรดฟอร์มิกในเมทานอล) จาก 20 เป็น 80% ภายใน 40 นาที (รูปที่ 2.11a) จะเห็นว่าในช่วงแรกๆ พีกของสารแยกออกจากกันได้ดี ส่วนพีกท้ายโครมาโทแกรมบางพีกยังแยกจากกันไม่สมบูรณ์ จึงได้ทำการปรับเปลี่ยนรูปแบบของ gradient โดยในช่วงแรกเพิ่มอัตราส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ เพื่อให้พีกสารส่วนต้นโครมาโทแกรมจะได้เคลื่อนที่ออกมาได้เร็วขึ้น แล้วในช่วงหลัง ลดอัตราส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ (เพิ่ม k หรือปรับ α) เพื่อปรับให้พีกท้ายโครมาโทแกรมแยกออกจากกันดีขึ้น ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทดลองปรับเปลี่ยน gradient elution หลายๆ รูปแบบจนได้โครมาโทแกรมที่แยกสารได้สมบูรณ์และใช้ระยะเวลาที่เหมาะสมภายใน 40 นาที ดังรูปที่ 2.11b

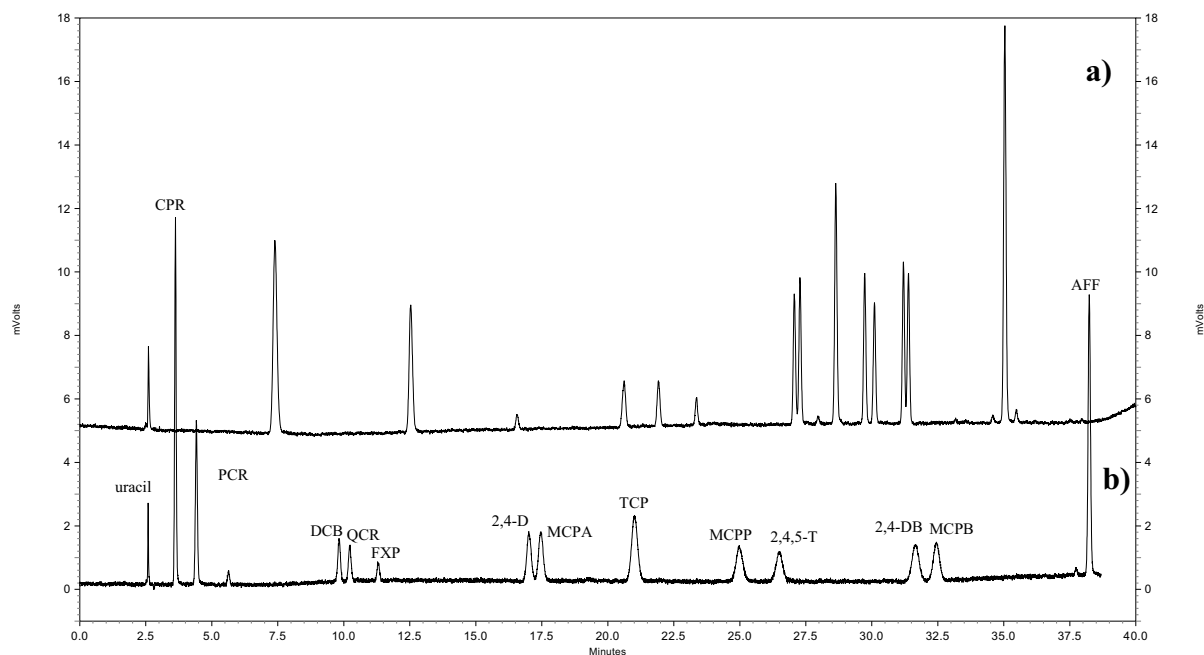
จากนั้นได้ทำการเปลี่ยนชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์จากเมทานอลเป็นอะซิโตนไตรล์ และปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ที่เป็นแบบ gradient elution จนได้ภาวะที่สามารถแยกสารได้ดีภายในระยะเวลาที่เหมาะสมแสดงดังรูปที่ 2.12b เมื่อเปรียบเทียบการแยกสารในตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นอะซิโตนไตรล์และเมทานอล จะเห็นว่าทั้งสองตัวทำละลายอินทรีย์สามารถแยกสารได้ดี และใช้ระยะเวลาในการแยกสารพอๆ กัน แต่มีลำดับการออกของสารสลับกัน 1 คู่ คือ MCPP กับ 2,4,5-T เนื่องจากเมื่อเปลี่ยนตัวทำละลายอินทรีย์ส่งผลต่อ selectivity ของสารได้

เมื่อเปรียบเทียบภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการแยกสารด้วย conventional column และ มอนอลิติกคอลัมน์ (รูปที่ 2.10 และ 2.11) พบว่าคอลัมน์ทั้งสองประเภทสามารถใช้แยกและวิเคราะห์สารกลุ่มฟีนอกซีแอซิดได้ แต่ในมอนอลิติกคอลัมน์สามารถแยกสารทุกพีกได้ baseline resolution ทั้ง

ในเฟสเคลื่อนที่เป็นเมทานอลและอะซิโตนในอัตราส่วน 1:1 ถึงแม้ว่ามอนอติทิกคอลัมน์ใช้ระยะเวลาแยกสารที่นานกว่า เนื่องจากใช้ความยาวของมอนอติทิกคอลัมน์ค่อนข้างมาก



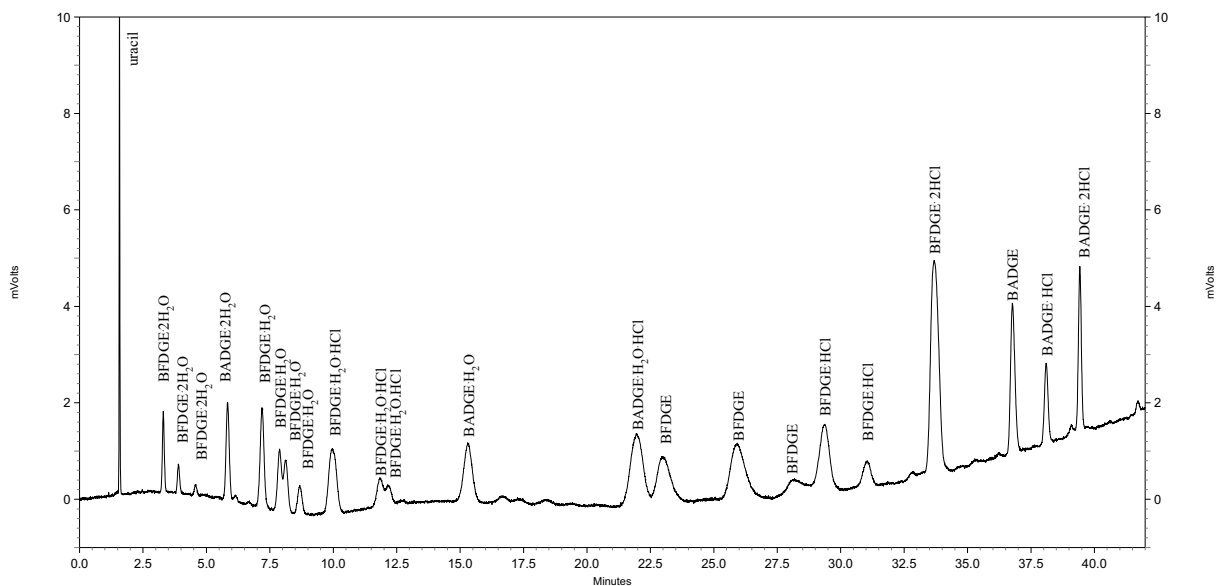
รูปที่ 2.11 โครมาโทแกรมของ phenoxy acid herbicides ด้วย μ HPLC โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น 0.1% formic acid ในน้ำ:0.1% formic acid ในเมทานอล (A:B) ด้วย gradient elution ดังนี้ a) 20-80%B (0-40 min) และ b) 45-44%B (0-3 min), 55%B (3-25 min), 55-60%B (25-26 min), 60%B (26-30 min), 60-80%B (30-35 min), 80%B (35-40 min) ภาวะอื่นๆ : คอลัมน์ ODS200a (ยาว 40 cm) และอัตราไหล 0.351 mL/min ($u = 2.5$ mm/s และ split ratio ประมาณ 75:1) และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 280 nm



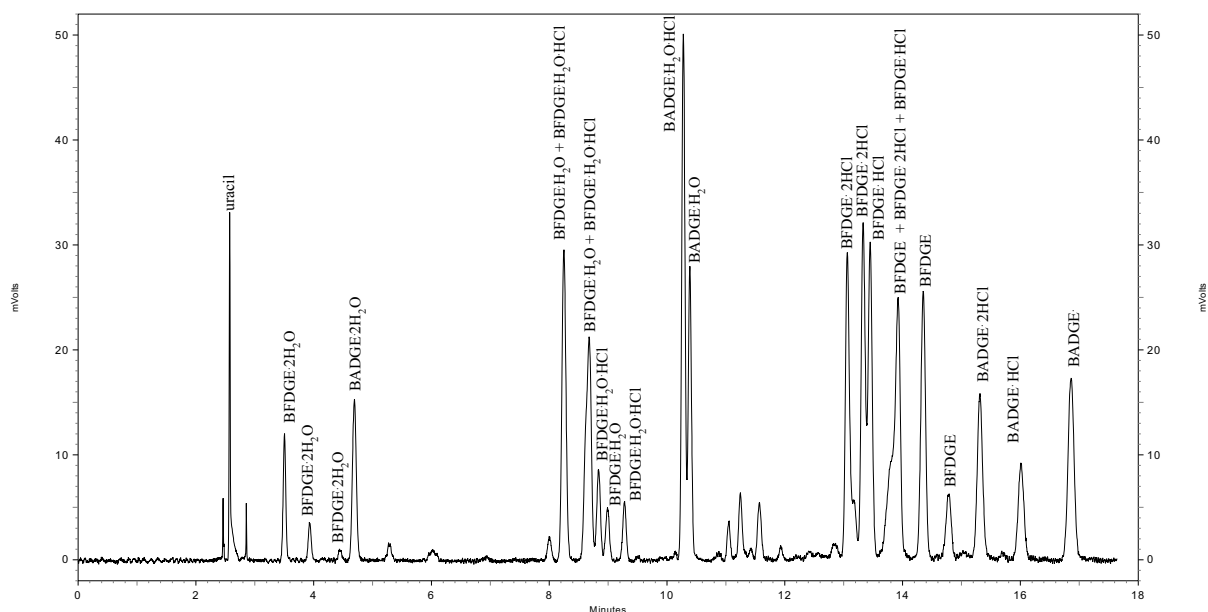
รูปที่ 2.12 โครมาโทแกรมของ phenoxy acid herbicides ด้วย μ HPLC โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น 0.1% กรดฟอร์มิกในน้ำ:0.1% กรดฟอร์มิกในอะซิโตไนไทรล์ (A:B) ด้วย gradient elution ดังนี้ a) 20-80%B (0-40 min) และ b) 32-40%B (0-3 min), 40%B (3-18 min), 40-42%B (18-19 min), 42%B (19-25 min), 42-60%B (25-30 min) และ 60%B (30-40min) ภาวะอื่นๆ : คอลัมน์ ODS200 (ยาว 40 cm) และอัตราไหล 0.369 mL/min ($u = 2.5$ mm/s และ split ratio 78:1) และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 280 nm

2) ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยก BADGE, BFDGE และอนุพันธ์ด้วยคอลัมน์ ODS

ได้ศึกษาพฤติกรรมการเคลื่อนที่และการแยกของ BADGE, BFDGE และอนุพันธ์ด้วย μ HPLC-UV โดยนำคอลัมน์ ODS200 ที่เตรียมได้มาใช้เป็นคอลัมน์แยกสาร และเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ (เมทานอลหรืออะซิโตไนไทรล์) โดยปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่เป็นแบบ gradient elution สำหรับเฟสเคลื่อนที่ที่เป็นน้ำและเมทานอล ได้ภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารดังรูปที่ 2.13 พิกของ BADGE, BFDGE และอนุพันธ์แต่ละชนิดแยกออกจากกันได้สมบูรณ์และสำหรับ BFDGE และอนุพันธ์บางตัวสามารถแยกไอโซเมอร์ออกจากกันได้ชัดเจน ถึงแม้ว่าเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์จะพอๆ กับการแยกสารด้วย conventional column ที่ได้รายงานไว้ก่อนหน้านี้ [Leepipatpiboon *et al.*: 2005] เมื่อเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่เป็นน้ำ และอะซิโตไนไทรล์ (รูปที่ 2.14) พิกของสารบางพิกไม่สามารถแยกออกจากกันได้สมบูรณ์



รูปที่ 2.13 โครมาโทแกรมของ BADGE, BFDGE และอนุพันธ์ ด้วย μ HPLC โดยใช้ภาวะแยกดังนี้: เฟสเคลื่อนที่เป็น น้ำ:เมทานอล (A:B) ด้วย gradient elution ดังนี้ 50%B (0-25 min), 50-80%B (25-45 min) ภาวะอื่นๆ : คอลัมน์ ODS200 ยาว 40 cm และอัตราไหล 0.426 mL/นาที ($u = 2.5$ mm/s และ split ratio ประมาณ 90:1) และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 220 nm



รูปที่ 2.14 โครมาโทแกรมของ BADGE, BFDGE และอนุพันธ์ด้วย μ HPLC โดยใช้ภาวะการแยกดังนี้: เฟสเคลื่อนที่เป็น น้ำ:อะซิโตไนไทรล์ (A:B) ด้วย gradient elution ดังนี้ 40-50%B (0-2 min), 50 (2-3 min), 50-60%B (3-5 min), 60%B (5-15 min) ภาวะอื่นๆ : คอลัมน์ ODS200b (ยาว 40 cm) และอัตราไหล 0.344 mL/min ($u = 2.5$ mm/s และ split ratio ประมาณ 73:1) และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 220 nm

3) การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับแยกสาร (phenoxy acids และ acidic herbicides และ BADGE, BFDGE และอนุพันธ์) ด้วยคอลัมน์ ODM

ได้ศึกษาพฤติกรรมการเคลื่อนที่และการแยกของ phenoxy acid herbicides ด้วย μ HPLC ที่มีเครื่องตรวจวัดเป็น UV โดยนำคอลัมน์ ODM200 ที่เตรียมได้มาใช้เป็นคอลัมน์แยกสาร โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ในภาวะที่เป็นกรด ประกอบด้วย 0.1% กรดฟอร์มิกในน้ำ:0.1% กรดฟอร์มิกในตัวทำละลายอินทรีย์ (เมทานอลหรืออะซิโตนไทรล์) แล้วปรับอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่แบบ gradient elution (ไม่ได้แสดงโครมาโทแกรมในที่นี้) พบว่าพีคที่ได้มีลักษณะ tailing อาจเนื่องจากสารแตกตัวได้บางส่วน จึงเกิดอันตรกิริยากับหมู่ซิลานอลที่เหลืออยู่บนเฟสคงที่ได้ นอกจากนี้ได้หาภาวะที่เหมาะสมสำหรับแยก BADGE, BFDGE และอนุพันธ์โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นน้ำ:ตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่าไม่สามารถแยกพีคสารออกจากกันได้สมบูรณ์ถึงแม้ว่าจะใช้อัตราส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ต่ำๆ แล้วก็ตาม ทำให้ในการแยกสารทั้งสองกลุ่มด้วยคอลัมน์ ODM ไม่ประสบผลสำเร็จ

2.4 สรุปผลการทดลอง

ได้เตรียมคอลัมน์มอนอลิติกซิลิกาคอลัมน์ แล้วนำไปปรับปรุงพื้นผิวเฟสคงที่ได้เป็นคอลัมน์ ODS และคอลัมน์ ODM จากนั้นนำคอลัมน์ ODS มาหาภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารในกลุ่ม phenoxy acids และ acidic herbicides โดยสามารถแยกพีคสารได้สมบูรณ์ ใช้เวลาในการวิเคราะห์สารประมาณ 40 นาที ทั้งในเฟสเคลื่อนที่ที่มีตัวทำละลายอินทรีย์เป็นเมทานอลและอะซิโตนไทรล์ นอกจากนี้ได้นำคอลัมน์ ODS มาหาภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารกลุ่ม BADGE, BFDGE และอนุพันธ์ โดยในการใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีตัวทำละลายเป็นเมทานอลสามารถแยกพีคสารออกจากกันได้สมบูรณ์ ใช้เวลาประมาณ 40 นาที ในขณะที่ตัวทำละลายเป็นอะซิโตนไทรล์ไม่สามารถแยกพีคสารทุกพีคออกจากกันได้สมบูรณ์

เอกสารอ้างอิง

- Berger U., Oehme M., and Girardin L. "Quantification of derivatives of bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) and novolac glycidyl ether (NOGE) migrated from can coatings into tuna by HPLC/fluorescence and MS detection" *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **369** (2001) 115-123.
- Cappiello A., Famiglini G., and Berloni A. "Large volume injection of acidic pesticides by reversed-phase micro high-performance liquid chromatography" *Journal of Chromatography A* **768** (1997) 215-222.
- Catalina M.I., Dalluge J., Vreuls R.J.J., and Brinkman U.A.T. "Determination of chlorophenoxy acid herbicides in water by in situ esterification followed by in-vial liquid-liquid extraction combined with large-volume on-column injection and gas chromatography-mass spectrometry" *Journal of Chromatography A* **877** (2000) 153-166.
- Cottier S., Riquet A.M., Feigenbaum A., Pollet B., Lapierre C., and Mortreuil P. "Identification of potential migrants from a vinylic organosol varnish by gas chromatography mass spectrometry and liquid chromatography mass spectrometry" *Journal of Chromatography A* **771** (1997) 366-373.
- Garcia R.S. and Losada P.P. "Determination of bisphenol A diglycidyl ether and its hydrolysis and chlorohydroxy derivatives by liquid chromatography-mass spectrometry" *Journal of Chromatography A* **1032** (2004) 37-43.
- Hirahara Y., Miyata M., Kamakura K., Watanabe Y., Takeda H., Maeda K., and Tonogai Y. "Comparison between methyl and pentafluorobenzyl esterification for analysis of 9 phenoxy acid herbicides in agricultural products" *Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health* **43** (1997) 129-139.
- Ishizuka N., Kobayashi H., Minakuchi H., Nakanishi K., Hirao K., Hosoya K., Ikegami T., and Tanaka N. "Monolithic silica columns for high-efficiency separations by high-performance liquid chromatography" *Journal of Chromatography A* **960** (2002) 85-96.
- Jung M. and Brumley W.C. "Trace Analysis of Fluorescein-Derivatized Phenoxy Acid Herbicides by Micellar Electrokinetic Chromatography with Laser-Induced Fluorescence Detection" *Journal of Chromatography A* **717** (1995) 299-308.
- Kruaysawat J., Marriott P.J., Hughes J., and Trenerry C. "Separation of chlorophenoxyacetic acids and chlorophenols by using capillary zone electrophoresis" *Electrophoresis* **22** (2001) 2179-2185.
- Kuang H., Chu X.G., Hou Y.X., and Xu C.L. "Simultaneous determination of 13 phenoxy acid herbicide residues in soybean by GC-ECD" *Analytical Letters* **39** (2006) 2617-2627.
- Leepipatpiboon N., Sae-Khow O., and Jayanta S. "Simultaneous determination of bisphenol-A-diglycidyl ether, bisphenol-F-diglycidyl ether, and their derivatives in oil-in-water and aqueous-based canned foods by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection" *Journal of Chromatography A* **1073** (2005) 331-339.
- Legido-Quigley C., Marlin N. D., Melin V., Manz A., and Smith N. W. "Advances in capillary electrochromatography and micro-high performance liquid chromatography monolithic columns for separation science" *Electrophoresis* **24** (2003) 917-944.

- Lintschinger J. and Rauter W. "Simultaneous determination of bisphenol A-diglycidyl ether, bisphenol F-diglycidyl ether and their hydrolysis and chlorohydroxy derivatives in canned foods" *European Food Research and Technology* **211** (2000) 211-217.
- Miyamoto K., Takeshi H., Kobayashi H., Morisaka H., Tokuda D., Horie K., Koduki K., Makino S., Núñez O., Yang C., Kawabe T., Ikegami T., Takubo H., Ishihama Y., and Tanaka N. "High-Efficiency Liquid Chromatography Separation Utilizing Long Monolithic Silica Capillary Columns" *Analytical Chemistry* **80** (2008) 8741-8750.
- Motokawa M., Kobayashi H., Ishizuka N., Minakuchi H., Nakanishi K., Jinnai H., Hosoya K., Ikegami T., and Tanaka N. "Monolithic silica columns with various skeleton sizes and through-pore sizes for capillary liquid chromatography" *Journal of Chromatography A* **961** (2002) 53-63.
- Nerin C., Philo M.R., Salafranca J., and Castle L. "Determination of bisphenol-type contaminants from food packaging materials in aqueous foods by solid-phase microextraction-high-performance liquid chromatography" *Journal of Chromatography A* **963** (2002) 375-380.
- Nilsson T., Baglio D., Galdo-Miguez I., Madsen J.O., and Facchetti S. "Derivatisation/solid-phase microextraction followed by gas chromatography mass spectrometry for the analysis of phenoxy acid herbicides in aqueous samples" *Journal of Chromatography A* **826** (1998) 211-216.
- Núñez O., Ikegami T., Kajiwarra W., Miyamoto K., Horie K., and Tanaka N. "Preparation of high efficiency and highly retentive monolithic silica capillary columns for reversed-phase chromatography by chemical modification by polymerization of octadecyl methacrylate" *Journal of Chromatography A* **1156** (2007) 35-44.
- Núñez O., Nakanishi, K., and Tanaka, N. "Preparation of Monolithic Silica Columns for High-Performance Liquid Chromatography" *Journal of Chromatography A* **1191** (2008) 231-252.
- Pereiro I.R., Irimia R.G., Cano E.R., and Torrijos R.C. "Optimisation of a gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of phenoxy acid herbicides in water samples as silyl derivatives" *Analytica Chimica Acta* **524** (2004) 249-256.
- Rimmer D.A., Johnson P.D., and Brown R.H. "Determination of phenoxy acid herbicides in vegetation, utilising high-resolution gel permeation chromatographic clean-up and methylation with trimethylsilyldiazomethane prior to gas chromatographic analysis with mass-selective detection" *Journal of Chromatography A* **755** (1996) 245-250.
- Rodriguez I., Rubi E., Gonzalez R., Quintana J.B., and Cela R. "On-fibre silylation following solid-phase microextraction for the determination of acidic herbicides in water samples by gas chromatography" *Analytica Chimica Acta* **537** (2005) 259-266.
- Rosales-Conrado N., Leon-Gonzalez M.E., Perez-Arribas L.V., and Polo-Diez L.M. "Determination of chlorophenoxy acid herbicides and their esters in soil by capillary high performance liquid chromatography with ultraviolet detection, using large volume injection and temperature gradient" *Analytica Chimica Acta* **470** (2002) 147-154.
- Snyder L.R., Kirkland J.J., and Glajeh J.L. (1997) Practical HPLC method development John Wiley&Son, Inc.

- Takino M., Daishima S., and Nakahara T. "Automated on-line in-tube solid-phase microextraction followed by liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry for the determination of chlorinated phenoxy acid herbicides in environmental waters" *Analyst* **126** (2001) 602-608.
- Wu J.M., Ee K.H., and Lee H.K. "Automated dynamic liquid-liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection for the determination of phenoxy acid herbicides in environmental waters" *Journal of Chromatography A* **1082**(2005) 121-127.

บทที่ 3

การเปรียบเทียบค่าจำเพาะการแยกสารของอะทาลิโคคัลมันน์ประเภทอนอลิตที่ ปรับปรุงพื้นผิวด้วยพอลิออกตะเดคซิลเมทาคริเลตและหมู่พอลิออกตะเดคซิลสำหรับการ แยกสารประกอบกลุ่มเฮไลเจนในลิกวิดโครมาโทกราฟีแบบรีเวิร์สเฟส¹

3.1 คำนำ

จากรายงานที่ผ่านมา พื้นผิวของอะทาลิโคคัลมันน์ประเภทซิลิกามอนอลิตได้มีการปรับปรุงพื้นผิวให้ได้เฟสคงที่หลากหลาย ซึ่งมีกลไกการแยกสารแตกต่างกัน เช่น reversed-phase [Miyamoto *et al.*:2008, Motokawa *et al.*:2002, Hara *et al.*: 2006, Cabrera: 2004, Eeltink *et al.*: 2004], ion-exchange [Chambers *et al.*:2007] หรือ hydrophilic interaction [Ikegami *et al.*:2008] เป็นต้น เฟสคงที่ของคอลัมน์ที่แตกต่างกัน ส่งผลให้มีคุณสมบัติของเฟสคงที่ (column characteristic) และค่าจำเพาะการแยก (selectivity, α ซึ่งในที่นี้หมายถึงอัตราส่วนของรีเทนชันแฟกเตอร์ของสาร เช่น k_2/k_1 , $\alpha \geq 1$) ต่างกันไป จึงควรมีการศึกษาสมบัติดังกล่าวเพื่อให้เข้าใจอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างสารกับเฟสคงที่ จนทำให้นักวิเคราะห์สามารถเลือกใช้เฟสคงที่ได้เหมาะสมกับการวิเคราะห์สารชนิดต่างๆ และข้อมูลเหล่านี้ยังเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารประเภทใหม่ [Stella *et al.*:2001a, Stella *et al.*:2001b, Neue *et al.*: 2006, Wilson *et al.*: 2002, Turowski *et al.*: 2001]

จากงานวิจัยที่ผ่านมา [Núñez *et al.*: 2007b] ได้ศึกษาคุณสมบัติของอะทาลิโคคัลมันน์ประเภทอนอลิตที่ปรับปรุงพื้นผิวเป็น reversed-phase ได้แก่ คอลัมน์ ODM [Núñez *et al.*: 2007a] และ ODS [Tanaka *et al.*: 1985] สำหรับการแยกสารที่มีขั้วและไม่มีขั้วบางประเภท เช่น benzenes และ naphthalene derivatives, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), steroids and alkylphthalates และ tocopherol homologues พบว่าทั้งสองคอลัมน์นี้แสดงคุณสมบัติในการแยกสารเหล่านี้แตกต่างกัน โดยคอลัมน์ ODM เกิดอันตรกิริยากับสารประเภทที่มีวงอะโรแมติก รูปร่างแบนราบและมีความแข็งแรงของโครงสร้างโมเลกุลได้ดี อีกทั้งสังเกตได้ว่าคอลัมน์ประเภท ODM มีค่าจำเพาะการแยกสารที่ทำการศึกษาคือดีกว่าคอลัมน์ ODS โดยคอลัมน์ ODM แยกสารได้ดีกว่าเมื่อใช้ภาวะการแยกที่เหมือนกันกับคอลัมน์ ODS นอกจากนี้ยังมีรายงานการเปรียบเทียบการแยกสารของคอลัมน์ที่ใช้เฟสคงที่เป็น poly(octadecyl acrylate) (ODA) ที่เคลือบบนเม็ดซิลิกา กับเฟสคงที่เป็น ODS ที่เคลือบบนเม็ดซิลิกา [Chowdhury *et al.*: 2000, Fukumoto *et al.*:1994, Malik *et al.*:2008] ซึ่ง

¹ งานวิจัยนี้ได้นำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติที่ HPLC2008Kyoto และตีพิมพ์ใน Journal of Chromatography A 1216 (2009) 5868-5874 ดังภาคผนวก 1

คอลัมน์ ODA มีโครงสร้างของสายโซ่ C18 เหมือนกับคอลัมน์ ODM จากการศึกษาพบว่า คอลัมน์ ODA ให้ค่าจำเพาะการแยกสารประเภท PAHs ได้ดีกว่า เนื่องจากเฟสคงที่ ODA มีสายโซ่ C18 ที่จัดเรียงตัวกันเป็นระเบียบทำให้เกิดอันตรกิริยาได้ดี และยังเกิดอันตรกิริยาระหว่างหมู่คาร์บอนิลบนเฟสคงที่ ODA กับสารประเภทแอโรแมติกอีกด้วย เมื่อเปรียบเทียบกับเกิดการเกิดอันตรกิริยาของสารกับเฟสคงที่ ODS

สำหรับสารประกอบที่มีหมู่ไฮดรอกซิลเป็นสารที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม เช่น chlorophenols, polychlorinated biphenyls และ halogenated dibenzo-p-dioxins โดยแต่ละกลุ่มประกอบด้วย homologue และ isomer มากมาย ดังนั้นจึงต้องการวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับการวิเคราะห์สารเหล่านี้ จากงานวิจัยที่ผ่านมา [Hosoya *et al.*:1993] ได้มีเปรียบเทียบค่าจำเพาะการแยกสารสำหรับวิเคราะห์ตัวทำละลายที่มีองค์ประกอบของหมู่ไฮดรอกซิล บนเฟสคงที่ที่เป็น ODS ที่เคลือบบนเม็ดซิลิกา กับเฟสคงที่จำพวกเม็ดพอลิเมอร์ ได้แก่ poly(methyl methacrylate-ethylene dimethacrylate) และ poly(styrene-divinylbenzene) โดยพบว่า เฟสคงที่จำพวกพอลิเมอร์สามารถเกิดอันตรกิริยากับสารประกอบกลุ่มไฮดรอกซิลได้ดีกว่า แต่อย่างไรก็ตามเฟสคงที่ที่เป็นเม็ดพอลิเมอร์ให้ประสิทธิภาพการแยกที่ไม่ดีนัก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะต่อยอดงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ทำการศึกษาคูสมบัติของคอลัมน์ ODS และ ODM [Núñez *et al.*: 2007, Hosoya *et al.*:1993] โดยจะทำการศึกษาและเปรียบเทียบการรีเทนและค่าจำเพาะการแยกสารบนคอลัมน์ ODM และ ODS สำหรับการแยกสารที่มีหมู่ไฮดรอกซิลเป็นองค์ประกอบ โดยเลือกใช้สารทดสอบเป็น halogenated benzenes และนำไปเปรียบเทียบกับ alkylbenzenes นอกจากนี้ได้ประยุกต์ใช้คอลัมน์ ODM และ ODS สำหรับแยกสารกลุ่ม chlorophenols 17 ชนิด

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 เครื่องมือ

- ระบบที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ด้วย μ HPLC เพื่อใช้ศึกษาและเปรียบเทียบค่าจำเพาะการแยกของคอลัมน์เป็นระบบของ HPLC แบบ split-flow/injection (ดังรูปที่ 2.4 ในบทที่ 2) ประกอบด้วยปั๊ม (บริษัท Jasco รุ่น X-LC 3185PU), 7725 injector (บริษัท Rheodyne) ที่มี splitting T-joint, UV detector (บริษัท GL Sciences รุ่น MU701) และ capillary flow cell (GL Sciences, cell volume 6 nL) ในการทดลองได้ใช้คอลัมน์ ODM และ ODS เส้นผ่านศูนย์กลาง 200 μ m ความยาว 28 cm โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 30 °C ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 214 nm และให้เฟสเคลื่อนที่เคลื่อนที่ด้วยความเร็วเชิงเส้น 1.0 mm/s

3.2.2 สารเคมี

- สารทดสอบที่ใช้ในการศึกษาค่าจำเพาะการแยกของคอลัมน์แบบ reversed-phase ได้แก่

1) *monoalkylbenzenes*: benzene (-H), toluene (-CH₃), ethylbenzene (-C₂H₅) and propylbenzene (-C₃H₇)

2) *monohalogenated benzenes*: fluorobenzene (-F), chlorobenzene (-Cl), bromobenzene (-Br) and iodobenzene (-I)

3) *dialkylbenzenes*: *o*-xylene (*o*-di-CH₃), *m*-xylene (*m*-di-CH₃), *p*-xylene (*p*-di-CH₃), *o*-diethylbenzene (*o*-di-C₂H₅), *m*-diethylbenzene (*m*-di-C₂H₅) และ *p*-diethylbenzene (*p*-di-C₂H₅)

4) *dihalogenated benzenes*: *o*-difluorobenzene (*o*-di-F), *m*-difluorobenzene (*m*-di-F), *p*-difluorobenzene (*p*-di-F), *o*-dichlorobenzene (*o*-di-Cl), *m*-dichlorobenzene (*m*-di-Cl), *p*-dichlorobenzene (*p*-di-Cl), *o*-dibromobenzene (*o*-di-Br), *m*-dibromobenzene (*m*-di-Br) และ *p*-dibromobenzene (*p*-di-Br))

5) *chlorophenols*: (1) 2-chlorophenol, (2) 4-chlorophenol, (3) 3-chlorophenol, (4) 2,6-dichlorophenol, (5) 2,3-dichlorophenol, (6) 2,5-dichlorophenol, (7) 2,4-dichlorophenol, (8) 3,4-dichlorophenol, (9) 3,5-dichlorophenol, (10) 2,3,6-trichlorophenol, (11) 2,3,4-trichlorophenol, (12) 2,4,5-trichlorophenol, (13) 3,4,5-trichlorophenol, (14) 2,3,4,6-tetrachlorophenol, (15) 2,3,5,6-tetrachlorophenol, (16) 2,3,4,5-tetrachlorophenol และ (17) pentachlorophenol

3.3 ผลการทดลองและวิจารณ์

งานวิจัยนี้ได้ศึกษารีเทนชันและเปรียบเทียบค่าจำเพาะการแยกของสารบนคอลัมน์ ODM และ ODS โดยใช้สารทดสอบเป็นสารกลุ่ม halogenated benzenes และ alkyl benzenes และใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นเมทานอล (MeOH) และ อะซิโตไนไทรล์ (ACN) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการเปรียบเทียบค่าจำเพาะการแยกบนคอลัมน์ทั้งสองชนิดนั้นทำที่ภาวะเดียวกัน ดังนั้นการรีเทนและค่าจำเพาะการแยกสารที่แตกต่างกันเป็นผลมาจากความแตกต่างของคุณสมบัติของเฟสคงที่ทั้งสอง

3.3.1 Monosubstituted benzenes

ได้ศึกษา selectivity ของ monohalogenated benzenes และ monoalkylbenzenes บนคอลัมน์ ODM และ ODS ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 200 μ m ยาว 28 cm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นน้ำ: ACN หรือ น้ำ: MeOH (A:B) ในช่วง 50-80 %B โครมาโทแกรมที่ได้ในเฟสเคลื่อนที่เป็น 70% ACN และ 70% MeOH แสดงดังรูปที่ 3.1 ทั้ง monohalogenated benzenes และ monoalkylbenzenes รีเทนบนคอลัมน์ ODM ได้นานกว่าทั้งใน MeOH และ ACN จากรูปที่ 3.1a เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น MeOH ในภาวะต่างๆ ที่เหมือนกัน คู่ -Cl กับ -CH₃ และ -I กับ -C₂H₅

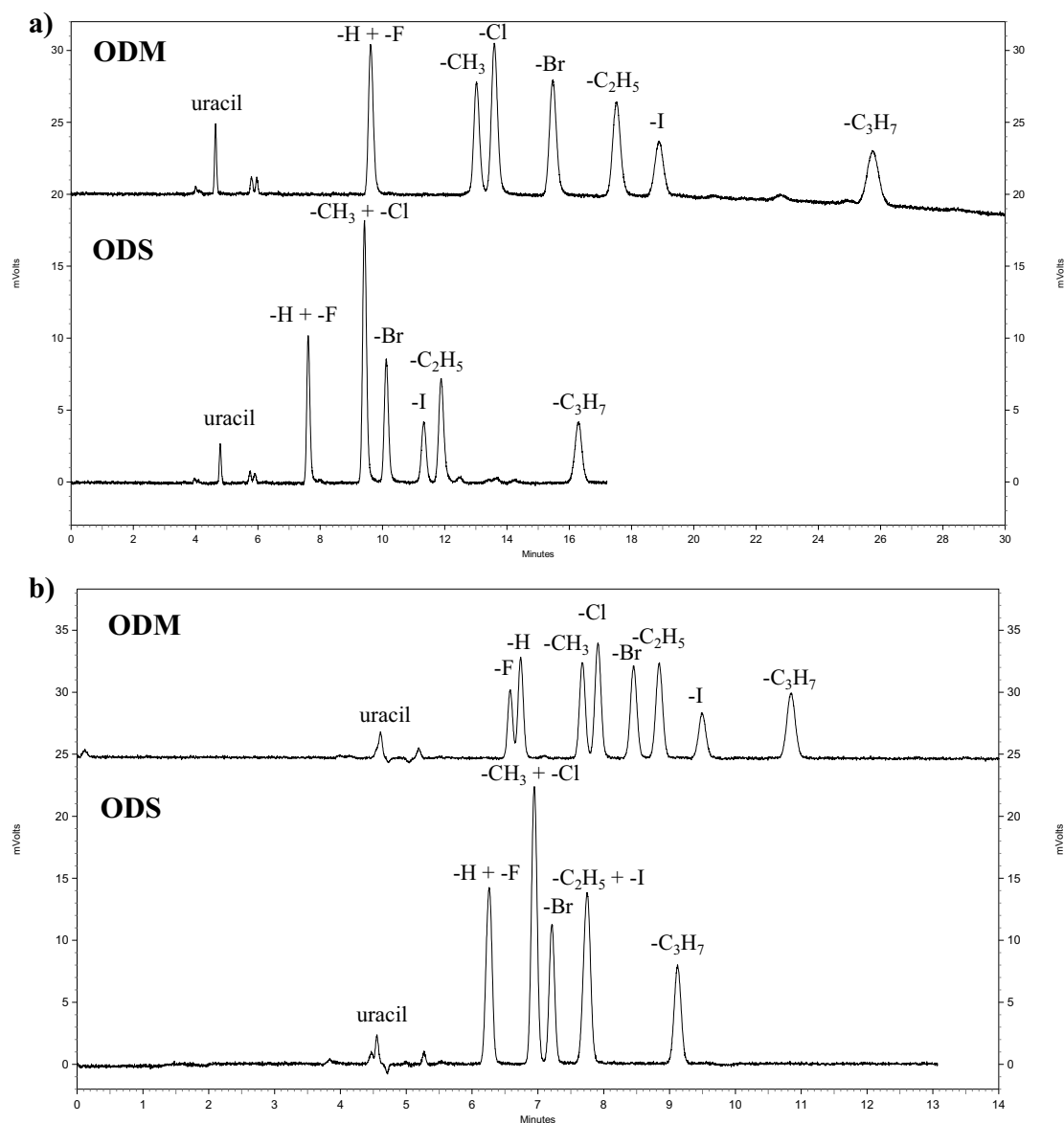
แยกออกจากกันได้บนคอลัมน์ ODM ในขณะที่ไม่เกิดการแยกของกลุ่ม $-Cl$ กับ $-CH_3$ และเกิดการสลับลำดับการออกของ $-I$ กับ $-C_2H_5$ บนคอลัมน์ ODS และเมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น ACN (รูปที่ 3.1b) ให้ผลในทำนองเดียวกัน โดยที่สารคู่ $-F$ กับ $-H$, $-Cl$ กับ $-CH_3$ และ $-I$ กับ $-C_2H_5$ เกิดการแยกได้บนคอลัมน์ ODM แต่ไม่เกิดการแยกบนคอลัมน์ ODS นอกจากนี้สังเกตได้ว่าการรีเทนของสารกลุ่ม halogenated benzenes บนคอลัมน์ ODM และ ODS มีความแตกต่างกันมากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับสารกลุ่ม alkylbenzenes ทั้งในเฟสเคลื่อนที่ที่เป็น MeOH และ ACN

กระบวนการรีเทนของสารใน reversed-phase HPLC ขึ้นกับ 2 ปัจจัย ได้แก่ ผลของเฟสเคลื่อนที่ และผลของเฟสคงที่ โดยอันตรกิริยาที่เกี่ยวข้องระหว่างสารกับเฟสเคลื่อนที่ที่เป็น hydrophobic interaction ในขณะที่อันตรกิริยาระหว่างสารกับเฟสคงที่มี dispersion interaction เป็นอันตรกิริยาหลัก แต่อาจมี dipolar interaction อื่นๆ ร่วมด้วย ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของเฟสคงที่ และตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ซึ่งสามารถดูดซับบนผิวของเฟสคงที่ได้บางส่วน ดังนั้นการที่สารมีพฤติกรรมเคลื่อนที่และการแยกแตกต่างกันทั้งที่ใช้ภาวะอื่นๆ เหมือนกัน เพียงแต่ใช้เฟสคงที่ที่แตกต่างกัน จึงเป็นผลจากความแตกต่างของเฟสคงที่นั่นเอง

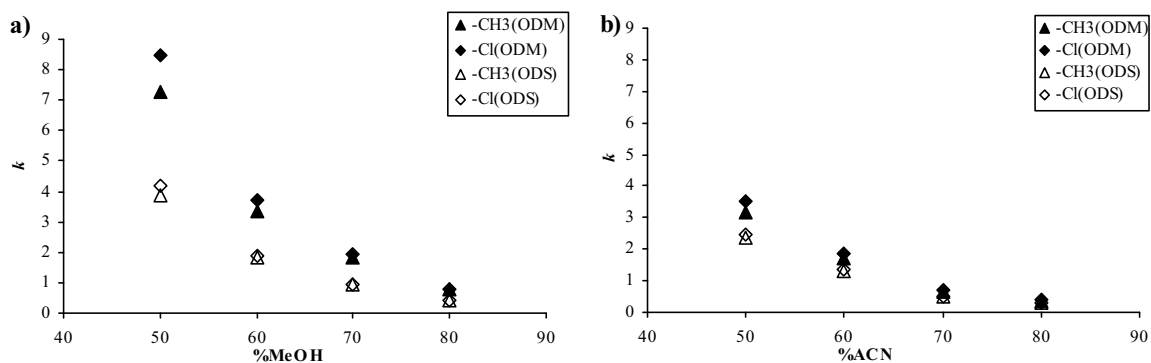
เมื่อเปรียบเทียบการรีเทนของสารในเฟสเคลื่อนที่ที่เป็น ACN:น้ำ และ MeOH:น้ำ ดังรูปที่ 3.2 ซึ่งเป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างรีเทนชันแฟกเตอร์ (k) (คำนวณค่า k ได้โดยใช้สมการที่ 2.1 ในบทที่ 2) ที่ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ในที่นี้ยกตัวอย่างผลของ chlorobenzene และ toluene นำมาวิจารณ์ผล พบว่าทั้ง $-Cl$ กับ $-CH_3$ รีเทนบนคอลัมน์ ODM ได้ดีกว่า และที่ปริมาณของเมทานอลต่ำๆ $-Cl$ รีเทนทั้งบนคอลัมน์ ODM และ ODS ได้ดีกว่า $-CH_3$ เมื่อเปลี่ยนตัวทำละลายอินทรีย์เป็น ACN ก็ให้แนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน ซึ่งจากกราฟเห็นได้ว่าตัวทำละลายอินทรีย์ส่งผลต่อการรีเทนของสารบนคอลัมน์ ODM ได้มากกว่า โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับสารกลุ่ม halogenated compounds นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบการแยกในเฟสเคลื่อนที่ที่เป็น ACN และ MeOH บนคอลัมน์เดียวกัน เมื่อเทียบกับ MeOH พบว่า ACN ทำให้สารรีเทนบนคอลัมน์ได้น้อยลง เนื่องจากสารเกิด dispersion interaction กับเฟสคงที่ได้ลดลงในเฟสเคลื่อนที่ที่เป็น ACN

เมื่อพิจารณากราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\log k$ ของสารบนคอลัมน์ ODM เทียบกับ $\log k$ ของสารบนคอลัมน์ ODS ดังรูปที่ 3.3 สารกลุ่ม monosubstituted benzenes ให้ค่า $\log k$ บนคอลัมน์ ODM มากกว่า แสดงว่ารีเทนบนคอลัมน์ ODM ได้ดีกว่า ทั้งในระบบเฟสเคลื่อนที่ ACN และ MeOH จากกราฟพบว่าเมื่อจำนวนคาร์บอนในสายโซ่ตรงของ alkylbenzenes เพิ่มขึ้น ก็ให้การรีเทนเพิ่มขึ้นในลักษณะความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรง ซึ่งพฤติกรรมลักษณะนี้เป็นพฤติกรรมปกติสำหรับในระบบที่เป็น reversed-phase ส่วนสารกลุ่ม halogenated benzenes ก็ให้ความสัมพันธ์ในลักษณะที่เพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงเช่นเดียวกันเมื่อเพิ่มขนาดและ polarizability ของเฮโลเจนอะตอม และเมื่อเปรียบเทียบความชันของกราฟระหว่างสารกลุ่ม monohalogenated benzenes กับ

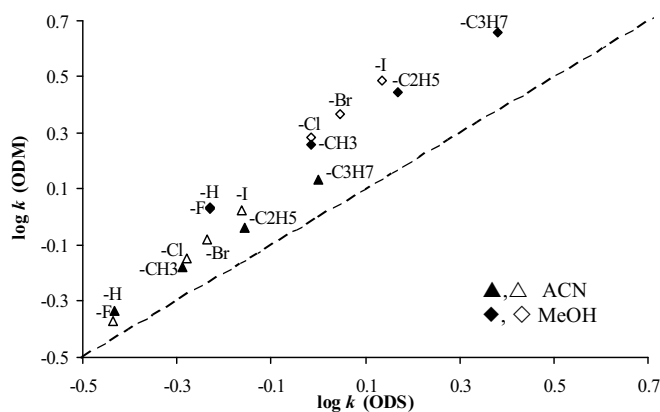
monoalkylbenzenes พบว่า ความเข้มข้นของ halogenated benzenes มีค่ามากกว่าทั้งในเฟสเคลื่อนที่ที่เป็น ACN และ MeOH ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากมีอันตรกิริยาเพิ่มเติมที่มีผลต่อการรีเทนของ halogenated benzenes บน ODM คอลัมน์ เมื่อเทียบกับอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นกับ alkylbenzenes [Turowski *et al.*: 2001]



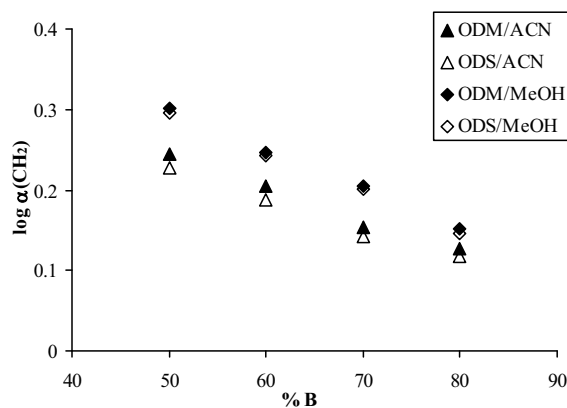
รูปที่ 3.1 โครมาโทแกรมของ monohalogenated benzenes และ monoalkylbenzenes โดยใช้คอลัมน์ ODM และ ODS ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 200 μm ยาว 28 cm และใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็น (a) 70% MeOH และ (b) 70% ACN และภาวะอื่นๆ ได้แก่ $u = 1.0 \text{ mm/s}$ ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 214 nm และควบคุมอุณหภูมิที่ 30 $^{\circ}\text{C}$



รูปที่ 3.2 ค่ารีเทนชันแฟกเตอร์ของ chlorobenzene และ toluene ในเฟสเคลื่อนที่ที่มีอัตราส่วนตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ ในช่วง 50-80% โดย a) MeOH และ b) ACN บนคอลัมน์ ODM และ ODS และภาวะอื่นๆ ดังรูปที่ 3.1



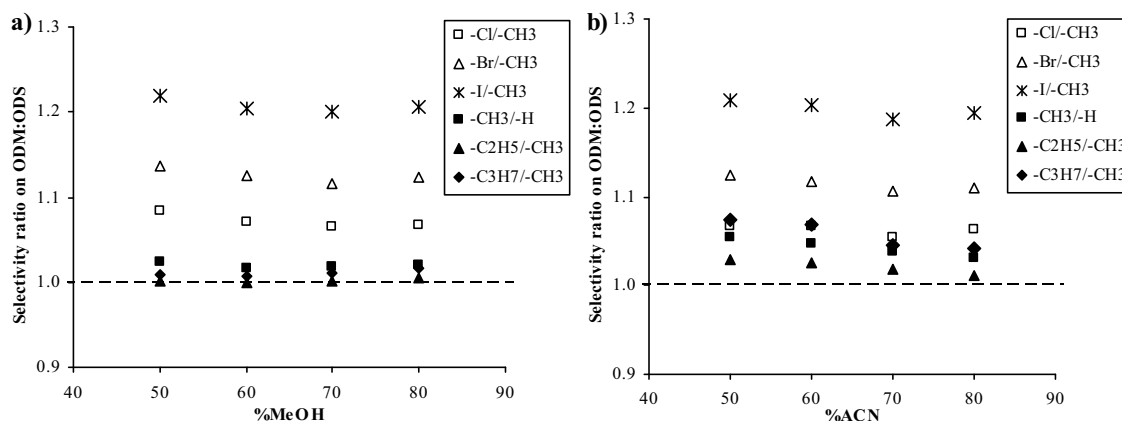
รูปที่ 3.3 ค่า $\log k$ ของ monosubstituted benzenes บนคอลัมน์ ODM เทียบกับค่า $\log k$ ของสารบนคอลัมน์ ODS และใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็น (a) 70% MeOH และ (b) 70% ACN และภาวะอื่นๆ ดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.4 ความสัมพันธ์ระหว่าง $\log \alpha(\text{CH}_2)$ กับ % organic solvent ในเฟสเคลื่อนที่ในช่วง 50-80% และภาวะอื่นๆ ดังรูปที่ 3.1

กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\log$ ของ methylene group selectivity ($\log \alpha(\text{CH}_2)$) เทียบกับ ปริมาณของปริมาณของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนในช่วง 50-80% แสดงดังรูปที่ 3.4 โดย $\log \alpha(\text{CH}_2)$ คำนวณได้จากความชันของกราฟเส้นตรงที่พลอตระหว่าง $\log k$ ของ alkylbenzenes กับจำนวนคาร์บอนในโซ่ตรง ถ้าหากค่า $\log \alpha(\text{CH}_2)$ มาก แสดงถึงว่าเฟสคงที่นั้นมี ความ hydrophobic ที่มาก ซึ่งจากรูปที่ 3.4 คอลัมน์ ODM ให้ค่า $\log \alpha(\text{CH}_2)$ ที่มากกว่าคอลัมน์ ODS ทั้งในเฟสเคลื่อนที่เป็น ACN และ MeOH ทั้งนี้เนื่องจากคอลัมน์ ODM มีจำนวนสายโซ่ C18 ที่เกิดพันธะกับ silica support มากกว่า [Núñez *et al.*: 2007a] อีกทั้งระยะห่างระหว่างสายโซ่ C18 ในคอลัมน์ ODS กว้างกว่า ทำให้มีปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ที่มาดูดซับบนเฟสคงที่ได้ดีกว่า คอลัมน์ ODM เมื่อพิจารณาค่า $\log \alpha(\text{CH}_2)$ บนคอลัมน์ ODM กับ ODS ในเฟสเคลื่อนที่เป็น ACN เห็นได้ว่า ค่า $\log \alpha(\text{CH}_2)$ ของคอลัมน์ทั้งสองมีความแตกต่างกันชัดเจนกว่าในกรณีที่ใช้เฟส เคลื่อนที่เป็น MeOH อาจเป็นผลมาจากการที่ ACN สามารถดูดซับลงบนพื้นผิวของเฟสคงที่ได้ ดีกว่า MeOH [Kazakevich *et al.*:2001]

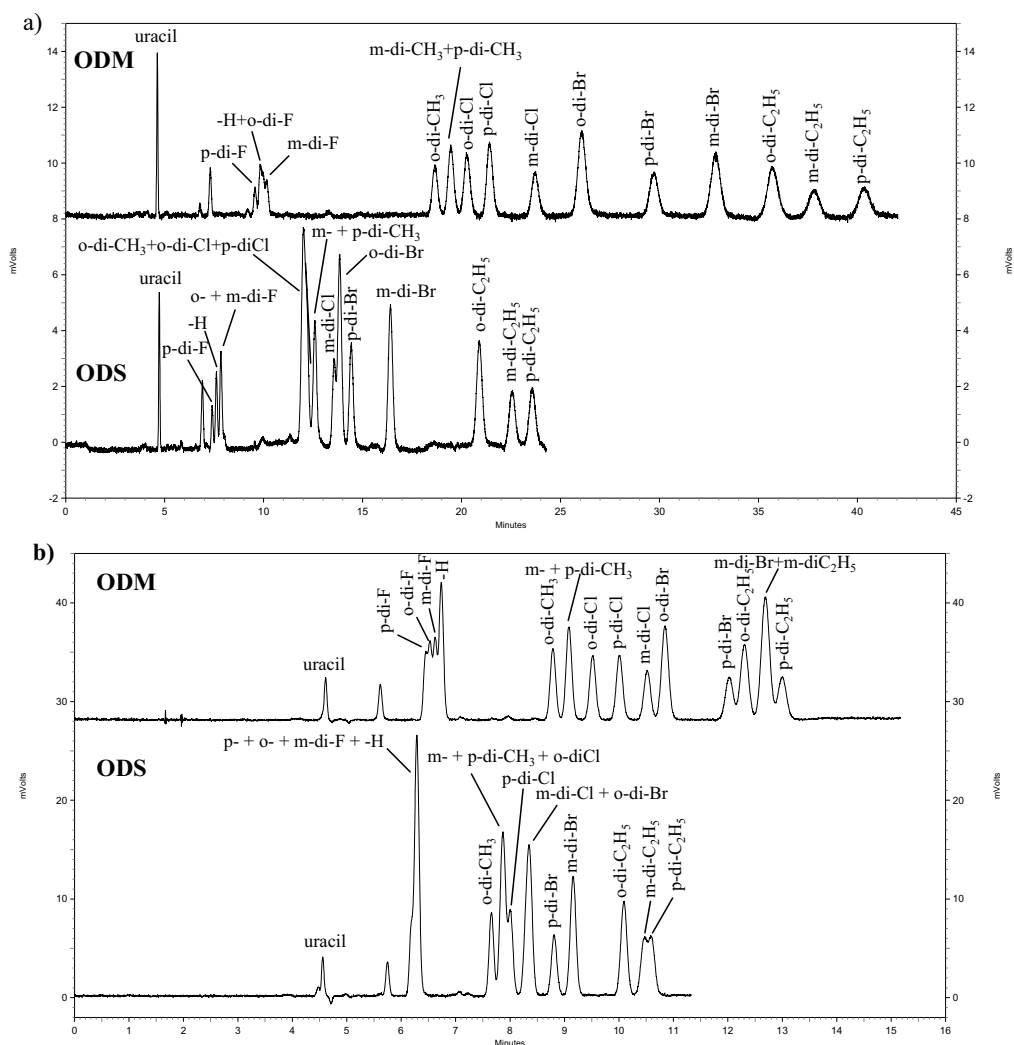
รูปที่ 3.5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของค่าจำเพาะการแยกบนคอลัมน์ ODM เทียบกับ ODS กับปริมาณของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ โดยค่าจำเพาะการแยก คำนวณได้จากอัตราส่วนของรีเทนชันแฟกเตอร์ของสาร สำหรับสารในกลุ่ม alkylbenzenes ให้ค่า ค่าจำเพาะการแยกของ homologous series บนคอลัมน์ ODM และ ODS พอดีกัน โดย α หมายถึง อัตราส่วนของรีเทนชันแฟกเตอร์ของสาร เช่น k_2/k_1 , $k_2 \geq k_1 \geq 1$ และ $\alpha \geq 1$ (อัตราส่วนของค่า จำเพาะการแยกใกล้ 1) ในขณะที่สารกลุ่ม halogenated benzenes ให้ค่าจำเพาะการแยกของสาร เทียบกับโทลูอินบนคอลัมน์ ODM มากกว่า ทั้งในเฟสเคลื่อนที่เป็น ACN และ MeOH โดยเมื่อ ขนาดอะตอมของเฮโลเจนเพิ่มขึ้น ค่าจำเพาะการแยกของเฮโลเจนที่เทียบกับโทลูอินบนคอลัมน์ ODM ยิ่งเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับคอลัมน์ ODS ค่าจำเพาะการแยกของ halogenated compounds บน คอลัมน์ทั้งสองนี้แตกต่างกัน เนื่องจากผลของ dispersion interaction บนคอลัมน์ ODM ที่มากกว่า เมื่อเทียบกับอันตรกิริยาที่เกิดกับ alkylbenzenes โดยมีเกิดอันตรกิริยาได้มากขึ้นเมื่อขนาดอะตอม ของเฮโลเจนใหญ่ขึ้น นอกจากนี้ยังเป็นผลจากหมู่คาร์บอนิลที่อยู่บนสายโซ่ของ octadecyl methacrylate บนเฟสคงที่ ODM ทำให้เกิด carbonyl- π interaction ระหว่างสารกับเฟสคงที่เพิ่มเติม ด้วย [Chowdhury *et al.*: 2000, Fukumoto *et al.*:1994, Malik *et al.*:2008]



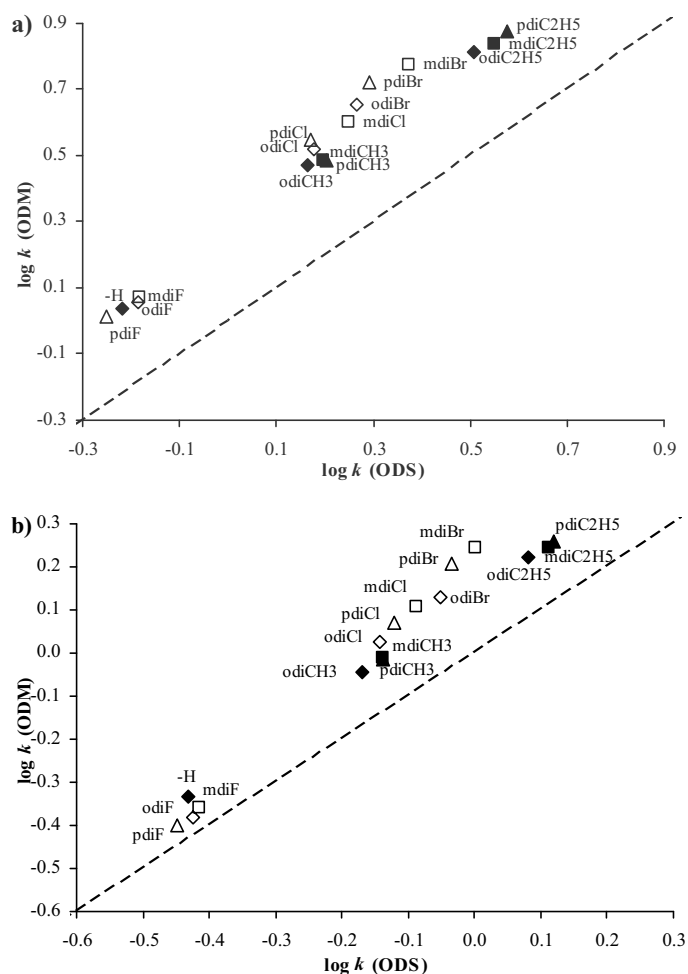
รูปที่ 3.5 อัตราส่วน selectivity ของสารบน ODM เทียบกับ ODS โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีอัตราส่วนของ organic solvent ในช่วง 50-80% โดย a) MeOH และ b) ACN ซึ่งจุดทึบเป็นการเปรียบเทียบระหว่างสารทดสอบที่เป็นอัลคิลเบนซีนที่มีหมู่ CH_2 ต่างกัน 1 หน่วย และ จุดโปร่งเป็นการเปรียบเทียบระหว่างสารทดสอบที่เป็นเฮโลเจนเบนซีนเทียบกับโทลูอิน และภาวะอื่นๆ ดังรูปที่ 3.1

3.3.2 Disubstituted benzenes

ได้ศึกษาและเปรียบเทียบค่าจำเพาะการแยกของสารกลุ่ม disubstituted benzenes บนคอลัมน์ ODM และ ODS ในเฟสเคลื่อนที่ทั้งที่เป็น ACN และ MeOH โครมาโทแกรมที่ได้แสดงดังรูปที่ 3.6 สารเกิดการรีเทนได้ดีกว่าบนคอลัมน์ ODM และสังเกตได้ว่าการแยกของสารที่เป็น positional isomer บนคอลัมน์ ODM เกิดได้ดีกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับคอลัมน์ ODS และเมื่อพิจารณากราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\log k$ ของสารกลุ่ม disubstituted benzenes บนคอลัมน์ ODM เทียบกับบนคอลัมน์ ODS (รูปที่ 3.7) พบว่ามีแนวโน้มที่คล้ายคลึงกับผลของ monosubstituted benzenes กล่าวคือ สารเกิดการรีเทนได้ดีบนคอลัมน์ ODM และสำหรับสารกลุ่ม alkylbenzenes มีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงตามความยาวสายโซ่คาร์บอน ส่วนสารกลุ่ม halogenated benzenes มีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงเช่นเดียวกัน ตามขนาดและ polarizability ที่เพิ่มขึ้น



รูปที่ 3.6 โครมาโทแกรมของ dihalogenated benzenes และ dialkylbenzenes โดยใช้คอลัมน์ ODM และ ODS ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 200 μ m ยาว 28 cm และใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น (a) 70% MeOH และ (b) 70% ACN และภาวะอื่นๆ ดังรูปที่ 3.1

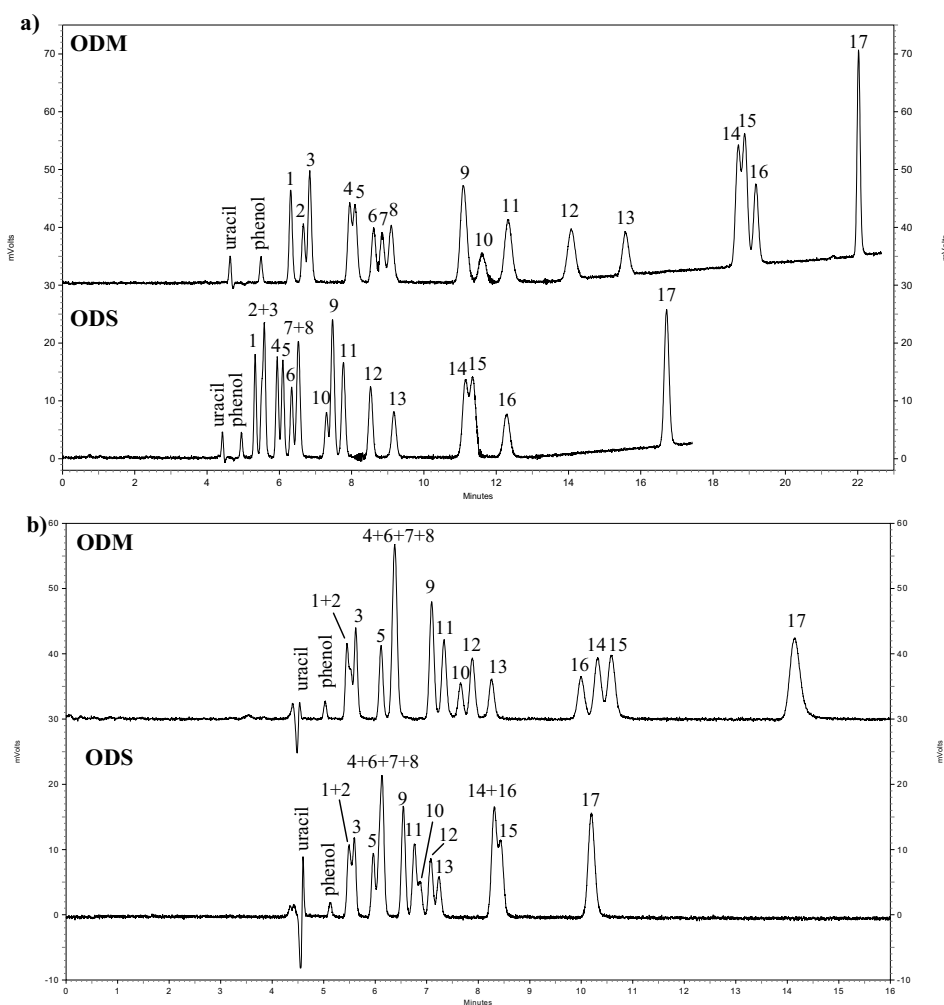


รูปที่ 3.7 ค่า $\log k$ ของ disubstituted benzenes บนคอลัมน์ ODM เทียบกับค่า $\log k$ ของสารบนคอลัมน์ ODS และใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น (a) 70% MeOH และ (b) 70% ACN และภาวะอื่นๆ ดังรูปที่ 3.1

3.3.3 Chlorophenols

ได้ศึกษาและเปรียบเทียบการแยกและค่าจำเพาะการแยกของสารโดยใช้สารทดสอบเป็นกลุ่ม chlorophenols ทั้งหมด 17 ชนิด สารประกอบกลุ่มนี้ประกอบด้วยสารที่มีจำนวนหมู่คลอรีนอะตอมแทนที่บนฟีนอลได้หลากหลาย และมีหลายไอโซเมอร์ [รูปที่ 3.8](#) แสดงโครมาโทแกรมการแยกสารกลุ่ม chlorophenols บนคอลัมน์ ODM และ ODS ในเฟสเคลื่อนที่ทั้งที่เป็น MeOH และ ACN พบว่าการรีเทนของสารมากขึ้นเมื่อจำนวนหมู่คลอรีนที่แทนที่บนวงเบนซีนเพิ่มขึ้นเนื่องจาก hydrophobicity ของสารเพิ่มมากขึ้น แล้วยังสารที่มีคลอรีนแทนที่ในตำแหน่งกระจายๆ กันบนวงเบนซีน ยังมีการรีเทนมากกว่าสารที่มีการแทนที่ติดๆ กัน เนื่องจากสารที่มีคลอรีนแทนที่ในตำแหน่งกระจายกันอยู่ มี hydrophobic area ที่มากกว่า [[Tanaka et al.:1993](#)] จาก [รูปที่ 3.8](#) เมื่อเปรียบเทียบการแยกสารบนคอลัมน์ ODM และ ODS สารกลุ่ม chlorophenols รีเทน

และแยกบนคอลัมน์ ODM ได้ดีกว่า ซึ่งสามารถอธิบายได้โดยสารเกิด dispersion interaction ได้มากกว่าบนคอลัมน์ ODM และเกิดอันตรกิริยากับหมู่คาร์บอนิลบนสายโซ่ C18 ของเฟสคงที่ ODM อีกด้วย [Chowdhury *et al.*: 2000, Fukumoto *et al.*:1994, Malik *et al.*:2008]



รูปที่ 3.8 โครมาโทแกรมของ chlorophenols ทั้งหมด 17 ชนิด โดยใช้คอลัมน์ ODM และ ODS ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 200 μm ยาว 28 cm และใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น (a) 70% MeOH และ (b) 70% ACN และภาวะอื่นๆ ดังรูปที่ 3.1

3.4 สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองที่ได้จากการแยกสารกลุ่ม mono- และ di-substituted benzenes รวมทั้งสารกลุ่ม chlorophenols ทั้ง 17 ชนิดบนคอลัมน์ ODM เปรียบเทียบกับคอลัมน์ ODS พบว่าคอลัมน์ ODM ให้การแยกสารประกอบกลุ่มเฮโลเจนได้ดีกว่า ดังนั้นคอลัมน์ ODM จึงน่าจะใช้เป็นอีกคอลัมน์หนึ่งที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารประกอบกลุ่มเฮโลเจนชนิดต่างๆ

เอกสารอ้างอิง

- Cabrera K., “Applications of Silica-Based Monolithic HPLC Columns” *Journal of Separation Science* **27** (2004) 843-852.
- Chambers S.D., Glenn K.M., and Lucy C.A. “Developments in Ion Chromatography Using Monolithic Columns” *Journal of Separation Science* **30** (2007) 1628-1645.
- Chowdhury M.A.J., Ihara H., Sagawa T., and Hirayama C., “Retention Versatility of Silica-Supported Comb-Shaped Crystalline and Non-Crystalline Phases in High-Performance Liquid Chromatography” *Journal of Chromatography A* **877** (2000) 71-85.
- Eeltink S., Decrop W.M.C., Rozing G.P., Schoenmakers P.J., and Kok W. Th., “Comparison of the Efficiency of Microparticulate and Monolithic Capillary Columns” *Journal of Separation Science* **29** (2004) 1431-1440.
- Fukumoto T., Ihara H., Sakaki S., Shosenji H., and Hirayama C., “Chromatographic Separation of Geometrical Isomers Using Highly Oriented Polymer-Immobilized Silica Gels” *Journal of Chromatography A* **672** (1994) 237-241.
- Hara T., Kobayashi H., Ikegami T., Nakanishi K., and Tanaka N., “Performance of Monolithic Silica Capillary Columns with Increased Phase Ratios and Small-Sized Domains” *Analytical Chemistry* **78** (2006) 7632-7642.
- Hosoya K., Frechet J.M.J., “Reversed-Phase Chromatographic Properties of Monodispersed Macroporous Particles of Poly(Styrene-Divinylbenzene) Prepared by a Multi-Step Swelling and Polymerization Method” *Journal of Liquid Chromatography* **16** (1993) 353-365.
- Ikegami T., Tomomatsu K., Takubo H., Horie K., and Tanaka N., “Separation Efficiencies in Hydrophilic Interaction Chromatography” *Journal of Chromatography A* **1184** (2008) 474-503.
- Kazakevich Y.V., LoBrutto R., Chan F., and Patel T., “Interpretation of the Excess Adsorption Isotherms of Organic Eluent Components on the Surface of Reversed-Phase Adsorbents: Effect on the Analyte Retention” *Journal of Chromatography A* **913** (2001) 75-87.
- Malik A.K., Rahman M.M., Czaun M., Takafuji M., and Ihara H., “Facile Synthesis of High-Density Poly(Octadecyl Acrylate)-Grafted Silica for Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography by Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization” *Journal of Chromatography A* **1187** (2008) 119-127.
- Miyamoto K., Hara T., Kobayashi H., Morisaka H., Tokuda D., Horie K., Koduki K., Makino S., Núñez O., Yang C., Kawabe T., Ikegami T., Takubo H., Ishihama Y., and Tanaka N., “High-Efficiency Liquid Chromatographic Separation Utilizing Long Monolithic Silica Capillary Columns” *Analytical Chemistry* **80** (2008) 8741-8750.
- Motokawa M., Kobayashi H., Ishizuka N., Minakuchi H., Nakanishi K., Jinnai H., Hosoya K., Ikegami T., and Tanaka N., “Monolithic Silica Columns with Various Skeleton Sized and Through-Pore Sizes for Capillary Liquid Chromatography” *Journal of Chromatography A* **961** (2002) 53-63.
- Neue U.D., O’Gara J.E., and Méndez A., “Selectivity in Reversed-Phase Separations: Influence of the Stationary Phase” *Journal of Chromatography A* **1127** (2006) 161-174.

- Núñez O., Ikegami T., Kajiware W., Miyamoto K., Horie K., and Tanaka N., "Preparation of High Efficiency and Highly Retentive Monolithic Silica Capillary Columns for Reversed-Phase Chromatography by Chemical Modification by Polymerization of Octadecyl Methacrylate" *Journal of Chromatography A* **1156** (2007a) 35-44.
- Núñez O., Ikegami T., Miyamoto K., and Tanaka N., "Study of a Monolithic Silica Capillary Column Coated with Poly(Octadecyl Methacrylate) for the Reversed-Phase Liquid Chromatographic Separation of Some Polar and Non-Polar Compounds" *Journal of Chromatography A* **1175** (2007b) 7-15.
- Stella C., Rudaz S., Veuthey J.L., and Tchaplal A., "Silica and Other Materials as Supports in Liquid Chromatography. Chromatographic Tests and Their Importance for Evaluating These Supports. Part I" *Chromatographia* **53** (2001a) S113-S131.
- Stella C., Rudaz S., Veuthey J.L., and Tchaplal A., "Silica and Other Materials as Supports in Liquid Chromatography. Chromatographic Tests and Their Importance for Evaluating These Supports. Part II" *Chromatographia* **53** (2001b) S132-S140.
- Tanaka N., Kinoshita H., Araki M., and Tsuda T., "On-Column Preparation of Chemically Bonded Stationary Phase with Maximum Surface Coverage and High Reproducibility, and Its Application to Packed Microcapillary Columns" *Journal of Chromatography* **332** (1985) 57.
- Tanaka N., Kimata K., Hosoya K., Miyanishi H., and Araki T., "Stationary Phase Effects in Reversed-Phase Liquid Chromatography" *Journal of Chromatography A* **656** (1993) 265-287.
- Turowski M., Morimoto T., Kimata K., Monde H., Ikegami T., Hosoya K., and Tanaka N., "Selectivity of Stationary Phases in Reversed-Phase Liquid Chromatography based on the Dispersion Interactions" *Journal of Chromatography A* **911** (2001) 177-190.
- Turowski M., Yamakawa N., Meller J., Kimata K., Ikegami T., Hosoya K., Tanaka N., and Throntan E.R., "Deuterium Isotope Effects on Hydrophobic Interactions: the Importance of Dispersion Interactions in the Hydrophobic Phase" *Journal of American Chemical Society* **125** (2003) 13836-13849.
- Wilson N.S., Nelson M.D., Dolan J.W., Synder L.R., Wolcott R.G., and Carr P.W., "Column Selectivity in Reversed-Phase Liquid Chromatography I. A General Quantitative Relationship" *Journal of Chromatography A* **961** (2002) 171-193.

บทที่ 5

แบบจำลองทางทฤษฎีของค่าจำเพาะการแยกสำหรับสารที่มีประจุ ในไมเซลล์าร์อิเล็กโตรไคเนติกโครมาโทกราฟี¹

5.1 คำนำ

ดังที่กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 1.1.3.2 ไมเซลล์าร์อิเล็กโตรไคเนติกโครมาโทกราฟี (micellar electrokinetic chromatography, MEKC) เป็นประเภทหนึ่งของ CE ที่มีบัฟเฟอร์ประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิว เช่น SDS โดยจะฟอร์มตัวเป็นไมเซลล์ซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสคงที่เทียม [Terabe *et al.*: 1992, Altria *et al.*: 2000, Pappas *et al.*: 2005, Iadarola *et al.*: 2008, Terabe *et al.*: 1985] MEKC เป็นเทคนิคที่ใช้อย่างกว้างขวางสำหรับแยกสารที่ไม่มีประจุและสารที่มีประจุซึ่งมีรายงานในงานวิจัยในปี 1999 [Quirino and Terabe: 1999], 2002 [Molina and Silva: 2002], 2003 [Welsch and Michalke: 2003], 2005 [Pappas *et al.*: 2005] สำหรับการแยกสารที่ไม่มีประจุจะใช้สารลดแรงตึงผิวที่มีประจุ [Terabe *et al.*: 1992, Pappas *et al.*: 2005, Iadarola *et al.*: 2008, Terabe *et al.*: 1985 Quirino and Terabe: 1999, Terabe: 2009, Riekkola *et al.*: 1997, Ehala *et al.*: 2007, Gong *et al.*: 2006, Dubber and Kanfer: 2006] ขณะที่ใช้สารลดแรงตึงผิวที่มีหรือไม่มีประจุสำหรับแยกสารที่มีประจุ [Terabe *et al.*: 1992, Pappas *et al.*: 2005, Iadarola *et al.*: 2008, Quirino and Terabe: 1999, Terabe: 2009, Riekkola *et al.*: 1997, Mallampati *et al.*: 2005, Cesla *et al.*: 2006, Damic and Nigovic: 2009] เนื่องจากความแตกต่างของการกระจายตัวของสารในไมเซลล์และความแตกต่างของความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าปรากฏของสารที่มีประจุ (effective electrophoretic mobility, $\Delta\mu$) จึงสามารถแยกสารใน MEKC ได้ [Altria *et al.*: 2000, Pappas *et al.*: 2005, Quirino and Terabe: 1999, Mallampati *et al.*: 2005, Iadarola *et al.*: 2005, Tellez *et al.*: 2007] โดยทั่วไปค่าการแยก (resolution, R_s) ของสารใน CE แสดงได้ดังสมการที่ 5.1 [Giddings: 1969, Jorgenson and Lukacs: 1981]

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{\Delta\mu}{\mu + \mu_{eo}} \quad (5.1)$$

เมื่อ N คือ จำนวนเพลตทางทฤษฎีหรือประสิทธิภาพ, μ คือ ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าปรากฏของสาร, $\Delta\mu$ คือ ความแตกต่างของ μ หรือ $\mu_2 - \mu_1$ สำหรับสารสองตัว และ μ_{eo} คือ ความสามารถในการเคลื่อนที่ด้วยอิเล็กโตรออสโมซิส สำหรับสารสองตัวที่มีทิศทางของ μ ไปทาง

¹งานวิจัยนี้ได้นำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติที่ ITP2010Maryland และ APCE2010HongKong และตีพิมพ์ใน Electrophoresis 32 (2011) 203-209 ดังภาคผนวก 3

เดียวกัน สมการที่ 5.1 อาจจัดรูปให้มีความสัมพันธ์กับค่าการแยกหรือ R_s ในรูปของ efficiency term, selectivity term และ mobility term ดังแสดงในสมการที่ 5.2

$$R_s = \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left(\frac{\alpha_m - 1}{\alpha_m} \right) \left| \frac{\mu_2}{\mu + \mu_{eo}} \right| \quad (5.2)$$

เมื่อ α_m คือ separation selectivity หรือ mobility selectivity ซึ่งนิยามเป็นอัตราส่วนของความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าปรากฏของสารสองตัว เช่น μ_2/μ_1 โดย $|\mu_2| > |\mu_1|$

ใน MEKC ที่ใช้ normal elution mode จะมีทิศทางของความเร็วเล็กโทรออสโมซิส (v_{eo}), ความเร็วของสารและความเร็วของไมเซลล์ (v_{mc}) โดย $|v_{eo}| > |v_{mc}|$ สมการค่าการแยกของสารที่ไม่มีการแสดงให้มีความสัมพันธ์กับ retention term ดังสมการที่ 5.3 [Nielsen and Foley: 1993, Pyell: 2006]

$$R_s = \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left(\frac{\alpha_k - 1}{\alpha_k} \right) \left(\frac{k_2}{1 + \bar{k}} \right) \left(\frac{1 - t_{eo}/t_{mc}}{1 + (t_{eo}/t_{mc})\bar{k}} \right) \quad (5.3)$$

เมื่อ k คือ รีเทนชันแฟกเตอร์, α_k คือ retention selectivity นิยามเป็นอัตราส่วนของ k เช่น k_2/k_1 และ t_{eo} กับ t_{mc} คือ ไมเกรชันไทม์ของ EOF marker และ micelle marker ตามลำดับ

การแยกสารที่มีประจุสมบูรณ์ใน MEKC โดยใช้ normal elution mode อาศัยความแตกต่างของการกระจายตัวของสารในไมเซลล์และความแตกต่างของความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร ค่าการแยกสามารถแสดงได้ดังสมการที่ 5.4 [Nielsen and Foley: 1993]

$$R_s = \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left(\frac{\alpha_k - 1}{\alpha_k} \right) \left(\frac{k_2}{1 + \bar{k}} \right) \left(\frac{1 + t_{eo}/t_{ep} - t_{eo}/t_{mc}}{1 + t_{eo}/t_{ep} + (t_{eo}/t_{mc})\bar{k}} \right) \quad (5.4)$$

เมื่อ t_{ep} คือ ไมเกรชันไทม์ที่สัมพันธ์กับความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารที่มีประจุ และในกรณีนี้ $t_{ep} = t_{ep2} = t_{ep1}$

จากสมการที่ 5.3 และ 5.4 จะแสดงให้เห็นว่า separation selectivity อาจหมายถึง retention selectivity ได้ ในกรณีสารที่วิเคราะห์มีความแตกต่างของความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า (μ_0) ภายใต้ภาวะที่ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวในบัฟเฟอร์มีค่าเท่ากับศูนย์หรือ CZE เมื่อทำการวิเคราะห์สารดังกล่าวใน MEKC การแยกของสารจะขึ้นอยู่กับทั้ง k และ μ_0 เมื่อเปรียบเทียบการแยกสารที่มีประจุใน CZE กับ MEKC ที่มีการเติมสารลดแรงตึงผิวลงในบัฟเฟอร์พบว่า MEKC สามารถแยกสารบางชนิดได้ดีขึ้น แต่ก็สามารถทำให้การแยกของสารบางชนิดแย่ลงได้เช่นกัน [Iadarola *et al.*: 2008, Riekkola *et al.*: 1997, Dubber and Kanfer: 2006, Mallampati *et al.*: 2005,

Cesla *et al.*: 2006, Damic and Nigovic: 2009, Iadarola *et al.*: 2005, Huang *et al.*: 2005, Nhujak *et al.*: 2005, Huertas-Perez *et al.*: 2006, Huang *et al.*: 2003] ซึ่งผลดังกล่าวนี้สอดคล้องกับผลการทดลองในการแยกไครัลที่ใช้ dual cyclodextrins ซึ่งได้รายงานในงานวิจัยเราก่อนหน้านี้ [Nhujak *et al.*: 2005]

เพื่ออธิบาย separation selectivity และ electrophoretic mobility order ใน MEKC สำหรับสารที่มีประจุที่มี μ_0 แตกต่างกัน งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อสร้างแบบจำลองทางทฤษฎีของ separation selectivity ใน MEKC ที่สัมพันธ์กับตัวแปรที่ไม่มีหน่วยของ mobility selectivity ใน CZE และ retention selectivity ใน MEKC และเปรียบเทียบ separation selectivity ที่ได้จากการทดลองและที่ได้จากการทำนายใน MEKC โดยทำการทดลองด้วย normal elution mode และใช้บัฟเฟอร์เป็น 10 mM ไดโซเดียมบอเรต (pH 10.2) ที่มีการเติม SDS เป็นสารลดแรงตึงผิว โดยมีอัลคิลพาราเบนเป็นสารทดสอบ

5.2 การทดลอง

5.2.1 เครื่องมือ

- 1) เครื่องอะโพลาริโอเล็กโทรฟอรีซิส ของบริษัท Beckman รุ่น MDQ
- 2) เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ของ Metrohm รุ่น 744
- 3) เครื่อง sonication ของ ultrasonic steri-cleaner
- 4) เครื่องผลิตน้ำ Milli Q

5.2.2 สารเคมี

- 1) อัลคิลพาราเบน (PB) ได้แก่ isoparaben (IP), ethylparaben (EP), propylparaben (PP) และ butylparaben (BP) ของบริษัท Sigma-Aldrich
- 2) โดเดคซิลเบนซีน (DB) ของบริษัท Sigma-Aldrich
- 3) โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต (SDS) ของบริษัท Sigma
- 4) ไดโซเดียมเตตระโบเรตเดคาไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Fluka
- 5) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Fluka

5.2.3 การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง CE

ภาวะของ CE ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ดังต่อไปนี้ คือ (ในกรณีที่แตกต่างไปจากนี้จะระบุ)

เครื่อง CE	: Beckman รุ่น MDQ
อะโพลาริโอ	: uncoated fused silica capillary 50 μm i.d. $\times$ 40.2 cm (30 cm ถึงเครื่องตรวจวัด)
การบรรจุสาร	: อัดความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 3 วินาที
การตรวจวัด	: photodiode array ช่วง 190-300 nm และตรวจวัดที่ 220 nm

Capillary rinse : ก่อนการทดลองแต่ละวัน ล้างภายในแคพิลลารีด้วยเมทานอล, 0.1 M โซเดียมไฮดรอกไซด์และน้ำอย่างละ 15 นาที และบัฟเฟอร์ 15 นาที และก่อนการวิเคราะห์แต่ละครั้งล้างด้วย 0.1 M โซเดียมไฮดรอกไซด์และบัฟเฟอร์อย่างละ 2 นาที

อุณหภูมิของแคพิลลารี : 25°C

ศักย์ไฟฟ้า : 15 kV

BGE : 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ที่ pH 10.2 ที่ประกอบด้วย SDS เป็นสารลดแรงตึงผิว

5.2.4 การเตรียมบัฟเฟอร์

บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดลองหาค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ของสารมี 2 ระบบ คือ

- 1) บัฟเฟอร์ใน CZE ประกอบด้วย 10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ปรับ pH เป็น 10.2 ด้วย 1.0 M NaOH
- 2) บัฟเฟอร์ใน MEKC ประกอบด้วย 20-60 mM SDS ใน 10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ pH 10.2

บัฟเฟอร์ทั้งสองระบบเตรียมโดยใช้น้ำ Milli Q จากนั้นนำไป sonicate ประมาณ 30 นาที แล้วกรองบัฟเฟอร์ผ่าน 0.45 μm PTFE filter ก่อนการวิเคราะห์

5.2.5 การเตรียมสารทดสอบ

เตรียม stock solution ความเข้มข้น 1000 ppm ของสารทดสอบโดยละลายสารทดสอบแต่ละตัวแยกกันด้วยอะซิโตนไทรล์ จำนวน 5 mL จากนั้นเจือจางแต่ละสารละลายด้วยน้ำ Milli Q ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 mL สำหรับ stock solution ของ DB และ thiourea เตรียมโดยละลายสารแต่ละตัวแยกกันด้วยเอทานอลและเจือจางจนได้ความเข้มข้น 20000 ppm ด้วยน้ำ Milli Q ส่วนสารละลายมาตรฐานประกอบด้วย 20-60 ppm ของสารทดสอบ, 30 ppm thiourea และ 150 ppm DB เตรียมได้โดยเจือจาง stock solution ด้วย 1.0 mM บอเรตบัฟเฟอร์ หลังจากนั้นนำไปกรองผ่าน 0.45 μm PTFE filter ก่อนการวิเคราะห์

5.3 ผลการทดลองและวิจารณ์

5.3.1 แบบจำลองทางทฤษฎี ของ separation selectivity ใน MEKC สำหรับสารที่มีประจุ

ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารที่มีประจุสองตัวใน MEKC (μ_{MEKC}) แสดงดังสมการที่ 5.5 และ 5.6 [Nielsen and Foley: 1993]

$$\mu_{(\text{MEKC},1)} = \left(\frac{\mu_{0,1} + k_1 \mu_{\text{mc}}}{1 + k_1} \right) \quad (5.5)$$

$$\mu_{(\text{MEKC},2)} = \left(\frac{\mu_{0,2} + k_2 \mu_{\text{mc}}}{1 + k_2} \right) \quad (5.6)$$

เมื่อ μ_0 คือ ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารภายใต้ภาวะที่มีความเข้มข้นของ SDS เท่ากับศูนย์หรือ CZE และ μ_{mc} คือความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของไมเซลล์ marker ตัวห้อย 1 และ 2 หมายถึงสารตัวที่ 1 และ 2 ตามลำดับ separation selectivity ใน MEKC (α_{MEKC}) นิยามเป็นอัตราส่วนของ μ_{MEKC} เมื่อ $k_2 \geq k_1 > 0$ สามารถจัดรูปได้ดังสมการที่ 5.7

$$\alpha_{MEKC} = \alpha_{CZE} \left(\frac{\beta + \frac{\alpha_k}{\alpha_{CZE}} k_1}{\beta + k_1} \right) \left(\frac{(1 + k_1)}{1 + \alpha_k k_1} \right) \quad (5.7)$$

เมื่อ α_{CZE} คือ mobility selectivity ใน CZE หรืออัตราส่วนของ μ_0 , เช่น $\mu_{0,2}/\mu_{0,1}$, α_k คือ retention selectivity ของสารลดแรงตึงผิว SDS สำหรับสารที่มีประจุสองตัว หรืออัตราส่วนของ k , เช่น k_2/k_1 , และ β อัตราส่วนของ $\mu_{0,1}/\mu_{mc}$ โดยที่ $\alpha_k \geq 1.0$ เสมอ สำหรับค่า $\alpha_{CZE} > 1.0$ หมายถึงลำดับการเคลื่อนที่ของสารซึ่งมี $|\mu|$ ใน CZE และ k ใน MEKC เหมือนกัน เช่น $k_2 > k_1$ และ $|\mu_2| > |\mu_1|$, ในขณะที่ $\alpha_{CZE} < 1.0$ หมายถึงลำดับการเคลื่อนที่ของสารซึ่งมี $|\mu|$ ใน CZE และ k ใน MEKC สลับกัน เช่น $k_2 > k_1$ ในขณะที่ $|\mu_2| < |\mu_1|$

จากสมการที่ 5.7 และงานวิจัยที่ผ่านมาของกลุ่มเรเกี่ยวกับแบบจำลองทางทฤษฎีของ separation selectivity สำหรับการแยกไครัลด้วย dual cyclodextrins [Nhujak *et al.*: 2005] สามารถเสนอแบบจำลองทางทฤษฎีของ α_{MEKC} สำหรับสารที่มีประจุสองตัวใน MEKC ได้ 4 แบบ ดังแสดงในตารางที่ 5.1 โดยอ้างอิงตามช่วงของค่า α_{CZE} , α_k , ρ และลำดับของค่า $|\mu|$ ใน CZE และ k ใน MEKC สำหรับการทำนายค่าของ α_{MEKC} สำหรับสารที่มีประจุสองตัว ค่า β ในสมการที่ 5.7 ประมาณให้มีค่าเท่ากันเท่ากับ 0.5 รูปที่ 5.1 แสดงพล็อตของ α_{MEKC} model Types I—III กับ k_1 ซึ่งการเพิ่มค่า k สามารถทำได้โดยการเพิ่มความเข้มข้น SDS ([SDS]) ในบัฟเฟอร์ของ MEKC

ตารางที่ 5.1 แบบจำลองทางทฤษฎีของ separation selectivity ใน MEKC (α_{MEKC})

Type	Order of $ \mu $ in CZE and k in MEKC	α_{CZE}	α_k	ρ	Assumed values		
					α_{CZE}	α_k	β
I	Same	$\alpha_{CZE} \geq 1$	$\alpha_k > \alpha_{CZE} \geq 1$	$\rho > 1$	1.1	1.2–3.3	0.5
II	Same	$\alpha_{CZE} > 1$	$\alpha_{CZE} \geq \alpha_k \geq 1$	$\rho \leq 1$	1.5	1.0–1.5	0.5
III	Reversed	$\alpha_{CZE} < 1$	$\alpha_k \geq 1 > \alpha_{CZE}$	$\rho > 1$	0.8	1.0–6.4	0.5
IV	Co-migration	$\alpha_{CZE} = 1$	$\alpha_k = \alpha_{CZE} = 1$	$\rho = 1$	–	–	0.5

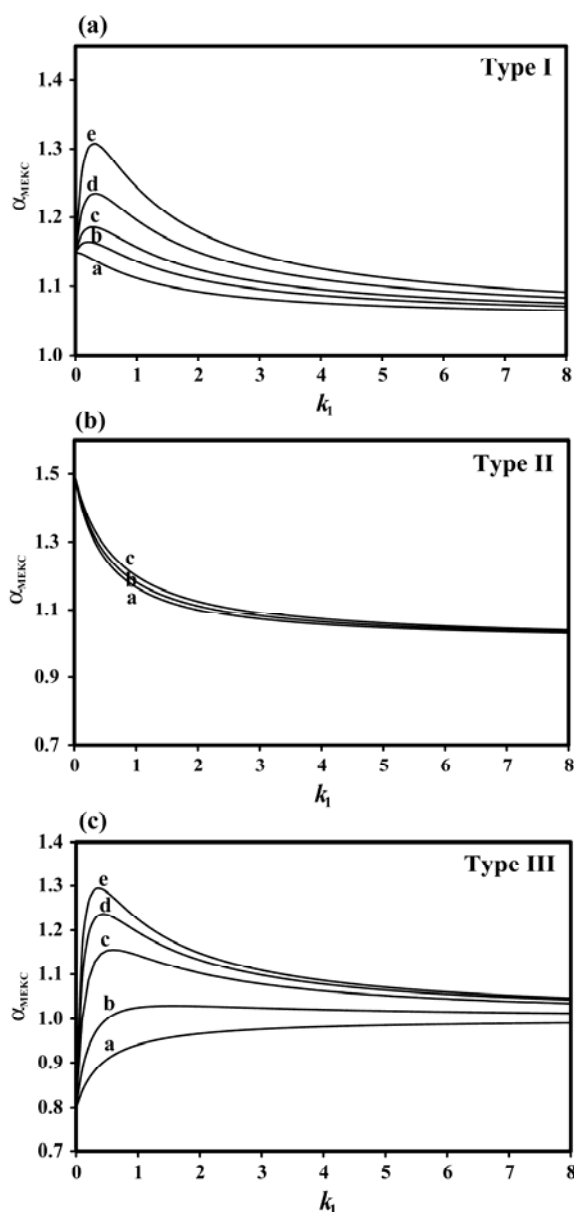
จากแบบจำลอง α_{MEKC} แบบที่ 1 ในรูปที่ 5.1a สำหรับค่า ρ ที่แน่นอนใด ๆ ยกเว้น $\rho \approx 1.0$ พบว่าค่า α_{MEKC} มีค่าเพิ่มขึ้นจนถึงค่าสูงสุดเมื่อ k_1 มีค่าเพิ่มขึ้น จากนั้นมีค่าลดลงที่ค่า k_1 สูงขึ้น สำหรับค่า k_1 ค่าหนึ่ง ๆ เมื่อค่า α_k มีค่าเพิ่มขึ้นจะได้ค่า α_{MEKC} ที่สูงขึ้น สำหรับช่วงของค่า k_1 ที่สนใจ พบว่าค่า α_{MEKC} สูงสุดจะลดลงเมื่อค่า α_k เพิ่มขึ้น ดังนั้นแบบจำลอง α_{MEKC} แบบที่ 1 แสดงลำดับ

เหมือนกันของค่า $|\mu|$ ใน CZE และ k ใน MEKC ของสารที่มีประจุ และเมื่อค่า α_k สูงกว่าค่า α_{CZE} นั่นคือสามารถเพิ่ม α_{MEKC} สำหรับสารที่มีประจุสองตัวใน MEKC ได้ ในทางตรงกันข้ามกับแบบที่ 1 พบว่าแบบจำลอง α_{MEKC} แบบที่ 2 ($\alpha_k \leq \alpha_{CZE}$) ในรูปที่ 5.1b แสดงค่า α_{MEKC} มีค่าลดลงเมื่อเพิ่มค่า k_1 แสดงให้เห็นการแยกที่แย่งของสารที่มีประจุสองตัว สำหรับลำดับที่สลับกันของค่า $|\mu|$ ใน CZE และ k ใน MEKC ของสารที่มีประจุแสดงในรูปที่ 5.1c ในแบบจำลอง α_{MEKC} แบบที่ 3 ซึ่งแบบจำลองจะเริ่มจากค่า α_{MEKC} ที่น้อยกว่า 1.0 ($1/\alpha_{MEKC} > 1$) และเข้าใกล้ 1.0 (การแยกที่ไม่ดี) ที่ k_1 เพิ่มขึ้น จากนั้นมีค่ามากกว่า 1.0 (การแยกดีขึ้น) เมื่อเพิ่มค่า k_1 มากขึ้นที่ค่า α_{MEKC} เท่ากับ 1.0 ค่า k_1 มีค่าดังสมการที่ 5.8

$$k_1 = \frac{(1 - \alpha_{CZE})}{(\alpha_{CZE} - \alpha_k) + (\alpha_k - 1)/\beta} \quad (5.8)$$

เมื่อค่า α_k มีค่าน้อย ๆ ที่ค่า k_1 สูงขึ้นจะได้ค่า α_{MEKC} มีค่าเท่ากับ 1.0 ซึ่งสอดคล้องกับเส้นกราฟล่างสุดของแบบจำลอง α_{MEKC} แบบที่ 3 ซึ่งมีค่า α_{MEKC} เท่ากับ 0.99 ที่ค่า k_1 เพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 5.1c เป็นที่สังเกตว่าสำหรับค่าทางทฤษฎีของ α_{CZE} หรือ α_{MEKC} น้อยกว่า 1.0 ค่าในทางปฏิบัติจะมีค่าเท่ากับ $1/\alpha_{CZE}$ หรือ $1/\alpha_{MEKC}$ ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของค่า k_1 อาจทำให้เกิดการสลับลำดับของความสามารถในการเคลื่อนที่ของไฟฟ้าของสารที่มีประจุสองตัวได้ใน MEKC สำหรับแบบจำลอง α_{MEKC} แบบที่ 3 ($\alpha_k = 1.0$ และ $\alpha_{CZE} = 1.0$) หมายถึงไม่เกิดการแยกของสารสองที่มีประจุสองตัว จากรูปที่ 5.1 แบบจำลองทางทฤษฎีของ α_{MEKC} สามารถอธิบายการแยกสารที่มีประจุสองตัว โดยเมื่อค่า α_{MEKC} เพิ่มขึ้นจะให้การแยกของสารดีขึ้น สำหรับแบบจำลอง α_{MEKC} แบบที่ 1 ($\alpha_k > \alpha_{CZE}$) หรือแบบจำลอง α_{MEKC} แบบที่ 2 ($\alpha_k \gg \alpha_{CZE}$, or $\alpha_k > 1/\alpha_{CZE}$) separation selectivity ใน MEKC จะมีค่ามากกว่าใน CZE ที่ค่า k_1 ที่เหมาะสม

ในทางทฤษฎีนั้นทิศทางของ EOF และความเร็วมืดจะไม่ส่งผลกระทบต่อความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารและไมเซลล์ รวมทั้งรีเทนชันแฟกเตอร์ของสารในไมเซลล์ จากการที่ค่า α_m และ α_k ไม่แปรตามทิศทางของความเร็วที่กล่าวข้างต้น ดังนั้นแบบจำลอง α_{MEKC} ในงานวิจัยนี้สามารถใช้สำหรับ MEKC ที่เป็น normal mode, reversed mode และ restricted mode ซึ่งแต่ละ mode นี้ได้แบ่งตามทิศทางของ EOF และความเร็วทั้งหมดโดยรายละเอียดได้กล่าวไว้ใน [Pyell: 2006]



รูปที่ 5.1 แบบจำลองทางทฤษฎีของ α_{MEKC} ที่ได้จากการทำนายสำหรับสารที่มีประจุสองตัว คำนวณโดยใช้สมการที่ 5.7 และข้อมูลในตารางที่ 5.1 ตัวแปร a-e แทนค่าของ α_k สำหรับ (a) 1.2, 1.4, 1.7, 2.2 และ 3.3 ตามลำดับ (b) 1.0, 1.2 และ 1.5 ตามลำดับ และ (c) 1.0, 1.6, 3.2, 4.8 และ 6.4 ตามลำดับ

5.3.2 ค่า α_{MEKC} ที่ได้จากการทดลองและค่าที่ได้จากการทำนายสำหรับสารที่มีประจุลบใน MEKC ภายใต้ภาวะ normal elution mode โดยใช้สารลดแรงตึงผิวเป็น SDS ซึ่งมีประจุลบ

ในงานวิจัยนี้สารทดสอบเป็นสารประกอบพาราเบน ได้แก่ IP, BP, PP และ EP ซึ่งเป็นกรดอ่อนที่มี $\text{HO-C}_6\text{H}_4\text{COOR}$ ใน basic buffer ที่มี $\text{pH} > \text{pK}_a$ ของพาราเบน สารประกอบพาราเบนเหล่านี้จะสามารถแตกตัวได้ประจุลบ มีค่า pK_a ปรากฏเท่ากับ 8.80, 7.98, 8.00 และ 7.97 ตามลำดับ (ค่าอ้างอิงสำหรับ IP เท่ากับ 9.2 [Pirselova *et al.*: 1996] และสำหรับพาราเบนตัวอื่นๆ เท่ากับ 8.4 [Wilson and Gisvold: 1998]) สำหรับค่า pK_a ปรากฏนี้สามารถหาได้จากการวัดค่าความสามารถใน

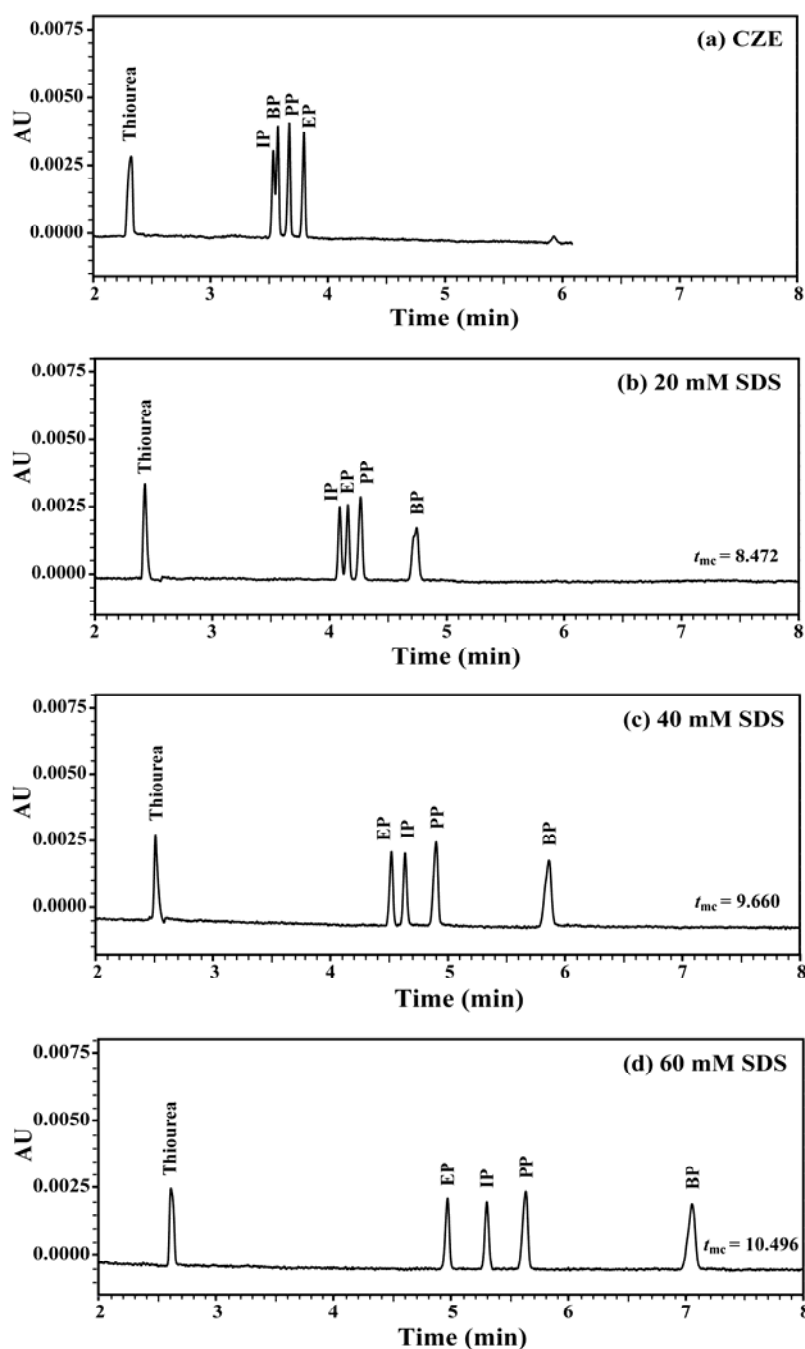
การเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารปรากฏ (μ_{eff}) ใน CZE ภายใต้บัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ที่ค่า pH ต่าง ๆ ตั้งแต่ 7.8 ถึง 10.2 จากนั้นเขียนกราฟเส้นตรงของความสัมพันธ์ระหว่าง $1/\mu_{\text{eff}}$ และ $10^{-\text{pH}}$ ($[\text{H}_3\text{O}^+]$) และหาค่า pK_a จาก log (slope/Y-intercept) [Jerez *et al.*: 2009] สำหรับบอเรตบัฟเฟอร์ pH 10.2 ที่ใช้เพื่อให้สารทดสอบแตกตัวเป็นประจุลบอย่างสมบูรณ์ด้วยวิธีการแตกตัวเท่ากับ 0.96 สำหรับ IP และ 0.99 สำหรับพาราเบนตัวอื่นๆ ซึ่งวิธีการแตกตัวคำนวณโดยใช้พารามิเตอร์ต่าง ๆ ภายใต้ภาวะ CE ที่ใช้ทดลองและใช้สมการวิธีการแตกตัวซึ่งได้มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ [Nielsen and Foley: 1993]

เพื่อที่จะสามารถทำนายค่าของ α_{MEKC} สำหรับสารที่มีประจุสองตัวใน MEKC จะต้องรู้พารามิเตอร์ต่างๆ คือค่า α_{CZE} ใน CZE และค่า α_k , k ใน MEKC รูปที่ 5.2 แสดงการแยกของพาราเบนโดยใช้ภาวะที่ไม่มี SDS หรือ CZE และภาวะที่มี SDS หรือ MEKC ซึ่งมีค่า [SDS] ต่าง ๆ (20-60 mM) จากรูปที่ 5.1a คือการแยกใน CZE ซึ่งมีแวกเตอร์ของความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของพาราเบนที่มีประจุลบมีทิศทางตรงข้ามกับแวกเตอร์ของ EOF มีลำดับการเคลื่อนที่ของสาร $\text{EP} > \text{PP} > \text{BP} > \text{IP}$ และมีค่า μ_{eff} เท่ากับ -2.25, -2.13, -2.03 และ $-1.97 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ตามลำดับ ดังนั้นลำดับของค่า $|\mu|$ คือ $\text{EP} > \text{PP} > \text{BP} > \text{IP}$ ส่วนค่า $|\mu|$ ของ IP ที่มีค่าน้อยกว่าพาราเบนอื่นๆ อาจเนื่องมาจากวิธีการแตกตัวที่น้อยกว่าและ/หรือขนาดของไฮโดรไดนามิกที่มีขนาดใหญ่กว่า

ในทางทฤษฎีสำหรับการแยกสารที่ไม่มีประจุใน MEKC ภายใต้ภาวะ normal elution mode โดยใช้สารลดแรงตึงผิวที่เป็นประจุลบ พฤติกรรมการเคลื่อนที่ของสารขึ้นอยู่กับค่า k ของสารเท่านั้น คือสารที่มีค่า k มากกว่าจะใช้เวลาในการวิเคราะห์นานกว่า อย่างไรก็ตามการแยกสารที่มีประจุใน MEKC ภายใต้ภาวะข้างต้นนั้น พฤติกรรมการเคลื่อนที่ของสารขึ้นอยู่กับค่า μ และ k ของสารที่วิเคราะห์แต่ละตัว ทำให้ยากต่อการทำนายลำดับการเคลื่อนที่ของ migration time หรือ μ_{eff} ของสารใน MEKC รีเทนชันแฟกเตอร์ (k) คำนวณจากอิเล็กโตรฟีโรรแกรมของ MEKC และใช้สมการที่ 5.9 [Tellez *et al.*: 2007, Nielsen and Foley: 1993, Tellez *et al.*: 2007]

$$k = \frac{\mu_{\text{MEKC}} - \mu_0}{\mu_{\text{mc}} - \mu_{\text{MEKC}}} \quad (5.9)$$

พารามิเตอร์ต่าง ๆ ได้นิยามไว้แล้วก่อนหน้านี้ในสมการที่ 5.5 และ 5.6 จากจากอิเล็กโตรฟีโรรแกรมของ MEKC ในรูปที่ 5.2b-d, ค่า k (ตารางที่ 5.2) สำหรับสารประกอบพาราเบนที่มีประจุลบซึ่งมีลำดับการออกดังนี้ $\text{BP} > \text{PP} > \text{IP} > \text{EP}$ ซึ่งสอดคล้องกับลำดับของค่าคงที่การกระจายตัวของสารในออกทานอลและน้ำ $\text{BP} > \text{PP} > \text{EP}$ [Poouthree *et al.*: 2007, Golden *et al.*: 2005, Tavares *et al.*: 2009]



รูปที่ 5.2 อิเล็กโทรโฟโกราฟีของพาราเบนภายใต้ภาวะ (a) 0 CZE, (b) 20, (c) 40, และ 60 mM SDS ใน 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ที่ปรับ pH ด้วย 1.0 M NaOH ภาวะอื่นๆ ของ CE: uncoated fused-silica capillary 50 μm i.d. $\times$ 40.2 cm (30 cm ถึงเครื่องตรวจวัด) อุณหภูมิคอลัมน์ 25 $^{\circ}\text{C}$, ศักย์ไฟฟ้า 15 kV, ตรวจวัดที่ 220 nm การบรรจุสารแบบอัดความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 3 วินาที

จากรูปที่ 5.2d สำหรับการแยกใน MEKC ที่บัฟเฟอร์ประกอบด้วย 60 mM SDS พบว่า ลำดับของ t_m หรือ $|\mu_{\text{MEKC}}|$ คือ BP > PP > IP > EP ซึ่งแตกต่างจากลำดับใน MEKC ที่บัฟเฟอร์ประกอบด้วย 20 mM SDS (รูปที่ 5.2b) BP > PP > EP > IP และใน CZE (รูปที่ 5.2a) EP > PP >

BP > IP พฤติกรรมการเคลื่อนที่ที่ต่างกันนี้สามารถอธิบายด้วย separation selectivity models ในหัวข้อ 5.3.1

ตารางที่ 5.2 Mobility selectivity (α_{CZE}), retention selectivity (α_k), retention factor (k_1), selectivity ratio (ρ), และชนิดของแบบจำลอง α_{MEKC}

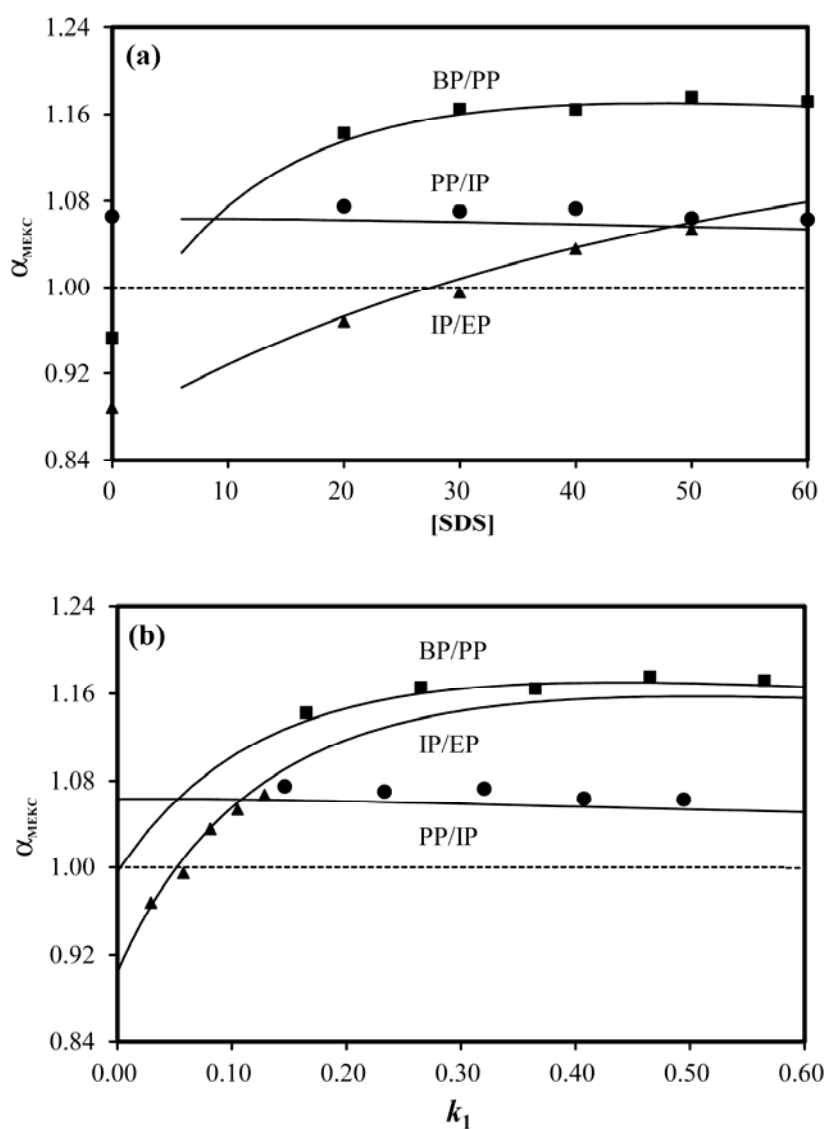
Pair	Solute 1	$k_1 = a[\text{SDS}] + b$	α_{CZE}	α_k	β	ρ	Types of model for α_{MEKC}
IP/EP	EP	0.00236[SDS]-0.013	0.888	k_{IP}/k_{EP}	0.575	$\rho > 1$	III
PP/IP	IP	0.00871[SDS]-0.028	1.066	k_{PP}/k_{IP}	0.511	$\rho > 1$	I
BP/PP	PP	0.01004[SDS]-0.035	0.953	k_{BP}/k_{PP}	0.544	$\rho > 1$	III
	BP	0.03068[SDS]-0.057	-	-	-	-	-

รูปที่ 5.3 แสดงค่า α_{MEKC} ที่ได้จากการทดลองและการทำนายสำหรับพาราเบนใน MEKC ภายใต้ภาวะที่มี [SDS] ต่าง ๆ (รูปที่ 5.3a) และค่า k_1 ต่าง ๆ (รูปที่ 5.3b) พบว่าความสัมพันธ์แรกใช้ในการพิจารณาหา [SDS] ที่สามารถแยกสารออกจากกันหรือทำให้ลำดับการเคลื่อนที่ของสารเกิดการสลับที่กัน ในขณะที่ความสัมพันธ์หลังใช้เปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทดลองและค่าที่ได้จากการทำนายเมื่อไม่ทราบ [SDS] ค่า α_{MEKC} ที่ได้การทำนายที่ [SDS] ต่าง ๆ (6.0-60 mM) คำนวณโดยใช้ข้อมูลในตารางที่ 5.2 และสมการที่ 5.7 ตารางที่ 5.2 แสดงค่า α_{CZE} , α_k , k , ρ และแบบจำลองของ α_{MEKC} ดังที่ได้อธิบายไว้ก่อนหน้านี้ สำหรับการแยกใน MEKC ของคู่สารหนึ่ง ๆ เช่น PP และ IP ค่า k_1 นิยามเป็น k ของสารที่มีค่า k น้อยกว่า เช่น k_{IP} เมื่อใช้ [SDS] (20-60 mM) และเขียนกราฟระหว่างค่า k_1 ที่ได้จากการทดลองกับ [SDS] จะได้กราฟเส้นตรง ซึ่งสามารถใช้ทำนายค่า k_1 ที่ [SDS] ต่าง ๆ ได้ เมื่อใช้ข้อมูลจากตารางที่ 5.2 และสมการที่ 5.7 พบว่าค่า α_{MEKC} ที่ได้จากการทดลองในรูปที่ 5.3 สอดคล้องกับค่าที่ได้จากการทำนาย แสดงให้เห็นว่าสมการที่ 5.7 สามารถใช้ในการทำนายค่า α_{MEKC} ในช่วงของ [SDS] และค่า k_1 ต่าง ๆ ได้

จากจากอิเล็กทรอนิกส์โทรโพแกรมในรูปที่ 5.2 และข้อมูลในตารางที่ 5.2 พบว่าค่า $|\mu|$ ใน CZE และค่า k ใน MEKC มีลำดับที่เหมือนกัน นั่นคือ $\alpha_{CZE} > 1.0$ และ $\alpha_{MEKC} > 1.0$ แม้ว่าค่า $\rho > 1.0$ แต่พบค่า α_{MEKC} ที่ได้จากการทำนายและจากการทดลองลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเพิ่ม [SDS] และ k_1 เนื่องจากค่า ρ ที่ได้จากการคำนวณนั้นมีค่าเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยเท่ากับ 1.032 และ 1.072 สำหรับ 10-60 mM SDS ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของค่า α_{MEKC} ของคู่สาร PP/IP ใน MEKC สอดคล้องกับแบบจำลอง α_{MEKC} แบบที่ 1 ซึ่งได้อธิบายก่อนหน้านี้ในกรณีที่มีค่า ρ น้อยๆ

เนื่องจากคู่สาร IP/EP และ BP/PP เกิดการสลับที่กันของค่า $|\mu|$ ใน CZE และค่า k ใน MEKC และค่า α_{CZE} มีค่าน้อยกว่า 1.0 ดังนั้นการสลับลำดับของค่า $|\mu|$ สำหรับคู่สาร IP/EP และ BP/PP ที่ [SDS] สูงและที่ [SDS] ต่ำ หรือเท่ากับศูนย์ สอดคล้องกับแบบจำลอง α_{MEKC} แบบที่ 3 เมื่อค่า α_{MEKC} เท่ากับ 1.0 พบว่าค่า k_1 ที่ได้จากการทำนายในรูปที่ 5.3b มีค่าประมาณ 0.003 สำหรับ

BP/PP ที่ [SDS] ต่ำ ๆ และเท่ากับ 0.052 สำหรับ IP/EP ซึ่งค่านี้สอดคล้องกับค่า k_1 ที่ได้จากการทดลองเท่ากับ 0.064 นอกจากนี้พบว่าเมื่อใช้สมการที่ 5.8 และใช้ค่า α_k เฉลี่ยเท่ากับ 3.831 สำหรับคู่สาร IP/EP ที่ 6.0-60 mM SDS ซึ่งให้ค่า α_{MEKC} เท่ากับ 1.0 ได้ค่า k_1 ที่ได้จากการทำนายเท่ากับ 0.057 ซึ่งสอดคล้องกับค่า k_1 ในรูปที่ 5.3b (0.052)



รูปที่ 5.3 α_{MEKC} ที่ได้จากการทดลอง (สัญลักษณ์) และจากการทำนาย (เส้นทึบ) สำหรับสารที่มีประจุสองตัวใน MEKC (a) ที่ [SDS] ต่าง ๆ (b) ที่ค่า k_1 ต่าง ๆ สำหรับค่าที่ได้จากการทำนายคำนวณโดยใช้สมการที่ 5.7 และข้อมูลในตารางที่ 5.2

5.4 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของ separation selectivity ใน MEKC สำหรับสารที่มีประจุสองตัวในภาวะที่ความเข้มข้นของ SDS และค่า k ต่าง ๆ สามารถอธิบายและทำนายโดยใช้สมการและแบบจำลองทางทฤษฎีของ separation selectivity ใน MEKC ที่สัมพันธ์กับตัวแปรที่ไม่มีหน่วยของ mobility selectivity ใน CZE และ retention selectivity ใน MEKC เมื่อเปรียบเทียบกับ CZE พบว่า MEKC สามารถเพิ่มหรือลด separation selectivity ของสารที่มีประจุสองตัวได้ขึ้นอยู่กับแต่ละแบบจำลองทางทฤษฎี นอกจากนี้พบว่า separation selectivity ที่ได้จากการทดลองมีความสอดคล้องกับค่าที่ได้จากการทำนายโดยใช้แบบจำลองทางทฤษฎีของ MEKC ในภาวะที่ความเข้มข้นของ SDS และค่า k ต่าง ๆ

เอกสารอ้างอิง

- Terabe, S., Matsubara, N., Ishihama, Y., Okada, Y. "Microemulsion Electrokinetic Chromatography: Comparison with Micellar Electrokinetic Chromatography" *J. Chromatography*. **608** (1992) 23-29.
- Altria, K. D., Clark, B. J., Mahuzier, P. E. "The Effect of Operating Variables in Microemulsion Electrokinetic Capillary Chromatography" *Chromatographia* **52** (2000) 758-768.
- Pappas, T. J., Gayton-Ely, M., Holland, L. A. "Recent Advances in Micellar Electrokinetic Chromatography" *Electrophoresis* **26** (2005) 719-734.
- Iadarola, P., Ferrari, F., Fumagalli, M., Viglio, S. "Determination of Amino Acids by Micellar EKC: Recent Advances in Method Development and Novel Applications to Different matrices" *Electrophoresis* **29** (2008) 224-236.
- Terabe, S., Otsuka, K., Ando, T. "Electrokinetic Chromatography with Micellar Solution and Open-Tubular Capillary" *Analytical Chemistry*. **57** (1985) 834-841.
- Quirino, J. P., Terabe, S. "Electrokinetic Chromatography" *Journal of Chromatography A* **856** (1999) 465-482.
- Molina, M., Silva, M. "Micellar Electrokinetic Chromatography: Current Developments and Future" *Electrophoresis* **23** (2002) 3907-3921.
- Welsch, T., Michalke, D. "(Micellar) Electrokinetic Chromatography: an Interesting Solution for the Liquid Phase Separation Dilemma" *Journal of Chromatography A* **1000** (2003) 935-951.
- Terabe, S. "Capillary Separation: Micellar Electrokinetic Chromatography" *Annual Reviews of Analytical Chemistry* **2** (2009) 99-120.
- Riekkola, M. -L., Wiedmer, S. K., Valkó, I. E., Sirén, H. "Selectivity in Capillary Electrophoresis in the Presence of Micelles, Chiral Selectors and Non-Aqueous Media" *Journal of Chromatography A* **792** (1997) 13-35.
- Ehala, S., Vaher, M., Kaljurand, M. "Separation of Aromatic Hydrophobic Sulfonates by Micellar Electrokinetic Chromatography" *Journal of Chromatography A* **1161** (2007) 322-326.
- Gong, S., Liu, F., Li, W., Gao, F., Gao, C., Liao, Y., Liu, H. "Separation of Hydrophobic Solutes by Organic-Solvent-Based Micellar Electrokinetic

- Chromatography Using Cation Surfactants" *Journal of Chromatography A* **1121** (2006) 274-279.
- Dubber, M. J., Kanfer, I. "Application of Reverse-Flow Micellar Electrokinetic Chromatography for the Simultaneous Determination of Flavonols and Terpene Trilactones in Ginkgo Biloba Dosage Forms" *Journal of Chromatography A* **1122** (2006) 266-274.
- Mallampati, S., Leonard, S., De Vulder, S., Hoogmartens, J., Van Schepdael, A. "Method Development and Validation for the Analysis of Didanosine Using Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography" *Electrophoresis* **26** (2005) 4079-4088.
- Česla, P., Blomberg, L., Hamberg, M., Jandera, P. "Characterization of Anacardic Acids by Micellar Electrokinetic Chromatography and Mass Spectrometry" *Journal of Chromatography A* **1115** (2006) 253-259.
- Damić, M., Nigović, B. "Fast Analysis of Statins in Pharmaceuticals by MEKC" *Chromatographia* **71** (2009) 233-240.
- Iadarola, P., Cetta, G., Luisetti, M., Annovazzi, L., Casado, B., Baraniuk, J., Zalone, C., Viglio, S. "Micellar Electrokinetic Chromatographic and Capillary Zone Electrophoretic Methods for Screening Urinary Biomarkers of Human Disorders: A Critical Review of the State-of-the-Art" *Electrophoresis* **26** (2005) 752-766.
- Téllez, A., Fuguet, E., Rosés, M. "Comparison of migration models for acidic solutes in micellar electrokinetic chromatography" *Journal of Chromatography A* **1139** (2007) 143-151.
- Giddings, J. C. "Generation of Variance, Theoretical Plates, Resolution, and Peak Capacity in Electrophoresis and Sedimentation" *Journal of Separation Science* **4** (1969) 181-189.
- Jorgenson, J. W., Lukacs, K. D. "Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries" *Analytical Chemistry* **53** (1981) 1298-1302.
- Nielsen, K. R., Foley, J. P., in: Camilleri, P. (Eds.) "Capillary Electrophoresis: Theory and Practice" CRC Press, Inc., Boca Raton 1993, pp. 117-161.
- Pyell, U. "Electrokinetic Chromatography: Theory, Instrumentation, and Application" John Wiley & Sons, West Sussex, 2006, pp. 4-10.
- Huang, H. -Y., Chiu, C. -W., Chen, Y. -C., Yeh, J. -M. "Comparison of microemulsion Electrokinetic Chromatography and Micellar Electrokinetic Chromatography as Methods for the Analysis of Ten Benzophenones" *Electrophoresis* **26** (2005) 895-902.
- Nhujak, T., Srisa-art, M., Kalampakorn, K., Tolieng, V., Petsom, A. "Determination of Gibberellic Acid in Fermentation Broth and Commercial Products by Micellar Electrokinetic Chromatography" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53** (2005) 1884-1889.
- Huertas-Pérez, J. F., del Olmo Iruela, M., García-Campaña, A. M., González-Casado, A., Sánchez-Navarro, A. "Determination of the Herbicide Metribuzin and its Major Conversion Products in Soil by Micellar Electrokinetic Chromatography" *Journal of Chromatography A* **1102** (2006) 280-286.
- Huang, H. -Y., Lai, Y. -C., Chiu, C. -W., Yeh, J. -M. "Comparing Micellar Electrokinetic Chromatography and Microemulsion Electrokinetic Chromatography for the Analysis of Preservatives in Pharmaceutical and Cosmetic Products" *Journal of Chromatography A* **993** (2003) 153-164.
- Nhujak, T., Sastravaha, C., Palanuvej, C., Petsom, A. "Chiral Separation in Capillary Electrophoresis Using Dual Neutral Cyclodextrins: Theoretical Models of

- Electrophoretic Mobility Difference and Separation Selectivity" *Electrophoresis* **26** (2005) 3814-3823.
- Norinder, U., Lidén, P., Boström, H. "Discrimination Between Modes of Toxic Action of Phenols Using Rule Based Methods" *Molecular Diversity* **10** (2006) 207-212.
- Boyce, M., Spickett, E." Separation and Quantification of Preservatives Using ion Pair HPLC and CZE: An Extended Investigation of Separation Mechanisms" *Journal of Chemistry Education*. **77** (2000) 740-742.
- Jerez, G., Kaufman, G., Prystai, M., Schenkeveld, S., Donkor, K. K." Determination of Thermodynamic pKa Values of Benzimidazole and Benzimidazole Derivatives by Capillary Electrophoresis" *Journal of Separation Science* **32** (2009) 32, 1087-1095.
- Kenndler, E., in: Khaledi, M. G. (Eds.), "High Performance Capillary Electrophoresis: Theory, Techniques, and Applications" John Wiley & Sons, Inc., New York 1998, pp. 25-76.
- Téllez, A., Fuguet, E., Rosés, M. "Optimization of the Separation of Ionizable Compounds in Micellar Electrokinetic Chromatography by Simultaneous Change of pH and SDS Concentration" *Electrophoresis* **28** (2007) 3712-3721.
- Poouthree, K., Leepipatpiboon, N., Petsom, A., Nhujak, T. "Retention Factor and Retention Index of Homologous Series Compounds in Microemulsion Electrokinetic Chromatography Employing Suppressed Electroosmosis" *Electrophoresis* **28** (2007) 767-778.
- Golden, R., Gandy, J., Vollmer, G. "A Review of the Endocrine Activity of Parabens and Implications for Potential Risks to Human Health" *Critical Reviews in Toxicology* **35** (2005) 435-458.
- Tavares, R. S., Martins F. C., Oliveira, P. J., Ramalho-Santos, J., Peixoto, F. P."Parabens in Male Infertility-is There a Mitochondrial Connection?" *Reproductive Toxicology* **27** (2009) 1-7.

บทที่ 6

แบบจำลองทางทฤษฎีของค่าจำเพาะการแยกสำหรับสารที่มีประจุ ในเทคนิคไซโคลเด็กซ์ทรินอิเล็กโตรโครมาโทกราฟี¹

6.1 คำนำ

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

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

- μ_0 คือ ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารใน CZE หรือสถานะที่ไม่มี CD
 μ_∞ คือ ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารกับ CD
 C คือ ความเข้มข้นของ CD ที่ไม่เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่ภาวะสมดุล ซึ่งมีค่าเท่ากับความเข้มข้น CD ที่เติมลงไปเมื่อความเข้มข้น CD มีค่ามากกว่าความเข้มข้นของสารมากๆ
 K คือ ค่า binding constant ระหว่างสารกับ CD

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

¹งานวิจัยนี้ได้นำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติที่ APCE2010HongKong และเขียนเพื่อส่งตีพิมพ์ในวารสารดังภาคผนวก 4

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

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

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

6.2 การทดลอง

6.2.1 สารเคมี

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

6.2.2 การเตรียมบัฟเฟอร์และสารทดสอบ

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

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

6.2.3 ภาวะของ CE

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

ก่อนการวิเคราะห์ในแต่ละวันล้างคัพพิลลารีด้วย 0.1 M NaOH และบัฟเฟอร์อย่างละ 10 นาที และระหว่างการวิเคราะห์ในแต่ละครั้งล้างคัพพิลลารีด้วย 0.1 M NaOH และบัฟเฟอร์อย่างละ 3 นาที แต่ละการทดลองทำซ้ำสองครั้ง

6.3 ผลการทดลองและวิจารณ์

6.3.1 แบบจำลองของค่าจำเพาะการแยกสำหรับสารที่มีประจุในเทคนิค CD-EKC

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

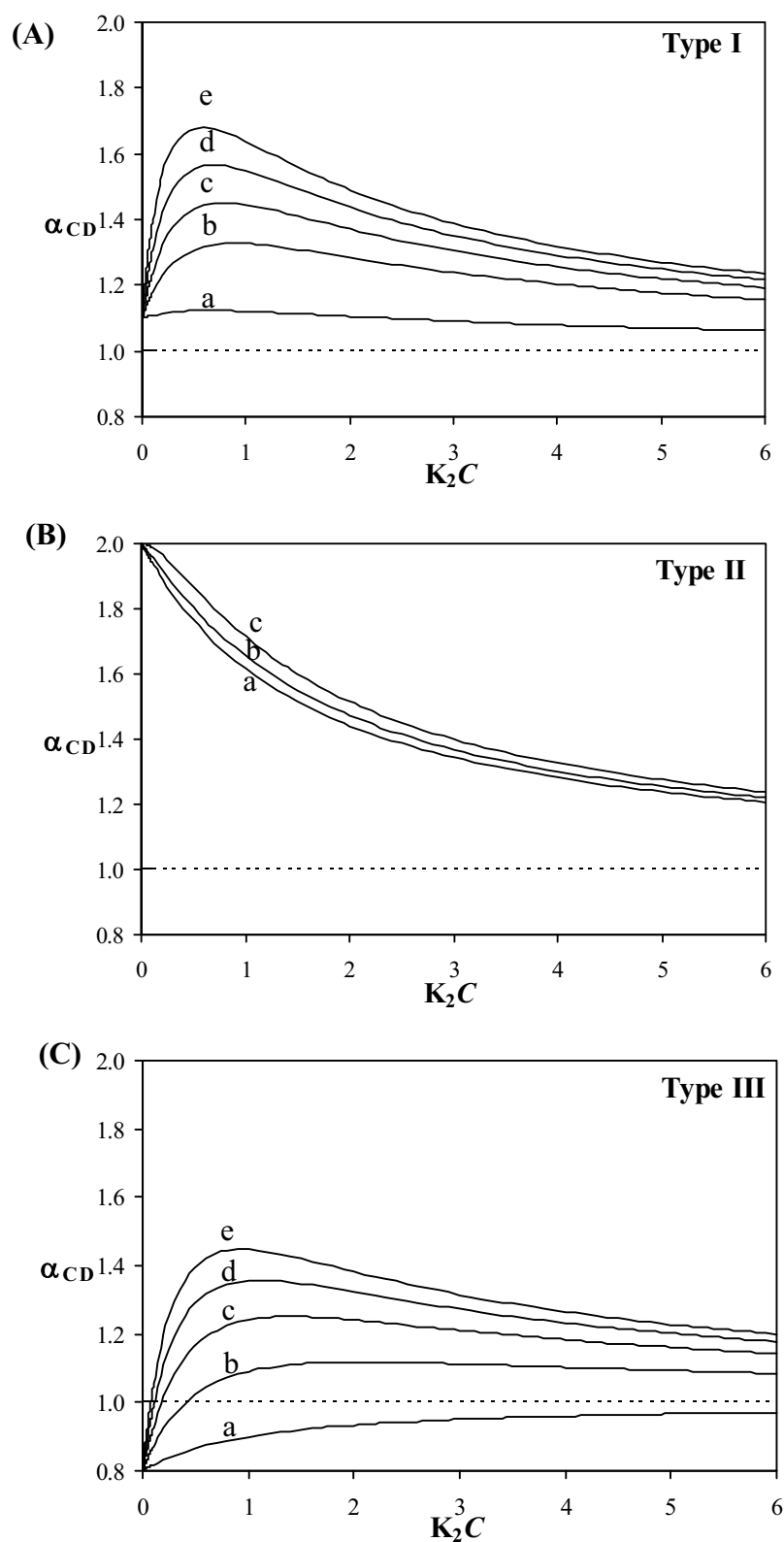
สลับกัน โดยเมื่อเดิม CD ลงไปในบัพเฟอ์การแยกสารลดลง เริ่มต้นจาก $1/\alpha_{CD} > 1$ ($\alpha_{CD} < 1$) ไปจนกระทั่ง α_{CD} มีค่าเท่ากับ 1 แล้วหลังจากนั้นการแยกสารจะดีขึ้น (α_{CD}) ที่ K_2C เพิ่มมากขึ้น จาก [สมการที่ 6.2](#) สามารถคำนวณ K_2C ที่ให้ α_{CD} มีค่าเท่ากับ 1 ได้ดังสมการ

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

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

ตารางที่ 6.1 ประเภทของแบบจำลองของ α_{CD}

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



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

6.3.2 ค่าจำเพาะการแยกสารของสารทดสอบที่ได้จากการทำนายและจากการทดลองในเทคนิค CD-EKC

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

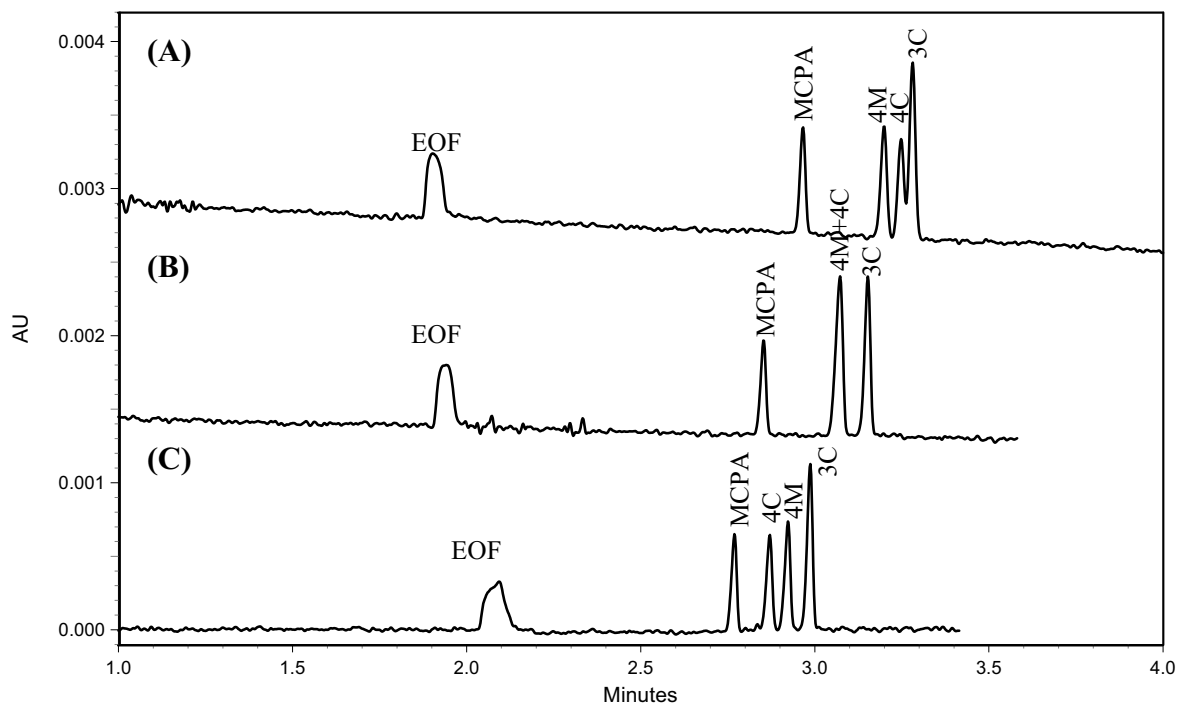
รูปที่ 6.2 แสดงตัวอย่างของอิเล็กโตรโฟโกราฟีของการแยก 3C, 4C, 4M และ MCPA ด้วยบัฟเฟอร์ของ CZE (0 mM β -CD, **รูปที่ 6.2A**) และบัฟเฟอร์ของ CD-EKC ที่มี β -CD เข้มข้น 2 mM (**รูปที่ 6.2B**) และ 12 mM (**รูปที่ 6.2C**) จาก**รูปที่ 6.2A** ซึ่งเป็นการแยกสารด้วย CZE สารทดสอบที่มีประจุลบเคลื่อนที่ไปทิศทางตรงข้ามกับ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

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

ยังแสดงให้เห็นว่าสมการที่ 6.2 สามารถใช้สำหรับทำนาย α_{CD} ที่ K_2C และที่ความเข้มข้นของ CD ต่างๆ ได้

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

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

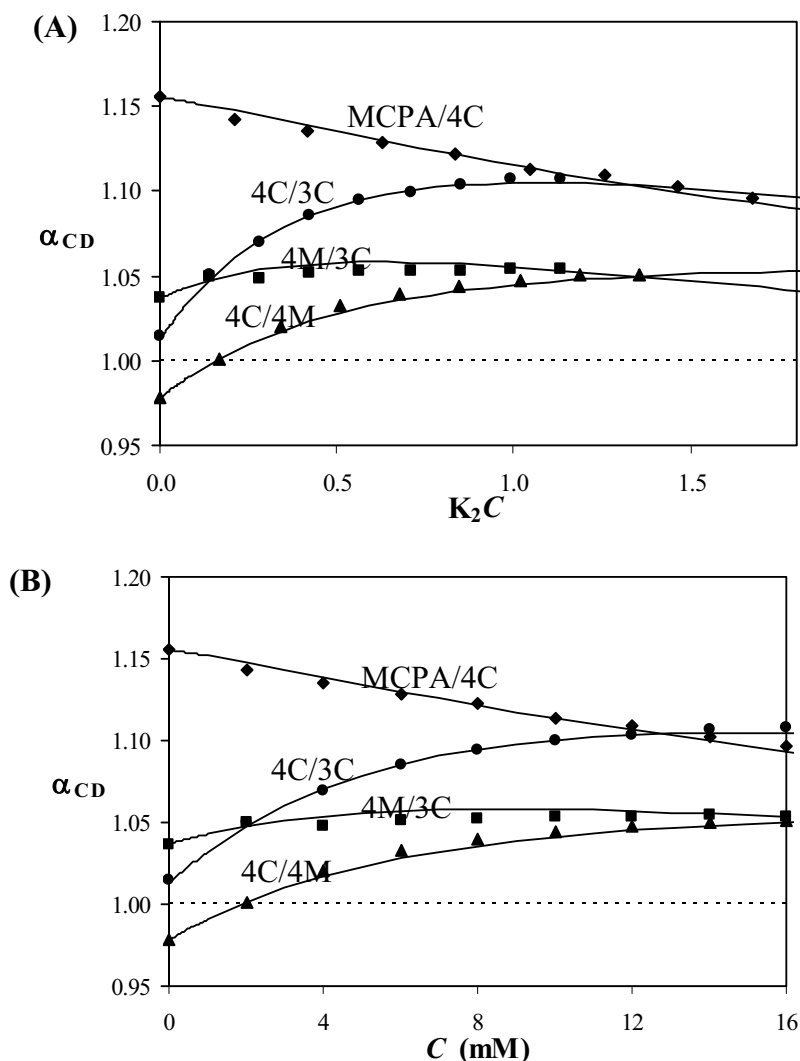


รูปที่ 6.2 อิเล็กโทรโฟโแกรมของอนุพันธ์กรดเบนโซอิกและกรดฟีนอกซี โดยใช้บัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย (A) 0 mM (CZE), (B) 2 mM และ (C) 12 mM β -CD ใน 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ที่ pH 9.2 และภาวะอื่นๆ ของ CE ประกอบด้วย uncoated fused-silica capillary ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 50 μ m ความยาว 40.2 cm (30 cm ถึงเครื่องตรวจวัด),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

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

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

^a สารตัวที่ 2



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

6.4 สรุปผลการทดลอง

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

เอกสารอ้างอิง

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

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

บทที่ 7

การเปรียบเทียบค่าจำเพาะการแยกในเทคนิคอะโครมาติกโพรไฟล์สำหรับสารกลุ่ม แอโรแมติกแอซิดที่มีหมู่แทนที่เป็นคลอโรและเมทิล¹

7.1 คำนำ

ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว CE เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับการแยกสารทั้งสารที่มีและไม่มีประจุ โดยเกิดการแยกสารได้เนื่องจากเกิดความแตกต่างของค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า (μ) ค่าจำเพาะการแยกสาร (α) เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อค่าการแยกของสาร สำหรับเทคนิค CZE ที่สารเกิดการแยกได้เนื่องจากความแตกต่างของอัตราส่วนของประจุต่อขนาดของสาร ทำให้เทคนิคนี้แยกสารกลุ่มที่มี μ ใกล้เคียงกันหรือ α มีค่าน้อยๆ ประมาณ 1 ได้ยาก จากรายงานที่ผ่านมา ได้มีวิธีการเพื่อปรับปรุงการแยกสารของเทคนิค CZE หลากหลายวิธี เช่น การปรับ pH ให้มีค่าใกล้เคียงกับค่าเฉลี่ยของ pK_a ของสาร [Wren: 1991, Terebe *et al.*: 1988] ทำให้ความสามารถในการแตกตัวของสารเปลี่ยนไป ส่งผลต่อความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร อย่างไรก็ตาม วิธีการปรับเปลี่ยน pH ไม่ค่อยเหมาะกับทางปฏิบัติ เช่น การแยกสารหลายๆชนิดที่มี pK_a แตกต่างกันในการวัดเดียวกัน หรืออาจปรับปรุงการแยกได้โดยเติมสารเติมแต่งลงไป เช่น ionic liquids [Yu *et al.*: 2005] และตัวทำละลายอินทรีย์ [Isemura *et al.*: 2009, Benz and Fritz: 1995, Farran *et al.*: 1999, Sarmini and Kenndler: 1997, Sarmini and Kenndler: 1998, Sarmini and Kenndler: 1999, Lee *et al.*: 1995, Fujiwara and Honda, 1987] ซึ่งสารเติมแต่งที่เติมลงไปในบัฟเฟอร์ส่งผลต่อ μ ของสารและ EOF ทำให้ α เปลี่ยนไป นอกเหนือจากการแยกด้วย CZE แล้ว การเติมเฟสเทียมลงไปในบัฟเฟอร์ เช่น ไมเซลล์ในเทคนิค MEKC (บทที่ 5) หรือ CD ในเทคนิค CD-EKC (บทที่ 6) ส่งผลให้ค่าจำเพาะการแยกสารเปลี่ยนไปได้

จากงานวิจัยที่ผ่านมา [Li and Lucy: 2001] มีรายงานว่า chlorobenzoate (C^-) และ methylbenzoate (M^-) มีค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าสัมบูรณ์ (μ^0 , 10^{-8} m²V⁻¹s⁻¹) ของแต่ละไอโซเมอร์ใกล้เคียงกัน ได้แก่ -3.16/-3.07, -3.22/-3.11 และ -3.17/-3.07 สำหรับ $2C^-/2M^-$, $3C^-/3M^-$ และ $4C^-/4M^-$ ตามลำดับ เมื่อคำนวณค่าจำเพาะการแยกสาร มีค่าดังนี้ 1.029, 1.035 และ 1.033 สำหรับไอโซเมอร์ของ 2-, 3- และ 4- C^-/M^- แสดงให้เห็นว่า R_s ของสารแต่ละคู่ค่อย

¹งานวิจัยนี้ได้นำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ APCE2010HongKong และเขียนเพื่อส่งตีพิมพ์ในวารสารดังภาคผนวก 5

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาและเปรียบเทียบ α ในเทคนิค CE ทั้ง 3 ประเภท เพื่อใช้สำหรับการแยกอนุพันธ์กรดเบนโซอิกที่มีหมู่แทนที่เป็นหมู่เมทิลและหมู่คลอโร เทคนิค CE ที่ใช้ได้แก่ 1) CZE ที่มีการปรับเปลี่ยนชนิดและปริมาณของตัวทำละลายอินทรีย์ 2) MEKC ที่ปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของ SDS และชนิดและปริมาณของตัวทำละลายอินทรีย์ และ 3) CD-EKC ที่ปรับเปลี่ยนชนิดและปริมาณของ CD จากนั้นนำมาประยุกต์ใช้สำหรับแยกสารปราบวัชพืชที่มีฤทธิ์เป็นกรด โดยเน้นสารในกลุ่มกรดฟีนอกซีที่มีหมู่แทนที่บนวงเบนซีนแตกต่างกันเพียงหมู่เมทิลและหมู่คลอโร 1 ตำแหน่ง โดยเมื่อเปรียบเทียบกับ CZE แล้ว การเปลี่ยนค่าจำเพาะการแยกสารใน MEKC และ CD-EKC สามารถอธิบายได้โดยใช้แบบจำลองของ α ดังที่ได้กล่าวมาแล้วในบทที่ 5 และ 6

7.2 การทดลอง

7.2.1 สารเคมี

(2-, 3- และ 4-) methylbenzoic acid; (2-, 3- และ 4-) chlorobenzoic acid; (2,3-, 2,4-, 2,5-, 2,6-, 3,4- และ 3,5-) dimethylbenzoic acid (DM⁻); (2,3-, 2,4-, 2,5-, 2,6-, 3,4- และ 3,5-) dichlorobenzoic acid (DC⁻); 4-Chloro-2-methylphenoxyacetic acid (MCPA), 4-(2-methyl-4-chlorophenoxy) butyric acid (MCPB), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 4-(2,4-dichlorophenoxy) butyric acid (2,4-DB), (2,4,5-trichlorophenoxy) acetic acid (2,4,5-T), acifluorfen, clopyralid, 2-methoxy-3,6-dichlorobenzoic acid (dicamba), mecoprop (MCP), และ picloram; disodium tetraborate decahydrate, sodium hydroxide, α -cyclodextrin (α -CD), β -cyclodextrin (β -CD), dimethyl- β -cyclodextrin (DM- β -CD), methanol (MeOH), acetonitrile (ACN), sodium dodecyl sulfate (SDS), mesityl oxide, thiourea และ 1-phenyldodecane (DB)

7.2.2 การเตรียมบัฟเฟอร์และสารทดสอบ

1) บัฟเฟอร์

- บัฟเฟอร์สำหรับเทคนิค capillary zone electrophoresis (CZE) เตรียมโดยปีเปิดสารละลาย 100 mM โซเดียมเตตระโบเรต และตัวทำละลายอินทรีย์ปริมาตรตามต้องการและเจือจางด้วยน้ำ

- บัฟเฟอร์สำหรับเทคนิค micellar electrokinetic chromatography (MEKC) เตรียมได้โดยปีเปิดสารละลาย 500 mM โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 100 mM โซเดียมเตตระโบเรต และตัวทำละลายอินทรีย์ปริมาตรตามต้องการ และปรับปริมาตรด้วยน้ำ

- บัฟเฟอร์สำหรับเทคนิค cyclodextrin electrokinetic chromatography (CD-EKC) เตรียมโดยชั่ง α -CD, β -CD หรือ DM- β -CD และละลายให้สารละลายสุดท้ายประกอบด้วย 10 mM โซเดียมเตตระโบเรต

2) สารทดสอบ

- สำหรับเทคนิค CZE และ CD-EKC ปิเปตสารละลายมาตรฐานปริมาณตามต้องการและนำไปเจือจางด้วยสารละลาย 1 mM โซเดียมเตตระโบเรต

- สำหรับเทคนิค MEKC ปิเปตสารละลายมาตรฐานปริมาณตามต้องการและนำไปเจือจางด้วยสารละลาย 20 mM SDS

ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย CE นำสารละลายบัฟเฟอร์และสารทดสอบมา sonicate 5 นาที เพื่อกำจัดแก๊สที่ละลายอยู่ในสารละลาย และกรองด้วย 0.45 μm nylon syringe filter

7.2.3 ภาวะของ CE

เครื่อง CE ยี่ห้อ Beckman รุ่น P/ACE™ MDQ capillary electrophoresis system และคะปิลลารีเป็น uncoated fused silica capillary column 50 μm ความยาว 40.2 cm (30 cm ถึง detector) ทำการบรรจุสารด้วยความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 3 วินาที โดยใช้ความต่างศักย์ 15 kV, ควบคุมอุณหภูมิด้วยระบบหล่อเย็นที่ 25 °C และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 214 nm

ก่อนทำการวิเคราะห์ในแต่ละวัน ล้างคอลัมน์ด้วย 0.1 M NaOH และบัฟเฟอร์ อย่างละ 10 นาที ระหว่างการวิเคราะห์แต่ละรัน ล้างคอลัมน์ด้วย 0.1 M NaOH และ บัฟเฟอร์อย่างละ 3 นาที และหลังการทดลองในแต่ละวัน ล้างคอลัมน์ด้วย 0.1 M NaOH และน้ำ อย่างละ 10 นาที

7.3 ผลการทดลองและวิจารณ์

7.3.1 Capillary zone electrophoresis (CZE) สำหรับ C^-/M^- และ DC^-/DM^- แต่ละคู่

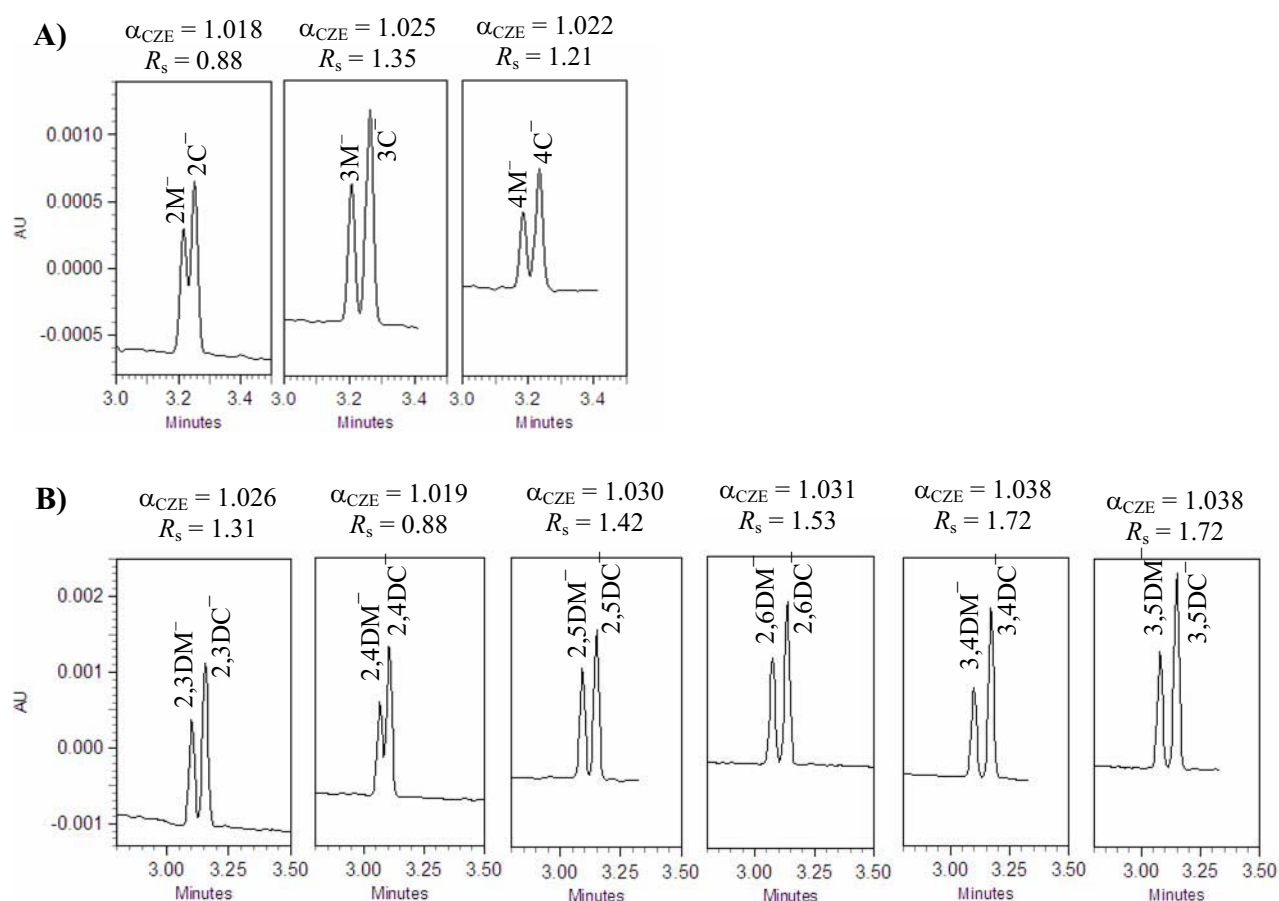
CZE เป็นเทคนิคการแยกสารที่เหมาะสมสำหรับสารที่มีประจุ โดยกลไกการแยกสารอาศัยความแตกต่างของค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร (electrophoretic mobility, μ) ซึ่งขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของประจุต่อขนาดของสาร [รูปที่ 7.1A](#) แสดงอิเล็กทรอนิกส์โปรแกรมของการแยกคู่ C^- และ M^- ในแต่ละ positional isomer ในเทคนิค CZE ที่ BGE ประกอบด้วย 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2 และไม่มีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ใดๆ ที่ภาวะดังกล่าวสารแต่ละตัวซึ่งมี $\text{pK}_\text{a} < 4.5$ แยกตัวเป็นประจุลบได้สมบูรณ์ ดังนั้นสารเคลื่อนที่ไปในทิศทางตรงข้ามกับ EOF แต่ EOF มีค่า μ มากกว่า สารจึงเคลื่อนที่ออกมาที่หลัง EOF marker โดยมีลำดับการออกของสารหรือลำดับของ $|\mu|$ เป็น $\text{C}^- > \text{M}^-$ จากรูปสังเกตได้ว่า พิกของ C^- และ M^- เคลื่อนที่ออกมาใกล้ๆ กัน และค่า μ ของสารที่คำนวณ ($10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) แสดงดังตารางที่ 7.1 และมี %RSD < 1.0 จาก [รูปที่ 7.1A](#) พิกของ C^- และ M^- ในแต่ละ positional isomer แยกออกจากกันไม่สมบูรณ์ และเมื่อพิจารณา [รูปที่ 7.1B](#) แสดงการแยกของ disubstituted benzoates (DC^-/DM^-) ในแต่ละ positional isomer ด้วย CZE พบว่าลำดับของ $|\mu|$ เป็น $\text{DC}^- > \text{DM}^-$ เหมือนกับลำดับของ $|\mu|$ ใน monosubstituted benzoates ที่ $\text{C}^- > \text{M}^-$ และการแยกของคู่ DC^- และ DM^- สำหรับ 2,6-, 3,4- และ 3,5-ไอโซเมอร์สามารถแยกออกจากกันได้

สมบรูณ์ ($R_s = 1.53$ ถึง 1.72) ในขณะที่ 2,3-, 2,4- และ 2,5-ไอโซเมอร์ไม่สามารถแยกได้สมบรูณ์ ($R_s = 0.88$ ถึง 1.42)

จากรูปที่ 7.1 สามารถคำนวณค่าจำเพาะการแยกของสารใน CZE (α_{CZE}) สำหรับการแยกของคู่ C^- และ M^- ได้ดังนี้ 1.018, 1.025 และ 1.023 สำหรับ 2-, 3- และ 4-ไอโซเมอร์ ตามลำดับ ค่าที่ทดลองได้มีแนวโน้มเหมือนกัน แต่มีค่าน้อยกว่าเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับค่าที่ได้จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่คำนวณโดยใช้ μ^0 ดังแสดงในหัวข้อ 7.1 และ สำหรับคู่ DC^- และ DM^- ได้ค่า α_{CZE} อยู่ในช่วง 1.019-1.038 เห็นได้ว่าค่า separation selectivity (α) (เป็นอัตราส่วนของค่า μ) ใกล้ 1 มาก แสดงว่ามีความแตกต่างของ μ น้อย หรือมีการแยกน้อยนั่นเอง

จากนั้นได้ศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีต่อค่า α_{CZE} โดยเติมตัวทำละลายอินทรีย์ MeOH หรือ ACN ในช่วง 10-20 % โดยปริมาตรลงใน 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ พบว่าเมื่อเติมตัวทำละลายอินทรีย์มากขึ้น ลำดับการออกของสารยังคงเหมือนเดิม แต่เวลาที่ใช้ในการเคลื่อนที่เพิ่มขึ้นเนื่องจาก ความหนืดของ BGE เพิ่มขึ้น นอกจากนี้การเติมตัวทำละลายอินทรีย์ยังส่งผลต่อ μ_{co} และ μ ของสารด้วย รูปที่ 7.2 แสดงตัวอย่างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง α_{CZE} และ R_s ของ C^- และ M^- ที่ความเข้มข้นของ MeOH ต่างๆ กัน จากรูปที่ 7.2A1 เมื่อเติม MeOH เพิ่มขึ้น ค่า α_{CZE} ลดลงเล็กน้อย แต่ค่า R_s เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจาก mobility term และ N มีค่ามากขึ้น ดังสมการที่ 7.1 และเมื่อใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็น ACN (ไม่ได้แสดงกราฟ) ผลที่ได้เป็นไปในลักษณะเดียวกันกับ MeOH

จากผลการทดลองที่ได้ การแยกของอนุพันธ์ benzoic acid ที่มีหมู่แทนที่เป็น methyl หรือ คลอโร ซึ่งมีค่า μ ใกล้เคียงกันมาก แยกออกจากกันได้ยาก มีค่า α_{CZE} ใกล้ 1 และถ้าต้องการปรับปรุงการแยกด้วยการปรับเปลี่ยนค่า α ทำได้ยาก เนื่องจากถึงแม้เติมตัวทำละลายอินทรีย์ลงไป α_{CZE} ก็เปลี่ยนแปลงไปเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ดังนั้นจึงได้ศึกษาการแยกสารเหล่านี้ด้วยเทคนิค CE แบบอื่นๆ เช่น MEKC และ CD-EKC ซึ่งเทคนิคเหล่านี้การเติม micelle หรือ CD ลงไปทำให้สารจะมีค่า μ ที่แตกต่างกัน เนื่องจากเกิดความแตกต่างของการเกิดอันตรกิริยากับ micelle หรือ CD นอกเหนือจากการแยกด้วยความแตกต่างของค่า μ ของสารเอง ส่งผลให้ค่า α เพิ่มขึ้น การแยกจะดีขึ้น



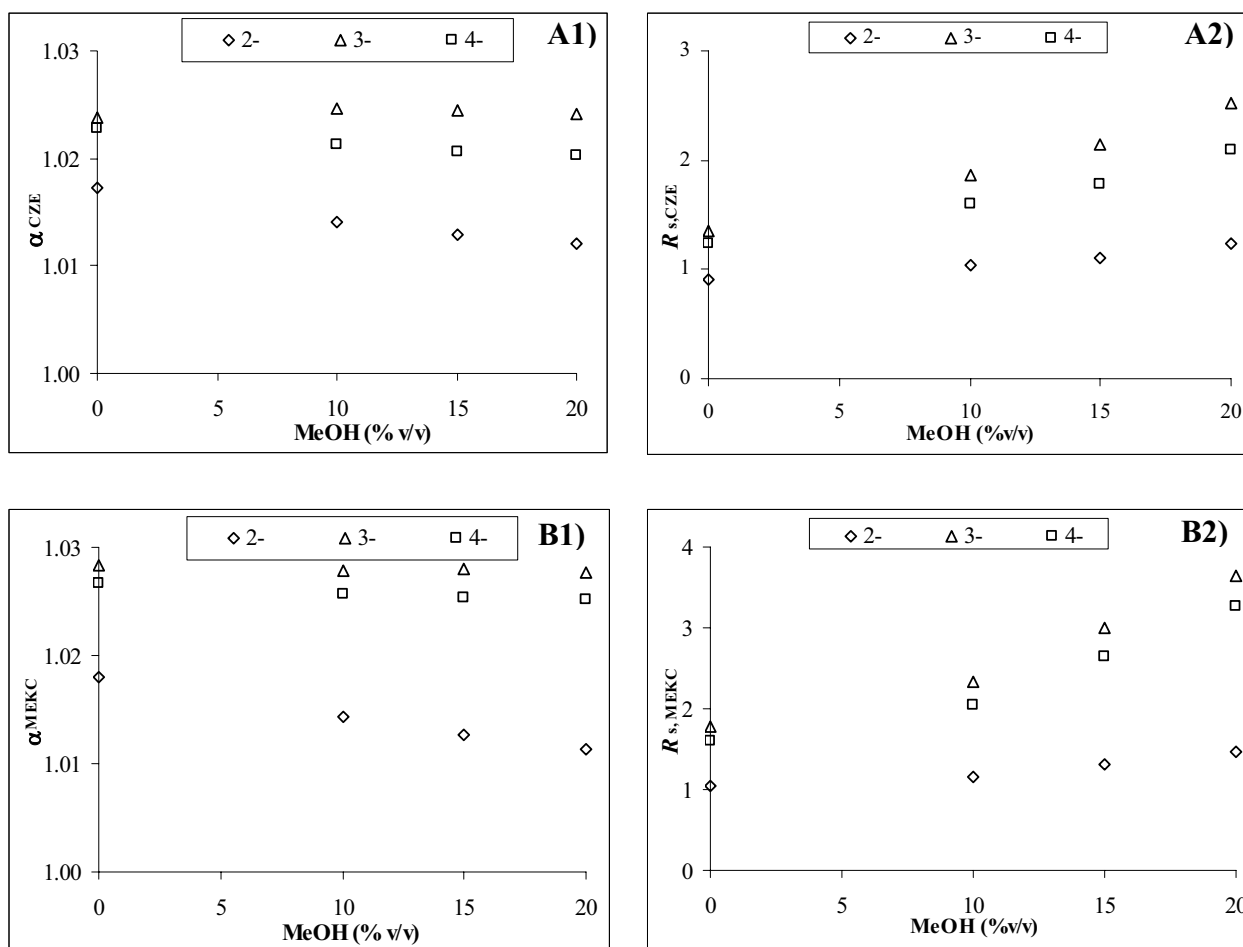
รูปที่ 7.1 อิเล็กโทรโฟโกราฟีของอนุพันธ์ benzoic acid ที่มีหมู่แทนที่เป็นคลอโรหรือเมทิล ในแต่ละไอโซเมอร์ ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CZE ที่มี BGE ประกอบด้วย 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2 และไม่มีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ ส่วนภาวะอื่นๆ ดังหัวข้อที่ 7.2.3

ตารางที่ 7.1 Mobilities (μ), mobility selectivities (α_{CZE} หรือ α_{MEKC}) และ retention selectivities (α_k) สำหรับ C^- , M^- , DC^- และ DM^- ใน CZE และ MEKC ที่ไม่มีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์

Analytes		CZE ^a		MEKC ^b		
		μ_{eff} ($10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	α_{CZE}	μ_{eff} ($10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	$\alpha_{\text{m, MEKC}}$	α_k
2-	C^- , M^-	-2.83, -2.78	1.02	-2.63, -2.59	1.02	1.03
3-	C^- , M^-	-2.86, -2.79	1.03	-2.66, -2.59	1.03	1.06
4-	C^- , M^-	-2.82, -2.76	1.02	-2.63, -2.56	1.03	1.05
2,3-	DC^- , DM^-	-2.74, -2.67	1.03	-2.47, -2.40	1.03	1.05
2,4-	DC^- , DM^-	-2.67, -2.62	1.02	-2.41, -2.36	1.02	1.04
2,5-	DC^- , DM^-	-2.73, -2.65	1.03	-2.48, -2.40	1.03	1.05
2,6-	DC^- , DM^-	-2.70, -2.62	1.03	-2.45, -2.37	1.04	1.06
3,4-	DC^- , DM^-	-2.75, -2.65	1.04	-2.52, -2.41	1.05	1.10
3,5-	DC^- , DM^-	-2.72, -2.62	1.04	-2.47, -2.39	1.04	1.10

^a BGE ประกอบด้วย 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2

^b BGE ประกอบด้วย 40 mM SDS และ 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2



รูปที่ 7.2 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ MeOH ต่อ α และ R_s ของ C^- และ M^- ใน CZE (A1, B1) และ MEKC (A2, B2): (A1) mobility selectivity in CZE (α_{CZE}), (B1) resolution in CZE ($R_{s,CZE}$), (A2) mobility selectivity in MEKC (α_{MEKC}) and (B2) resolution in MEKC ($R_{s,MEKC}$) โดย BGE ใน CZE ประกอบด้วย 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2 และ MEKC ประกอบด้วย 40 mM SDS และ 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2 ส่วนภาวะอื่นๆ ดังหัวข้อที่ 7.2.3

7.3.2 MEKC สำหรับ C^-/M^- และ DC^-/DM^- แต่ละคู่

การแยกสารทดสอบในเทคนิค MEKC ใช้ BGE ประกอบด้วย 40 mM SDS และ 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ที่ pH 9.2 และไม่มี การเติมตัวทำละลายอินทรีย์ ทั้งไมเซลล์ที่มีประจุลบและสารทดสอบที่มีประจุลบเคลื่อนที่ไปทางด้านขั้วลบในภาวะที่มี EOF จาก [ตารางที่ 7.1](#) เห็นได้ว่าลำดับการออกของสารใน MEKC เหมือนกับ CZE คือ มีลำดับของ $|\mu|$ เป็น $C^- > M^-$ และ $DC^- > DM^-$ กลไกการแยกสารในเทคนิค MEKC ขึ้นกับความแตกต่างของการ partitioning ของสารระหว่าง micelle กับ aqueous phase และความแตกต่างของ μ ของสารที่มีประจุ

จากงานวิจัยใน [บทที่ 5](#) ได้สร้างแบบจำลองของค่าจำเพาะการแยกสำหรับสารที่มีประจุใน MEKC (α_{MEKC}) เพื่อใช้อธิบายการเปลี่ยนแปลงของค่าจำเพาะการแยกและลำดับการออกของสาร

เปรียบเทียบกับใน CZE โดยสมการที่ใช้สำหรับสร้างแบบจำลองของ α_{MEKC} ได้จัดรูปแบบสมการให้มีความสัมพันธ์กับ α_k (อัตราส่วนของค่ารีเทนชันใน MEKC) และ α_{CZE} ดังสมการที่ 5.xx

ตารางที่ 7.1 แสดงค่า μ ใน CZE และ MEKC, α_{MEKC} , α_{CZE} และ α_k (อัตราส่วนของค่ารีเทนชันใน MEKC) สำหรับสาร C^- , M^- , DC^- และ DM^- เมื่อเปรียบเทียบการแยกสารใน MEKC กับ CZE เห็นได้ว่าค่า α_{MEKC} มีค่าสูงกว่า α_{CZE} เพียงเล็กน้อยเท่านั้น เนื่องจากสารมี α_k น้อยทำให้อัตราส่วนของ $\alpha_k / \alpha_{\text{CZE}}$ มีค่าน้อย อยู่ในช่วง 1.013 ถึง 1.063 (**สมการที่ 7.2**) หรือกล่าวอย่างง่ายว่าสารที่ทำการวิเคราะห์ซึ่งมีประจุลบ partitioning เข้าไปใน micelles ได้พอๆ กันทำให้ไม่ค่อยเกิดความแตกต่างของค่า μ และจากแบบจำลองของ α_{MEKC} ที่ได้รายงานไว้ก่อนหน้านี้ ค่า α_{MEKC} ของคู่สาร C^-/M^- และ DC^-/DM^- มีค่าเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ SDS ซึ่งสอดคล้องกับแบบจำลองประเภทที่ 1 ที่ $\alpha_{\text{CZE}} \geq 1.0$ and $\alpha_k > \alpha_{\text{CZE}}$ โดยที่อัตราส่วนของ $\alpha_k / \alpha_{\text{CZE}}$ มีค่าน้อยเมื่อเปรียบเทียบการแยกกับ CZE การแยกของคู่ C^-/M^- และ DC^-/DM^- ใน MEKC ดีขึ้นเพียงเล็กน้อย เนื่องจาก α_{MEKC} สูงกว่า α_{CZE} เพียงเล็กน้อย และเทอมของ mobility ใน MEKC มีค่ามากกว่าในขณะที่ N พอๆ กัน การแยกของคู่ C^-/M^- และ DC^-/DM^- ด้วย MEKC ส่วนใหญ่ให้การแยกที่สมบูรณ์ โดย C^-/M^- มี R_s ในช่วง 1.59 ถึง 1.77 และ DC^-/DM^- มี R_s ในช่วง 1.73 ถึง 2.67 ยกเว้น $2\text{C}^-/2\text{M}^-$ ($R_s = 1.09$) และ $2,4\text{DC}^-/2,4\text{DM}^-$ ($R_s = 1.25$).

นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของ SDS (ช่วง 20-80 mM) ต่อ α_{MEKC} พบว่าค่า α_{MEKC} ของคู่สาร C^-/M^- และ DC^-/DM^- ไม่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ SDS **รูปที่ 7.2B1 และ 7.2B2** แสดงผลของ MeOH ต่อ α_{MEKC} และ R_s ตามลำดับ สำหรับการแยก C^- และ M^- จาก**รูปที่ 7.2B** พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ส่งผลให้ α_{MEKC} ลดลงเล็กน้อย (**รูปที่ 7.2B1**) แต่ค่าการแยกสารกลับดีขึ้น (**รูปที่ 7.2B2**) ซึ่งแนวโน้มดังกล่าวเหมือนกับผลของการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ใน CZE ดังที่ได้กล่าวมาแล้วใน**หัวข้อ 7.3.1**

7.3.3 CD-EKC สำหรับ C^-/M^- และ DC^-/DM^- แต่ละคู่

ได้ศึกษาการแยกสารใน 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2 ที่เติม CD ได้แก่ α -CD (2 ถึง 60 mM), β -CD (2 ถึง 16 mM) และ DM- β -CD (2 ถึง 50 mM) โดยที่ β -CD 16 mM เป็นความเข้มข้นที่มากที่สุดที่ β -CD ละลายน้ำได้, α -CD 60 mM เพียงพอสำหรับแยกคู่สาร C^-/M^- และ DC^-/DM^- แล้ว มี $R_s > 2.4$ ยกเว้น $2,6\text{DC}^-/2,6\text{DM}^-$ เช่นเดียวกับ DM- β -CD 50 mM ก็เพียงพอสำหรับแยกคู่สาร C^-/M^- และ DC^-/DM^- แล้ว มี $R_s > 4.5$ ยกเว้น $2\text{C}^-/2\text{M}^-$ และ $2,6\text{DC}^-/2,6\text{DM}^-$

จากงานวิจัยใน**บทที่ 6** ได้สร้างแบบจำลองของค่าจำเพาะการแยกสำหรับสารที่มีประจุใน CD-EKC (α_{CD}) เพื่อใช้อธิบายการเปลี่ยนแปลงของค่าจำเพาะการแยกและลำดับการออกของสารเปรียบเทียบกับใน CZE โดยสมการที่ใช้สำหรับสร้างแบบจำลองของ α_{CD} ได้จัดรูปแบบสมการให้

ความสัมพันธ์กับ κ (อัตราส่วนของ binding constant, K ของสารกับ CD) และ α_{CZE} ดังสมการที่

6.2

ตารางที่ 7.2 แสดงค่า K , κ และ α_{CD} ที่มากที่สุดที่ความเข้มข้น CD ใดๆ ของคู่สาร C^-/M^- และ DC^-/DM^- พบว่า K ของ C^- และ DC^- มีค่ามากกว่า M^- และ DM^- แสดงให้เห็นว่า C^- เกิด complex กับ CD ได้ดีกว่า M^- เช่นเดียวกับ DC^- ที่ดีกว่า DM^- ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากอนุพันธ์เบนซีนที่มีหมู่แทนที่เป็นคลอโรมีความไฮโดรโฟบิกมากกว่าหมู่เมทิลทำให้ C^- และ DC^- เกิด complex กับ CD ได้ดี นอกจากนี้ยังอาจเป็นผลจากความเกาะเกาะของหมู่เมทิลที่มากกว่าหมู่คลอโร ส่งผลให้ M^- และ DM^- เกิด complex กับ CD ได้น้อยลง และเมื่อเปรียบเทียบคู่ C^-/M^- และ DC^-/DM^- ของไอโซเมอร์อื่นๆ คู่ของ $2C^-/2M^-$ และ $2,6DC^-/2,6DM^-$ เกิด complex กับ CD ได้น้อยมาก อาจเป็นไปได้ว่าเป็นผลของความเกาะเกาะของหมู่แทนที่ที่อยู่ติดกับหมู่คาร์บอนซีเลต

ปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเกิด inclusion complex ระหว่างสารกับ CD คือ ความเหมาะสมของขนาดโพรงของ CD กับขนาดของโมเลกุลของสาร เมื่อเปรียบเทียบ α -CD กับ β -CD ซึ่งขนาดโพรงของ β -CD มีขนาดใหญ่กว่า พบว่า K ใน α -CD มากกว่า β -CD สำหรับ C^- และ DC^- ยกเว้น $2C^-$, $2,3DC^-$, $2,6DC^-$ และ $3,4DC^-$ ในขณะที่ K ใน β -CD มากกว่าสำหรับ M^- และ DM^- ยกเว้น $3,5DM^-$ และเมื่อเปรียบเทียบ β -CD และอนุพันธ์ของ β -CD พบว่า ค่า K ใน DM - β -CD มีค่าน้อยกว่า β -CD สำหรับทุกไอโซเมอร์ทั้งนี้เนื่องจากผลของความเกาะเกาะของหมู่เมทิลที่อยู่ด้านขอบบนของโพรง DM - β -CD และผลการทดลองที่ได้ส่วนใหญ่สังเกตเห็นว่า α -CD และ DM - β -CD ให้ κ มากกว่า β -CD แสดงว่า α -CD และ DM - β -CD เป็น CD ที่เหมาะสมสำหรับการแยก C^-/M^- และ DC^-/DM^- ที่ดีกว่า และค่า κ ที่ได้มีค่าอยู่ในช่วงกว้าง ตั้งแต่ 1.0 ถึง 21.2 แสดงให้เห็นว่าตำแหน่งของหมู่แทนที่บนวงเบนซีนมีผลต่อการเกิด complex ระหว่างสารกับ CD

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ CD ส่งผลให้ค่า α_{CD} เพิ่มขึ้นจนถึงจุดสูงสุดจากนั้นค่อยๆ ลดลง ซึ่ง α_{CD} ที่ได้จากการทดลองที่มีค่าสูงที่สุดที่ความเข้มข้น CD ต่างๆ สำหรับการแยกแต่ละคู่สารของ C^-/M^- และ DC^-/DM^- แสดงดังตารางที่ 7.2 จากแบบจำลองของ α_{CD} ในบทที่ 6 เมื่อเปรียบเทียบกับ CZE การเพิ่มขึ้นของ α_{CD} สำหรับ C^-/M^- หรือ DC^-/DM^- แต่ละคู่จัดอยู่ในแบบจำลองแบบที่ III ($\kappa \geq 1 > \alpha_{CZE}$) ยกเว้นคู่ของ $2C^-/2M^-$ กับ α -CD ที่จัดอยู่ในแบบจำลองแบบที่ I ($\kappa > \alpha_{CZE} \geq 1$) เมื่อเปรียบเทียบกับ CZE การแยกสารใน CD-EKC ให้การแยกที่ดีกว่าสำหรับคู่ของ $2C^-/2M^-$ กับ α -CD ที่จัดอยู่ในแบบจำลองแบบที่ I และคู่ C^-/M^- หรือ DC^-/DM^- คู่อื่นๆ ที่จัดอยู่ในแบบจำลองแบบที่ III โดยที่แบบจำลองแบบที่ III สามารถปรับปรุงการแยกได้ถึงความเข้มข้นของ CD มากๆ และ κ มีค่ามากกว่า α_{CZE} และสำหรับคู่ที่เหลืออีก 4 คู่ ได้แก่ $2C^-/2M^-$ กับ DM - β -CD และ $2,6DC^-/2,6DM^-$ กับ α -CD, β -CD หรือ DM - β -CD ให้การแยกสารใน CD-EKC แย่กว่าใน CZE เนื่องจากมีอัตราส่วนของ κ/α_{CZE} น้อย

จากผลการทดลองที่ได้ ส่วนใหญ่แล้ว CD-EKC ให้ค่าการแยกสำหรับ C^-/M^- และ DC^-/DM^- ที่ดีกว่า CZE และ MEKC ($\alpha_{CD} > \alpha_{MEKC} > \alpha_{CZE}$) เมื่อใช้ α -CD 2-60 mM, β -CD 2-16 mM และ DM- β -CD 2-50 mM สามารถแยกคู่ C^-/M^- และ DC^-/DM^- ได้สมบูรณ์ยกเว้น $2C^-/2M^-$ และ $2,6DC^-/2,6DM^-$ ใน β -CD หรือ DM- β -CD โดยมี R_s ของ C^-/M^- ในช่วง 1.51 ถึง 15.8 และ DC^-/DM^- ในช่วง 1.66 ถึง 28.5

ตารางที่ 7.2 Mobilities (μ), binding constants (K), binding selectivities (κ), mobility selectivities ที่มากที่สุด ($\alpha_{\text{CD, max}}$) สำหรับ C^-/M^- , DC^-/DM^- , 2,4-DB/MCPB และ 2,4-D/MCPA ใน CD-EKC

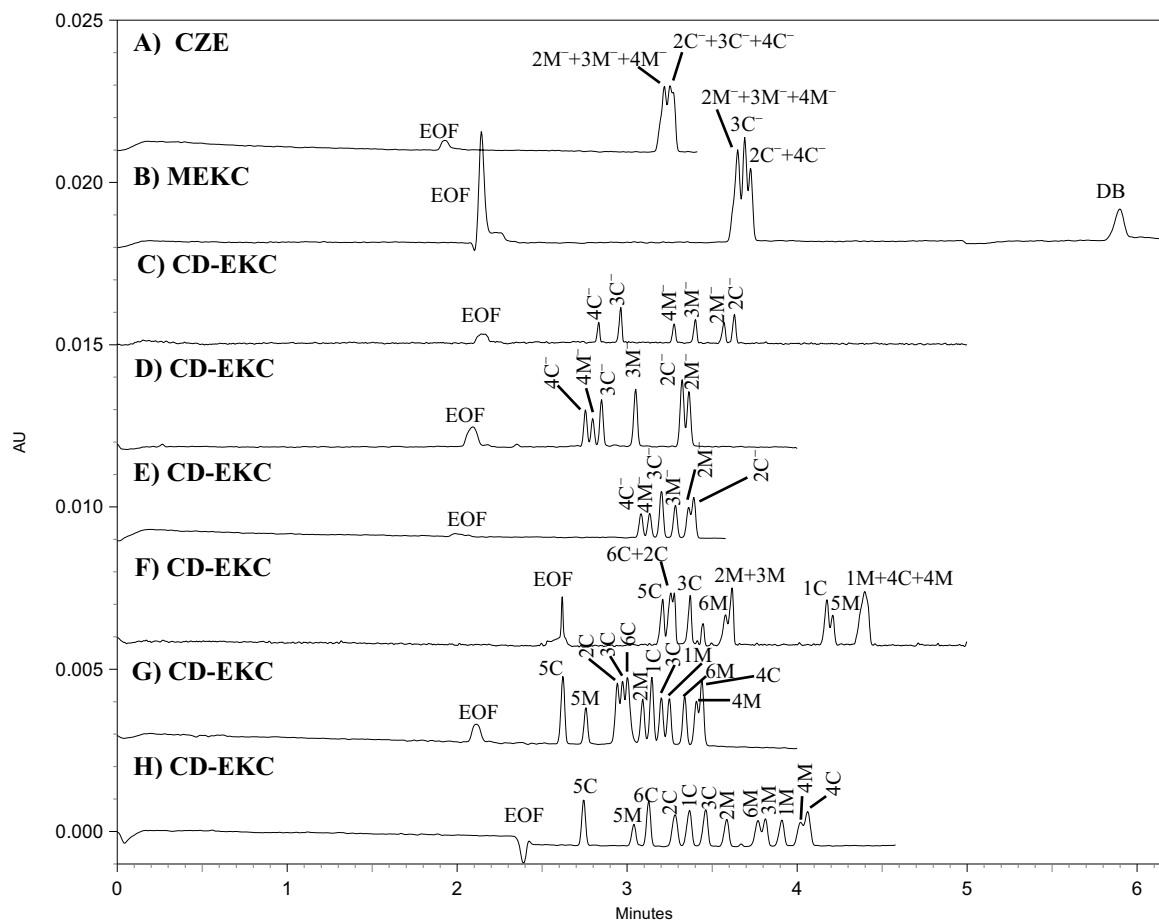
สาร	α -CD (0 ถึง 60 mM)			β -CD (0 ถึง 16 mM)			DM- β -CD (0 ถึง 50 mM)		
	K (M^{-1})	κ	$\alpha_{\text{CD, max}}$ ([CD] ^a)	K (M^{-1})	κ	$\alpha_{\text{CD, max}}$ ([CD] ^a)	K (M^{-1})	κ	$\alpha_{\text{CD, max}}$ ([CD] ^a)
2C ⁻ /2M ⁻	2.7±0.5 / 2.9±0.5	1.07	1.036 (60)	6.5±0.5 / 4.8±0.3	1.35	1.021 (16)	< 1.0 / < 1.0	~1.0	1.018 (0)
3C ⁻ /3M ⁻	80.7±2.0 / 22.3±0.6	3.62	1.408 (50)	70.8±0.4 / 29.7±0.2	2.38	1.183 (16)	30.7±0.8 / 8.4±0.2	3.65	1.404 (50)
4C ⁻ /4M ⁻	129.0±3.0 / 27.5±0.6	4.69	1.444 (30)	104.7±0.6 / 84.8±0.3	1.23	1.048 (14)	45.4±1.1 / 29.5±0.5	1.54	1.264 (40)
2,3DC ⁻ /2,3DM ⁻	3.5±0.9 / 2.0±0.8	1.75	1.074 (60)	52.9±0.5 / 45.0±0.9	1.18	1.081 (16)	15.2±0.4 / 8.2±0.5	1.85	1.417 (50)
2,4DC ⁻ /2,4DM ⁻	204.5±3.8 / 35.1±0.8	5.83	1.452 (20)	79.7±0.8 / 50.0±0.6	1.59	1.141 (16)	22.7±0.5 / 15.7±0.5	1.45	1.260 (50)
2,5DC ⁻ /2,5DM ⁻	97.3±2.9 / 37.2±1.1	2.62	1.247 (30)	80.5±0.6 / 43.3±0.7	1.86	1.206 (16)	21.0±0.6 / 2.2±0.3	9.55	1.241 (50)
2,6DC ⁻ /2,6DM ⁻	1.2±0.2 / 1.1±0.4	1.09	1.031 (0)	4.5±0.5 / 4.3±0.7	1.05	1.031 (0)	< 1.0 / < 1.0	~1.0	1.031 (0)
3,4DC ⁻ /3,4DM ⁻	14.5±2.8 / 2.1±0.5	6.90	2.025 (60)	404.1±3.1 / 167.6±1.2	2.41	1.217 (6)	203.6±3.5 / 68.5±1.2	2.97	1.679 (50)
3,5DC ⁻ /3,5DM ⁻	191.9±5.8 / 38.8±1.3	4.95	1.444 (20)	66.5±0.1 / 6.2±1.4	10.7	1.298 (16)	40.3±0.9 / 1.9±0.3	21.2	1.627 (50)
2,4-DB/MCPB	381.5±12.0 / 235.9±4.9	1.61	1.157 (6)	434.8±9.8 / 460.4±7.1	1.06	1.027 (10)	211.8±4.2 / 275.4±6.6	1.30	1.077 (6)
2,4-D/MCPA	274.3±7.8 / 197.3±6.0	1.39	1.072 (6)	108.2±1.6 / 110.6±1.3	1.02	1.037 (10)	41.9±1.1 / 59.1±1.1	1.41	1.178 (50)

^a ความเข้มข้นของ CD ที่ให้ค่า $\alpha_{\text{CD, max}}$ แสดงในวงเล็บ

7.3.4 การแยก C^-/M^- และ DC^-/DM^- ทุกไอโซเมอร์ในคราวเดียวกัน

รูปที่ 7.3 แสดงการแยก C^-/M^- และ DC^-/DM^- ทุกไอโซเมอร์ในคราวเดียวกันด้วย CZE, MEKC และ CD-EKC สำหรับการแยกสารใน CZE ด้วย 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ (**รูปที่ 7.3A**) พบว่า C^-/M^- ทั้ง 3 ไอโซเมอร์ขึ้นพีคทับกัน เนื่องจาก μ ที่ใกล้เคียงกันของสารแต่ละไอโซเมอร์ และเมื่อพิจารณาการแยกสารใน MEKC ด้วย 40 mM SDS (**รูปที่ 7.3B**) พบว่าการแยกของ C^-/M^- ทั้ง 3 ไอโซเมอร์ดีขึ้นเล็กน้อยทั้งนี้เนื่องจากผลของ α_k ที่มากกว่า α_{CZE} และเมื่อแยกสารด้วย CD-EKC (**รูปที่ 7.3C-E**) พบว่าลำดับการออกของ C^- และ M^- สลับกับใน CZE และ MEKC ดังที่แสดงในอิเล็กโตรโฟโกราฟีที่ใช้ α -CD 20 mM (**รูปที่ 7.3C**), β -CD 16 mM (**รูปที่ 7.3D**) และ DM- β -CD 5 mM (**รูปที่ 7.3E**) ยกเว้น $2C^-/2M^-$ ใน α -CD 20 mM และ DM- β -CD 5 mM ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากการเกิด binding ของ C^- กับ CD เกิดได้มากกว่า M^- กับ CD ส่งผลให้ $|\mu|$ ของสารและ complex ของสารกับ CD ลดลง เมื่อเปรียบเทียบการแยกสารใน CD-EKC กับ CZE และ MEKC พบว่า CD-EKC ให้การแยก C^-/M^- ทุกไอโซเมอร์พร้อมกันได้ดีกว่าเนื่องจาก α_{CD} มีค่ามากกว่า โดยเมื่อใช้ α -CD 15-60 mM ตัวอย่างเช่น α -CD 20 mM (**รูปที่ 7.3C**) สามารถแยก C^-/M^- ทุกไอโซเมอร์พร้อมกันได้สมบูรณ์

CD-EKC ให้การแยก DC^-/DM^- (**รูปที่ 7.3F-H**) ทุกไอโซเมอร์พร้อมกันได้ดีกว่า CZE และ MEKC เช่นเดียวกับ C^-/M^- โดยเมื่อใช้ DM- β -CD 40 mM (**รูปที่ 7.3H**) สามารถแยก DC^-/DM^- ทุกไอโซเมอร์พร้อมกันได้สมบูรณ์ยกเว้น $2,3DC^-/2,5DM^-$ และ $2,6DC^-/2,6DM^-$ โดยอาจปรับปรุงการแยก DC^-/DM^- ทุกไอโซเมอร์ในคราวเดียวกันได้ด้วยการเติมตัวทำลายอินทรีย์, เปลี่ยนชนิดและความเข้มข้นของ CD หรือใช้ CD พร้อมกัน

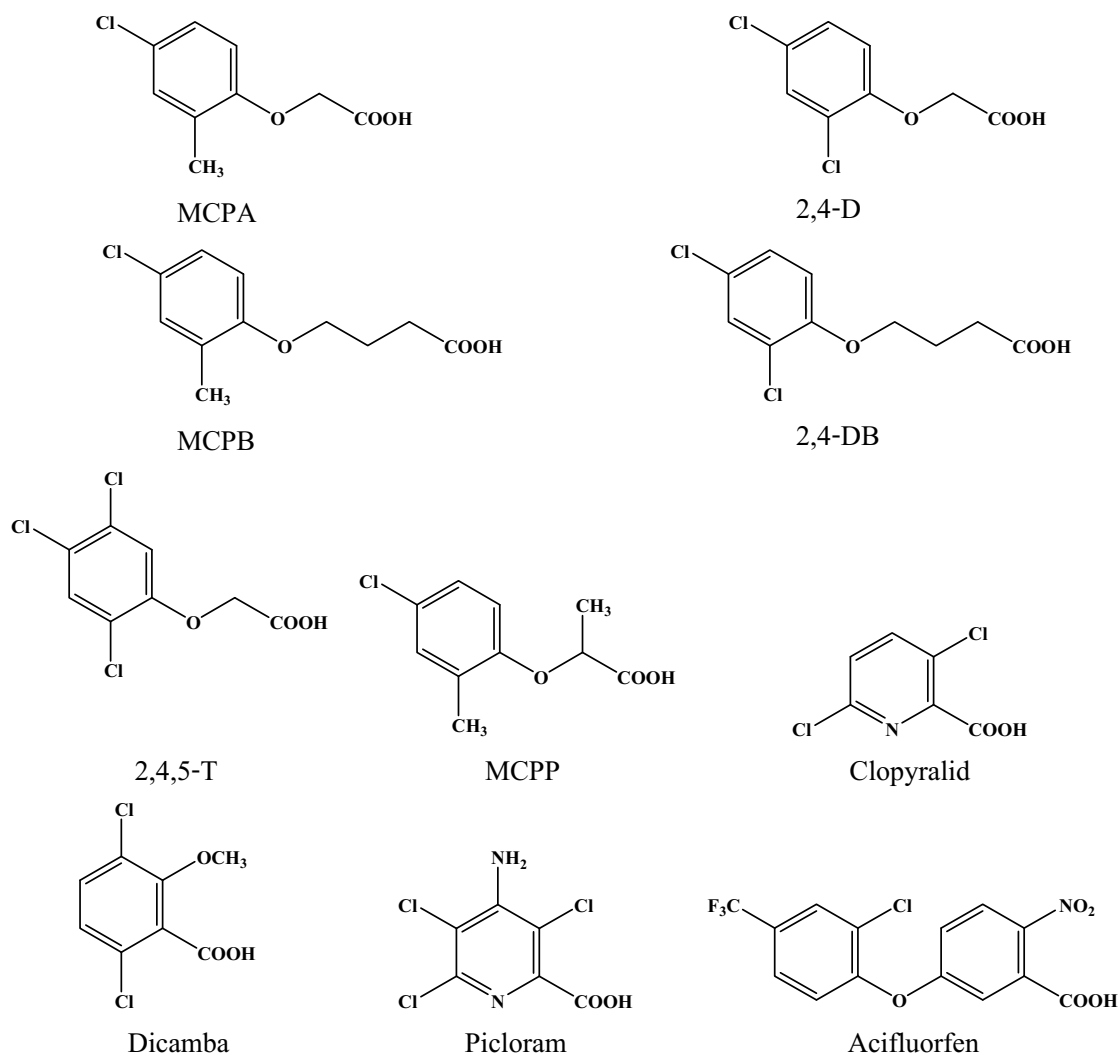


รูปที่ 7.3 การแยก C^- และ M^- ทุกไอโซเมอร์พร้อมกันด้วยเทคนิค CE แบบต่างๆ: (A) CZE ประกอบด้วย 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2, (B) MEKC ประกอบด้วย 40 mM SDS และ 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2, (C) CD-EKC ประกอบด้วย 20 mM α -CD และ 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2, (D) CD-EKC ประกอบด้วย 16 mM β -CD และ 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2, และ (E) CD-EKC ประกอบด้วย 5 mM DM- β -CD และ 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2 สำหรับ C^-/M^- ; (F) CD-EKC ประกอบด้วย 60 mM α -CD และ 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2, (G) CD-EKC ประกอบด้วย 12 mM β -CD และ 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2, และ (H) CD-EKC ประกอบด้วย 40 mM DM- β -CD และ 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2 สำหรับ DC^-/DM^- [2,3 DC^- (1C), 2,4 DC^- (2C), 2,5 DC^- (3C), 2,6 DC^- (4C), 3,4 DC^- (5C), 3,5 DC^- (6C), 2,3 DM^- (1M), 2,4 DM^- (2M), 2,5 DM^- (3M), 2,6 DM^- (4M), 3,4 DM^- (5M), 3,5 DM^- (6M)] ภาวะอื่นๆ แสดงหัวข้อที่ 7.2.3

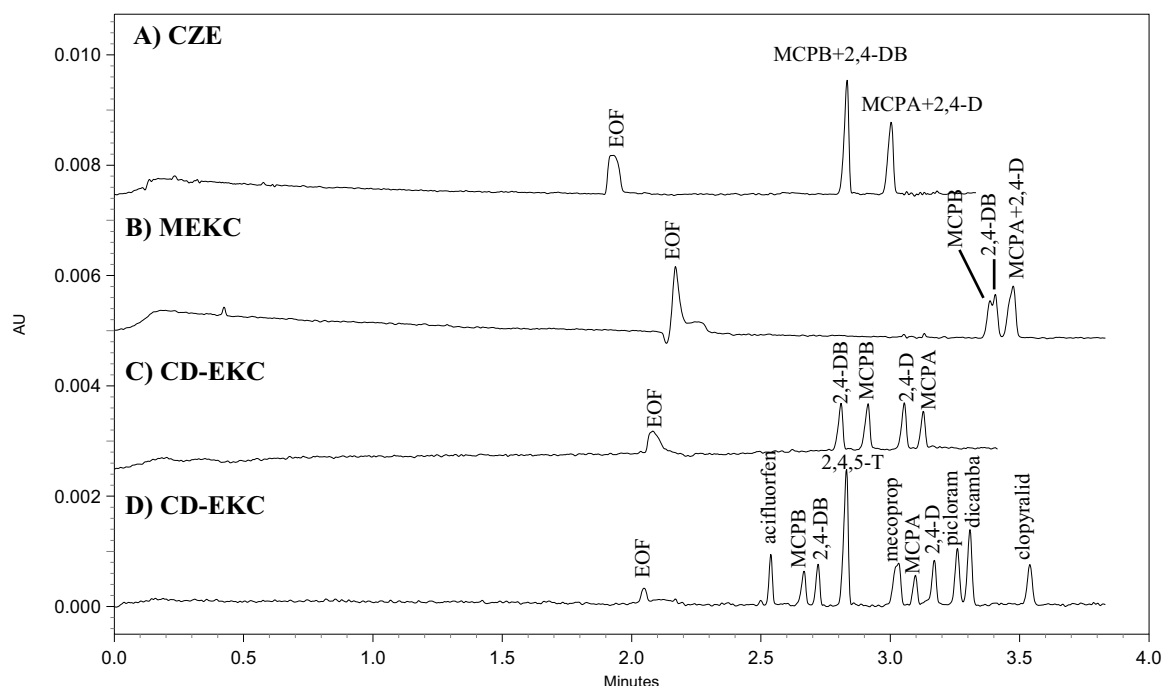
7.3.5 การประยุกต์สำหรับการแยก phenoxy acid herbicides

ได้ประยุกต์ใช้เทคนิค CE แบบต่างๆ สำหรับการแยกสารกลุ่ม phenoxy acid herbicides ซึ่งสูตรโครงสร้างสารแสดงดังรูปที่ 7.4 จากสูตรโครงสร้างจะเห็นว่า โมเลกุลของ 2,4-DB และ MCPB แตกต่างกันเพียงตำแหน่งเดียวที่เป็นหมู่คลอโรกับหมู่เมทิลบนวงแอโรแมติก เช่นเดียวกับ 2,4-D และ MCPA ในตอนเริ่มต้นจึงสนใจศึกษาสารทั้งสองคู่นี้ก่อน

รูปที่ 7.5 แสดงการแยกสารกลุ่ม phenoxy acids ด้วยเทคนิค CE ต่างๆ ได้แก่ CZE, MEKC และ CD-EKC พบว่าพีคของ 2,4-DB/MCPB และ 2,4-D/MCPA ซ้อนทับกันเมื่อวิเคราะห์ด้วย CZE ใน BGE ที่ประกอบด้วย 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ที่ pH 9.2 (รูปที่ 7.5A) เนื่องจากสารดังกล่าวมีค่า μ ใกล้เคียงกันมาก และการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ลงไปใน BGE ส่งผลต่อ α_{CZE} เพียงเล็กน้อย จากนั้นเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วย MEKC ที่ประกอบด้วย 40 mM SDS และ 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ที่ pH 9.2 (รูปที่ 7.5B) พบว่า พีคของสารยังคงซ้อนทับกันอยู่ เมื่อเติมตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งที่เป็น MeOH หรือ ACN จนถึง 20% v/v ลงในบัฟเฟอร์ของ CZE และ MEKC ก็ไม่สามารถแยกสารได้สมบูรณ์ เมื่อแยกสารด้วยเทคนิค CD-EKC โดยใช้ CD ที่มีชนิดและความเข้มข้นต่างๆ ได้ K , κ และ α_{CD} ที่มากที่สุดที่ความเข้มข้น CD ใดๆ ของ 2,4-DB/MCPB และ 2,4-D/MCPA ดังตารางที่ 7.2 เมื่อใช้ β -CD พบว่าไม่สามารถแยก 2,4-DB/MCPB และ 2,4-D/MCPA ออกจากกันได้ เนื่องจาก κ ของสารกับ β -CD มีค่าน้อย แต่เมื่อเปลี่ยนไปใช้ α -CD และ DM- β -CD ได้ κ ของสารกับ CD มากส่งผลให้ α_{CD} มาก รูปที่ 7.4 แสดงตัวอย่างของอิเล็กโตรฟีโรแกรมการแยก 2,4-DB/MCPB และ 2,4-D/MCPA ที่ใช้ α -CD 2 mM (รูปที่ 7.4C) หรือ DM- β -CD 3 mM (รูปที่ 7.4D) โดยสารแยกออกจากได้สมบูรณ์เมื่อใช้ α -CD 2 ถึง 30 mM สำหรับ 2,4-DB/MCPB และ 2 ถึง 15 mM สำหรับ 2,4-D/MCPA หรือ DM- β -CD 2 ถึง 8 mM สำหรับ 2,4-DB/MCPB และ 2 ถึง 50 mM สำหรับ 2,4-D/MCPA นอกจากนี้เมื่อใช้ BGE ประกอบด้วย 2 ถึง 8 mM DM- β -CD และ 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ สำหรับการแยก 2,4-DB/MCPB และ 2,4-D/MCPA และ phenoxy acids อื่นๆ อีก 6 ชนิด พร้อมกัน พบว่าสามารถแยกพีคสารออกจากกันได้สมบูรณ์ ผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 7.5D



รูปที่ 7.4 สูตร โครงสร้างของสารกลุ่ม phenoxy acid herbicides



รูปที่ 7.5 การแยก phenoxy acid herbicides ด้วยเทคนิค CE แบบต่างๆ (A) CZE ประกอบด้วย 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2, (B) MEKC ประกอบด้วย 40 mM SDS และ 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2, (C) CD-EKC ประกอบด้วย 2 mM α -CD และ 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2 (D) CD-EKC ประกอบด้วย 3 mM DM- β -CD และ 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2 ภาวะอื่นๆ ดังหัวข้อที่ 7.2.3

7.4 สรุปผลการทดลอง

ได้ศึกษาค่าจำเพาะการแยกสารใน CE ทั้ง 3 ประเภท ได้แก่ CZE, MEKC และ CD-EKC สำหรับแยกสารที่มีค่า μ ใกล้เคียงกัน เช่น C^-/M^- และ DC^-/DM^- พบว่า α_{CZE} มีค่าน้อย ในขณะที่ α_{MEKC} มีค่าสูงกว่า α_{CZE} เล็กน้อย เนื่องจากมีความแตกต่างของ partitioning ของสารเข้าไปในไมเซลล์น้อยเมื่อเทียบกับ α_{CZE} และเมื่อเติมตัวทำละลายอินทรีย์ลงไปบัฟเฟอร์ของ CZE และ MEKC พบว่า α_{CZE} และ α_{MEKC} ลดลงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับ CZE และ MEKC พบว่า CD-EKC ให้ α_{CD} มากกว่า α_{CZE} และ α_{MEKC} เนื่องจากความแตกต่างของ binding constant มีค่ามากเมื่อเทียบกับ α_{CZE} และเมื่อทำการแยก C^-/M^- หรือ DC^-/DM^- ทุกไอโซเมอร์พร้อมกัน CD-EKC ให้การแยกสารที่ดีที่สุดเช่นเดียวกันเมื่อเทียบกับอีก 2 เทคนิค นอกจากนี้ได้แยกสารในกลุ่มกรดฟีนอกซี พบว่า สารแยกออกจากกันได้สมบูรณ์เมื่อใช้ CD-EKC ที่เติม α -CD หรือ DM- β -CD ในขณะที่ไม่สามารถแยกได้ใน CZE และ MEKC ดังนั้น CD-EKC สามารถใช้เป็นทางเลือกที่ดีกว่าสำหรับการแยกสารที่มีหมู่แทนที่ที่แตกต่างกันเพียงหมู่คลอโรหรือหมู่เมทิล เมื่อเทียบกับ CZE และ MEKC

เอกสารอ้างอิง

- Benz, N. J., and Fritz, J. S., "Optimization of Separations of Alkyl-Substituted Phenolate Anions by Capillary Zone Electrophoresis" *Journal of High Resolution Chromatography* **18** (1995) 175-178.
- Farran, A., Serra, C., Sepaniak, M. J., "Three Different Approaches for the Separation of MCPA and 2,4-D by Capillary Electrophoresis" *Journal of Chromatography A* **835** (1999) 209-215.
- Fujiwara, S., and Honda, S., "Effect of Addition of Organic Solvent on the Separation of Positional Isomers in High-Voltage Capillary Zone Electrophoresis" *Analytical Chemistry* **59** (1987) 487-490.
- Wren, S. A. C., "Optimization of pH in the Electrophoretic Separation of 2-, 3- and 4-Methylpyridines" *Journal of Microcolumn Separations* **3** (1991) 147-154.
- Isemura, T., Kitagawa, F., and Otsuka, K., "Separation of Complex Mixtures of Fluorobenzoic Acids by Capillary Electrophoresis" *Journal of Separation Science* **32** (2009) 381-387.
- Lee, Y. J., Price, W. E., and Sheil, M. M., "Effect of Organic Solvents on the Separation of Benzoic Acids by Capillary Electrophoresis" *Analyst* **120** (1995)
- Li, D., and Lucy, C. A., "Prediction of Electrophoretic Mobilities. 4. Multiply Charged Aromatic Carboxylates in Capillary Zone Electrophoresis" *Analytical Chemistry* **73** (2001) 1324-1329.
- Sarmini, K., and Kenndler, E., "Capillary Zone Electrophoresis in Mixed Aqueous-Organic Media: Effect of Organic Solvents on Actual Ionic Mobilities, Acidity Constants and Separation Selectivity of Substituted Aromatic Acids. IV. Acetonitrile" *Journal of Chromatography* **833** (1999) 245-259.
- Sarmini, K., and Kenndler, E., "Capillary Zone Electrophoresis in Mixed Aqueous-Organic Media: Effect of Organic Solvents on Actual Ionic Mobilities, Acidity Constants and Separation Selectivity of Substituted Aromatic Acids. I. Methanol" *Journal of Chromatography* **806** (1998) 325-335.
- Sarmini, K., and Kenndler, E., "Influence of Organic Solvents on the Separation Selectivity in Capillary Electrophoresis" *Journal of Chromatography A* **792** (1997) 3-11.
- Terabe, S., Yashima, T., Tanaka, N., and Araki, M., "Separation of Oxygen Isotopic Benzoic Acids by Capillary Zone Electrophoresis Based on Isotope Effects on the Dissociation of the Carboxyl Group" *Analytical Chemistry* **60** (1988) 1673-1677.
- Yu, L., Qin, W., and Li, S. F. Y., "Ionic Liquids as Additives for Separation of Benzoic Acid and Chlorophenoxy Acid Herbicides by Capillary Electrophoresis" *Analytica Chimica Acta* **547** (2005) 165-171.

บทที่ 8

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

8.1 การเตรียมและทดสอบประสิทธิภาพของกะปิลาริคอลัมน์ประเภทซิลิกามอนอลิตและหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับแยกสารกลุ่มฟีนอกซีแอซิด และบิสฟีนอลเอไดโกลซิลิลอีเทอร์ บิสฟีนอลเอฟไดโกลซิลิลอีเทอร์ และอนุพันธ์

ได้เตรียมกะปิลาริคอลัมน์ประเภทซิลิกามอนอลิตที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 และ 200 μm โดยให้เกิดปฏิกิริยาผ่านกระบวนการ sol-gel และนำไปทดสอบประสิทธิภาพคอลัมน์โดยใช้สารทดสอบเป็นยูราซิลและเฟสเคลื่อนที่เป็น 80% เมทานอล เฉพาะคอลัมน์ที่มีความสูงของเพลตน้อยกว่า 8 μm หรือจำนวนเพลตมากกว่า 1.25×10^5 เพลต/เมตร แสดงว่ามีประสิทธิภาพสูง แล้วจึงนำไปปรับปรุงพื้นผิวซิลิกามอนอลิตให้มีเฟสคงที่เป็น octadecyl (ODS) และ poly(octadecyl methacrylate) (ODM) และนำไปทดสอบประสิทธิภาพคอลัมน์โดยใช้สารทดสอบเป็นยูราซิลและอัลคิลเบนซีนที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 1-6 (C1-C6) และเฟสเคลื่อนที่เป็น 80% เมทานอลและ 80% อะซิโตนไนโตรส จากผลการทดลองพบว่า เมื่อเปรียบเทียบ ODS และ ODM พบว่า ODM มีความไฮโดรโฟบิกมากกว่าเนื่องจากมีความหนาแน่นของสาย C18 มากกว่า

เมื่อนำคอลัมน์ ODS และ ODM ที่เตรียมได้มาใช้สำหรับแยกสารกลุ่มฟีนอกซีแอซิด และบิสฟีนอลเอไดโกลซิลิลอีเทอร์ บิสฟีนอลเอฟไดโกลซิลิลอีเทอร์ และอนุพันธ์ เปรียบเทียบกับการแยกด้วย conventional HPLC พบว่า สามารถแยกสารกลุ่มฟีนอกซีแอซิดได้ทั้งใน conventional HPLC และ μHPLC ที่เป็นคอลัมน์ ODS โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายกรด:ตัวทำละลายอินทรีย์ (เมทานอลหรืออะซิโตนไนโตรส) ด้วย gradient elution และสามารถแยกสารกลุ่มบิสฟีนอลเอไดโกลซิลิลอีเทอร์ บิสฟีนอลเอฟไดโกลซิลิลอีเทอร์ และอนุพันธ์ได้ทั้งใน conventional HPLC และ μHPLC ที่เป็นคอลัมน์ ODS เช่นเดียวกัน โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นน้ำ:เมทานอลด้วย gradient elution ในขณะที่ไม่สามารถแยกสารทั้งกลุ่มฟีนอกซีแอซิด และบิสฟีนอลเอไดโกลซิลิลอีเทอร์ บิสฟีนอลเอฟไดโกลซิลิลอีเทอร์ และอนุพันธ์ได้สมบูรณ์ด้วย μHPLC ที่เป็นคอลัมน์ ODM เนื่องจากพีกที่ได้มีลักษณะ tailing จึงอาจเกิดอันตรกิริยากับหมู่ซิลานอลที่เหลืออยู่บนเฟสคงที่ได้

8.2 การเปรียบเทียบค่าจำเพาะการแยกสารของกะปิลาริคอลัมน์ประเภทมอนอลิตที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยพอลิออกตะเดซิลเมทาคริเลตและหมู่ออกตะเดซิลสำหรับการแยกสารประกอบกลุ่มแอโรเจนในลิควิดโครมาโทกราฟีแบบรีเวิร์สเฟส

ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบ selectivity (อัตราส่วนของ retention factor ของสารสองชนิด) ของกะปิลาริคอลัมน์ประเภทมอนอลิตซิลิกาที่ปรับปรุงผิวด้วย poly(octadecyl methacrylate)

(ODM) และหมู่แทนที่ octadecyl (ODS) สำหรับสารทดสอบที่เป็น mono- และ dihalogenated benzenes ในรีเวอร์สเฟสคลิดโครมาโทกราฟี จากผลการทดลองพบว่าสารทดสอบรีเทน บนคอลัมน์ ODM ได้ดีกว่า ODS ในเฟสเคลื่อนที่ทั้งที่เป็น น้ำ:อะซิโตนไทรล์ และน้ำ:เมทานอล เมื่อใช้ alkylbenzenes เป็นสารอ้างอิง อัตราส่วน selectivity ของ halogenated benzenes เทียบกับ toluene บนคอลัมน์ ODM:ODS มากกว่า 1 แสดงว่าคอลัมน์ ODM มีค่า selectivity มากกว่า ODS ทั้งนี้เนื่องมาจากคอลัมน์ ODM มีความหนาแน่นของสาย C18 มากกว่า ทำให้ dispersion interaction ของคอลัมน์ ODM กับสารกลุ่มฮาโลเจนมีมากกว่า นอกจากนี้สารยังสามารถเกิดอันตรกิริยากับหมู่คาร์บอนิลบนสายโซ่ของพอลิเมอร์ของคอลัมน์ ODM ได้อีกด้วย และเมื่อใช้สารทดสอบเป็นกลุ่ม dihalogenated benzenes ก็ให้ผลไปในทิศทางเดียวกันกับ monosubstituted benzenes นอกจากนี้สารที่เป็นไอโซเมอร์กันเกิดการแยกบนคอลัมน์ ODM ได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับคอลัมน์ ODS จากนั้นเมื่อใช้สารทดสอบเป็นสารกลุ่ม chlorophenols ทั้งหมด 17 ตัว มีทั้ง mono และ polychlorophenols ซึ่งเป็นสารประกอบที่มี homologue และไอโซเมอร์หลากหลาย มาทำการแยกบนคอลัมน์ ODM และ ODS ก็ให้ผลการทดลองสอดคล้องกับสารทดสอบกลุ่มอื่นๆ โดยสารกลุ่ม chlorophenols เกิดการแยกบนคอลัมน์ ODM ได้ดีกว่า ด้วยเหตุผลเช่นเดียวกัน

ดังนั้นคอลัมน์ ODM จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการแยกสารประกอบกลุ่มฮาโลเจน นอกเหนือจากการใช้คอลัมน์ ODS ที่นิยมใช้กันอยู่ทั่วไปได้

8.3 การเปรียบเทียบและการทำนายรีเทนชันของสารประกอบแอโรแมติกที่มีหมู่แทนที่สองหมู่ในอะทาลิติกเฟสโครมาโทกราฟี

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการรีเทนชันของอนุพันธ์เบนซีนที่มีหมู่แทนที่สองหมู่ (ที่เหมือนกันและแตกต่างกันที่เป็น $-\text{CH}_3$, $-\text{F}$, $-\text{Cl}$, $-\text{Br}$, $-\text{OCH}_3$ และ $-\text{CHO}$) ในเทคนิคไมเซลล์รีเอ็กโครมาโทกราฟี (MEKC) และไมโครอิมัลชันรีเอ็กโครมาโทกราฟี (MEEKC) โดยที่เฟสคงที่เทียม (pseudo-stationary phase) ของ MEKC เป็นไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิว ส่วนของ MEEKC เป็นหยดน้ำมัน (เอธิลแอซิเตด) ที่ล้อมรอบด้วยสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม (ใช้ 1-บิวทานอล) จากผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวเท่ากัน ค่ารีเทนชันทั้ง $\log k$ (k คือรีเทนชันแฟกเตอร์) และ I (รีเทนชันอินเดกซ์) ของสารที่ได้จากทั้งสองเทคนิคมีค่าสอดคล้องกันสำหรับหมู่แทนที่ทั้งสองหมู่อยู่ในกลุ่มแรกที่เป็น $-\text{CH}_3$, $-\text{F}$, $-\text{Cl}$ และ $-\text{Br}$ ค่ารีเทนชันจาก MEEKC น้อยกว่า MEKC มากสำหรับหมู่แทนที่ทั้งสองหมู่อยู่ในกลุ่มที่สองที่เป็น $-\text{CHO}$ และ $-\text{OCH}_3$ และค่ารีเทนชันใน MEEKC น้อยกว่า MEKC เล็กน้อยเมื่อหมู่แทนที่หนึ่งอยู่ในกลุ่มที่สองและอีกหมู่หนึ่งอยู่ในกลุ่มแรก จากผลการทดลองสามารถอธิบายได้ว่าอันตรกิริยาของสารในกลุ่มแรกกับเฟสเทียมเกี่ยวข้องกับไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interaction) เป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นจึงไม่มีความแตกต่างของ partitioning หรือรีเทนชันของสารเข้าไปในเฟสเทียม ในขณะที่หมู่แทนที่

กลุ่มที่สองมีขั้วมากกว่าหมู่แรก จึงเป็นไปได้ว่าผลของ polarity-polarization ของสารกลุ่มนี้กับ 1-บิวทานอล ที่ผิวหยดนํ้ามัน ทำให้ลดรีเทนชันของสารเข้าไปในเฟสเทียมของ MEEKC และเมื่อคำนวณค่า $\log K_{ow}$ (K_{ow} คือ octanol-water coefficient) โดยใช้แอลคิลเบนซีนเป็นสารอ้างอิง พบว่าค่า $\log K_{ow}$ ที่ได้จากสารกลุ่มแรกสอดคล้องกับค่าอ้างอิง และสารกลุ่มที่สองได้ค่า $\log K_{ow}$ ต่ำกว่าค่าอ้างอิง นอกจากนี้ได้ทำนายค่ารีเทนชันของอนุพันธ์เบนซีนที่มีหมู่แทนที่ต่างกันจากอนุพันธ์เบนซีนที่มีหมู่แทนที่เหมือนกันโดยใช้หลักการเติม (additive approach) พบว่าค่าที่ได้จากการทำนายสอดคล้องกับค่าจากการทดลองสำหรับสารในกลุ่มแรกหรือหมู่แทนที่หนึ่งอยู่ในกลุ่มแรก และแตกต่างกันสำหรับสารในกลุ่มที่สอง แสดงว่าผลของ electronic effects มีผลทำให้ค่ารีเทนชันแตกต่างไปจากการทำนาย

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงแสดงให้เห็นว่าหมู่แทนที่มีผลต่อความแตกต่างของรีเทนชันของสารใน MEKC และ MEEKC และค่าที่ได้จากการทดลองและการทำนาย

8.4 แบบจำลองทางทฤษฎีของค่าจำเพาะการแยกสารที่มีประจุในเทคนิคไมเซลล์าร์อิเล็กโตรโครมาโทกราฟี

ไมเซลล์าร์อิเล็กโตรโครมาโทกราฟี (MEKC) เป็นเทคนิคเคพิลลารีอิเล็กโตรโฟรีซิสที่บัฟเฟอร์ประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิวทำหน้าที่เป็นเฟสคงที่เทียม (pseudo-stationary phase) เหมาะสำหรับการแยกสารที่ไม่มีประจุและมีประจุ แต่ทฤษฎีการแยกของสารใน MEKC ส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับสารที่ไม่มีประจุ ซึ่งขึ้นอยู่กับ retention selectivity เท่านั้น (α_k คือ อัตราส่วน retention factor (k) ของสารในไมเซลล์, $k_2/k_1 \geq 1$ เสมอ) ในงานวิจัยนี้ได้คิดค้นสมการและแบบจำลองทางทฤษฎีเพื่ออธิบายค่าจำเพาะของการแยกสาร (α_{MEKC} , อัตราส่วนของ effective electrophoretic mobility) ของสารที่มีประจุใน MEKC โดย α_{MEKC} ขึ้นอยู่กับทั้ง α_k และ α_{CZE} โดยที่ α_{CZE} เป็นอัตราส่วนของ electrophoretic mobility ในภาวะไม่มีไมเซลล์หรือเป็นภาวะของ capillary zone electrophoresis (CZE), $\mu_{0,2}/\mu_{0,1}$ อาจมากกว่าหรือน้อยกว่า 1)

แบบจำลองของ α_{MEKC} แบ่งได้เป็น 4 แบบ ตามลำดับของ $|\mu|$ ของสารใน CZE กับค่า k ใน MEKC และค่า p ซึ่งเป็นอัตราส่วน α_k/α_{CZE}

แบบที่ 1: $|\mu|$ ของสารใน CZE กับค่า k ใน MEKC มีลำดับเหมือนกันและ $p > 1$ หากเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง α_{MEKC} (แกน y) กับ k (แกน x) ที่ค่า α_k ต่างๆกัน จะพบว่า α_{MEKC} จะเพิ่มขึ้นตามค่า k จนถึงถึงค่าสูงสุดจากนั้นจะลดลงเรื่อยๆที่ค่า k มากๆ (เช่น $k > 5$) และถ้า α_k มาก α_{MEKC} จะมากด้วย ซึ่งสามารถตีความได้ว่าการแยกสารที่มีประจุด้วย MEKC จะดีขึ้น (เปรียบเทียบกับไม่มีไมเซลล์หรือภาวะ CZE) ก็ต่อเมื่อแบบจำลองของ α_{MEKC} เป็นแบบที่ 1

แบบที่ 2: $|\mu|$ ของสารใน CZE กับค่า k ใน MEKC มีลำดับเหมือนกันและ $p \leq 1$ พบว่า α_{MEKC} จะลดลงขึ้นตามค่า k ที่เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ที่ค่า α_k ใดๆ ซึ่งสามารถตีความได้ว่า MEKC ไม่ช่วย

ปรับปรุงการแยกสารที่มีประจุ (เปรียบเทียบกับไม่มีไมเซลล์หรือภาวะ CZE) ก็ต่อเมื่อแบบจำลองของ α_{MEKC} เป็นแบบที่ 2

แบบที่ 3: $|\mu|$ ของสารใน CZE กับค่า k ใน MEKC มีลำดับตรงข้ามกันและ $p > 1$ หากเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง α_{MEKC} (แกน y) กับ k (แกน x) ที่ค่า α_k ต่างๆกัน จะพบว่าถ้าค่า α_k มากกว่า 1 ถึง $1/\alpha_{\text{CZE}}$ ค่า α_{MEKC} จากเดิมที่น้อยกว่า 1 จะเพิ่มขึ้นเข้าใกล้เคียงหนึ่ง (แสดงว่าการแยกของสารลดลงหรือ MEKC ไม่ได้ช่วยปรับปรุงการแยก) แต่ถ้าค่า α_k มากกว่า $1/\alpha_{\text{CZE}}$ ค่า α_{MEKC} จากเดิมที่น้อยกว่า 1 จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนมากกว่าหนึ่ง (ซึ่งอาจปรับปรุงการแยกได้) จากนั้นจะลดลงทำให้การแยกสารลดลง ที่เป็นเช่นนี้เป็นเพราะว่าลำดับของ $|\mu|$ ของสารใน CZE กับค่า k ใน MEKC มีลำดับตรงข้ามกัน

แบบที่ 4: $|\mu|$ ของสารใน CZE เท่ากัน ค่า k ใน MEKC เท่ากัน และ $p = 1$ ดังนั้นฟังก์ชันของสารไม่สามารถแยกกันได้ด้วยเทคนิค MEKC

ได้ตรวจสอบแบบจำลองโดยศึกษาค่าจำเพาะของการแยกสารกลุ่มพาราเบนในภาวะที่สารเหล่านี้มีประจุลบใน MEKC ที่มีโซเดียมโดเดคซิลซัลเฟตเป็นไมเซลล์ พบว่าค่า α_{MEKC} ที่ได้จากการทดลองสอดคล้องกับแบบจำลองที่ 1 และ 3

ดังนั้นจุดเด่นของงานวิจัยนี้ คือ สมการและแบบจำลองของค่าจำเพาะของการแยกสารเป็นสิ่งคิดค้นใหม่สำหรับอธิบายการแยกสารที่มีประจุใน MEKC ว่าทำไม MEKC จึงช่วยหรือไม่ช่วยปรับปรุงการแยกของสาร ทำให้เป็นแนวทางในการหาภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารได้

8.5 แบบจำลองทางทฤษฎีของค่าจำเพาะการแยกสำหรับสารที่มีประจุในเทคนิคไซโคลเด็กซ์ทรินอิเล็กโตรโครมาโทกราฟี

ได้จัดรูปสมการให้สัมพันธ์กับตัวแปรที่ไม่มีหน่วยและสร้างแบบจำลองทางทฤษฎีสำหรับค่าจำเพาะการแยกสาร (α_{CD}) ในเทคนิคไซโคลเด็กซ์ทรินอิเล็กโตรโครมาโทกราฟี (cyclodextrin electrokinetic chromatography, CD-EKC) เพื่อใช้สำหรับอธิบายการเปลี่ยนแปลง α_{CD} และลำดับการเคลื่อนที่ของสารที่มีประจุที่มีค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า (μ_0) ใน capillary zone electrophoresis (CZE, ภาวะที่ไม่มี CD) แตกต่างกันและใช้ CD ที่ไม่มีประจุ ในการจำแนกแบบจำลองค่าจำเพาะการแยกใน CD-EKC พิจารณาจาก selectivity ratio (p) ซึ่งเป็นอัตราส่วนของ k/α_{CZE} (k เป็นอัตราส่วนของ binding constant (K) ของสารกับ CD และ α_{CZE} เป็นอัตราส่วนของ μ_0) และลำดับของ $|\mu_0|$ ใน CZE กับ K ใน CD-EKC โดยสามารถจำแนกแบบจำลอง 4 แบบ ดังนี้ i) แบบที่ 1 (ลำดับของ $|\mu_0|$ ใน CZE กับ K ใน CD-EKC เหมือนกัน และ $p > 1$) เปรียบเทียบกับ CZE เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ CD (C) ลงไปในบัฟเฟอร์ การแยกของสารจะดีขึ้นจนถึงจุดๆ หนึ่งจากนั้นจึงค่อยๆ ลดลง และลำดับการเคลื่อนที่ของสารเหมือนเดิม ii) แบบที่ 2 (ลำดับของ $|\mu_0|$ ใน CZE กับ K ใน CD-EKC เหมือนกัน และ $p < 1$) แบบจำลองนี้ตรงกันข้ามกับ

แบบจำลองที่ 1 โดยเมื่อเพิ่ม C ส่งผลให้การแยกสารแย่งเมื่อเทียบกับใน CZE และลำดับการเคลื่อนที่ของสารเหมือนเดิม iii) แบบที่ 3 (ลำดับของ $|\mu_0|$ ใน CZE กับ K ใน CD-EKC สลับกัน และ $\rho > 1$) เมื่อเพิ่ม C ในช่วงแรกการแยกจะแย่งเริ่มจาก $1/\alpha_{CD} > 1$ จนถึง α_{CD} ใกล้ 1 ที่ KC มีค่า $\beta(1-\alpha_{CZE})/[\beta(\alpha_{CZE}K-1)+\alpha_{CZE}(1-K)]$ โดย β เป็นอัตราส่วนของ μ ในภาวะที่ไม่มี CD กับ μ ของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารกับ CD หลังจากนั้นสารจะแยกจากกันได้ดีขึ้น $\alpha_{CD} > 1$ ที่ KC สูงๆ และในแบบจำลองนี้ลำดับการเคลื่อนที่ของสารใน CD-EKC และ CZE อาจเหมือนกันหรือสลับกันก็ได้ และ iv) แบบที่ 4 ($\rho = 1$) สารไม่สามารถแยกออกจากกันได้ทั้งใน CZE และ CD-EKC

นอกจากนี้ได้เปรียบเทียบค่าความจำเพาะการแยกที่ได้จากการทำนายและจากการทดลองที่ความเข้มข้นของ β -CD ต่างๆ (0-16 mM) โดยใช้สารทดสอบเป็นสารประกอบกลุ่มอนุพันธ์ของกรดเบนโซอิกและกรดฟีนอกซีอะซิติก พบว่าค่า α_{CD} ที่ได้จากการทำนายและจากการทดลองมีความสอดคล้องกันอย่างยิ่งที่ความเข้มข้นของ CD และ KC ต่างๆ

ดังนั้นสมการที่ได้จัดรูปแบบขึ้นสามารถใช้สำหรับทำนาย α_{CD} ที่ KC และที่ความเข้มข้นของ CD ต่างๆ ได้ จึงเป็นแนวทางในการหาภาวะที่เหมาะสมของการแยกสารได้

8.6 การเปรียบเทียบค่าจำเพาะการแยกในเทคนิคอะพอลาร์โรอิเล็กโตรโฟรีซิสสำหรับสารกลุ่มเอโรแมติกแอซิดที่มีหมู่แทนที่เป็นคลอโรและเมทิล

ได้ศึกษาและเปรียบเทียบค่าจำเพาะการแยก (α) ในเทคนิค capillary electrophoresis ทั้ง 3 ประเภท ได้แก่ CZE, MEKC และ CD-EKC เพื่อใช้สำหรับการแยกสารกลุ่มที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า (μ) ใกล้เคียงกันหรือ α มีค่าน้อยๆ ประมาณ 1 เช่น ไอโซเมอร์ของอนุพันธ์กรดเบนโซอิกที่มีหมู่แทนที่เป็นหมู่เมทิลและหมู่คลอโรจำนวนหนึ่งและสองหมู่ จากการทดลองพบว่าการแยกสารด้วยบัฟเฟอร์ของ CZE ที่ประกอบด้วย 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ที่ pH 9.2 และไม่มีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ ให้ค่าจำเพาะการแยกใน CZE (α_{CZE}) น้อย มีค่าอยู่ในช่วง 1.018-1.038 สำหรับแต่ละไอโซเมอร์ของมอนอคลอโรเบนโซเอต/มอนอเมทิลเบนโซเอต (2-, 3- และ 4- C^-/M^-) และไอโซเมอร์ของไดคลอโรเบนโซเอต/ไดเมทิลเบนโซเอต (2,3-, 2,4-, 2,5-, 2,6-, 3,4- และ 3,5- DC^-/DM^-) และเมื่อใช้บัฟเฟอร์ของ MEKC ที่ประกอบด้วย 40 mM SDS ใน 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ที่ pH 9.2 และไม่มีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่า ค่าจำเพาะการแยกใน MEKC (α_{MEKC}) สูงขึ้นกว่า α_{CZE} เพียงเล็กน้อย โดยมีค่าอยู่ในช่วง 1.019-1.046 เนื่องจากสารมี retention selectivity (อัตราส่วนของรีเทนชันแฟกเตอร์ของสารที่เข้าไปในไมเซลล์) น้อย จากนั้นเมื่อมีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็น 10-20% โดยปริมาตรของเมทานอลหรืออะซิโตนไทรกลีเซอรีนใน CZE และ MEKC พบว่าค่า α_{CZE} และ α_{MEKC} ลดลงเล็กน้อย และเมื่อใช้บัฟเฟอร์ของ CD-EKC ที่ประกอบด้วย α -CD (2-60 mM), β -CD (2-16 mM) หรือ dimethyl β -CD (2-50 mM DM- β -CD) ใน 10 mM บอเรตบัฟเฟอร์ที่ pH 9.2 และไม่มีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่า α_{CD} มีค่ามากกว่า α_{CZE} และ

α_{MEKC} โดย α_{CD} มีค่าสูงถึง 2.02 สำหรับ C^-/M^- และ DC^-/DM^- ยกเว้น $2\text{C}^-/2\text{M}^-$ ใน DM- β -CD และ $2,6\text{DC}^-/2,6\text{DM}^-$ ใน β -CD และ DM- β -CD สามารถอธิบายได้โดยสารเกิดความแตกต่างของ binding selectivity (κ เป็นอัตราส่วนของ binding constant ของสารกับ CD) ตัวอย่างเช่น $4\text{C}^-/4\text{M}^-$ ใน 30 mM α -CD ให้ค่า $\alpha_{\text{CD}} = 1.44$ และ $\kappa = 4.69$ และ $3,5\text{DC}^-/3,5\text{DM}^-$ ใน 50 mM DM- β -CD ให้ค่า $\alpha_{\text{CD}} = 1.63$ และ $\kappa = 21.2$ นอกจากนี้ได้ทำการแยกทุกไอโซเมอร์ของ C^-/M^- และ DC^-/DM^- ในคราวเดียวกัน พบว่า CD-EKC ให้การแยกที่ดีกว่า CZE และ MEKC อีกทั้งได้ประยุกต์สำหรับแยกสารปราบวัชพืชที่มีฤทธิ์เป็นกรด โดยเน้นสารในกลุ่มกรดฟีนอกซีที่มีหมู่แทนที่บนวงเบนซีนแตกต่างกันเพียงหมู่เมทิลและหมู่คลอโร 1 ตำแหน่ง พบว่า สารแยกออกจากกันได้สมบูรณ์เมื่อใช้ CD-EKC ที่เติม α -CD หรือ DM- β -CD ในขณะที่ไม่สามารถแยกได้ใน CZE และ MEKC

ดังนั้น CD-EKC สามารถใช้เป็นทางเลือกที่ดีกว่าสำหรับการแยกสารที่มีหมู่แทนที่ที่แตกต่างกันเพียงหมู่คลอโรหรือหมู่เมทิล เมื่อเทียบกับ CZE และ MEKC

8.7 ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาทางทฤษฎีและทางปฏิบัติของการแยกที่มีประสิทธิภาพสูงในเทคนิคการแยกสารด้วยกะปิลาริขนาดไมโครเมตร (microseparation) ที่เกี่ยวข้องกับเทคนิคกะปิลาริอิเล็กโตรโฟรีซิส (CE) และไมโครไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (μ HPLC) การศึกษารีเทนชัน (retention) ทำให้เกิดประโยชน์ในเชิงวิชาการของเทคนิคการแยกสาร เข้าใจถึงพฤติกรรมเคลื่อนที่ของสารที่เกิดขึ้นจากปัจจัยต่างๆ ส่วนการศึกษาค่าจำเพาะของการแยกสารทำให้เข้าใจระบบและปัจจัยที่มีผลต่อค่าการแยกของสาร ซึ่งเป็นแนวทางในการเลือกภาวะที่ให้ประสิทธิภาพของการแยกสารที่ดี แนวทางของงานวิจัยที่สามารถศึกษาต่อในอนาคต อาทิเช่น

1) ด้านเฟสคงที่มอนอลิทใน μ HPLC และ CE กำลังเป็นที่น่าสนใจในปัจจุบัน การพัฒนาชนิดของมอนอลิทที่ปรับปรุงผิวด้วยหมู่แทนที่อื่นๆ ทั้งที่มีขั้ว ไม่มีขั้วและประเภทพอลิเมอร์ รวมทั้งการศึกษาเชิงทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับรีเทนชันและค่าจำเพาะของการแยกสาร

2) สมการและแบบจำลองของค่าจำเพาะของการแยกสารที่มีประจุใน MEKC และ CD-MEKC อาจศึกษาเพิ่มเติมในระบบอื่นๆ เช่น การแยกสารที่มีประจุด้วยสารลดแรงตึงผิวที่ไม่มีประจุใน MEKC การแยกสารที่ไม่มีประจุโดยใช้ CD สองชนิดที่มีประจุใน CD-EKC อีกทางการเสนอสมการของค่าการแยกสาร (resolution) ที่มีประจุ ที่สัมพันธ์กับตัวแปรไม่มีหน่วยเป็นต้น

3) การพัฒนาเทคนิค CE, μ HPLC ซึ่งมีประสิทธิภาพสูง รวมทั้งการตรวจวัดที่เชื่อมต่อกับ mass spectrometer (MS) ที่ให้สภาพไวสูงและข้อมูลของโครงสร้างของสาร เช่น CE-MS และ μ HPLC-MS สำหรับการแยกและวิเคราะห์สารในตัวอย่างที่ซับซ้อนเป็นสิ่งที่น่าสนใจ โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางด้านการแพทย์ ชีวโมเลกุล proteomics สิ่งแวดล้อมและอาหาร เป็นต้น

ภาคผนวก 1

ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสาร

Journal of Chromatography A 1216 (2009), 5868-5874

การเปรียบเทียบค่าจำเพาะการแยกสารของคอลัมน์ประเภทมอนอลิธที่ปรับปรุงพื้นผิว
ด้วยพอลิออกตะเดซิลเมทาคริเลตและหมู่พอลิออกตะเดซิลสำหรับการแยกสารประกอบ
กลุ่มเฮโลเจนในเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบรีเวอร์สเฟส

Selectivity Comparisons of Monolithic Silica Capillary Columns Modified with
Poly(octadecyl methacrylate) and Octadecyl Moieties for Halogenated Compounds
in Reversed-Phase Liquid Chromatography



Selectivity comparisons of monolithic silica capillary columns modified with poly(octadecyl methacrylate) and octadecyl moieties for halogenated compounds in reversed-phase liquid chromatography

Wasura Soonthorntantikul^a, Natchanun Leepipatpiboon^a, Tohru Ikegami^b,
Nobuo Tanaka^b, Thumnoon Nhujak^{a,*}

^a Chromatography and Separation Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

^b Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Science and Technology, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto, 606-8585, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 February 2009

Received in revised form 1 June 2009

Accepted 9 June 2009

Available online 13 June 2009

Keywords:

Halogenated compounds

Selectivity

Reversed-phase HPLC

Monolithic silica capillary columns

ABSTRACT

Stationary phase selectivities for halogenated compounds in reversed-phase HPLC were compared using C18 monolithic silica capillary columns modified with poly(octadecyl methacrylate) (ODM) and octadecyl moieties (ODS). The preferential retention of halogenated benzenes on ODM was observed in methanol/water and acetonitrile/water mobile phases. In selectivity comparison of selected analytes on ODM and ODS, greater selectivities for halogenated compounds were obtained with respect to alkylbenzenes on an ODM column, while similar selectivities were observed with a homologous series of alkylbenzenes on ODM and ODS columns. These data can be explained by greater dispersive interactions by more densely packed octadecyl groups on the ODM polymer coated column together with the contribution of carbonyl groups in ODM side chains. For the positional isomeric separation of dihalogenated benzenes (*ortho*-, *meta*-, *para*-), the ODM column also provided better separation of these isomers for the adjacently eluted isomers that cannot be completely separated on an ODS column in the same mobile phase. These results imply that the ODM column can be used as a better alternative to the ODS column for the separation of other halogenated compounds.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Monolithic capillary columns are viable alternative to conventional particle packed columns for high efficiency HPLC separations at similar pressure drop because of small-sized skeletons and relatively large through pores [1–5]. In previous work, hybrid monolithic silica capillary columns were prepared from a mixture of tetramethoxysilane (TMOS) and methyltrimethoxysilane (MTMS) [3]. The surface of monolithic silica capillary column can be modified to obtain various stationary phases in different chromatographic modes such as reversed-phase [1–4], ion-exchange [6] and hydrophilic interaction [7] by following a monomeric or polymeric procedure, for achieving desired solute selectivities in HPLC. Column characteristics and selectivities have been studied so that chromatographers can choose suitable stationary phases for particular separations, and these properties are very useful in method development [8–12].

C18 monolithic silica capillary columns for reversed-phase HPLC can be obtained by chemical modification with octadecyl moieties

(ODS column) [13] or coating with poly(octadecyl methacrylate) (ODM column) [14]. Recently, the different performance of ODM and ODS monolithic silica capillary columns was reported for separating some polar and non-polar compounds such as benzene and naphthalene derivatives, polycyclic aromatic hydrocarbons, steroids and alkyl phthalates, and tocopherol homologues [15]. The ODM column had a preference for the compounds with aromatic characters, rigid and planar structures and lower length-to-breadth ratios. The polymeric ODM stationary phase also showed differences in selectivity against the ODS column. Better separations were observed for some compounds on ODM versus ODS columns under the same condition. In addition, poly(octadecyl acrylate) (ODA) grafted onto silica, which is similar structure of side chains with an ODM stationary phase, has been reported for conventional HPLC columns [21–23]. In comparison with an ODS phase, the comb-shaped polymer phase showed greater selectivity for polycyclic aromatic hydrocarbons. Selectivity in the ODA phase is enhanced by the molecular ordering of the long-chain octadecyl groups and interactions between the carbonyl groups of the polymer and π -containing compounds.

Halogenated compounds, a class of molecules of high environmental concern, can be generated in many industrial and natural processes [16,17]. These include a number of compound

* Corresponding author. Tel.: +66 2 218 7609; fax: +66 2 218 7598.

E-mail address: thumnoon.n@chula.ac.th (T. Nhujak).

groups such as chlorophenols, polychlorinated biphenyls (PCBs), halogenated dibenzo-*p*-dioxins, which contain various homologues and isomers in each compound group. The development of methods to separate and analyze these compounds is needed. The separation selectivity of common halogenated organic solvents between a typical C18 stationary phase and polymer-based packing materials including poly(methyl methacrylate-ethylene dimethacrylate) beads and poly(styrene-divinylbenzene) beads was previously compared [18]. In general, these polymeric stationary phases demonstrate preferential retention of halogenated compounds than a conventional silica-based C18 stationary phase although the polymer packing materials have shown low column efficiency. Therefore, it is interesting to extend previous work [15,18] to study differences in retention and selectivity of ODM and ODS stationary phases for halogenated compounds, using halogenated benzene derivatives as test analytes relative to alkylbenzenes.

This work investigates the retention of halogenated and alkyl substituted benzenes and compares the selectivity of these test analytes on ODM and ODS monolithic silica capillary columns in reversed phase HPLC. In addition to halogenated benzenes, chlorophenols were separated on both ODM and ODS columns. The chromatographic performance of these compounds was studied using either methanol or acetonitrile mobile phase systems.

2. Experimental

2.1. Chemicals and materials

All reagents were of analytical grade. Tetramethoxysilane (TMOS), methyltrimethoxysilane (MTMS), 3-methacryloxypropyltrimethoxysilane (MOP) and octadecyldimethylchlorosilane (ODS-Cl) were purchased from ShinEtsu Chemicals (Tokyo, Japan). Acetonitrile, urea, and pyridine were obtained from Wako Pure (Osaka, Japan); poly(ethyleneglycol) (PEG, MW = 10,000) from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany); octadecyl methacrylate from TCI (Tokyo, Japan). Methanol, hexane, toluene, acetic acid (1 M), diethylamine and α, α' -azobis-isobutyronitrile (AIBN) were obtained from Nacalai Tesque (Kyoto, Japan). Methanol, acetonitrile and toluene were distilled before further use. Purified water (Arium 611 UV system, Sartorius, Goettingen, Germany) was used. Fused silica capillaries of 200 μ m I.D. and 375 μ m O.D. were purchased from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA).

Test analytes were purchased from Nacalai Tesque, TCI, Sigma-Aldrich and Wako Pure. The following solution mixtures were used in this study: *monoalkylbenzenes* (benzene (–H), toluene (–CH₃), ethylbenzene (–C₂H₅) and propylbenzene (–C₃H₇)); *monohalogenated benzenes* (fluorobenzene (–F), chlorobenzene (–Cl), bromobenzene (–Br) and iodobenzene

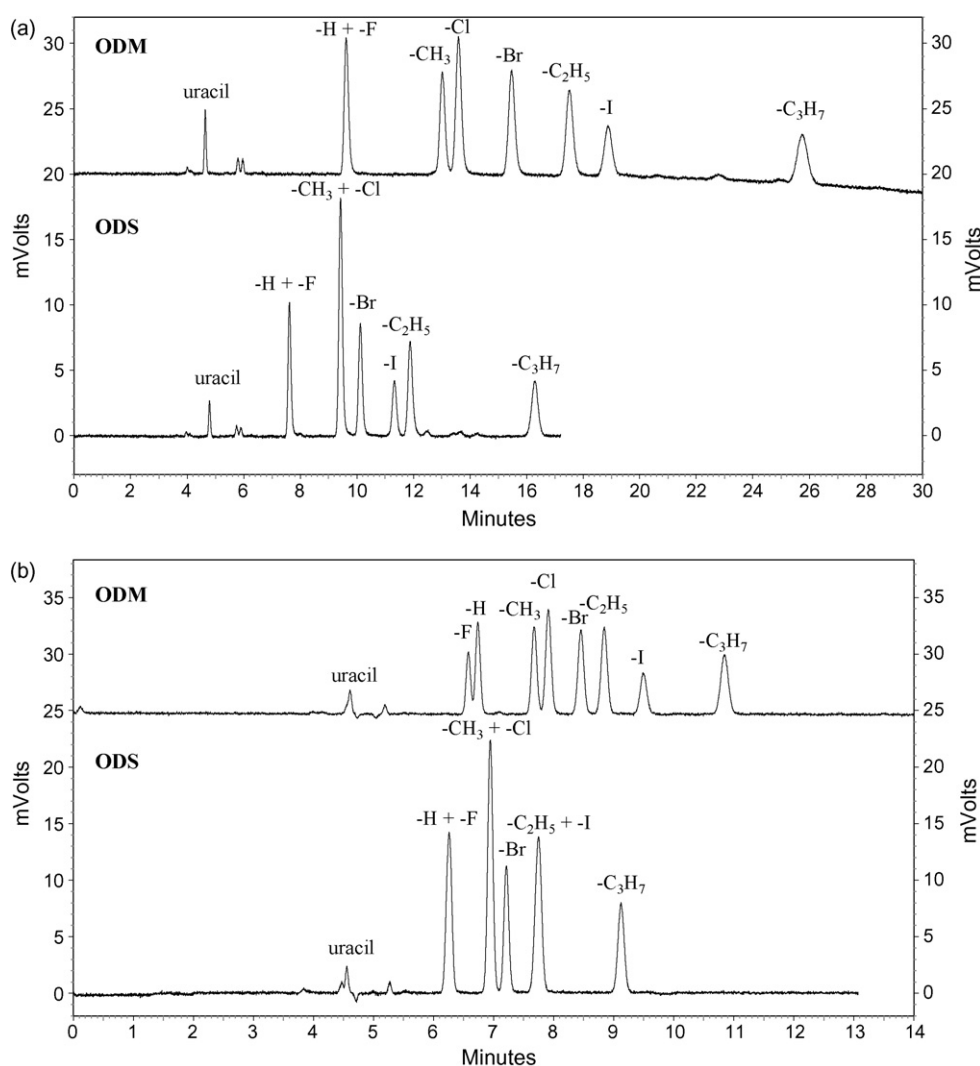


Fig. 1. Chromatograms of mixtures of monohalogenated benzenes and monoalkylbenzenes on ODM and ODS columns using (a) 70% (v/v) methanol and (b) 70% (v/v) acetonitrile. Uracil was used as an unretained marker.

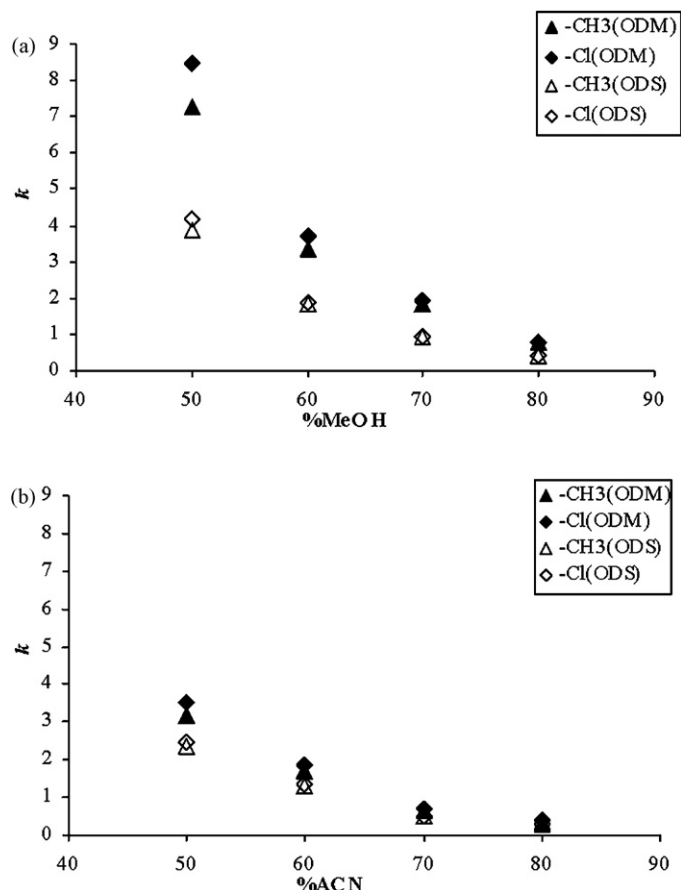


Fig. 2. Retention factor (k) of toluene and chlorobenzenes on ODM and ODS columns in a wide range of organic modifier concentrations: (a) methanol and (b) acetonitrile.

(-I)); *dialkylbenzenes* (*o*-xylene (*o*-di-CH₃), *m*-xylene (*m*-di-CH₃), *p*-xylene (*p*-di-CH₃), *o*-diethylbenzene (*o*-di-C₂H₅), *m*-diethylbenzene (*m*-di-C₂H₅) and *p*-diethylbenzene (*p*-di-C₂H₅)); *dihalogenated benzenes* (*o*-difluorobenzene (*o*-di-F), *m*-difluorobenzene (*m*-di-F), *p*-difluorobenzene (*p*-di-F), *o*-dichlorobenzene (*o*-di-Cl), *m*-dichlorobenzene (*m*-di-Cl), *p*-dichlorobenzene (*p*-di-Cl), *o*-dibromobenzene (*o*-di-Br), *m*-dibromobenzene (*m*-di-Br) and *p*-dibromobenzene (*p*-di-Br)); *chlorophenols* ((1) 2-chlorophenol, (2) 4-chlorophenol, (3) 3-chlorophenol, (4) 2,6-dichlorophenol, (5) 2,3-dichlorophenol, (6) 2,5-dichlorophenol, (7) 2,4-dichlorophenol, (8) 3,4-

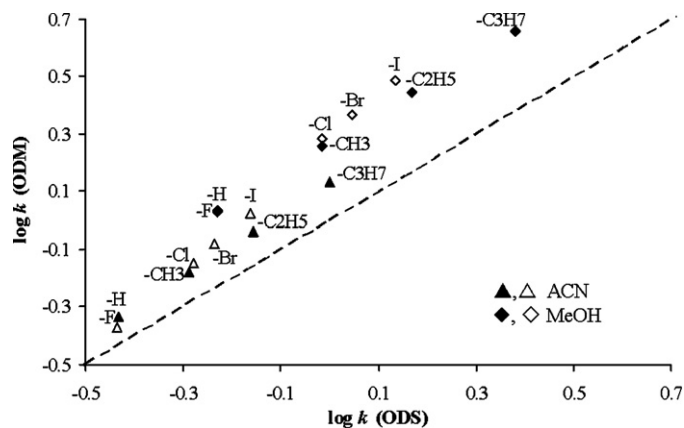


Fig. 3. Plots of $\log k$ of monosubstituted benzenes on an ODM column against those on an ODS column using (a) 70% (v/v) methanol and (b) 70% (v/v) acetonitrile as mobile phases.

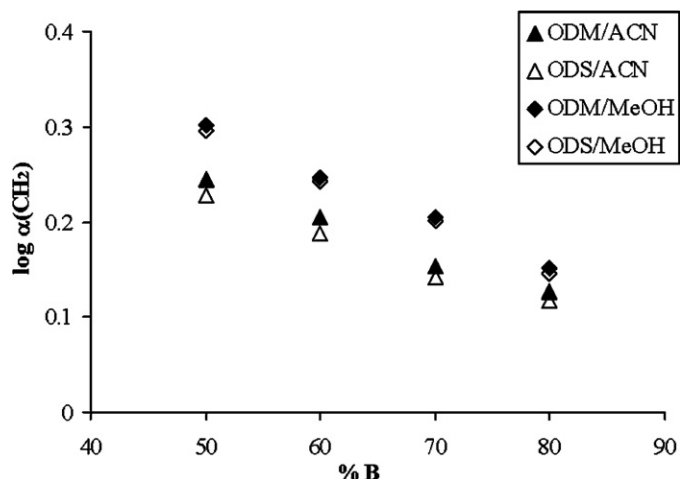


Fig. 4. Comparison of $\log \alpha(\text{CH}_2)$ on ODM and ODS columns using acetonitrile and methanol mobile phases.

dichlorophenol, (9) 3,5-dichlorophenol, (10) 2,3,6-trichlorophenol, (11) 2,3,4-trichlorophenol, (12) 2,4,5-trichlorophenol, (13) 3,4,5-trichlorophenol, (14) 2,3,4,6-tetrachlorophenol, (15) 2,3,5,6-tetrachlorophenol, (16) 2,3,4,5-tetrachlorophenol and (17) pentachlorophenol).

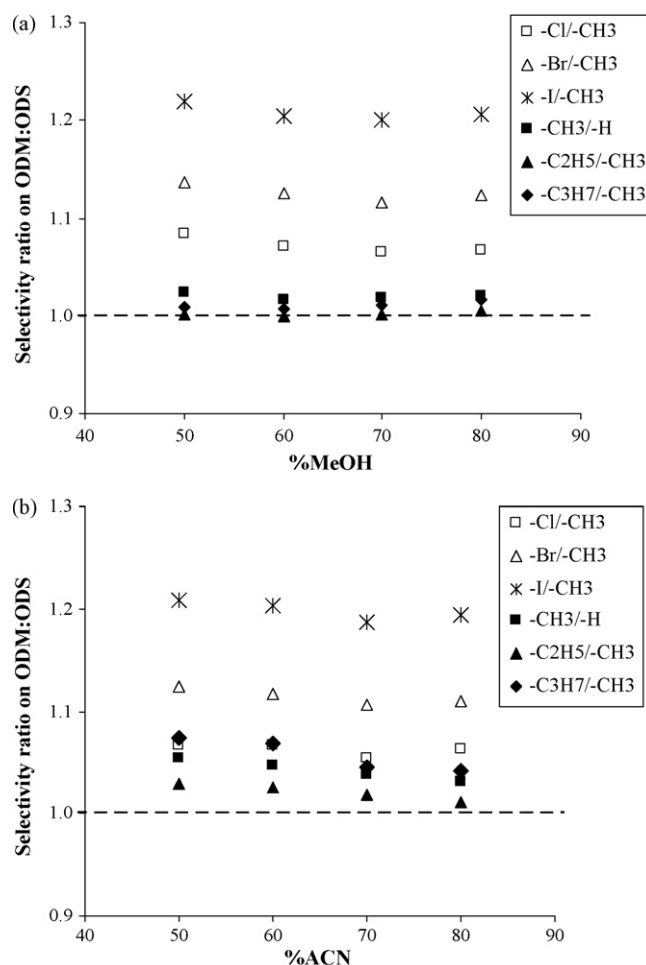


Fig. 5. The selectivity ratio on ODM:ODS columns for monosubstituted benzenes against selected reference analytes using (a) 50–80% (v/v) methanol and (b) 50–80% (v/v) acetonitrile as mobile phases.

2.2. Instrumentation

Chromatographic measurements were performed using a split-injection/flow HPLC system which consisted of pumps (Jasco X-LC 3185PU, Jasco, Tokyo, Japan), an MU 701 UV-vis detector (GL Sciences Inc., Tokyo, Japan) and an injection valve (model 7725, Rheodyne, CA, USA) fitted with a T-union (as a splitter) with one end connected to the capillary column and another end to a flow restrictor (a stainless steel tubing 0.1 mm I.D., 1/16 in. O.D.). The temperature of all systems was controlled in an air-circulating oven at 30 °C. UV detection was monitoring at 214 nm. Linear velocity (u) was set at 1.0 mm/s. All chromatographic data were collected in duplicate runs using version 2.8.3 EZChrom Elite Client/Server software.

2.3. Preparation and chemical modification of monolithic columns

Hybrid type monolithic silica capillary columns were prepared from a mixture of TMOS and MTMS in 200 μ m I.D. fused silica capillaries, as previously reported [1]. The surface modification of ODM columns was obtained similar to previously reported procedures by free radical polymerization of octadecyl methacrylate using an AIBN initiator [14]. Briefly, monolithic silica capillary columns were washed with methanol for 24 h.

Then, MOP bonding was carried out by rinsing columns with a solution of MOP:pyridine 1:1 for 48 h at 80 °C, followed by a methanol wash. MOP bonded columns were rinsed with toluene for 3 h and a polymerization reaction solution (250 μ L of octadecyl methacrylate monomer and 250 μ L of a 38 mg/mL AIBN solution in toluene) was flushed into columns and allowed to react at 80 °C for 3 h. For ODS column preparation, monolithic silica capillary columns were washed with THF and then toluene. ODS columns were obtained using octadecyldimethyl-*N,N*-diethylaminosilane (ODS-DEA prepared from ODS-Cl and diethylamine with a molar ratio 1:2.5 in toluene). The on-column bonding reaction was carried out as previously reported [13], by continuously feeding the columns with 20% (v/v) ODS-DEA solution in toluene at 0.8 MPa and allowing it to react for 3 h at 60 °C, followed by washes with toluene, THF and methanol, respectively.

The performance of prepared ODM and ODS columns, such as plate height (H) and permeability (K), was evaluated using a mixture of uracil and alkylbenzenes in 80% methanol mobile phase at u of 1.0 mm/s. These two types of reversed-phase columns showed high column efficiencies and permeabilities, with H_{uracil} of 8.5 μ m, $H_{\text{amylbenzene}}$ of 9.1 μ m and K of 8.8×10^{-14} m² for ODS columns, while H_{uracil} of 10.9 μ m, $H_{\text{amylbenzene}}$ of 11.6 μ m and K of 8.7×10^{-14} m² for ODM columns. Retention factors of amylbenzene on ODM and ODS were obtained to be 3.35 and 1.10, respectively,

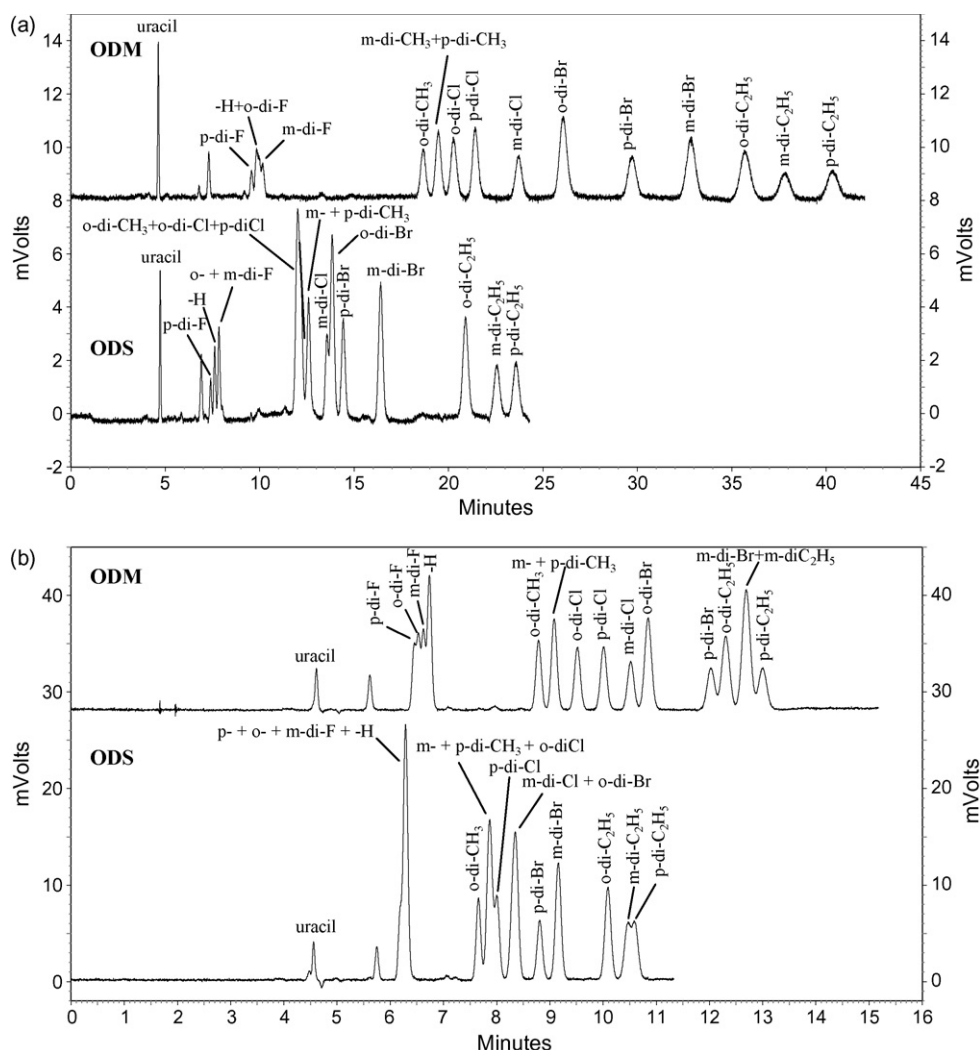


Fig. 6. Chromatograms of mixtures of dihalogenated benzenes and dialkylbenzenes on ODM and ODS columns using (a) 70% (v/v) methanol and (b) 70% (v/v) acetonitrile as mobile phases.

3. Results and discussion

3.1. Monosubstituted benzenes

Solute retention in reversed-phase HPLC can be divided into two processes: mobile phase and stationary phase effects. The former commonly relates to hydrophobic interactions, while the latter includes dispersion interactions as universal interactions along with possible contributions of dipolar interactions depending on a stationary phase structure and an organic solvent in the chromatographic system. Since the analytes were separated under the same mobile phase, the different elution behavior of halogenated and alkyl substituted benzene pairs was presumably due to the difference in the stationary phase effect. It should be noted that ODM at 70% methanol (Fig. 1a) and ODS at 60% methanol (not shown) gave comparable retention times for $-\text{CH}_3$. Baseline resolution was obtained for $-\text{Cl}$ and $-\text{CH}_3$ on the ODM column, while partial separation of these two compounds was observed on the ODS column. However, this work compares the selectivity of a given stationary phase using the same mobile phase, but not separation selectivity at optimum conditions of mobile phases for each stationary phase.

the acetonitrile mobile phase, a slight decrease in retention of analytes was observed because of the loss of dispersion interactions in acetonitrile, in comparison with the methanol mobile phase [14].

Fig. 3 demonstrates that, mobile phases with 70% methanol and 70% acetonitrile, $\log k$ values of monosubstituted benzenes on the ODM column are higher than those on the ODS column, indicating that both monohalogenated benzenes and monoalkylbenzenes have preferential retention for the ODM column in either acetonitrile or methanol mobile phase systems. From Fig. 3, alkylbenzenes gave a linear increase with an increase in the number of carbon atoms in the aliphatic chain, which is common behavior for a reversed-phase system. Halogenated benzenes also demonstrated a linear tendency with increasing size and polarizability. In comparison with the slope of $\log k$ for monosubstituted benzenes on ODM against ODS stationary phases (Fig. 3), the slope from monohalogenated benzenes is greater in mobile phases with either acetonitrile or methanol because of additional interactions affecting the retention behavior of halogenated benzenes on the ODM column compared with alkylbenzenes [12].

The logarithm of the methylene group selectivity ($\log \alpha(\text{CH}_2)$) can be obtained from the value of the slope of a linear plot between $\log k$ of the alkylbenzenes against the number of alkyl carbons. Fig. 4 shows plots of $\log \alpha(\text{CH}_2)$ of alkylbenzenes in a range of 50–80% (v/v) organic solvents including acetonitrile and methanol on ODM and ODS columns. The value of $\alpha(\text{CH}_2)$ reflects the stationary phase hydrophobicity. The higher the value of $\alpha(\text{CH}_2)$, the greater the hydrophobicity of the stationary phase. In comparison with the

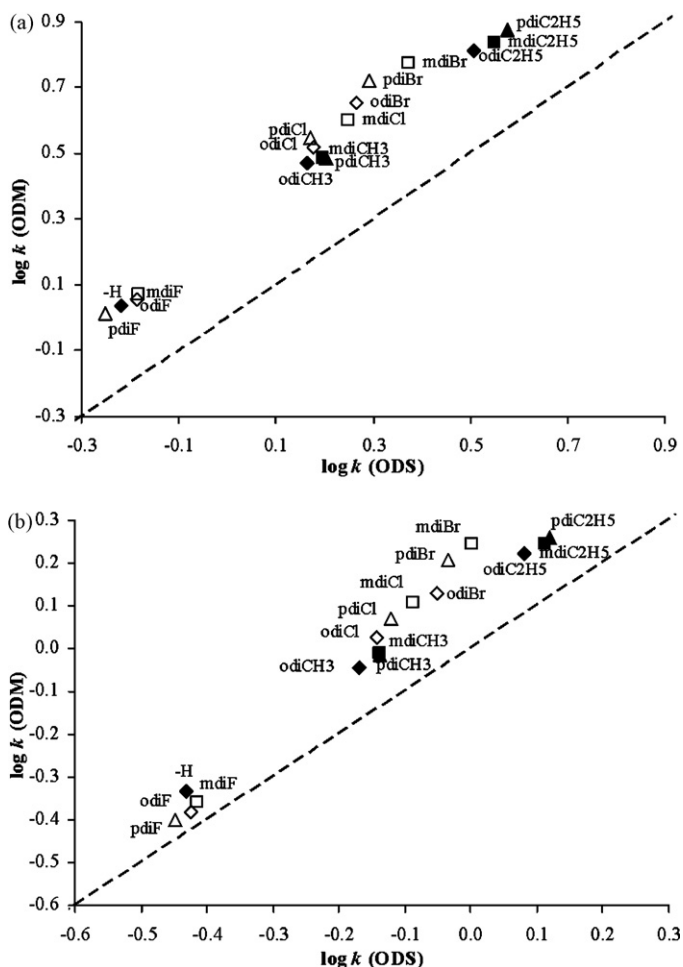


Fig. 7. Plots of $\log k$ of disubstituted benzenes on an ODM column against those on an ODS column using (a) 70% (v/v) methanol and (b) 70% (v/v) acetonitrile as mobile phases.

ODS column, the ODM column shows a higher hydrophobicity using either acetonitrile or methanol mobile phases. This is caused by the difference in bonding density or the amount of C18 bonded to silica support. Due to the lower preference for planar solutes on the ODS column (the higher C18 chain density on the ODM column) [14], the greater distance between the C18 chains on the ODS stationary phase allows for a higher amount of organic solvent to be adsorbed onto the ODS stationary phase than that on the ODM stationary phase. A significant difference in $\log \alpha(\text{CH}_2)$ or hydrophobicity on ODM and ODS columns in Fig. 3 was observed in acetonitrile in comparison to methanol mobile phases, probably due to the greater amount of adsorbed acetonitrile on the reversed-phased stationary phase [19].

Selectivity (α) is defined as the ratio of retention factors of two analytes. In this work, the selectivity of ODM and ODS columns for monosubstituted benzenes was compared by plotting the ratio of the selectivity of ODM relative to ODS columns as shown in Fig. 5. A similar selectivity, the α ratio ≈ 1 , on ODM and ODS columns for homologous series of alkylbenzenes was observed. When the α value is obtained from halogenated benzenes with respect to toluene, the selectivity of the stationary phases for analytes is influenced by the structural fragments. The ODM column provides a greater selectivity for monohalogenated benzenes relative to toluene in both acetonitrile and methanol mobile phases.

An increase in the selectivity of halogenated benzenes relative to toluene was observed with an increasing size in the halogenated atom. The difference in the selectivity of halogenated compounds on these two columns could involve dispersive interactions [20] to a greater extent for a large halogen atom as a substituent than in the case of alkylbenzenes on the ODM column. According to previous works on selectivity of poly(octadecyl acrylate) stationary phase grafted on silica particles in a conventional HPLC column [21–23], it can be mentioned in our work that the contribution of carbonyl groups in the side chain of the ODM stationary phase can be involved through carbonyl- π interactions between the stationary phase and solute to cause the enhanced retention of halogenated compounds with the ODM phase.

3.2. Disubstituted benzenes

Fig. 6 shows chromatograms of disubstituted benzenes on ODM and ODS stationary phases using 70% methanol and 70% acetonitrile mobile phases. The general elution order of *ortho*, *meta* and *para* disubstituted benzenes has similar tendencies as in the case of monosubstituted benzenes. The elution order on ODM and ODS columns are the same. These test analytes elute in the order of the following retention times $\text{di-F} \sim \text{H} < \text{di-CH}_3 < \text{di-Cl} < \text{di-Br} < \text{di-C}_2\text{H}_5$. The elution order varies systematically with a change in substituents,

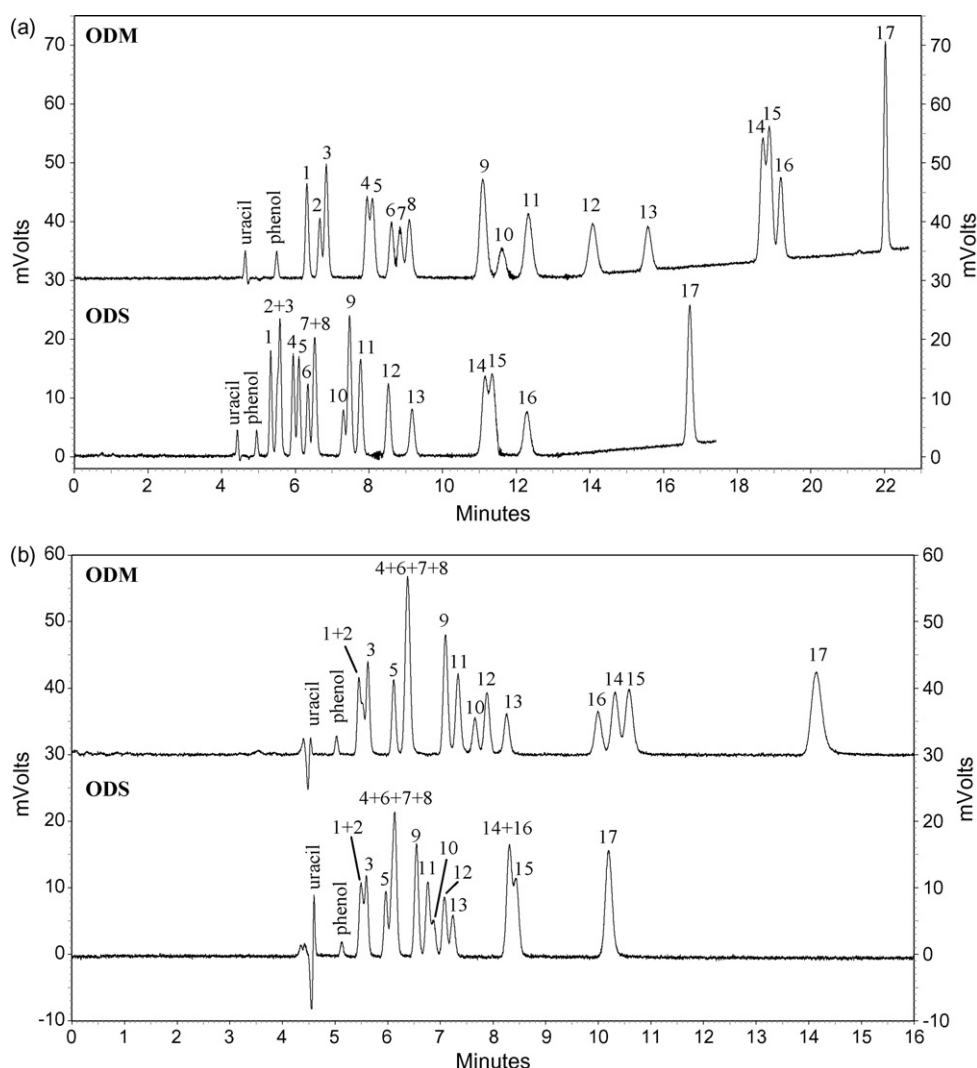


Fig. 8. Separation of 17 chlorophenols on ODM and ODS columns using (a) gradient elution of A:B with 70%B (0–8 min), 70–100%B (8–18 min) and 100%B (18–23 min), where A is water with 0.1% formic acid (FA), and B is methanol with 0.1% FA, and (b) isocratic elution of 40:60 A:B, where A is water with 0.1% FA, and B is acetonitrile with 0.1% FA.

but it is not systematic within these groups. For dialkylbenzenes, the elution order of each isomer is *ortho* < *meta* < *para*. Dichlorobenzene and dibromobenzene isomers elute in the retention time order of *ortho* < *para* < *meta*, while *para* < *ortho* < *meta* for difluorobenzenes on both ODM and ODS columns. It is obvious that the ODM column provides better separation of positional isomers of dihalogenated benzenes for the adjacently eluted isomers that cannot be separated under the same conditions on the ODS column.

Plots of log *k* values for disubstituted benzenes on the ODM column were plotted against those on the ODS column using 70% methanol and 70% acetonitrile mobile phases as in Fig. 7. The greater retention of disubstituted benzenes on ODM than ODS columns was obtained as the similar trends of monosubstituted benzenes. The effect of the stationary phase on the retention for each positional isomer of halogenated benzenes was greater on the ODM column with an increasing size of the halogen atom owing to greater dispersion interactions together with the contribution of carbonyl groups on the ODM stationary phase [21–23].

3.3. Chlorophenols

The performance of ODM and ODS columns for separating halogenated compounds was demonstrated using chlorophenols as test analytes. These compounds contain a number of homologues and isomers. The separation of mono- and polychlorophenols on ODM and ODS columns are shown in Fig. 8, using methanol and acetonitrile mobile phases. The retention of chlorophenols was longer with increasing the number of the chlorine atom on phenol due to the higher hydrophobicity of solutes. When chlorine was substituted on the isolated substitution, these compounds gave higher retentions compared to the congested substitution due to higher hydrophobic areas [24]. As can be seen in Fig. 8a, the separation of 4-chlorophenol/3-chlorophenol (2/3) and 2,4-dichlorophenol/3,4-dichlorophenol (7/8) pairs was achieved on the ODM column, while co-elution of these pairs was observed on the ODS column under the same methanol mobile phase composition with comparable times. In addition, the reversed retention order of 3,5-dichlorophenol/2,3,6-trichlorophenol (9/10) on ODM and ODS columns was obtained. The better separation of chlorophenols on the ODM column was also observed using the same mobile phase as isocratic elution of 60% acetonitrile (Fig. 8b). The higher retention and better resolution of 17 chlorophenols on the ODM than ODS columns was obtained due to greater dispersive interactions of analytes on the ODM column. The retention is also enhanced by the carbonyl- π interactions on the ODM stationary phase [21–23]. It should be noted that the optimized separation of chlorophenols with the ODM or ODS column may also be performed by appropriate gradient elution with the mobile phase.

4. Conclusions

Monolithic silica capillary column modified with poly(octadecyl methacrylate) (ODM) have greater preference and greater selectivity for halogenated benzenes, in comparison with the monolithic silica capillary columns bonded using octadecyldimethyl-*N,N*-diethylaminosilane (ODS). This is due to the greater contribution of

dispersive interactions on the ODM stationary phase with the contribution of carbonyl groups in ODM side chains. In most cases, the separation of adjacently eluted positional isomers of halogenated compounds was achieved on the ODM column which cannot be separated on the ODS column using the same mobile phase. The ODM column also provides better separation of homologues and isomers of chlorophenols. The results imply that the ODM column can be used as an alternative to the conventional ODS column for separating other halogenated compounds.

Acknowledgements

The authors gratefully thank to the Thailand Research Fund for the research grant (RMU5080054) to TN and the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (PHD00252550) to WS. This work was also supported by the Japan Society for the Promotion of Science with a Grant-in-Aid for Scientific Research (20350036) to NT and a post-doctoral fellowship (PO7337) to TN. We would like to extend thank to the Ratchadaphisek Somphot Endowment from Chulalongkorn University (CU), and the Center for Petrochemicals, and Advanced Materials, CU for partial support to Chromatography and Separation Research Unit.

References

- [1] K. Miyamoto, T. Hara, H. Kobayashi, H. Morisaka, D. Tokuda, K. Horie, K. Koduki, S. Makino, O. Núñez, C. Yang, T. Kawabe, T. Ikegami, H. Takubo, Y. Ishihama, N. Tanaka, *Anal. Chem.* 80 (2008) 8741.
- [2] T. Hara, H. Kobayashi, T. Ikegami, K. Nakanishi, N. Tanaka, *Anal. Chem.* 78 (2006) 7632.
- [3] M. Motokawa, H. Kobayashi, N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, H. Jinnai, K. Hosoya, T. Ikegami, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A* 961 (2002) 53.
- [4] K. Cabrera, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 843.
- [5] S. Eeltink, W.M.C. Decrop, G.P. Rozing, P.J. Schoenmakers, W.Th. Kok, *J. Sep. Sci.* 29 (2004) 1431.
- [6] S.D. Chambers, K.M. Glenn, C.A. Lucy, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 1628.
- [7] T. Ikegami, K. Tomomatsu, H. Takubo, K. Horie, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A* 1184 (2008) 474.
- [8] C. Stella, S. Rudaz, J.L. Veuthey, A. Tchaplá, *Chromatographia* 53 (2001) S113.
- [9] C. Stella, S. Rudaz, J.L. Veuthey, A. Tchaplá, *Chromatographia* 53 (2001) S132.
- [10] U.D. Neue, J.E. O'Gara, A. Méndez, *J. Chromatogr. A* 1127 (2006) 161.
- [11] N.S. Wilson, M.D. Nelson, J.W. Dolan, L.R. Snyder, R.G. Wolcott, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* 961 (2002) 171.
- [12] M. Turowski, T. Morimoto, K. Kimata, H. Monde, T. Ikegami, K. Hosoya, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A* 911 (2001) 177.
- [13] N. Tanaka, H. Kinoshita, M. Araki, T. Tsuda, *J. Chromatogr.* 332 (1985) 57.
- [14] O. Núñez, T. Ikegami, W. Kajiura, K. Miyamoto, K. Horie, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A* 1156 (2007) 35.
- [15] O. Núñez, T. Ikegami, K. Miyamoto, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A* 1175 (2007) 7.
- [16] P. Liljelind, G. Soderstrom, B. Hedman, S. Kallsson, L. Lundin, S. Marklund, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 3680.
- [17] J. Boer, R.J. Law, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 223.
- [18] K. Hosoya, J.M.J. Frechet, *J. Liq. Chromatogr.* 16 (1993) 353.
- [19] Y.V. Kazakevich, R. LoBrutto, F. Chan, T. Patel, *J. Chromatogr. A* 913 (2001) 75.
- [20] M. Turowski, N. Yamakawa, J. Meller, K. Kimata, T. Ikegami, K. Hosoya, N. Tanaka, *E.R. Throntan, J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 13836.
- [21] M.A.J. Chowdhury, H. Ihara, T. Sagawa, C. Hirayama, *J. Chromatogr. A* 877 (2000) 71.
- [22] T. Fukumoto, H. Ihara, S. Sakaki, H. Shosenji, C. Hirayama, *J. Chromatogr. A* 672 (1994) 237.
- [23] A.K. Malik, M.M. Rahman, M. Czaun, M. Takafuji, H. Ihara, *J. Chromatogr. A* 1187 (2008) 119.
- [24] N. Tanaka, K. Kimata, K. Hosoya, H. Miyaniishi, T. Araki, *J. Chromatogr. A* 656 (1993) 265.

ภาคผนวก 1

ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสาร

Journal of Chromatography A 1216 (2009), 5868-5874

การเปรียบเทียบค่าจำเพาะการแยกสารของคอลัมน์ประเภทมอนอลิธที่ปรับปรุงพื้นผิว
ด้วยพอลิออกตะเดซิลเมทาคริเลตและหมู่พอลิออกตะเดซิลสำหรับการแยกสารประกอบ
กลุ่มเฮโลเจนในเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบรีเวอร์สเฟส

Selectivity Comparisons of Monolithic Silica Capillary Columns Modified with
Poly(octadecyl methacrylate) and Octadecyl Moieties for Halogenated Compounds
in Reversed-Phase Liquid Chromatography

Siriporn Angkanasiriporn
Wutipong Singsung
Amorn Petsom
Thumnoon Nhujak

Chromatography and Separation
Research Unit, Department of
Chemistry, Faculty of Science,
Chulalongkorn University,
Bangkok, Thailand

Received August 14, 2009
Revised October 9, 2009
Accepted October 29, 2009

Research Article

Comparison and prediction of the retention in micellar electrokinetic chromatography and microemulsion electrokinetic chromatography for disubstituted benzenes

Retention index (I), rather than retention factor (k), was found to be a more reasonable parameter for comparison of the relative affinity of disubstituted benzenes in MEEKC and MEKC, due to independent of I with the SDS surfactant concentration. MEKC and MEEKC may give similar or different I values, depending on types of moieties. With known I and K_{ow} for alkylbenzenes as references in MEKC and MEEKC, the values of K_{ow} for disubstituted benzenes can be estimated from the observed I values, where K_{ow} is the octanol–water distribution constant. In addition, a group additive approach can be used to predict I for disubstituted benzenes with different moieties from the average observed I for the disubstituted benzenes with same moieties. However, electronic effects and/or intramolecular interaction may result in the different observed I from prediction.

Keywords:

CE / Disubstituted benzenes / EKC / Retention / Separation

DOI 10.1002/elps.200900486

1 Introduction

MEKC and MEEKC are widely used for CE separation of neutral as well as charged compounds [1–4], covering vitamins [5, 6], commercial pharmaceuticals [1, 7], bioanalysis [8] and natural products [9, 10]. Typically, MEKC is performed by adding a surfactant, such as SDS, to form a micellar phase [1, 11, 12], while MEEKC is performed by adding oil droplets (such as octane and ethyl acetate), a surfactant as an emulsifier (such as SDS) to stabilize the microemulsion and to generate charged oil droplets, and a cosurfactant (such as short chain alcohols) to lower the interfacial tension and to enhance the stability of the microemulsion system [3–5, 13–15]. The EKC separation mechanism is based on the difference in the partitioning of analytes between an aqueous phase and a pseudostationary phase (PSP), a micellar phase in MEKC [16, 17] and a microemulsion in MEEKC [18, 19].

In EKC, the retention factor (k), defined as the ratio of the total moles of analytes in PSP *versus* those in the aqueous phase, is one of the characteristics that express the retention behavior of analytes in PSP [13, 20, 21]. The retention mechanism in EKC may be explained using quantitative structure–relationships and quantitative structure–property relationships between the analytes and the PSP [22–24]. Theoretically, the retention factor is related to K and the phase ratio (V_m/V_{aq}) by the equation $k = K(V_m/V_{aq})$ [5, 25, 26], where K is the distribution constant of the analyte between the two phases, and V_m and V_{aq} are the PSP volume and the aqueous phase volume, respectively. At the same concentration of SDS in the buffers, higher values of $\log k$ were found in MEKC than MEEKC for six herbicides [25], bisphenol-A diglycidyl ether and its derivatives [26]. However, in comparison with MEKC at 50 mM SDS, MEEKC at 60 mM SDS gave a higher $\log k$ for test analytes [27].

Typically, the relative affinity of analytes in the same PSP and phase ratio under particular conditions can be compared using k . The higher the retention factor, the stronger the partitioning or the affinity of the analytes in PSP. In the case of the different phase ratios or PSP, such as the microemulsion and the micelle [27], it is more reasonable to compare the relative affinity of the analytes between two systems in terms of K rather than k , because k depends on the phase ratio, while K is independent of the phase ratio. However, with known k values derived experimentally, the value of K in MEEKC cannot be calculated exactly because of

Correspondence: Dr. Thumnoon Nhujak, Chromatography and Separation Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand
E-mail: thumnoon.n@chula.ac.th
Fax: +66-2-2187598

Abbreviations: BADGE, bisphenol-A-diglycidyl ether; BZ, alkylbenzenes; DB, dodecylbenzene; PSP, pseudostationary phase

an inexact value for the phase ratio as described in previous work [21, 28, 29].

The retention index (*I*) or migration index is another parameter to express the retention behavior of analytes, and is compared with the reference standards, such as a homologous series of alkylbenzenes (BZ) or alkyl aryl ketones [20, 21, 30]. The retention index is independent of the phase ratio and the concentration of the surfactant in MEKC [20, 30] and MEEKC [21], and, therefore, may be used for comparison of the relative affinity of analytes in different PSP and/or phase ratios.

In previous work [31], the values of *k* and *K* for disubstituted benzenes in MEKC were predicted based on the solute structure of monosubstituted benzenes using a group additive approach. The predicted values of log *k* for positional isomers (such as *ortho*-, *meta*- and *para*-) of disubstituted benzenes were assumed to be equal, while the observed values of log *k* for these compounds are different. Therefore, it is interesting to extend previous work [31] so as to be able to predict the retention behaviors of disubstituted benzenes.

Accordingly, the aims of this work are to investigate *I* for comparison of the relative affinity of disubstituted benzenes between the microemulsion in MEEKC and the micellar in MEKC at either the same or at different SDS concentrations, and to establish an alternative group-based additive approach for the prediction of *k* and *I* for disubstituted benzenes with different moieties from those for disubstituted benzenes with same moieties.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals

Disodium tetraborate decahydrate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), 1-butanol and a homologous series of benzenes (BZ), such as benzene, toluene, ethylbenzene and propylbenzene, were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland); SDS was from Sigma (St. Louis, MO, USA); ethyl acetate was from Merck (Darmstadt, Germany); dodecylbenzene (DB) and the following disubstituted benzenes were from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany): *o*-, *m*-, *p*-xylenes (diMe); *o*-, *m*-, *p*-dimethoxybenzenes (diOMe); *o*-, *m*-, *p*-dibenzaldehydes (diCHO); dihalogenated benzenes with same moieties (diX), such as *o*-, *m*-, *p*-difluorobenzenes (diF), *o*-, *m*-, *p*-dichlorobenzenes (diCl) and *o*-, *m*-, *p*-dibromobenzenes (diBr); dihalogenated benzenes with different moieties (X/Y), such as *o*-, *m*-, *p*-chlorofluorobenzenes (F/Cl), *o*-, *m*-, *p*-bromochlorobenzenes (Cl/Br) and *o*-, *m*-, *p*-bromofluorobenzenes (F/Br); halogenated toluenes (Me/X), such as *o*-, *m*-, *p*-chlorotoluenes (Me/Cl), *o*-, *m*-, *p*-fluorotoluenes (Me/F) and *o*-, *m*-, *p*-bromotoluenes (Me/Br); halogenated methoxybenzenes (OMe/X), such as *o*-, *m*-, *p*-chloromethoxybenzenes (OMe/Cl), *o*-, *m*-, *p*-fluoromethoxybenzenes (OMe/F) and *o*-, *m*-, *p*-bromomethoxybenzenes (OMe/Br); halogenated benzaldehydes (CHO/X), such as *o*-, *m*-, *p*-chlorobenzaldehydes (CHO/Cl), *o*-, *m*-, *p*-fluorobenzaldehydes (CHO/F) and *o*-, *m*-, *p*-bromobenzaldehydes (CHO/Br); *o*-, *m*-, *p*-methoxytoluenes (Me/OMe); *o*-, *m*-, *p*-tolualde-

hydes (Me/CHO); *o*-, *m*-, *p*-methoxybenzaldehydes (OMe/CHO).

2.2 Preparation of buffers and analytes

The MEKC buffer contained 10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ at pH 9.2 and 50 mM SDS, while MEEKC buffer contained 10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ at pH 9.2, 50 or 60 mM SDS, 0.5% v/v ethyl acetate and 1.2% v/v 1-butanol. It should be noted that oils typically used in MEEKC include octane, heptane and ethyl acetate. However, ethyl acetate/water has lower interfacial tension and requires lower SDS concentration than octane/water or heptane/water to form stable microemulsions [4, 32]. In MEEKC with high EOF, the higher the SDS concentration, the longer the analysis time. Therefore, ethyl acetate with 50 and 60 mM SDS (1.4 and 1.7% w/v) was used in this work.

All buffers were sonicated for 30 min to obtain clear degassed solutions. Stock solutions of each analyte, thiourea (an EOF marker) and DB (a PSP marker), were separately prepared at a concentration of 10 000 ppm in methanol. In MEKC, the sample mixture containing the desired analytes, thiourea and DB at 100 ppm each, was obtained by pipetting each stock solution and then diluting the mixture with 50 mM SDS in water, while the sample mixture for MEEKC analysis was diluted with the solution containing 50 mM SDS in water, 0.5% v/v ethyl acetate and 1.2% v/v 1-butanol. All buffers and final test analytes solutions were filtered through a 0.45- μm PTFE membrane filters prior to CE analysis.

2.3 CE conditions

All the CE separations were performed using a Beckman Coulter MDQ-CE system equipped with a photo-DAD scanning from 190 to 300 nm and monitoring at 214 nm. An uncoated fused-silica capillary of 40.2 cm in length (30 cm to detector) $\times$ 50 μm id, thermostated at 25°C, was used. The voltage was set at 15 kV and the sample solution was introduced by 0.5 psi pressure injection for 3 s. Each experiment was carried out in triplicate. Between consecutive runs, the capillary was rinsed with methanol, 0.1 M NaOH for 2 min each and then with the buffer for 1 min.

3 Results and discussion

3.1 Retention and retention index in MEKC and MEEKC

In MEKC and MEEKC, the retention index of analytes can be estimated from the equation [20, 21]

$$I = \frac{100(\log k - b)}{a} \quad (1)$$

where a and b are the slope and the intercept, respectively, of a linear Eq. (2) between $\log k$ and z :

$$\log k = az + b \quad (2)$$

where z is the number of carbon atoms of a homologous series used as standard reference compounds. From an electropherogram of MEKC and MEEKC with high EOF, k for uncharged analytes can be calculated according to the equation:

$$k = \frac{t_m - t_{eo}}{t_{eo}(1 - t_m/t_{mc})} \quad (3)$$

where t_m , t_{mc} and t_{eo} are the migration times of an analyte, a PSP marker (dodecylbenzene) and an EOF marker (thiourea), respectively.

Table 1. Linear relationship between the $\log k$ and z values obtained from a homologous series of alkylbenzenes in MEEKC and MEKC

Mode	[SDS] mM	$\log k = az + b$		
		a	b	r^2
MEKC	50	0.448 ± 0.011	-2.695 ± 0.085	0.9987
MEEKC	50	0.442 ± 0.012	-2.615 ± 0.087	0.9986
MEEKC	60	0.443 ± 0.013	-2.534 ± 0.096	0.9984

Using a homologous series of BZ (C6 to C9), the linear relationship between $\log k$ and z was obtained, as given in Table 1. Similar methylene selectivity, where $\alpha_{CH_2} = a$ [29], indicates that the microemulsion and micellar phases have a similar hydrophobicity [21].

Figure 1 shows a comparison of the $\log k$ and I values for disubstituted benzenes, obtained from MEEKC and plotted against those obtained from MEKC, where I values were determined using BZ as standards. Comparison of I and k values between the same and different concentrations of SDS revealed a similar relative I for each analyte in MEEKC against MEKC (Fig. 1B and D) and thus the independence of I with respect to the SDS concentration, whilst a different relative $\log k$ value (Fig. 1A and C) was observed due to the dependence of k upon the SDS concentration. This implies that I can be used to compare the relative affinity of solutes in different PSP or phase ratios. Similar I values in MEKC and MEEKC were obtained for xylenes, dihalogenated benzenes and halogenated toluenes, while significantly smaller I values were observed in MEEKC than in MEKC for diCHO, diOMe and OMe/CHO. In addition, a slightly smaller I in MEEKC than in MEKC was observed for disubstituted benzenes containing a methoxy moiety or an aldehyde moiety, such as OMe/X, Me/OMe, CHO/X and Me/CHO. This may be explained as being due to the dominant hydrophobic interaction of the PSP-solute in the highly hydrophobic xylenes and dihalogenated benzenes resulting in a similar affinity of solutes in the micelles and the

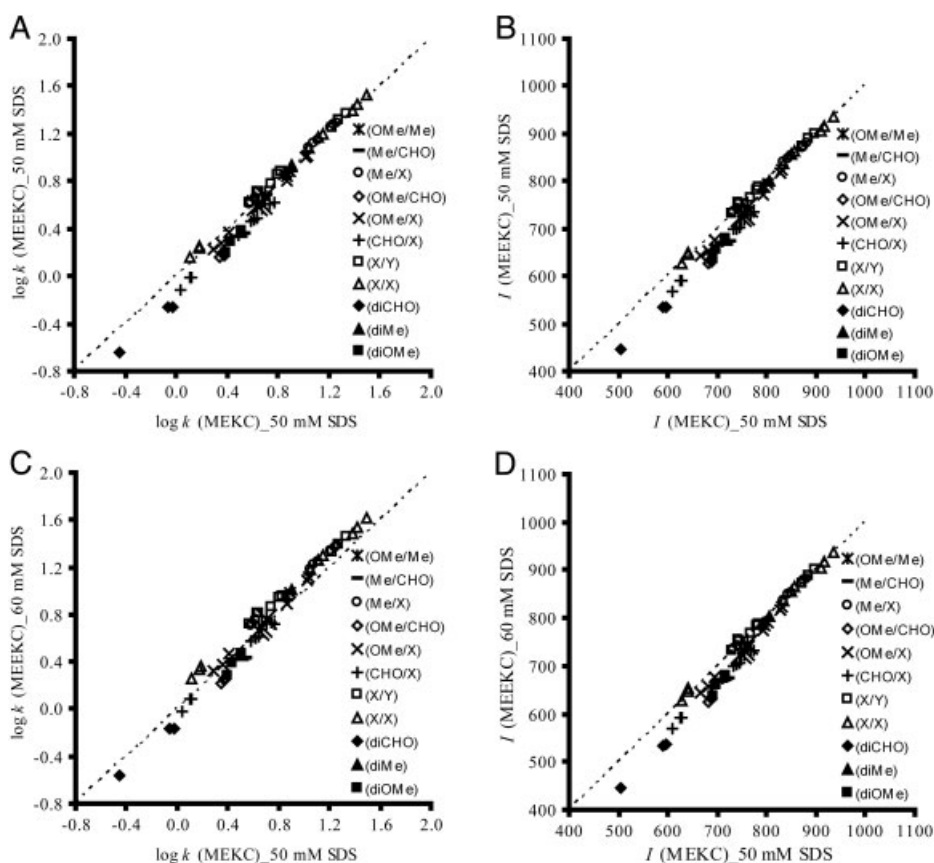


Figure 1. Plots of the observed $\log k$ (A and C) and I (B and D) values obtained for disubstituted benzenes in MEEKC against the same in MEKC.

microemulsion. Since the methoxy and aldehyde moieties are more polar than the alkyl and halogenated moieties, free 1-butanol in the aqueous solution and/or 1-butanol co-surfactant at the oil surface decreases K with different selectivity, resulting in a smaller I value in MEEKC than in MEKC. It should be noted that the retention for disubstituted benzenes are in the order of (i) diCHO < diOMe < diMe < diF < diCl < diBr, and (ii) F/Cl < F/Br < Cl/Br. The I order is similar to the log K_{ow} order given in Table 2.

3.2 Octanol–water distribution constant (log K_{ow}) determined by MEKC and MEEKC

The value of log K_{ow} may be determined from the linear relationship between log K_{ow} and log k [33–35] or log K_{ow}

and I [21, 28]. In our previous work, no significant difference was found between K_{ow} values obtained from k or I . In addition, a calibration plot of log K_{ow} against I is simpler when known values of nominal I for BZ are used as I standards [21] according to Eq. 4

$$\log K_{ow} = cI + d \quad (4)$$

where c and d are the slope and the intercept, respectively.

Using C6–C9 BZ as standards [21, 36], a log K_{ow} -nominal I calibration gives the best fit as a linear equation ($\log K_{ow} = 0.00516(\pm 0.0001)I - 0.970(\pm 0.080)$), with an r^2 value of 0.9992. The observed values of log K_{ow} for the disubstituted benzenes obtained from MEKC and MEEKC are shown in Table 2, with the literature values of the same compounds where available. Excellent agreement of log K_{ow} from MEKC and MEEKC was found for xylenes, dihalogenated benzenes

Table 2. Predicted and literature values of log K_{ow} values for the disubstituted benzenes in MEKC and MEEKC

Disubstituted benzene	log K_{ow}			Disubstituted benzene	log K_{ow}		
	Observed ^{a)}		Literature [36]		Observed ^{a)}		Literature [36]
	MEKC	MEEKC			MEKC	MEEKC	
<i>o</i> -diMe	3.12	3.10	3.12	<i>o</i> -Me/CHO	2.68	2.47	2.26
<i>m</i> -diMe	3.18	3.17	3.20	<i>m</i> -Me/CHO	2.74	2.51	NA
<i>p</i> -diMe	3.18	3.17	3.15	<i>p</i> -Me/CHO	2.71	2.48	NA
<i>o</i> -diF	2.33	2.38	NA	<i>o</i> -OMe/F	2.46	2.36	NA
<i>m</i> -diF	2.33	2.37	NA	<i>m</i> -OMe/F	2.61	2.53	NA
<i>p</i> -diF	2.26	2.27	NA	<i>p</i> -OMe/F	2.54	2.41	NA
<i>o</i> -diCl	3.42	3.45	3.38	<i>o</i> -OMe/Cl	2.69	2.50	NA
<i>m</i> -diCl	3.46	3.48	3.48	<i>m</i> -OMe/Cl	2.80	2.64	NA
<i>p</i> -diCl	3.34	3.34	3.38	<i>p</i> -OMe/Cl	2.84	2.64	NA
<i>o</i> -diBr	3.78	3.76	NA	<i>o</i> -OMe/Br	3.33	3.27	NA
<i>m</i> -diBr	3.87	3.85	NA	<i>m</i> -OMe/Br	3.32	3.24	NA
<i>p</i> -diBr	3.74	3.71	NA	<i>p</i> -OMe/Br	3.13	3.02	NA
<i>o</i> -F/Cl	2.87	2.91	NA	<i>o</i> -CHO/F	2.16	1.96	NA
<i>m</i> -F/Cl	2.88	2.91	NA	<i>m</i> -CHO/F	2.25	2.08	NA
<i>p</i> -F/Cl	2.79	2.80	NA	<i>p</i> -CHO/F	2.26	2.08	NA
<i>o</i> -F/Br	3.06	3.09	NA	<i>o</i> -CHO/Cl	2.95	2.86	NA
<i>m</i> -F/Br	3.09	3.11	NA	<i>m</i> -CHO/Cl	3.17	3.12	NA
<i>p</i> -F/Br	3.00	2.99	NA	<i>p</i> -CHO/Cl	3.14	3.08	NA
<i>o</i> -Cl/Br	3.61	3.62	NA	<i>o</i> -CHO/Br	2.87	2.66	NA
<i>m</i> -Cl/Br	3.68	3.68	NA	<i>m</i> -CHO/Br	2.99	2.80	NA
<i>p</i> -Cl/Br	3.55	3.54	NA	<i>p</i> -CHO/Br	3.03	2.82	NA
<i>o</i> -Me/F	2.85	2.86	NA	<i>o</i> -OMe/CHO	2.53	2.28	NA
<i>m</i> -Me/F	2.81	2.81	NA	<i>m</i> -OMe/CHO	2.56	2.32	NA
<i>p</i> -Me/F	2.80	2.80	NA	<i>p</i> -OMe/CHO	2.56	2.29	NA
<i>o</i> -Me/Cl	3.42	3.42	3.42	<i>o</i> -diOMe	2.59	2.33	NA
<i>m</i> -Me/Cl	3.38	3.38	3.28	<i>m</i> -diOMe	2.72	2.54	NA
<i>p</i> -Me/Cl	3.34	3.35	3.33	<i>p</i> -diOMe	2.63	2.42	NA
<i>o</i> -Me/Br	3.59	3.59	NA	<i>o</i> -diCHO	1.60	1.34	NA
<i>m</i> -Me/Br	3.55	3.56	NA	<i>m</i> -diCHO	2.09	1.80	NA
<i>p</i> -Me/Br	3.54	3.54	NA	<i>p</i> -diCHO	2.06	1.80	NA
<i>o</i> -Me/OMe	2.95	2.88	2.74				
<i>m</i> -Me/OMe	2.87	2.78	2.66				
<i>p</i> -Me/OMe	2.91	2.80	2.81				

NA = not available.

a) SD $\leq \pm 0.08$.

and halogenated toluenes, while in contrast a smaller $\log K_{ow}$ value was derived from MEEKC than from MEKC for the disubstituted benzenes containing a mono- or di-substituent of methoxy or aldehyde. This difference can be explained in a similar way as that of the differences in I values above. In addition, the observed $\log K_{ow}$ from MEKC and MEEKC was found to be in good agreement with the available literature values of some compounds, except for *o*-methylbenzaldehyde, indicating that in most cases either MEKC or MEEKC can be used for determination of $\log K_{ow}$.

3.3 Predicted and observed retention for disubstituted benzenes with different moieties

The group additive approach is based on the assumption of additive-constitutive properties [30, 37, 38], and is applied for calculation of $\log K_{ow}$ [29, 39, 40], from Eq. (5)

$$\log K_{ow}(PR) = \kappa(P) + \sum \kappa(R) \quad (5)$$

where $\kappa(P)$ and $\kappa(R)$ are the values of $\log K_{ow}$ for the parent P and substituent R, respectively.

The values of $\log K_{ow}$ for disubstituted benzenes with the same and different R-values are given by Eqs. (6)–(8), where P in this work refers to C_6H_4 .

$$\log K_{ow}(PR^1R^1) = \kappa(P) + 2\kappa(R^1) \quad (6)$$

$$\log K_{ow}(PR^2R^2) = \kappa(P) + 2\kappa(R^2) \quad (7)$$

$$\log K_{ow}(PR^1R^2) = \kappa(P) + \kappa(R^1) + \kappa(R^2) \quad (8)$$

It follows from Eqs. (6)–(8) that

$$\log K_{ow}(PR^1R^2) = \frac{\log K_{ow}(PR^1R^1) + \log K_{ow}(PR^2R^2)}{2} \quad (9)$$

Since $\log k$ and I are directly related to $\log K_{ow}$, it follows from Eqs. (2), (4) and (8) that

$$I(PR^1R^2) = \frac{I(PR^1R^1) + I(PR^2R^2)}{2} \quad (10)$$

and so

$$\log k(PR^1R^2) = \frac{\log k(PR^1R^1) + \log k(PR^2R^2)}{2} \quad (11)$$

Therefore, with a known $\log K_{ow}$, I and $\log k$ for the disubstituted benzenes with the same R moieties, the predicted values for disubstituted benzenes with a different R can be obtained from the average value for PR^1R^1 and PR^2R^2 , without having to know the values of κ .

Figure 2 compares the observed and predicted values of I for different disubstituted benzenes, using I data obtained from disubstituted benzenes with the same R. For example, the predicted I for *p*-chlorofluorobenzene is obtained from the average I for *p*-dichlorobenzene and *p*-difluorobenzene. In general, the observed values of I were found to be consistent with the predicted ones, and especially for halogenated toluenes and dihalogenated benzenes. However, poor agreement between the observed and predicted I values was seen for the methoxyaldehydes and tolualdehydes, and particularly in the case of the *ortho*-isomers. This may be caused by electronic effects for all positional isomers, such as the electron withdrawing by aldehyde groups and electron releasing by methoxy groups [41], and intramolecular interactions of the *ortho*-substituents on a change in the polarity of these compounds. This implies that the group additive approach is suitable for the prediction of the reliable retention rates for disubstituted benzenes with small effects of electronic affecting groups. It should be noted that, in previous work [31], the group additive approach was used for prediction of the micelle–water distribution constant (K_{mw}) in MEKC using a similar relationship to that of Eq. (5). However, the known values of κ_{mw} for P and R were needed and, moreover, the predicted values of K_{mw} for *o*-, *m*- and *p*- PR^1R^2 were equal, yet the observed values of K_{mw} for these positional isomers are in fact different.

3.4 Predicted and observed values of $\log k$ for disubstituted aromatic compounds from our previous work

In our previous work, the retention of bisphenol-A-diglycidyl ether derivatives (BADGEs) [26] and curcuminoids [42] containing two different moieties were observed to be good between those containing the same two moieties. Tables 3 and 4 show the good agreement between the predicted and observed $\log k$

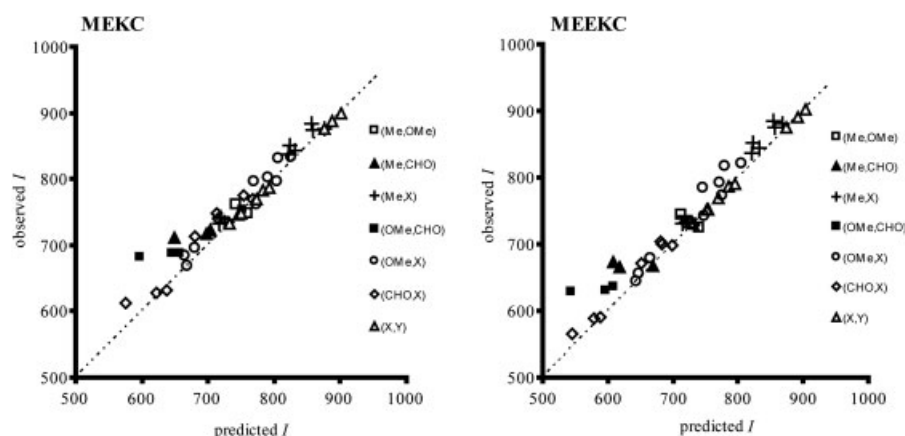
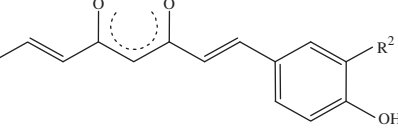


Figure 2. Plots of the observed and predicted I values obtained for disubstituted benzenes with different moieties in MEKC and MEEKC.

Table 3. Observed and predicted values of log *k* for curcuminoids containing two different R moieties (–OCH₃, –H)



Demethoxycurcumin
(R¹ = -OCH₃, R² = -H)

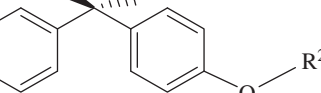
MEEKC conditions	log <i>k</i>	
	Predicted ^{a)}	Observed ^{b)}
(a) Various types and concentrations of organic co-solvents (+ 180 mM SDS)		
25% v/v ACN	0.651	0.649
25% v/v EtOH	0.828	0.825
25% v/v 2-PrOH	0.700	0.698
30% v/v 2-PrOH	0.602	0.600
(b) Various [SDS] and 25% v/v 2-PrOH		
130 mM	0.646	0.643
180 mM	0.700	0.698

The MEEKC buffer contained 50 mM phosphate at pH 2.5, 1.1% v/v *n*-octane, 890 mM 1-butanol plus SDS and organic co-solvents as indicated in the table. Other CE conditions are as reported in [42].

a) Obtained from the average log *k* for bis-demethoxycurcumin (R¹ = R² = –OCH₃) and curcumin (R¹ = R² = –H).

b) Data from previous work [42]. RSD for *k* < 1.0%.

Table 4. Observed and predicted values of log *k* for BADGE and BADGE.HCl containing two different substituting groups



BADGE.HCl.H₂O
(R¹ = 2,3-dihydroxypropyl, R² = 3-chloro-2-hydroxypropyl)

BADGE.H₂O
(R¹ = 2,3-dihydroxypropyl, R² = glycidyl ether)

CE conditions	log <i>k</i> in MEEKC				log <i>k</i> in MEKC			
	BADGE.HCl.H ₂ O		BADGE.H ₂ O		BADGE.HCl.H ₂ O		BADGE.H ₂ O	
	Predicted	Observed	Predicted	Observed	Predicted	Observed	Predicted	Observed
(a) Various types of organic co-solvents at 25% v/v and 180 mM SDS								
ACN	0.591	0.613	0.567	0.569	1.00	1.03	0.945	0.950
EtOH	0.571	0.582	0.538	0.531	1.44	1.48	1.36	1.36
2-PrOH	0.502	0.506	0.481	0.469	0.887	0.914	0.850	0.849
(b) Various [SDS] and 25% v/v EtOH								
180 mM	0.571	0.582	0.538	0.531	1.44	1.48	1.36	1.36
140 mM	0.511	0.524	0.474	0.467	1.38	1.41	1.29	1.28
100 mM	0.413	0.424	0.368	0.362	1.31	1.34	1.20	1.19

The MEKC buffer contained 50 mM phosphate at pH 2.5, plus SDS and organic co-solvents as indicated. The MEEKC buffer contained 50 mM phosphate at pH 2.5, 1.0% v/v *n*-octane, 890 mM 1-butanol, plus SDS and organic co-solvents as indicated. Other CE conditions were as reported in [26]. RSD for *k* < 1.5%.

values obtained for the curcuminoid and bisphenol-A-diglycidyl ether each containing two different moieties, which indicates that the group additive approach can also be extended to be used for prediction of the retention of disubstituted aromatic compounds with a large parent molecule.

4 Concluding remarks

The values of *k* and *I* for disubstituted benzenes in MEKC and MEEKC were determined. Comparing the relative *I* values for each solute in MEEKC against those in MEKC, revealed very

similar values, and was independent of I with respect to the SDS concentration. In contrast, under the same comparisons, different relative k values were found. This implies that I , rather than k , can be used as the parameter to compare the relative affinity of compounds in MEEKC and MEKC that have different PSP and phase ratios. A similar I value in both the MEEKC and MEKC was observed for the disubstituted benzenes with $-\text{CH}_3$ and/or halogen moieties ($-\text{F}$, $-\text{Cl}$ and $-\text{Br}$). In contrast, the same disubstituted benzenes with $-\text{CHO}$ and $-\text{OCH}_3$ moieties revealed a smaller I value being obtained in MEEKC than in MEKC, presumably because free 1-butanol in the aqueous phase in MEEKC increases the solubility of the solutes and thereby, reduces the affinity or I of the solutes in the microemulsion. In addition, the predicted $\log k$ and I values for disubstituted benzenes with different moieties of $-\text{CH}_3$ and halogens were found to be in excellent agreement with the observed values, when the predicted values were obtained from the average for disubstituted benzenes with same moieties, according to a group additive approach. However, a significant difference between the observed and predicted retention was found for disubstituted benzenes with at least one moiety of $-\text{CHO}$ or $-\text{OCH}_3$, due to electronic effects of polar moieties causing a deviation in the actual affinity of solutes away from the predicted interactions.

The authors gratefully thank the 90th Anniversary of Chulalongkorn University (CU) Fund, the Ratchaphisak Somphot Endowment Fund, and the Thailand Research Fund (RMU5080054) for financial support, and the Center for Petroleum, Petrochemicals and Advanced Materials, CU, for partial support.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Pappas, T. J., Gayton-Ely, M., Holland, L. A., *Electrophoresis* 2005, 26, 719–734.
- [2] Silva, M., *Electrophoresis* 2009, 30, 50–64.
- [3] Huie, C. W., *Electrophoresis* 2006, 27, 60–75.
- [4] Ryan, R., Donegan, S., Power, J., McEvoy, E., Altria, K., *Electrophoresis* 2009, 30, 65–82.
- [5] Hansen, S. H., *Electrophoresis* 2003, 24, 3900–3907.
- [6] Okamoto, H., Nakajima, T., Ito, Y., *J. Chromatogr. A* 2003, 986, 153–161.
- [7] McEvoy, E., Donegan, S., Power, J., Altria, K. D., *Chromatographia* 2008, 68, 56–59.
- [8] Wu, C. H., Chen, T. H., Huang, K. P., Wang, G. R., Liu, C. Y., *Electrophoresis* 2007, 28, 3691–3696.
- [9] Tripodi, V., Flor, S., Carlucci, A., Lucangioli, S., *Electrophoresis* 2006, 27, 4431–4438.
- [10] Zang, H. G., Zhu, J. H., Qi, S. D., Chen, X. G., Hu, Z. D., *Biomed. Chromatogr.* 2007, 21, 1083–1087.
- [11] Muijselaar, P. G., *J. Chromatogr. A* 1997, 780, 117–127.
- [12] Huhn, C., Pütz, M., Pyell, U., *Electrophoresis* 2008, 29, 783–795.
- [13] Altria, K. D., *J. Chromatogr. A* 2000, 892, 171–186.
- [14] Altria, K. D., Clark, B. J., Mahuzier, P. -E., *Chromatographia* 2000, 52, 758–768.
- [15] Altria, K. D., Broderick, M. F., Donegan, S., Power, J., *Electrophoresis* 2004, 25, 645–652.
- [16] Terabe, S., Otsuka, K., Ichikawa, K., Ando, T., *Anal. Chem.* 1984, 56, 111–113.
- [17] Terabe, S., Otsuka, Y., Ando, T., *Anal. Chem.* 1985, 57, 834.
- [18] Miola, M. F., Snowden, M. J., Altria, K. D., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998, 18, 785–797.
- [19] Pedersen-Bjergaard, S., Gabel-Jensen, C., Honoré Hansen, S., *J. Chromatogr. A* 2000, 897, 375–381.
- [20] Muijselaar, P. G. H. M., Claessens, H. A., Cramers, C. A., *Anal. Chem.* 1994, 66, 635–644.
- [21] Poouthree, K., Leepipatpiboon, N., Petsom, A., Nhujak, T., *Electrophoresis* 2007, 28, 767–778.
- [22] Poole, S. K., Poole, C. F., *J. Chromatogr. A* 2008, 1182, 1–24.
- [23] Yang, S., Khaledi, M. G., *J. Chromatogr. A* 1995, 692, 301–310.
- [24] Yang, S., Khaledi, M. G., *Anal. Chem.* 1995, 67, 499–510.
- [25] Song, L., Ou, Q., Yu, W., Li, G., *J. Chromatogr. A* 1995, 699, 371–382.
- [26] Pooutree, K., Soonthorntantikul, W., Leepipatpiboon, N., Nhujak, T., *Electrophoresis* 2007, 28, 3705–3711.
- [27] Terabe, S., Matsubara, N., Ishihama, Y., Okada, Y., *J. Chromatogr.* 1992, 608, 23–29.
- [28] Ishihama, Y., Oda, Y., Uchikawa, K., Asakawa, N., *Anal. Chem.* 1995, 67, 1588–1595.
- [29] Mertzman, M. D., Foley, J. P., *J. Chromatogr. A* 2005, 1073, 181–189.
- [30] Ahuja, E. S., Foley, J. P., *Analyst* 1994, 119, 353–360.
- [31] Kelly, K. A., Burns, S. T., Khaledi, M. G., *Anal. Chem.* 2001, 73, 6057–6062.
- [32] Zhao, Y., Ming, Y., Zhang, H., Luo, X., Chen, L., Li, Y., *Chromatographia* 2005, 62, 611–615.
- [33] Klotz, W. L., Schure, M. R., Foley, J. P., *J. Chromatogr. A* 2001, 930, 145–154.
- [34] Gong, S., Bo, T., Huang, L., Li, K. A., Liu, H., *Electrophoresis* 2004, 25, 1058–1064.
- [35] Molina, M., Silva, M., *Electrophoresis* 2000, 21, 3625–3633.
- [36] David, R. L., *Handbook of Chemistry and Physics*, 88th Edn, CRC Press, Taylor & Francis Group, London 2007–2008, Chapter 16, pp. 16–41.
- [37] Leo, A. J., *Chem. Rev.* 1993, 93, 1281–1306.
- [38] Smith, G. A., Christian, S. D., Tucker, E. E., *Langmuir* 1987, 3, 598–599.
- [39] Herbert, B. J., Dorsey, J. G., *Anal. Chem.* 1995, 67, 744–749.
- [40] Xia, Z., Jiang, X., Mu, X., Chen, H., *Electrophoresis* 2008, 29, 835–842.
- [41] Streitwieser, A., Heathcock, C. H., Kosower, E. M., *Introduction to Organic Chemistry*, 4th Edn, Macmillan Publishing Company, New York 2006.
- [42] Nhujak, T., Saisuan, W., Srisa-art, M., Petsom, A., *J. Sep. Sci.* 2006, 29, 666–676.

ภาคผนวก 3

ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสาร

Electrophoresis 32 (2011), 203-209

แบบจำลองทางทฤษฎีของค่าจำเพาะการแยกสำหรับสารที่มีประจุ
ในไมเซลล์าร์อิเล็กโตรไคเนติกโครมาโทกราฟี

**Theoretical Models of Separation Selectivity for Charged Compounds
in Micellar Electrokinetic Chromatography**

Chanida Puangpila¹
Amorn Petsom²
Thumnoon Nhujak¹

¹Chromatography and
Separation Research Unit,
Department of Chemistry,
Faculty of Science,
Chulalongkorn University,
Bangkok, Thailand

²Research Center for Bioorganic
Chemistry, Department of
Chemistry, Faculty of Science,
Chulalongkorn University,
Bangkok, Thailand

Received March 8, 2010

Revised October 18, 2010

Accepted October 18, 2010

Research Article

Theoretical models of separation selectivity for charged compounds in micellar electrokinetic chromatography

Equations and theoretical models for MEKC separation selectivity (α_{MEKC}) were established to explain a change in separation and electrophoretic mobility order of fully charged analytes, in which α_{MEKC} is related to the dimensionless values of mobility selectivity in CZE (α_{CZE}) and retention selectivity (α_k) in MEKC, and where α_{CZE} and α_k are defined as the ratio of electrophoretic mobility in CZE and the ratio of retention factor (k) in MEKC for two charged analytes, respectively. Using four alkylparabens as test analytes, excellent agreement was found between the observed α_{MEKC} and the proposed α_{MEKC} models of test analytes in MEKC over a wide range of SDS concentrations and values of k . For example, in comparison with CZE separation of charged analytes, MEKC separation can enhance separation selectivity up to the maximum value when the selectivity ratio (ρ) is greater than 1.0 ($\rho = \alpha_k/\alpha_{\text{CZE}}$), while lower separation selectivity is obtained with $\rho < 1.0$ ($\alpha_{\text{CZE}} > \alpha_k > 1$).

Keywords:

Charged compounds / MEKC / Mobility selectivity / Retention selectivity / Separation selectivity
DOI 10.1002/elps.201000405

1 Introduction

MEKC is one of the modes in CE in which the MEKC buffer contains a surfactant, such as SDS, to form micelles acting as a pseudo-stationary phase [1–5]. MEKC is widely used for separation of neutral and charged compounds as reported in reviews covering the literature up to 1999 [6], 2002 [7], 2003 [8], 2005 [3], and 2009 [9]. The MEKC separation of neutral analytes is performed using ionic surfactants [1, 3–6, 9–13], while charged analytes are separated using ionic, or non-ionic surfactants [1, 3, 4, 6, 9, 10, 14–16]. With different partitioning of analytes in the micelle, neutral as well as charged analytes show differences in effective electrophoretic mobility ($\Delta\mu$), and therefore these can be separated in MEKC [2, 3, 6, 14, 17, 18]. Typically, the resolution, R_s , of two analytes in CE is given by [19, 20]:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left| \frac{\Delta\mu}{\bar{\mu} + \mu_{\text{eo}}} \right| \quad (1)$$

where N is the number of theoretical plates or efficiency, μ is the effective electrophoretic mobility, $\Delta\mu$ is the difference in μ , $\mu_2 - \mu_1$, for two analytes, and μ_{eo} is the electroosmotic mobility. For two analytes with same direction of μ , Eq. (1) may be rearranged to relate to the resolution R_s to the efficiency term, the selectivity term, and the mobility term as expressed in the following equation:

$$R_s = \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left(\frac{\alpha_m - 1}{\alpha_m} \right) \left| \frac{\mu_2}{\bar{\mu} + \mu_{\text{eo}}} \right| \quad (2)$$

where α_m is the separation selectivity or mobility selectivity, which is defined as the ratio of effective electrophoretic mobilities for two analytes such as μ_2/μ_1 for $|\mu_2| > |\mu_1|$.

In MEKC with normal elution mode, the same direction of electroosmotic velocity (v_{eo}), the observed velocity of analytes and observed velocity of micelles (v_{mc}), and $|v_{\text{eo}}| > |v_{\text{mc}}|$, the resolution equation for neutral analytes can be expressed to relate to the retention term as follows [21, 22]:

$$R_s = \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left(\frac{\alpha_k - 1}{\alpha_k} \right) \left(\frac{k_2}{1 + k} \right) \left(\frac{1 - t_{\text{eo}}/t_{\text{mc}}}{1 + (t_{\text{eo}}/t_{\text{mc}})k} \right) \quad (3)$$

where k is the retention factor, α_k is the retention selectivity defined as the ratio of k such as k_2/k_1 , and t_{eo} and t_{mc} are the migration times of an EOF marker and a micelle marker, respectively.

With the normal elution mode of the MEKC separation of fully charged analytes due only to the difference in micellar partitioning and not in their electrophoretic

Correspondence: Associate Professor Thumnoon Nhujak, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand
E-mail: thumnoon.n@chula.ac.th
Fax: +66-2-218-7598.

Abbreviations: BP, butyl *p*-hydroxybenzoate; EP, ethyl *p*-hydroxybenzoate; IP, methyl *m*-hydroxybenzoate; PP, propyl *p*-hydroxybenzoate

mobilities, the resolution equation is given as follows [21]:

$$R_s = \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left(\frac{\alpha_k - 1}{\alpha_k} \right) \left(\frac{k_2}{1+k} \right) \times \left(\frac{1+t_{eo}/t_{ep} - t_{eo}/t_{mc}}{1+t_{eo}/t_{ep} + (t_{eo}/t_{mc})k} \right) \quad (4)$$

where t_{ep} is the migration time corresponding to the electrophoretic mobility of the charged analyte, and $t_{ep} = t_{ep2} = t_{ep1}$ for this case.

It can be seen in Eqs. (3) and (4) that the separation selectivity may be now referred to the retention selectivity. In the case of analytes with a difference in their electrophoretic mobility (μ_0) at zero concentration of surfactant or CZE, the MEKC separation is based on the differences in both k and μ_0 . In comparison with the CZE separation of charged analytes, the addition of surfactant to the MEKC buffer may result in improved separation for some analytes, but lowered degree of separation for other analytes [4, 10, 13–17, 23–26]. These dual effects are similar to those seen in chiral separation using dual cyclodextrins as reported in our previous work [27].

In order to explain the separation selectivity and electrophoretic mobility order in MEKC for charged analytes with differences in μ_0 , the aims of this work are to establish theoretical models of MEKC separation selectivity which is related to the dimensionless values of mobility selectivity in CZE and retention selectivity in MEKC, and to compare the observed and predicted separation selectivity in MEKC. The MEKC separation with normal elution mode was carried out using SDS surfactant in a 10-mM disodium tetraborate buffer at pH 10.2, and the test analytes used were alkyl-parabens.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals

All the test analytes were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany): isomethylparaben (methyl *m*-hydroxybenzoate; IP), ethylparaben (ethyl *p*-hydroxybenzoate; EP), propylparaben (propyl *p*-hydroxybenzoate; PP), and butylparaben (butyl *p*-hydroxybenzoate; BP). Sodium hydroxide and disodium tetraborate decahydrate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) were supplied by Fluka (Buchs, Switzerland), SDS from Sigma (St. Louis, MO, USA), all organic solvents obtained from Merck (Dramstadt, Germany), and dodecylbenzene/micellar marker (M) from Sigma-Aldrich.

2.2 CE conditions

CE experiments were carried out with a Beckman Coulter MDQ-CE system equipped with a photo-DAD scanning from 190 to 300 nm and monitoring at 220 nm. The data-

handling system comprised an IBM PC and 32 Karat Software. The uncoated fused-silica capillary, 40.2 cm in length (30 cm to detector) $\times$ 50 μm id (Polymicro Technologies, AZ), was used for CZE and MEKC separations, thermostated at 25°C. Voltage was set at 15 kV. A sample solution was introduced by 0.5 psi pressure injection for 3 s. Prior to each daily analysis, the capillary was rinsed sequentially for 15 min with methanol, 0.1 M NaOH, water, and a running buffer. Between consecutive runs, the capillary was flushed with 0.1 M NaOH and then with a running buffer, each for 2 min. All experiment runs were performed in duplicate.

2.3 Buffering electrolytes

The electrophoretic mobilities were determined in two buffer systems: (1) CZE with 10 mM disodium tetraborate buffer, adjusted to pH 10.2 with 1.0 M NaOH, and (2) MEKC with 20 to 60 mM SDS in a pH 10.2 10 mM disodium tetraborate buffer. All buffers were prepared using Milli-Q water, sonicated for 30 min, and then filtered through 0.45 μm PTFE filters prior to use.

2.4 Stock and standard solutions

Each test analyte was separately dissolved in 5 mL of ACN, and then each analyte solution was diluted with Milli-Q water in a 10 mL volumetric flask to give 1000 ppm stock solutions. Stock solutions of DB and thiourea were also separately dissolved in ethanol, and then diluted to 20 000 ppm with Milli-Q water. A working standard solution containing 20–60 ppm of each test analyte, 30 ppm thiourea, and 150 ppm DB was prepared by diluting each of the stock solutions with a 1.0 mM borate buffer. All solutions were filtered through 0.45 μm PTFE filters prior to analysis.

3 Results and discussion

3.1 Theoretical models of separation selectivity in MEKC for charged compounds

In MEKC, effective electrophoretic mobilities of two fully charged analytes, μ_{MEKC} , are given by [21]

$$\mu_{(\text{MEKC},1)} = \left(\frac{\mu_{0,1} + k_1 \mu_{mc}}{1 + k_1} \right) \quad (5)$$

$$\mu_{(\text{MEKC},2)} = \left(\frac{\mu_{0,2} + k_2 \mu_{mc}}{1 + k_2} \right) \quad (6)$$

where μ_0 is the electrophoretic mobility at zero concentration of SDS or under CZE conditions, and μ_{mc} is the electrophoretic mobility of the micelle marker. Subscripts 1

and 2 refer to the analytes 1 and 2, respectively. The separation selectivity in MEKC (α_{MEKC}), the ratio of μ_{MEKC} with $k_2 \geq k_1 > 0$, may be rearranged to relate to the dimensionless values as follows:

$$\alpha_{\text{MEKC}} = \alpha_{\text{CZE}} \left(\frac{\beta + \frac{\alpha_k}{\alpha_{\text{CZE}}} k_1}{\beta + k_1} \right) \left(\frac{(1+k_1)}{1+\alpha_k k_1} \right) \quad (7)$$

where α_{CZE} is the mobility selectivity in CZE or the ratio of μ_0 , e.g. $\mu_{0,2}/\mu_{0,1}$, α_k is the retention selectivity of the SDS surfactant for two analytes or the ratio of k , e.g. k_2/k_1 , and β is the ratio for $\mu_{0,1}/\mu_{\text{mc}}$. It should be noted that α_k is always ≥ 1.0 . The value of $\alpha_{\text{CZE}} > 1.0$ refers to the same order of $|\mu|$ in CZE and k in MEKC, e.g. $k_2 > k_1$ and $|\mu_2| > |\mu_1|$, whereas $\alpha_{\text{CZE}} < 1.0$ refers to the reversed order of $|\mu|$ in CZE and k in MEKC, e.g. $k_2 > k_1$ and $|\mu_2| < |\mu_1|$.

According to Eq. (7) and our previous work on theoretical models of separation selectivity of chiral separation using dual cyclodextrins [27], the proposed theoretical models of α_{MEKC} for two charged analytes in MEKC can be classified into four types as listed in Table 1, based on the ranges of α_{CZE} , α_k , ρ , and the order of $|\mu|$ in CZE and k in MEKC. In order to predict the value of α_{MEKC} for two charged analytes, the value of β in Eq. (7) is assumed to be equal to 0.5. Figure 1 shows plots of the α_{MEKC} model of Types I–III over a wide range of k_1 . Practically, an increase in k may be obtained by an increase in the concentration of SDS ([SDS]) in an MEKC buffer.

According to the α_{MEKC} model for Type I in Fig. 1A, at a fixed value of ρ except in the case $\rho \approx 1.0$, the value of α_{MEKC} increases with an increase in k_1 to a maximum value, and then decreases at higher values of k_1 . At a fixed value of k_1 , the higher the value of α_k , the greater the value of α_{MEKC} . The k_1 giving the maximum α_{MEKC} value decreases as the value of α_k increases. Therefore, the α_{MEKC} model of Type I shows that, with the same order of $|\mu|$ in CZE and k in MEKC for charged analytes, higher α_k than α_{CZE} can improve α_{MEKC} of two solutes in MEKC. In contrast to Type I, the α_{MEKC} model for Type II ($\alpha_k \leq \alpha_{\text{CZE}}$) in Fig. 1B shows that the value of α_{MEKC} decreases with an increase in k_1 , implying poorer separation for two charged analytes. For the reversed order of $|\mu|$ in CZE and k in MEKC for charged analytes as shown in Fig. 1C, the theoretical α_{MEKC} for the Type III model starts from less than 1.0 ($1/\alpha_{\text{MEKC}} > 1$) to near 1.0 (poorer separation) with increasing k_1 and then higher than 1.0 (better separation) at higher k_1 values. At an

α_{MEKC} of 1.0, the value of k_1 is given by:

$$k_1 = \frac{(1 - \alpha_{\text{CZE}})}{(\alpha_{\text{CZE}} - \alpha_k) + (\alpha_k - 1)/\beta} \quad (8)$$

The small value of α_k gives a higher k_1 at α_{MEKC} 1.0, which is consistent with the bottom line for α_{MEKC} of 0.99 in Fig. 1C. It should be noted that for a theoretical value of α_{CZE} or $\alpha_{\text{MEKC}} < 1.0$, the practical separation selectivity is equal to $1/\alpha_{\text{CZE}}$ or $1/\alpha_{\text{MEKC}}$. Therefore, an increase in k_1 may result in a reversed order of electrophoretic mobility for two charged analytes in MEKC. The model Type IV ($\alpha_k = 1.0$ and $\alpha_{\text{CZE}} = 1.0$) indicates that no resolution is obtained for two solutes (plot not shown).

As can be seen in Fig. 1, the theoretical model of α_{MEKC} can be employed to describe the separation of two charged analytes. The greater the α_{MEKC} value ($\alpha_k > 1.0$), the greater the resolution. Better separation selectivity in MEKC over CZE can be obtained for the α_{MEKC} Type I ($\alpha_k > \alpha_{\text{CZE}}$), or Type III models ($\alpha_k > \alpha_{\text{CZE}}$, or $\alpha_k > 1/\alpha_{\text{CZE}}$) at appropriate values of k_1 .

It should be noted that the direction of EOF velocity and total velocity does not affect the electrophoretic mobility of analytes and micelles, and the retention factor of analytes in MEKC. Owing to independence of the values of α_{m} and α_k with the direction of these velocities, our proposed selectivity models can be used for MEKC with normal, reversed, and restricted modes classified by the direction of EOF and total velocity as details given in [22].

3.2 Observed and predicted α_{MEKC} for negatively charged compounds in MEKC with normal elution mode and anionic SDS surfactant

In this work, parabens such as IP, BP, PP, and EP, a weak acid with $\text{HO-C}_6\text{H}_4\text{COOR}$, were chosen as test analytes. In a basic buffer with $\text{pH} > \text{pK}_a$ of parabens, these parabens can carry a negative charge. The apparent pK_a values were found to be 8.80, 7.98, 8.00, and 7.97, respectively (literature values of 9.2 for IP [28] and 8.4 for other parabens [29]). It should be noted that the apparent pK_a values were determined by measuring effective mobility (μ_{eff}) in CZE with a 10-mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ buffer at various pH values of 7.8–10.2, and plotting $1/\mu_{\text{eff}}$ versus $10^{-\text{pH}}$ ($[\text{H}_3\text{O}^+]$) to obtain pK_a from log (slope/Y-intercept) [30]. A pH 10.2 borate buffer was used to

Table 1. Types of theoretical models for α_{MEKC}

Type	Order of $ \mu $ in CZE and k in MEKC	α_{CZE}	α_k	ρ	Assumed values		
					α_{CZE}	α_k	β
I	Same	$\alpha_{\text{CZE}} \geq 1$	$\alpha_k > \alpha_{\text{CZE}} \geq 1$	$\rho > 1$	1.1	1.2–3.3	0.5
II	Same	$\alpha_{\text{CZE}} > 1$	$\alpha_{\text{CZE}} \geq \alpha_k \geq 1$	$\rho \leq 1$	1.5	1.0–1.5	0.5
III	Reversed	$\alpha_{\text{CZE}} < 1$	$\alpha_k \geq 1 > \alpha_{\text{CZE}}$	$\rho > 1$	0.8	1.0–6.4	0.5
IV	Co-migration	$\alpha_{\text{CZE}} = 1$	$\alpha_k = \alpha_{\text{CZE}} = 1$	$\rho = 1$	—	—	0.5

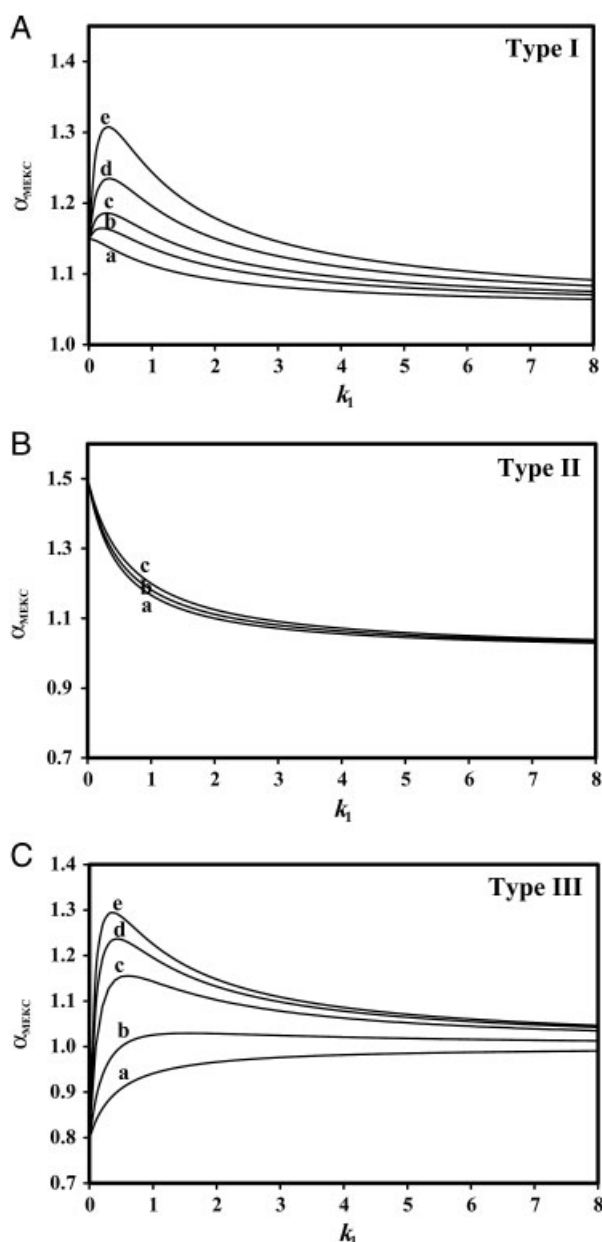


Figure 1. Predicted models of the separation selectivity (α_{MEKC}) for two charged analytes in MEKC. Calculation using Eq. (7) and data as listed in Table 1. a–e refer to the values of α_k for (A) 1.2, 1.4, 1.7, 2.2 and 3.3, respectively, (B) 1.0, 1.2 and 1.5, respectively, and (C) 1.0, 1.6, 3.2, 4.8 and 6.4, respectively.

afford almost fully negatively charged analytes with degrees of ionization of 0.96 for IP and 0.99 for other parabens, calculated using apparent $\text{p}K_a$ determined under our CE conditions and the equation for degrees of ionization reported in the textbook [31].

In order to obtain the predicted value of α_{MEKC} for two charged analytes in MEKC, the following parameters must be known: the mobility selectivity in CZE, the retention selectivity in MEKC, and the retention factor in MEKC. Figure 2 shows the separations of parabens using an SDS-

free system (or a CZE system) and an MEKC system with various SDS concentrations (20–60 mM). From CZE separation (Fig. 2A), in which the electrophoretic mobility vectors of negatively charged parabens are opposite to an EOF vector, the migration time order EP>PP>BP>IP with the effective electrophoretic mobilities μ of -2.25 , -2.13 , -2.03 and $-1.97 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectively, indicates the $|\mu|$ order EP>PP>BP>IP, in line with the charge-to-size ratio for homologous series EP>PP>BP. The smaller $|\mu|$ for IP than other parabens may be due to the smaller degree of ionization, and/or larger hydrodynamic size of IP.

Theoretically, for MEKC separation of neutral analytes with normal elution mode in ionic surfactant, the migration behavior depends only on the retention factors of the analytes. The higher the retention factor, the longer the migration time. However, for the MEKC separation of charged analytes with the above conditions, the migration behavior depends on the electrophoretic mobility and retention factor of each analyte, and therefore it is difficult to predict the order of the migration time or the effective electrophoretic mobility in MEKC.

The retention factor k is calculated from MEKC electropherograms using the following equation [18, 21, 32]:

$$k = \frac{\mu_{\text{MEKC}} - \mu_0}{\mu_{\text{mc}} - \mu_{\text{MEKC}}} \quad (9)$$

where all parameters are previously defined in Eqs. (5) and (6). From the MEKC electropherograms in Fig. 2B–D, the retention factors (Table 2) for negatively charged parabens were obtained in the order BP>PP>IP>EP, which are consistent with the magnitude order of octanol–water distribution constants in this series BP>PP>EP [33–35].

As seen in Fig. 2D for MEKC separation with 60 mM SDS, the order of t_m or $|\mu_{\text{MEKC}}|$ is obtained to be BP>PP>IP>EP, whereas different orders are obtained in MEKC at 20 mM SDS (Fig. 2B): BP>PP>EP>IP, and in CZE (Fig. 2A), EP>PP>BP>IP. These differences in migration behavior can be explained using the separation selectivity models in Section 3.1.

Figure 3 shows the observed and predicted values of α_{MEKC} for parabens in MEKC over a wide range of [SDS] (Fig. 3A) and k_1 values (Fig. 3B). The former is useful to consider the SDS concentration giving the achieve resolution of all solutes and the reversed migration, whereas the latter is useful to compare the observed and the predicted model without known [SDS]. The predicted values of α_{MEKC} at different [SDS] (6.0–60 mM) were calculated using data in Table 2 and Eq. (7). Table 2 also lists the mobility selectivity, retention selectivity, retention factor, selectivity ratio, and predicted models of α_{MEKC} . As previously mentioned, for MEKC separation of a particular analyte pair, such as PP and IP, k_1 refers to the retention factor for the solute with smaller k , such as k_{IP} . Using a wide range of [SDS] (20–60 mM), the observed k_1 can be plotted against [SDS] to derive a linear calibration plot, allowing predicted values of k_1 at various [SDS] to be obtained. Using data in Table 2 and Eq. (7), the observed values of α_{MEKC} in Fig. 3 were found to

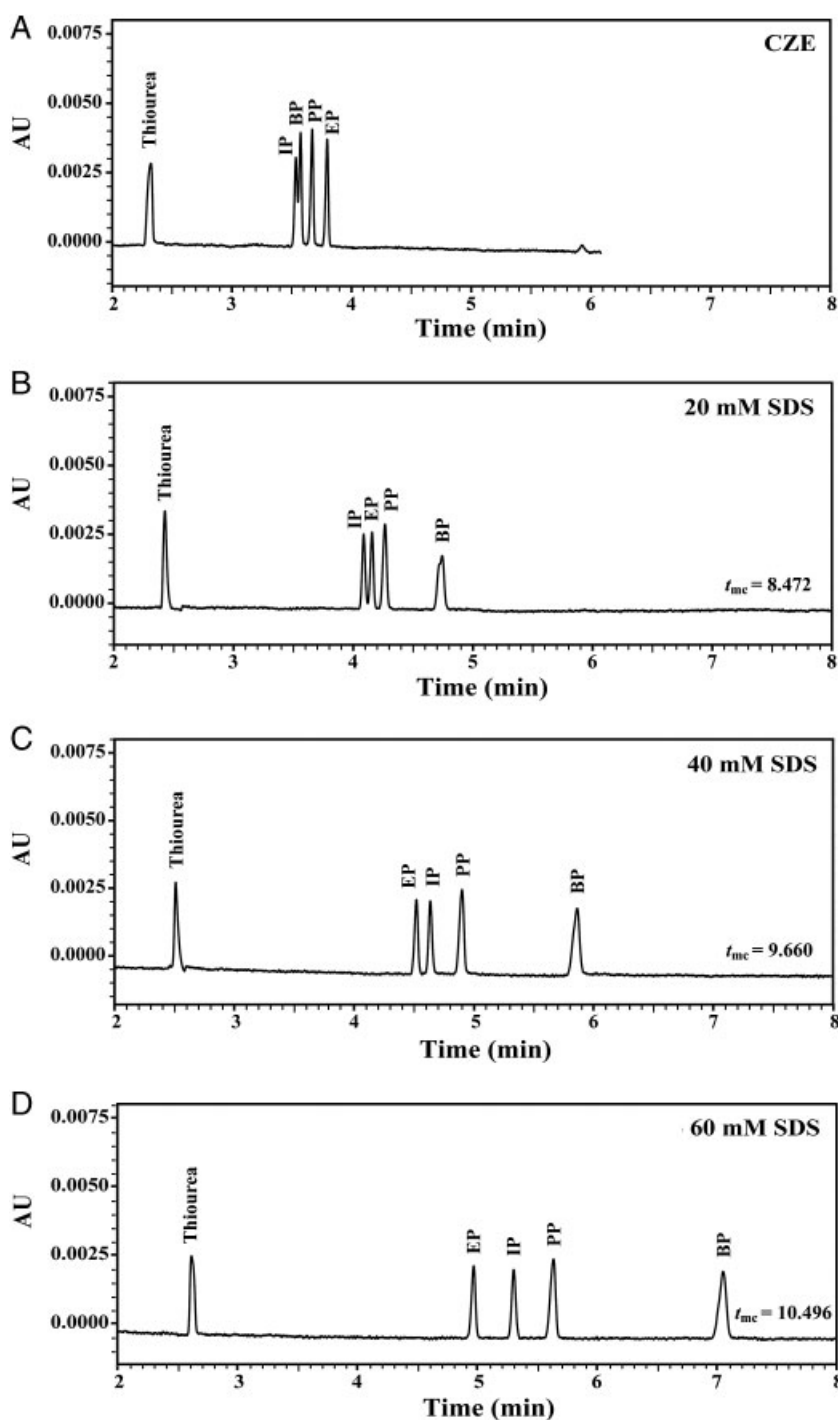


Figure 2. Electropherograms of parabens using (A) 0 (CZE), (B) 20, (C) 40, and (D) 60 mM SDS in a 10-mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ buffer adjusted to pH 10.2 with 1.0 M NaOH. Other CE conditions: uncoated fused-silica capillary, 50 μm id $\times$ 40.2 cm (30 cm to the detector), a temperature of 25°C, an applied voltage of 15 kV, UV detection at 220 nm, and 0.5 psi pressure injection for 3 s.

Table 2. Mobility selectivity (α_{CZE}), retention selectivity (α_k), retention factor (k_1), selectivity ratio (ρ), and types of α_{MEKC} model

Pair	Solute 1	$k_1 = a[\text{SDS}] + b$	α_{CZE}	α_k	β	ρ	Types of model for α_{MEKC} in MEKC
IP/EP	EP	$0.00236[\text{SDS}] - 0.013$	0.888	$k_{\text{IP}}/k_{\text{EP}}$	0.575	$\rho > 1$	III
PP/IP	IP	$0.00871[\text{SDS}] - 0.028$	1.066	$k_{\text{PP}}/k_{\text{IP}}$	0.511	$\rho > 1$	I
BP/PP	PP	$0.01004[\text{SDS}] - 0.035$	0.953	$k_{\text{BP}}/k_{\text{PP}}$	0.544	$\rho > 1$	III
	BP	$0.03068[\text{SDS}] - 0.057$	—	—	—	—	—

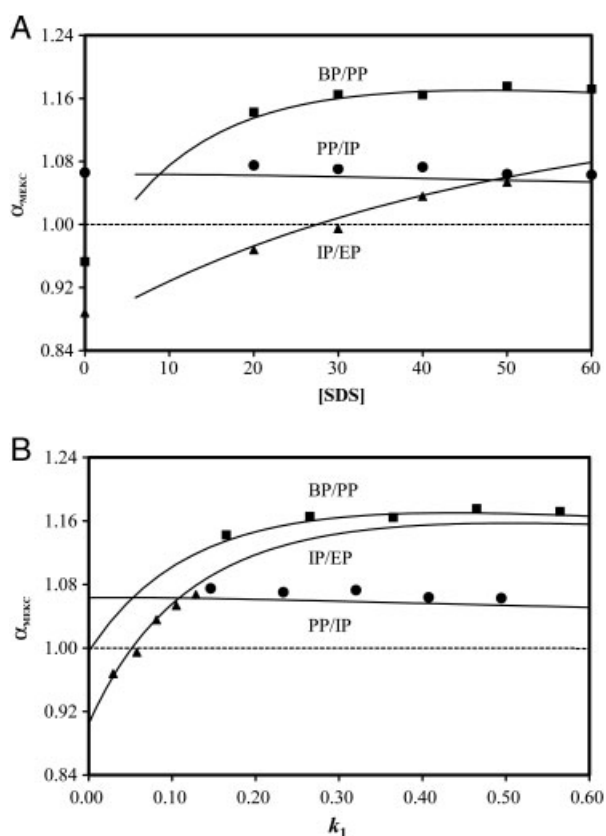


Figure 3. Observed (symbols) and predicted (solid lines) α_{MEKC} for two charged analytes in MEKC. (A) Various concentrations of SDS and (B) various values of k_1 . Predicted values are obtained using Eq. (7) and data as listed in Table 2.

be in good agreement with the predicted values, indicating that Eq. (7) can be used for prediction of the α_{MEKC} values over a wide range of [SDS] and k_1 .

According to electropherograms in Fig. 2 and data in Table 2, the same order of $|\mu|$ in CZE and k in MEKC was obtained, and therefore $\alpha_{\text{CZE}} > 1.0$ and $\alpha_{\text{MEKC}} > 1.0$. Although the ρ value is greater than 1.0, a slight decrease in the observed and predicted values of α_{MEKC} with an increase in [SDS] and k_1 is due to small calculated values of ρ between 1.032 and 1.072 for 10–60 mM SDS. Therefore, a change in α_{MEKC} for PP/IP in MEKC is consistent with the α_{MEKC} model of Type I described earlier with small values of ρ .

Owing to the reversed order of $|\mu|$ in CZE and k in MEKC for IP/EP and BP/PP, and the theoretical value of α_{CZE} being less than 1.0, the reversed $|\mu|$ order for IP/EP and BP/PP at high [SDS] and at low or zero [SDS] is consistent with the α_{MEKC} Type III model. At an α_{MEKC} value of 1.0, the predicted values of k_1 in Fig. 3B are estimated to be 0.003 for BP/PP at very low [SDS], and 0.052 for IP/EP which is in good agreement with the observed k_1 of 0.064. It should be noted that, employing Eq. (8) with an average α_k of 3.831 for IP/EP at 6.0–60 mM SDS, the predicted values of k_1 of 0.057 giving α_{MEKC} of 1.0 are found to be in good agreement with k_1 in Fig. 3B (0.052).

4 Concluding remarks

We have shown that a change in MEKC separation selectivity for two charged analytes over a wide range of [SDS] and k values can be explained and predicted using our proposed equations and theoretical models of separation selectivity, where the separation selectivity is related to the dimensionless values of the mobility selectivity in CZE and retention selectivity in MEKC. In comparison with CZE, the ability of MEKC to improve or reduce separation selectivity for two charged analytes depends on the model of separation selectivity. In addition, excellent agreement was found between the observed α_{MEKC} and the proposed α_{MEKC} models of test analytes in MEKC over a wide range of [SDS] and k values.

The financial support from the following sources is gratefully acknowledged: the Thailand Research Fund (RMU5080054) to T. N., and the Ratchaphisek Somphot Endowment Fund, under the National Research University Project, under the 90th Anniversary of Chulalongkorn University (CU) Fund to C. P. and under the Research Unit Fund to ChSRU. We also acknowledge the Institute for the Promotion of the Teaching Science and Technology for studentship to C. P., the Center for Petroleum, Petrochemicals and Advanced Materials, CU, for partial support, and the Thai Government Stimulus Package 2 (TKK255), under the Project for Establishment of Comprehensive Center for Innovative Food, Health Products and Agriculture (PERFECTA), for CE instrument support.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Terabe, S., Matsubara, N., Ishihama, Y., Okada, Y., *J. Chromatogr.* 1992, **608**, 23–29.
- [2] Altria, K. D., Clark, B. J., Mahuzier, P. E., *Chromatographia* 2000, **52**, 758–768.
- [3] Pappas, T. J., Gayton-Ely, M., Holland, L. A., *Electrophoresis* 2005, **26**, 719–734.
- [4] Iadarola, P., Ferrari, F., Fumagalli, M., Viglio, S., *Electrophoresis* 2008, **29**, 224–236.
- [5] Terabe, S., Otsuka, K., Ando, T., *Anal. Chem.* 1985, **57**, 834–841.
- [6] Quirino, J. P., Terabe, S., *J. Chromatogr. A* 1999, **856**, 465–482.
- [7] Molina, M., Silva, M., *Electrophoresis* 2002, **23**, 3907–3921.
- [8] Welsch, T., Michalke, D., *J. Chromatogr. A* 2003, **1000**, 935–951.
- [9] Terabe, S., *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2009, **2**, 99–120.
- [10] Riekkola, M.-L., Wiedmer, S. K., Valkó, I. E., Sirén, H., *J. Chromatogr. A* 1997, **792**, 13–35.
- [11] Ehala, S., Vaher, M., Kaljurand, M., *J. Chromatogr. A* 2007, **1161**, 322–326.

- [12] Gong, S., Liu, F., Li, W., Gao, F., Gao, C., Liao, Y., Liu, H., *J. Chromatogr. A* 2006, 1121, 274–279.
- [13] Dubber, M. J., Kanfer, I., *J. Chromatogr. A* 2006, 1122, 266–274.
- [14] Mallampati, S., Leonard, S., De Vulder, S., Hoogmartens, J., Van Schepdael, A., *Electrophoresis* 2005, 26, 4079–4088.
- [15] Česla, P., Blomberg, L., Hamberg, M., Jandera, P., *J. Chromatogr. A* 2006, 1115, 253–259.
- [16] Damić, M., Nigović, B., *Chromatographia* 2009, 71, 233–240.
- [17] Iadarola, P., Cetta, G., Luisetti, M., Annovazzi, L., Casado, B., Baraniuk, J., Zanone, C., Viglio, S., *Electrophoresis* 2005, 26, 752–766.
- [18] Téllez, A., Fuguet, E., Rosés, M., *J. Chromatogr. A* 2007, 1139, 143–151.
- [19] Giddings, J. C., *Sep. Sci.* 1969, 4, 181–189.
- [20] Jorgenson, J. W., Lukacs, K. D., *Anal. Chem.* 1981, 53, 1298–1302.
- [21] Nielsen, K. R., Foley, J. P., in: Camilleri, P. (Ed.), *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*, CRC Press, Inc., Boca Raton 1993, pp. 117–161.
- [22] Pyell, U., *Electrokinetic Chromatography: Theory, Instrumentation, and Application*, John Wiley & Sons, UK 2006, pp. 4–10.
- [23] Huang, H.-Y., Chiu, C.-W., Chen, Y.-C., Yeh, J.-M., *Electrophoresis* 2005, 26, 895–902.
- [24] Nhujak, T., Srisa-art, M., Kalampakorn, K., Tolieng, V., Petsom, A., *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 1884–1889.
- [25] Huertas-Pérez, J. F., del Olmo Iruela, M., García-Campaña, A. M., González-Casado, A., Sánchez-Navarro, A., *J. Chromatogr. A* 2006, 1102, 280–286.
- [26] Huang, H.-Y., Lai, Y.-C., Chiu, C.-W., Yeh, J.-M., *J. Chromatogr. A* 2003, 993, 153–164.
- [27] Nhujak, T., Sastravaha, C., Palanuvej, C., Petsom, A., *Electrophoresis* 2005, 26, 3814–3823.
- [28] Piršelová, K., Baláž, Š., Schultz, T. W., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1996, 30, 170–177.
- [29] Wilson, C. O., Gisvold, O., *Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, Lippincott-Raven, Philadelphia 1998, pp 915–918.
- [30] Jerez, G., Kaufman, G., Prystai, M., Schenkeveld, S., Donkor, K. K., *J. Sep. Sci.* 2009, 32, 1087–1095.
- [31] Kenndler, E., in: Khaledi, M. G. (Ed.), *High Performance Capillary Electrophoresis: Theory, Techniques, and Applications*, John Wiley & Sons, New York 1998, pp. 29–30.
- [32] Téllez, A., Fuguet, E., Rosés, M., *Electrophoresis* 2007, 28, 3712–3721.
- [33] Poouthree, K., Leepipatpiboon, N., Petsom, A., Nhujak, T., *Electrophoresis* 2007, 28, 767–778.
- [34] Golden, R., Gandy, J., Vollmer, G., *Crit. Rev. Toxicol.* 2005, 35, 435–458.
- [35] Tavares, R. S., Martins, F. C., Oliveira, P. J., Ramalho-Santos, J., Peixoto, F. P., *Reprod. Toxicol.* 2009, 27, 1–7.

ภาคผนวก 4

ผลงานวิจัยเตรียมส่งตีพิมพ์ในวารสาร

แบบจำลองทางทฤษฎีของค่าจำเพาะการแยกสำหรับสารที่มีประจุ
ในเทคนิคไซโคลเดกซ์ทรินอิเล็กโตรไคเนติกโครมาโทกราฟี

**Theoretical Models of Separation Selectivity for Charged Compounds
in Cyclodextrin Electrokinetic Chromatography**

Theoretical models of separation selectivity for charged compounds in cyclodextrin electrokinetic chromatography

Wasura Soonthorntantikul, Natchanun Leepipatpiboon, Monpichar Srisa-art, Thumnoon Nhujak*
Chromatography and Separation Research Unit (ChSRU), Department of Chemistry, Faculty of Science,
Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

Corresponding author: Assoc.Prof.Dr. Thumnoon Nhujak, Chromatography and Separation Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand. E-mail: thumnoon.n@chula.ac.th Tel.: +66-2-218-7609 Fax: +66-2-218-7598

Abstract: Simple equation and theoretical models, related to the dimensionless values of separation selectivity (α_{CZE}) in capillary zone electrophoresis (CZE), binding selectivity (κ), β , γ and KC , are proposed in order to explain a change in the separation selectivity (α_{CD}) in cyclodextrin electrokinetic chromatography (CD-EKC) for two charged analytes using neutral cyclodextrin (CD), and where α and κ are defined as the ratio of effective electrophoretic mobility in CZE (μ_0) and the ratio of binding constant (K), respectively, C the free CD concentration, K_2 the weaker CD binding constant, μ_∞ the electrophoretic mobility of analyte-CD complex, β_2 the $\mu_{0,2}/\mu_{\infty,2}$ ratio and γ the $\mu_{\infty,1}/\mu_{\infty,2}$ ratio. Using substituted benzoic acids and phenoxyacetic acid as test analytes with β -CD, the changes in the observed α_{CD} values were found to be in good agreement with the theoretical α_{CD} models over a wide range of K_2C and C values. For example, in comparison with CZE, the presence of CD in the buffer can enhance α_{CD} up to the maximum value with the selectivity ratio ($\rho = \kappa/\alpha_{CZE}$) > 1.0 , while a worse α_{CD} is obtained with $\rho < 1.0$.

Keywords: Capillary electrophoresis, Capillary zone electrophoresis, Cyclodextrin electrokinetic chromatography, Separation selectivity

1. Introduction

Cyclodextrin electrokinetic chromatography (CD-EKC) is one of the modes in CE which is performed by the addition of cyclodextrin (CD) in the buffer to form an inclusion complex between the analyte and the CD. The effective electrophoretic mobility (μ) of the analyte in CD-EKC is given by Eq. (1) [1-3];

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

where μ_0 and μ_∞ are the electrophoretic mobilities of the analyte and its complex at zero (capillary zone electrophoresis, CZE) and at infinite CD concentrations, respectively, K is the binding constant of the analyte to CD, and C is the free CD concentration at equilibrium that is assumed to (i) equal the initial CD concentration and (ii) that it is significantly greater than the analyte concentration.

CD-EKC is widely used for the separation of enantiomers [4-12] with identical μ_0 and μ_∞ values but with different K values and, therefore, CD-EKC separation is based on the differences in μ only that arise from the differences in K of each isomer to CD. The resolution, R_s , of two analytes in CE is given by Eq. (2) [3, 13];

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{\Delta\mu}{\bar{\mu} + \mu_{eo}} \quad (2)$$

where $\bar{N}$ and $\bar{\mu}$ are the average efficiency and electrophoretic mobility, respectively, $\Delta\mu$ is the electrophoretic mobility difference, and μ_{eo} is the electroosmotic mobility. Generally, the resolution equation in CE (Eq. (2)) may be rearranged to relate to the efficiency, separation selectivity and mobility terms, as in Eq. (3) [14];

$$R_s = \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left| \frac{\mu_2}{\bar{\mu} + \mu_{eo}} \right| \quad (3)$$

where α is the separation selectivity or mobility selectivity, defined as the ratio of μ for two analytes: $\alpha = \mu_2/\mu_1$, $\alpha > 1$.

In addition to chiral separation, CD-EKC can be also used for separating achiral compounds [15-22], such as small molecules and positional isomers. Here, with a difference in μ_0 , the separation in CD-EKC is then not only due to the difference in K but also to the difference in μ_0 . In comparison with CZE, the use of CD may result in an enhancement of α for some analytes or a loss of α for other analytes, and consequentially the same or a reversed migration order of analytes may be obtained between CD-EKC and CZE [16-17, 19-20, 22]. These dual effects with the presence of a pseudo-stationary phase are similar to those in the chiral separation of charged enantiomers with dual neutral CDs [23], and in the micellar

electrokinetic chromatographic (MEKC) separation of charged compounds [14] in our previous works. A change in separation selectivity from dual effects can be clarified using theoretical models of separation selectivity for charged compounds, as detailed previously [14, 23].

Therefore, the aim of this study is to develop equation and theoretical models in order to explain a change in the neutral CD-EKC separation selectivity (α_{CD}) and electrophoretic mobility order for charged analytes with different μ_0 values. According to our previous work [14, 23], the equation and theoretical models of α_{CD} are related to the dimensionless values. In addition, the observed and predicted α_{CD} values were compared from various β -CD concentrations, using four negatively charged analytes of substituted benzoic acids and phenoxyacetic acid.

2. Experimental

2.1 Chemicals

All reagents were of analytical grade. Disodium tetraborate decahydrate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), and sodium hydroxide were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland), β -CD was from Sigma (St. Louis, MO, USA), mesityl oxide was from Aldrich (WI, USA). The following substituted benzoic acids were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany): 3-chlorobenzoic acid (3C), 4-chlorobenzoic acid (4C) and 4-methylbenzoic acid (4M). 4-Chloro-2-methylphenoxyacetic acid (MCPA) was supplied from Riedel de Haën (Seelze, Germany).

2.2 Preparation of running buffers and analytes

CE measurements were carried out in two buffer systems: CZE and CD-EKC. The CZE buffer contained 10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ at pH 9.2, whilst the CD-EKC buffers are derived from this by the addition of various concentrations of β -CD (2 to 16 mM, limited by the solubility of β -CD of 16 mM), in the 10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ at pH 9.2.

Stock solutions of each test analyte at 5.0 mM were separately dissolved in methanol and then diluted with purified water. The sample mixtures containing each analyte at 0.1 mM and 50 ppm mesityl oxide were obtained by pipetting each stock solution and then diluting the mixture with 1.0 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$. All sample solutions and buffers were sonicated and filtered through 0.45 μm membrane filters prior to CE analysis.

2.3 CE conditions

All CE separations were performed on a Beckman Coulter MDQ CE system equipped with a photodiode array scanning from 190 to 300 nm and monitoring at 214 nm and an uncoated fused-silica column (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) of 40.2 cm in length (30 cm to detector) $\times$ 50 μm I.D., and thermostatted at 25 $^\circ\text{C}$. The applied voltage was set at 15 kV. A sample solution was introduced by 0.5 psi pressure injection for 3 s. Prior to analysis each day, the capillary was rinsed with 0.1 M NaOH and then the buffer for 10 min each. Between consecutive runs, the capillary was rinsed with 0.1 M NaOH and then the buffer for 3 min each. Each experiment was carried out in duplicate.

3. Results and discussion

3.1 Theoretical models of neutral CD-EKC separation selectivity

As can be seen in Eq. (3), the resolution mainly depends on α , and the separation selectivity in CD-EKC (α_{CD}), instead of α in Eq. (3), is defined as the ratio of μ for two analytes, *e.g.* μ_2/μ_1 . From Eq. (1), in the case of charged analytes 1 and 2 to neutral CD with $K_1 \geq K_2$, the CD-EKC separation selectivity may be rearranged to relate to the dimensionless values of α_{CZE} , κ , β , γ and KC as Eq. (4);

$$\alpha_{CD} = \alpha_{CZE} \left(\frac{\beta_2 + K_2 C}{\beta_2 + \alpha_{CZE} \kappa K_2 C \gamma} \right) \left(\frac{1 + \kappa K_2 C}{1 + K_2 C} \right) \quad (4)$$

where α_{CZE} is the separation selectivity in CZE (defined as the ratio of μ_0 for two analytes, *e.g.* $\mu_{0,2}/\mu_{0,1}$), κ is the CD binding selectivity (defined as the ratio of K for two analytes, *e.g.* K_1/K_2 , $\kappa \geq 1.0$), β_2 is the $\mu_{0,2}/\mu_{\infty,2}$ ratio and γ is the $\mu_{\infty,1}/\mu_{\infty,2}$ ratio. It should be noted that the stronger binding of analyte 1 than 2 to CD results in smaller apparent $|\mu|$ of analyte 1 than 2 and, therefore, the separation selectivity (α_{CZE} or α_{CD}) was calculated from the ratio of μ for analyte 2/1, whereas κ was from the ratio of K for analyte 1/2.

Using a similar concept to our previous works on the chiral separation selectivity for charged enantiomers with dual neutral CDs [23], and the separation selectivity for charged compounds in MEKC [14], the separation selectivity for charged compounds in neutral CD-EKC in this work can be classified into four types, as given in Table 1, based on the selectivity ratio (ρ) which is defined as the κ/α_{CZE} ratio, and the orders of $|\mu_0|$ in CZE and K in CD-EKC. The same order refers to when $K_1 > K_2$ and $|\mu_{0,1}| > |\mu_{0,2}|$, while the reversed order refers to when $K_1 > K_2$ but $|\mu_{0,2}| > |\mu_{0,1}|$. It should be noted that Eq. (4) can be also used for $\mu_{0,1} \neq \mu_{0,2}$ or $\mu_{0,1} = \mu_{0,2}$ ($\alpha_{CZE} > 1.0$, < 1.0 or $= 1.0$), κ is always ≥ 1.0 , and the practical separation selectivity is equal to $1/\alpha_{CZE}$ or $1/\alpha_{CD}$ for the theoretical value of α_{CZE} or $\alpha_{CD} < 1.0$. Using Eq. (4) and the data in Table 1, with $\beta = 3$ and $\gamma = 1$, Figure 1 shows the plots of α_{CD} models of Types I to III as a function of the $K_2 C$ products at various ρ values. At a $K_2 C$ value of 0, the α_{CD} value refers to α_{CZE} .

According to the α_{CD} model for Type I as shown in Fig.1A with $\kappa > \alpha_{CZE} \geq 1$, an increase in the concentration of CD in CD-EKC enhances α_{CD} to a maximum value at $K_2C \approx 1$, and then decreases at higher K_2C values. At a given K_2C , the higher the value of ρ , the greater the value of α_{CD} . This indicates that, in comparison with CZE, neutral CD-EKC with the Type I α_{CD} model can improve the resolution of charged compounds. This may simply be explained by that, for $|\mu_{0,2}| > |\mu_{0,1}|$ in CZE ($\alpha_{CZE} > 1$), analyte 1 with a stronger binding to CD ($K_1 > K_2$ with $\kappa > \alpha_{CZE}$) results in a much smaller $|\mu_1|$ than $|\mu_2|$ and, therefore, a higher α_{CD} or μ_2/μ_1 at the appropriate K_2C value.

In contrast to that observed with the Type I model, CD-EKC with the Type II α_{CD} model ($\alpha_{CZE} \geq \kappa \geq 1$), or when the CD binding selectivity is less than the $|\mu_0|$ selectivity (Fig. 1B), showed a gradual decrease in the α_{CD} over a wide range of K_2C values. The smaller the ρ value, the smaller the α_{CD} value. This implies an inferior separation ability of the two analytes in CD-EKC than in CZE for the case of the Type II α_{CD} model.

As can be seen in Fig. 1C, for the Type III α_{CD} model with $\kappa \geq 1 > \alpha_{CZE}$, the reversed order of $|\mu|$ in the CD-EKC, compared to that in CZE, results in a loss of the separation, starting from $1/\alpha_{CD} > 1$ ($\alpha_{CD} < 1$) to near 1 and then increases the separation ($\alpha_{CD} > 1$) at higher K_2C values. From Eq. (4), it follows that the value of K_2C giving α_{CD} of 1 is given by Eq. (5);

$$K_2C = \frac{\beta(1 - \alpha_{CZE})}{\beta(\alpha_{CZE}\kappa - 1) + \alpha_{CZE}(1 - \kappa)} \quad (5)$$

With $\alpha_{CZE}\kappa = 1$ or $\kappa = 1/\alpha_{CZE}$ as shown in Fig. 1C, when $\kappa = 1.25$ the same order of $|\mu|$ in CD-EKC and $|\mu_0|$ in CZE is observed over a wide range of K_2C values, and K_2C gives α_{CD} of 1 at $-\beta$, implying that a α_{CD} of 1 occurs at an infinite K_2C value. The higher the value of ρ , the lower the value of K_2C at α_{CD} of 1. The K_2C value that gives a maximum α_{CD} value decreases with increasing ρ values. In comparison with CZE, CD-EKC with this α_{CD} model, especially at high κ values, can provide a better separation with $\kappa > 1/\alpha_{CZE}$. With $\kappa = \alpha_{CZE} = 1$ for the Type IV α_{CD} model (Table 1), there is no separation of the charged analytes under either the CZE or CD-EKC conditions (plot not shown).

3.2 Observed and predicted neutral CD-EKC separation selectivity for negatively charged compounds

In order to predict the theoretical models of α_{CD} for charged compounds in neutral CD-EKC, the values of α_{CZE} , κ , β and γ must be known. In initial experimental work, several weak acids were used in the CD-EKC separation. However, the substituted benzoic acids and phenoxyacetic acid, including 3C, 4C, 4M and MCPA, were chosen here to be representatives to cover three types of α_{CD} models. With $pK_a < 4.4$ for all test analytes [24, 25], then in the pH 9.2 buffer used here, each analyte carries a fully negative charge. Figure 2 shows an example of the obtained electropherograms for the simultaneous separation of 3C, 4C, 4M and MCPA in CZE buffer with 0 mM β -CD (Fig. 2A) and in the CD-EKC buffers with 2 and 12 mM β -CD (Fig. 2B and 2C, respectively). As can be seen in Fig. 2A, when using CZE the negatively charged analytes migrate against the electroosmotic flow (EOF) with the $|\mu_0|$ order of $3C > 4C > 4M > MCPA$, depending on the ratio of charge to hydrodynamic radius of the analytes. From the CD-EKC electropherograms, the $|\mu|$ orders of the test analytes were obtained to be $3C > 4C \approx 4M > MCPA$ in 2 mM β -CD (Fig. 2B), whereas $3C > 4M > 4C > MCPA$ in 12 mM β -CD (Fig. 2C). In comparison with CZE, the same migration order in CD-EKC was found for 4C/3C, 4M/3C and MCPA/4C over a wide range of CD concentrations from 2-16 mM β -CD, while a reversed order was obtained for 4C/4M at a CD concentration above 2 mM β -CD. This different migration behavior for these analytes can be explained by using the α_{CD} models in Section 3.1.

Table 2 shows the values of μ_0 , μ_∞ , α_{CZE} , K , κ , ρ , β , γ and types of α_{CD} model for each pair of test analytes. The K and μ_∞ values were determined using the CEFIT Program of a nonlinear least-squares fit to the data points of the corrected electrophoretic mobilities, with a change in the buffer viscosity, as a function of the CD concentration [23, 26-27]. Accordingly, from the data in Table 2 and Eq. (4), the observed and predicted α_{CD} values were evaluated and plotted for the test analytes in various K_2C products (Fig. 3A) and β -CD concentrations (0-16 mM, Fig. 3B). The former can be used to compare the observed and predicted model without known CD concentrations, while the latter can be used to consider the CD concentrations giving the achieved resolution of the analytes and the reversed migration orders. As can be seen in Fig. 3, the observed values of α_{CD} were found to be in good agreement with the predicted values, indicating that Eq. (4) can be used for the prediction of the α_{CD} values over a wide range of K_2C and C values.

From the electropherograms in Fig. 2 and the data in Table 2, a reversed order of $|\mu_0|$ in CZE and K in CD-EKC was obtained for the 4C/3C, 4M/3C and MCPA/4C analyte pairs, but the same order was observed for $|\mu_0|$ in CZE and $|\mu|$ in CD-EKC. In comparison with CZE, a greater α_{CD} value was obtained at a higher K_2C value and C for 4C/3C and 4M/3C with $\rho > 1.0$ and, therefore, a change in α_{CD} for 4C/3C and 4M/3C is consistent with the Type I α_{CD} model. In contrast to that seen for 4C/3C and 4M/3C above, at

higher K_2C and C values, smaller α_{CD} is seen for MCPA/4C with $\rho < 1.0$, which is consistent with the Type II α_{CD} model.

Due to the same order of $|\mu_0|$ in CZE and K in CD-EKC for 4C/4M with $\alpha_{CZE} < 1.0$ and $\rho > 1.0$ (Table 2), the reversed order of $|\mu_0|$ in CZE and $|\mu|$ in CD-EKC was found at higher K_2C and C values, as shown in the Fig. 2. Therefore, the CD-EKC separation for 4C/4M is consistent with the Type III α_{CD} model. The α_{CD} of 1 for a pair of 4C/4M was observed at 2 mM β -CD and K_2C of 0.170, which is in good agreement with the calculated K_2C of 0.166 using Eq. (5).

4. Conclusions

The proposed equation and the theoretical models for CD-EKC separation selectivity presented herein, which are related to the dimensionless values of α_{CZE} , κ , β , γ and KC , can be used to explain and reliably predict the change in the CD-EKC separation selectivity and electrophoretic mobility order for charged analytes over a wide range of neutral CD concentrations and K_2C products. In comparison with CZE, the presence of CD in the buffer may improve or reduce separation selectivity for charged analytes in CD-EKC, depending on the CD-EKC separation selectivity models. When using substituted benzoic acids and phenoxyacetic acid as test analytes with β -CD, a good agreement was found between the observed and predicted values of CD-EKC separation selectivity across various CD concentrations and K_2C values.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support provided by the Thailand Research Fund (RMU5080054 to TN), the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (PHD00252550 to WS) and the Nation Research University Project of CHE and the Rachadaphiseksomphot Endowment Fund (FW648I). We extend our thanks to the Thai Government Stimulus Package 2(TKK25), under the Project for Establishment of Comprehensive Center for Innovative Food, Health Products and Agriculture (PERFECTA), for CE instrument support, and the Center of Petroleum, Petrochemicals and Advanced Materials, CU, for partial support.

References

- [1] S. A. C. Wren, J. Chromatogr. A 636 (1993) 57.
- [2] S. G. Penn, E. T. Bergström, D. M. Goodall, Anal. Chem. 66 (1994) 2866.
- [3] B. Chankvetadze, Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis, John Wiley & Sons, Chichester, 1997, pp. 29, 111.
- [4] V. Cucinotta, A. Contino, A. Giuffrida, G. Maccarrone, M. Messina, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 953.
- [5] S. Fanali, Electrophoresis 30 (2009) S203.
- [6] B. Chankvetadze, Electrophoresis 30 (2009) S211.
- [7] G. Gübitz, M. G. Schmid, J. Chromatogr. A 1204 (2008) 140.
- [8] K. M. Al Azzam, B. Saad, R. Adnan, H. Y. Aboul-Enein, Anal. Chim. Acta 674 (2010) 249.
- [9] A. Kwatczak, K. Duszczak, A. Bielejewska, Anal. Chim. Acta 645 (2009) 98.
- [10] J. Yang, X. Lu, L. Pan, K. Jiang, M. Cheng, F. Li, J. Sep. Sci. 31 (2008) 3749.
- [11] H. Zhang, H. Shao, Y. A. Z. Zhang, Chromatographia 68 (2008) 653.
- [12] B. Chankvetadze, K. Lomsadze, N. Burjanadze, J. Breitreutz, G. Pintore, M. Chessa, K. Bergander, G. Blaschke, Electrophoresis 24 (2003) 1083.
- [13] M. G. Khaledi, High Performance Capillary Electrophoresis, John Wiley & Sons, New York, 1998, p. 54.
- [14] C. Puangpila, A. Petsom, T. Nhujak, Electrophoresis, doi: 10.1002/elps.201000405.
- [15] H. Epple, L. Blanes, A. Beavis, C. Roux, P. Doble, Electrophoresis 31 (2010) 2608.
- [16] H. -Y. Cheung, Q. -F. Zhang, J. Chromatogr. A 1213 (2008) 231.
- [17] P. Česla, J. Fischer, E. Tesařová, P. Jandera, V. Staněk, J. Chromatogr. A 1149 (2007) 358.
- [18] K. Tian, H. Zhang, X. Chen, Z. Hu, J. Chromatogr. A 1123 (2006) 134.
- [19] M.-H. Chen, W.-H. Ding, J. Chromatogr. A 1033 (2004) 167.
- [20] P. D. Ferguson, D. M. Goodall, J. S. Loran, J. Chromatogr. A 768 (1997) 29.
- [21] J. H. T. Luong, A. L. Nguyen, J. Chromatogr. A 792 (1997) 431.
- [22] Y. -Z. Hsieh, H. -Y. Huang, J. Chromatogr. A 745 (1996) 217.
- [23] T. Nhujak, C. Sastravaha, C. Palanuvej, A. Petsom, Electrophoresis 26 (2005) 3814.
- [24] J. A. Dean, Lange's Handbook of Chemistry, McGraw-Hill Book Co., Singapore, 13th ed., 1987.
- [25] A. J. Cessna, R. Grover, J. Agric. Food Chem. 26 (1978) 289.
- [26] T. Nhujak, D. M. Goodall, J. Chromatogr. A 907 (2001) 313.
- [27] S. G. Penn, E. T. Bergström, I. Knights, G. Lui, A. Ruddick, D. M. Goodall, J. Phys. Chem. 99 (1995) 3875.

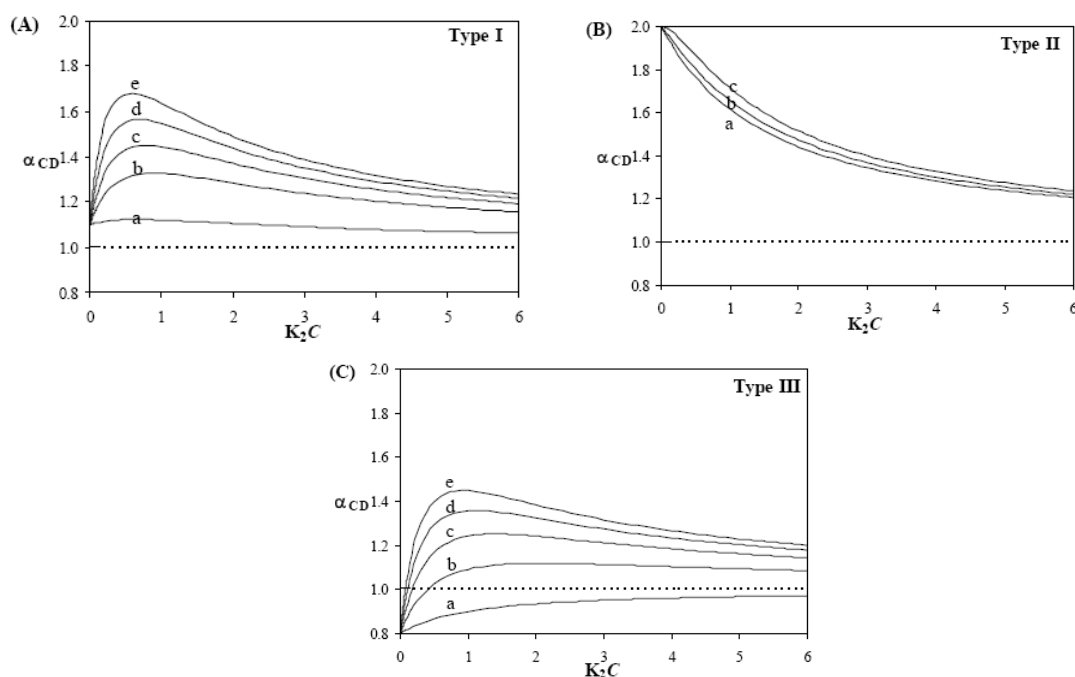


Figure 1 Predicted models of CD-EKC separation selectivity for charged analytes. Calculated using Eq. (4) and the data listed in Table 1. a to e refer to the binding selectivity (κ) values for (A) 1.2, 2.4, 3.5, 4.9 and 6.8, respectively, (B) 1.1, 1.4 and 2.0, respectively, and (C) 1.25, 2.3, 3.5, 4.8, 6.2, respectively.

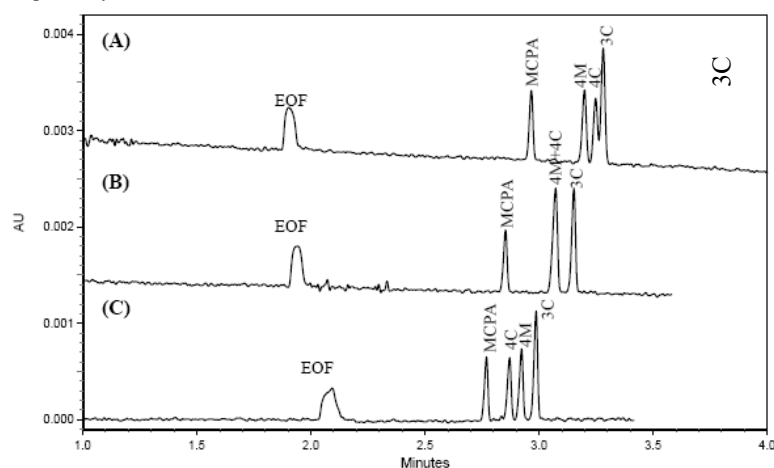


Figure 2 Electropherograms of substituted benzoic acids and phenoxyacetic acid using (A) 0 mM (CZE), (B) 2 mM and (C) 12 mM β -CD in 10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ at pH 9.2. Other CE conditions were: 50 μm I.D. $\times$ 40.2 cm (30 cm to detector) uncoated fused-capillary, temperature of 25 $^\circ\text{C}$, applied voltage of 15 kV, UV detection at 214 nm and 0.5 psi pressure injection for 3 s.

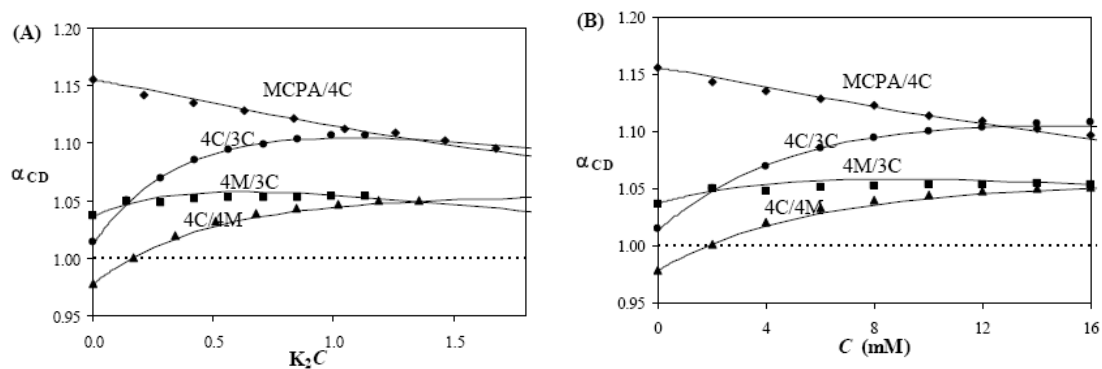


Figure 3 Observed (symbols) and predicted (solid lines) CD-EKC separation selectivity for charged compounds with β -CD from 0-16 mM. (A) Various K_2C values and (B) various β -CD concentrations (C). Predicted values are obtained using Eq. (4) and the data in Table 2.

Table 1 Types of theoretical models of α_{CD}

Type	Order of $ \mu_0 $ in CZE and K in CD-EKC	Order of $ \mu_0 $ in CZE and $ \mu $ in CD-EKC	α_{CZE} ($\mu_{0,2}/\mu_{0,1}$)	κ (K_1/K_2)	ρ	Assumed values		
						α_{CZE}	κ	β
I	Reversed	Same	$\alpha_{CZE} \geq 1$	$\kappa > \alpha_{CZE} \geq 1$	$\rho > 1.0$	1.1	1.2-6.8	3.0
II	Reversed	Same	$\alpha_{CZE} > 1$	$\alpha_{CZE} \geq \kappa \geq 1$	$\rho \leq 1.0$	2.0	1.1-2.0	3.0
III	Same	Same or Reversed	$\alpha_{CZE} < 1$	$\kappa \geq 1 > \alpha_{CZE}$	$\rho > 1.0$	0.8	1.25-6.2	3.0
IV	Comigration	Comigration	$\alpha_{CZE} = 1$	$\kappa = \alpha_{CZE} = 1$	$\rho = 1.0$	-	-	-

Table 2 Electrophoretic mobility (μ , 10^{-8} m² V⁻¹ s⁻¹), CZE separation selectivity (α_{CZE}), binding constant (K , M⁻¹), binding selectivity (κ), selectivity ratio (ρ), the ratio of $\mu_{0,2}/\mu_{\infty,2}$ (β), the ratio of $\mu_{\infty,1}/\mu_{\infty,2}$ (γ), and types of α_{CD} models for test analytes.

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

^aAnalyte 2

ภาคผนวก 5

ผลงานวิจัยเตรียมส่งตีพิมพ์ในวารสาร

การเปรียบเทียบค่าจำเพาะการแยกในเทคนิคอะพิลลารีอิลเล็กโทรโฟริซิสสำหรับสารกลุ่ม
แอโรแมติกแอซิดที่มีหมู่แทนที่เป็นคลอโรและเมทิล

Comparison of Separation Selectivity in CZE, MEKC and CD-EKC for
Chlorobenzoates/Methylbenzoates, and Application to Separation of Phenoxy Acid
Herbicides

Comparison of Separation Selectivity in Capillary Zone Electrophoresis, Micellar Electrokinetic Chromatography and Cyclodextrin Electrokinetic Chromatography for Chlorobenzoates/Methylbenzoates, and Application to Separation of Phenoxy Acid Herbicides
*Wasura Soonthorntantikul, Natchanun Leepipatpiboon, Monpichar Srisa-art, Thumnoon Nhujak**
Chromatography and Separation Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Correspondence: Assoc.Prof.Dr. Thumnoon Nhujak, Chromatography and Separation Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand. **E-mail:** thumnoon.n@chula.ac.th **Fax:** +66-2-218-7598

Abbreviations: C^- , chlorobenzoate; **CD-EKC**, cyclodextrin electrokinetic chromatography; DC^- , dichlorobenzoate; DM^- , dimethylbenzoate; **DM- β -CD**, dimethyl- β -cyclodextrin; **MeOH**, methanol; M^- , methylbenzoate

Keywords: Cyclodextrin electrokinetic chromatography, Capillary zone electrophoresis, micellar electrokinetic chromatography, Phenoxy acids, Separation Selectivity

Abstract: CE separation selectivity for monochlorobenzoates/monomethylbenzoates (C^-/M^-) and dichlorobenzoates/dimethylbenzoates (DC^-/DM^-), having similar electrophoretic mobilities, were compared in three CE modes including CZE, MEKC and cyclodextrin-EKC (CD-EKC). Small CZE separation selectivity (α_{CZE}) was obtained for each pair of C^-/M^- and DC^-/DM^- . The very slightly higher MEKC separation selectivity (α_{MEKC}) than α_{CZE} was obtained due to the small retention selectivity. The higher CD-EKC separation selectivity (α_{CD}) than α_{CZE} and α_{MEKC} was obtained for C^-/M^- and DC^-/DM^- , due to the great CD binding selectivity. In addition, simultaneous separation of ten phenoxy acid herbicides, especially 2,4-DB/MCPB and 2,4-D/MCPA having the difference in chloro and methyl substituents on a benzene ring, was also obtained using the CD-EKC buffer containing 3.0 mM DM- β -CD. Therefore, in comparison with CZE and MEKC, CD-EKC can be used as the better alternative to separate compounds having the different substituents only by chloro and methyl groups.

1 Introduction

CE is a high efficiency separation technique for separating charged and neutral compounds. Basically, the separation mechanism in CE is based on the difference in the electrophoretic mobility (μ) of the analytes. The resolution, R_s , of two analytes in CE is given by the equation [1, 2]:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{\Delta\mu}{\bar{\mu} + \mu_{eo}} \quad (1)$$

where $\bar{N}$ and $\bar{\mu}$ are the average efficiency and the average electrophoretic mobility, respectively, $\Delta\mu$ is the electrophoretic mobility difference, and μ_{eo} is the electroosmotic mobility. Typically, the resolution (R_s) in CE (Eq. (1)) may be rearranged to relate to efficiency, separation selectivity and mobility terms, as follows [3]:

$$R_s = \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left| \frac{\mu_1}{\bar{\mu} + \mu_{eo}} \right| \quad (2)$$

where α is the separation selectivity or mobility selectivity, defined as the ratio of the effective electrophoretic mobility (μ) of two analytes: $\alpha = \mu_2/\mu_1$, $\alpha > 1$.

The separation selectivity is a characteristic that simply describes separation in CE. This parameter shows the ability of the separation method to distinguish analytes from the others. Since the CZE separation for charged analytes arise only from the differences in charge-to-size ratio, it is difficult to reach baseline resolution for separating the analytes having very similar μ or small α ($\alpha \approx 1.0$). As a result, several methods to improve the CZE separation have been reported. The use of the pH of the buffers close to the pK_a of the analytes [4-9] is one of the methods to obtain the difference in μ for acid compounds. The optimum pH value is theoretically calculated to be the average pK_a values for two analytes [7-8]. However, this method is not impractical use for the simultaneous separation of several pairs of analytes having different average pK_a values. Moreover, the additives, such as ionic liquids [10] and organic solvents [4-5, 11-16], may be used to improve α because of their influence on μ and μ_{eo} . In addition to CZE, the addition of any pseudo stationary phases such as micelles in MEKC [11, 17-18] and CDs in CD-EKC [11, 19-23] has been reported to improve the separation due to the interaction of the analytes and pseudo stationary phases.

From the literature [24], chlorobenzoate (C^-) and methylbenzoate (M^-) show very similar measured absolute electrophoretic mobility (μ^0 , $10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) of each positional isomer of C^-/M^- : -3.16/-3.07, -3.22/-3.11 and -3.17/-3.07 for 2 C^- /2 M^- , 3 C^- /3 M^- and 4 C^- /4 M^- , respectively. Therefore, the calculated separation selectivities are 1.029, 1.035 and 1.033 for 2-, 3- and 4- C^-/M^- isomer, respectively, indicating low resolution of each pair.

The aims of this study are to investigate and to compare the separation selectivity in three CE modes for benzoic acids with chloro and methyl substituents: i) CZE with different types and concentrations of organic solvents, ii) MEKC with different SDS concentrations, and different types and concentrations of organic modifiers, and iii) CD-EKC with different types and concentrations of CDs. In addition, the CE separation for acidic herbicides having the difference in a chloro- and a methyl-substituent on the aromatic ring was also examined. In comparison with CZE, a change in separation selectivity in MEKC and CD-EKC will be also explained using our recent works on separation selectivity models [3, 25].

2 Materials and methods

2.1 Chemicals

All reagents were of analytical grade. Disodium tetraborate decahydrate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), and sodium hydroxide were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland); thiourea, methanol (MeOH) and ACN were from Merck (Darmstadt, Germany); SDS, α -CD, β -CD and dimethyl- β -CD (DM- β -CD) were from Sigma (St. Louis, MO, USA); mesityl oxide was from Aldrich (WI, USA); dodecylbenzene (DB) and the following benzoic acid derivatives with chloro and methyl groups were from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany): 2-, 3-, 4-methylbenzoic acid (M); 2-, 3-, 4-chlorobenzoic acid (C); 2,3-, 2,4-, 2,5-, 2,6-, 3,4-, 3,5-dimethylbenzoic acid (DM); 2,3-, 2,4-, 2,5-, 2,6-, 3,4-, 3,5-dichlorobenzoic acid (DC). All herbicide standards were obtained from Riedel de Haën (Seelze, Germany) and Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany): 4-Chloro-2-methylphenoxyacetic acid (MCPA), 4-(2-methyl-4-chlorophenoxy) butyric acid (MCPB), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 4-(2,4-dichlorophenoxy) butyric acid (2,4-DB), (2,4,5-trichlorophenoxy) acetic acid (2,4,5-T), 5-(2-chloro-4-trifluoromethylphenoxy)-2-nitrobenzoic acid (acifluorfen), 3,6-dichloro-pyridine-2-carboxylic acid (clopyralid), 2-methoxy-3,6-dichlorobenzoic acid (dicamba), 2-(4-chlorophenoxy)-2-methyl-propionic acid (mecroprop), and 4-amino-3,5,6-trichloro-picolinic acid (picloram).

2.2 Preparation of running buffers and analytes

CE measurements were carried out in three buffer systems: i) CZE, ii) MEKC, and iii) CD-EKC. BGEs used for CZE contained 10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ at pH 9.2 with or without the addition of organic modifiers (0 to 20% v/v) such as methanol (MeOH) and ACN. The MEKC buffers contained a 10 mM borate buffer at pH 9.2 and SDS (20–80 mM). The effect of organic modifiers in MEKC was studied using a 10 mM borate buffer at pH 9.2, 40 mM SDS and various concentrations of organic modifiers (0 to 20% v/v MeOH or ACN). For CD-EKC, BGEs containing α -CD (2-60 mM), β -CD (2-16 mM) or DM- β -CD (2-50 mM) were prepared at various concentrations by weighing an appropriate amount of CD and dissolving these in 10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ at pH 9.2.

Stock solutions of each test analyte at 5.0 mM were separately dissolved in MeOH and then diluted with purified water. The mixtures contained each analyte at 0.1 mM and mesityl oxide as EOF marker in CZE and CD-EKC, while thiourea as EOF marker and DB as micelle marker in MEKC. All sample solutions and buffers were filtered through 0.45 μm membrane filters prior to CE analysis.

2.3 CE conditions

All CE separations were performed on a Beckman Coulter MDQ CE system equipped with a photodiode array (PDA) scanning from 190 to 300 nm and monitoring at 214 nm. An uncoated fused-silica used (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) was 40.2 cm in length (30 cm to detector) $\times$ 50 μm id, and thermostatted at 25 $^\circ\text{C}$. The applied voltage was set at 15 kV. A sample solution was introduced by 0.5 psi pressure injection for 3 s. Prior to analysis each day, the capillary was conditioned as detailed in previous work [25]. Each experiment was carried out in duplicate.

3 Results and discussion

3.1 CZE separation of C^-/M^- and DC^-/DM^-

The CZE separation mechanism is based on the difference in μ of the analytes due to the difference in the ratio of charge to hydrodynamic radius of solutes [1]. Figure 1A shows the separated electropherograms of a pair of monosubstituted benzoates: 2 C^- /2 M^- , 3 C^- /3 M^- and 4 C^- /4 M^- , using 10 mM borate buffer at pH 9.2 without the addition of organic modifier. In the pH 9.2 buffer, each analyte, with $\text{p}K_a < 4.5$ [26–27], carries a fully negative charge and, therefore, each analyte migrates after an EOF marker with the migration time order or the electrophoretic mobility ($|\mu|$) order: $C^- > M^-$. A pair of C^-/M^- in each positional isomer migrates closely for each other. The μ values ($10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) of the C^-/M^- are shown in

Table 1, with %RSD < 1.0. As can be seen from Fig. 1A, the baseline resolution of C⁻/M⁻ for all pairs was not achieved, $R_s < 1.5$. Figure 1B shows the CZE separations of disubstituted benzoates DC⁻/DM⁻ (2,3-, 2,4-, 2,5-, 2,6-, 3,4 and 3,5-isomers). The $|\mu|$ values of disubstituted benzoates were found in the order DC⁻ > DM⁻ (Table 1), similar to the $|\mu|$ order of monosubstituted benzoates C⁻ > M⁻. The baseline resolution of DC⁻/DM⁻ was achieved for 2,6-, 3,4- and 3,5-isomers ($R_s = 1.53$ – 1.72), while not achieved for 2,3-, 2,4- and 2,5-isomers ($R_s = 0.88$ – 1.42).

From Fig. 1A for the separation of monosubstituted benzoates, the CZE separation selectivities (α_{CZE}) were obtained to be 1.018, 1.025 and 1.023 for 2-, 3- and 4-C⁻/M⁻ isomers, respectively, which have the same trend but slightly less than those of literature values calculated using μ^0 as previously mentioned in Section 1. The values of α_{CZE} for disubstituted benzoates were obtained in the range of 1.019–1.038. The α_{CZE} value close to 1.0 indicates small separation selectivity or small difference in μ . According to Eq. (2), the most important parameter to enhance R_s is the separation selectivity. The higher the value of α , the better the value of R_s . The resolution also scales with the mobility term ($|\mu_2 / (\bar{\mu} + \mu_{eo})|$) and the square root of the efficiency.

The addition of organic solvent into BGEs was reported to improve the separation of sample mixtures in CZE due to a change in μ and μ_{eo} [4-5, 11-16]. In this work, the effect of organic solvents to α_{CZE} was studied by separately adding 10-20% v/v MeOH or ACN into 10 mM Na₂B₄O₇ buffer. With an increase in organic modifier concentrations, the same $|\mu|$ order was obtained with longer migration time (data not shown). Figure 2 shows an example of the effect of MeOH on α_{CZE} and R_s for monosubstituted benzoates (C⁻/M⁻). From Fig. 2A1, although a slight decrease in α_{CZE} was obtained with increasing the amount of MeOH in the buffer, the better R_s was observed (Fig. 2A2) because of the slightly higher values of the mobility term and the greater $\bar{N}$ (data not shown) according to Eq. (2). The similar result with MeOH was also observed using ACN as an organic modifier (data not shown).

The use of a buffer with suitable pH at the average pK_a values for two analytes [7-8] is one of the alternative methods to enhance α_{CZE} . For example, using the pK_a values reported from literature [26-27] for calculation of suitable pH of the buffers, the different pHs of 3.39, 4.05 and 4.17 may be used for separating each pair of 2-, 3- and 4-C⁻/M⁻, respectively. Another alternative method to improve α for benzoic acid derivatives is the addition of pseudo-stationary phases such as micelles in MEKC [11, 17-18] and CDs in CD-EKC [11, 19-23].

3.2 MEKC separation of C⁻/M⁻ and DC⁻/DM⁻

Using an MEKC buffer containing 40 mM SDS in a 10 mM borate buffer at pH 9.2, anionic micelles and negatively charged solutes migrate toward the cathode with the presence of high EOF. As shown in Table 1, the migration of analytes in MEKC were found in the $|\mu|$ order C⁻ > M⁻ and DC⁻ > DM⁻, similar $|\mu|$ order in CZE. Typically, the charged analytes in MEKC are separated due to the differences in their micellar partitioning and their electrophoretic mobility (α_{CZE}). In our recently previous work [3], the separation selectivity for charge analytes in MEKC relates to α_k and α_{CZE} as the equation:

$$\alpha_{MEKC} = \alpha_{CZE} \left(\frac{\beta + \frac{\alpha_k}{\alpha_{CZE}}}{\beta + k_1} \right) \left(\frac{1 + k_1}{1 + \alpha_k k_1} \right) \quad (7)$$

where α_{MEKC} is the mobility selectivity in MEKC, α_k is the retention selectivity defined as the ratio of retention factor (k) in MEKC for two analytes and β is the ratio of the analyte μ in CZE (μ_0) to the micelle marker μ in MEKC.

In comparison between MEKC and CZE as shown in Table 1, the very slightly higher α_{MEKC} than α_{CZE} is due to the small α_k giving the small ratio of α_k/α_{CZE} ranging from 1.013 to 1.063. According to theoretical models for α_{MEKC} [3], a slight increase in α_{MEKC} for C⁻/M⁻ and DC⁻/DM⁻ is consistent with the model of Type I ($\alpha_k > \alpha_{CZE} \geq 1.0$) with small values of α_k/α_{CZE} . In comparison with CZE, the slightly better R_s for C⁻/M⁻ and DC⁻/DM⁻ in MEKC was obtained due to the slightly higher α_{MEKC} than α_{CZE} and the greater mobility term for MEKC with comparable N . In most cases, the baseline resolution in MEKC was achieved for a pair of C⁻/M⁻ ($R_s = 1.59$ – 1.77) and DC⁻/DM⁻ ($R_s = 1.73$ – 2.67), except for 2C⁻/2M⁻ ($R_s = 1.09$) and 2,4DC⁻/2,4DM⁻ ($R_s = 1.25$).

Over a wide range of SDS concentrations of 20–80 mM, the α_{MEKC} values for each pair of C⁻/M⁻ or DC⁻/DM⁻ were insignificantly different (data not shown). Figure 2B1 and 2B2 show an example of the effect of MeOH in the MEKC buffer on α_{MEKC} and R_s , respectively, for monosubstituted benzoates (C⁻/M⁻). As can be seen in Fig. 2B, an increase in organic solvent concentrations gives a very slight decrease in α_{MEKC} (Fig.

2B1) but the better R_s (Fig. 2B2) in MEKC, a similar trend found in CZE with the addition of organic solvents.

3.3 CD-EKC separation of C^-/M^- and DC^-/DM^-

In order to enhance separation selectivity of the charged analytes, α -CD (2-60 mM), β -CD (2-16 mM) and DM- β -CD (2-50 mM) were separately added into the pH 9.2 borate buffer. It should be noted that 16 mM for β -CD is the saturated solubility in water, 60 mM α -CD gave the achieved baseline resolution with $R_s > 2.4$, except for the co-elution of 2,6DC $^-$ /2,6DM $^-$, and 50 mM DM- β -CD gave $R_s > 4.5$, except for the co-elution of 2C $^-$ /2M $^-$ and 2,6DC $^-$ /2,6DM $^-$. In the presence of CD, the CD-EKC separation for two charged analytes arises from the differences in their binding constant (K) to CD and their electrophoretic mobility (α_{CZE}). The different ability of CD to form inclusion complex with the analytes is governed by several factors such as the match between the cavity size of CD and the molecular size of the analytes, hydrophobic interaction and hydrogen bonding interactions [1, 2].

In our recently reported work [25], the CD-EKC separation selectivity for charge compounds was developed to relate to κ and α_{CZE} as the following equation:

$$\alpha_{CD} = \alpha_{CZE} \left(\frac{\beta_2 + K_2 C}{\beta_2 + \alpha_{CZE} \kappa K_2 C \gamma} \right) \left(\frac{1 + \kappa K_2 C}{1 + K_2 C} \right) \quad (3)$$

where α_{CD} is the mobility selectivity in CD (μ_2/μ_1), κ is the CD binding selectivity defined as the ratio of K for two analytes (K_1/K_2 with $K_1 \geq K_2$), β is the ratio of the analyte μ in CZE to the analyte-CD complex μ in CD-EKC ($\mu_{0,2}/\mu_{\infty,2}$), γ is the ratio of μ_{∞} for two analytes ($\mu_{\infty,1}/\mu_{\infty,2}$), and C is CD concentration.

Table 2 shows the values of K , κ , observed maximum selectivities in CD-EKC ($\alpha_{CD, \max}$) and types of α_{CD} model for each pair of C^-/M^- or DC^-/DM^- , using 2-60 mM α -CD, 2-16 mM β -CD or 2-50 mM DM- β -CD. The K and μ_{∞} values were determined using the CEFIT Program of a nonlinear least-squares fit to the data points of the corrected electrophoretic mobilities, with a change in the buffer viscosity, as a function of C [28-29]. The calculated μ_{∞} of weakly-binding analytes was obtained from the average of μ_{∞} values of other positional isomers and used to calculate K , as previously suggested [21]. The greater K for chlorosubstituted than methylsubstituted benzoates in each isomer indicates the strong CD binding to C^- than M^- and also DC^- than DM^- . This is possibly due to the stronger hydrophobicity of chlorosubstituted than methylsubstituted benzoates to CD cavity as seen from the higher k in MEKC for C^- than M^- and DC^- than DM^- . In addition, the steric effect of $-\text{CH}_3$ than $-\text{Cl}$ may reduce inclusion complexing for M^- or DM^- to CD. In comparison with other isomers, 2C $^-$, 2M $^-$, 2,6DC $^-$ and 2,6DM $^-$ have weaker binding to CD possibly due to the steric effect of substituents adjacent to a $-\text{COO}^-$ group.

Depending on the match between the interior size of CD (β -CD larger than α -CD) and the molecular size of the analytes, the higher K in α -CD than β -CD for C^- and DC^- was observed except for 2C $^-$, 2,3DC $^-$, 2,6DC $^-$ and 3,4DC $^-$, while the higher K in β -CD for M^- and DM^- was obtained except for 3,5DM $^-$. For the β -CD derivative, the smaller K in DM- β -CD than β -CD for all analytes was observed due to steric hindrance of methyl groups on the upper rim of DM- β -CD cone. In most cases, α -CD and DM- β -CD gave the higher binding selectivities ($\kappa = K_2/K_1$) than did β -CD, implying that α -CD and DM- β -CD is the better selector for separation of C^-/M^- and DC^-/DM^- . The κ values ranging from 1.0 to 21.2 indicates that the position of substituents affects on the difference in the CD binding of substituted benzoates.

Over a wide range of CD concentration, the values of α_{CD} increase to maximum values and then decrease and, therefore, the observed maximum α_{CD} as listed in Table 2 is the value for each pair of C^-/M^- or DC^-/DM^- at a given CD concentration in a working range used in this work. According to theoretical models for α_{CD} [25], in comparison with CZE, an increase in α_{CD} for each pair of C^-/M^- or DC^-/DM^- is consistent with the Type III α_{CD} model ($\kappa \geq 1 > \alpha_{CZE}$), except for the Type I α_{CD} model ($\kappa > \alpha_{CZE} \geq 1$) for 2C $^-$ /2M $^-$ with α -CD-EKC.

It should be noted that the analyte 2 in CD-EKC refers to the analyte with lower K , in order to fit with Eq.(3) and the Type of α_{CD} model [25]. For example, for 3C $^-$ /3M $^-$ with α -CD having K values of 80.7/22.3 M $^{-1}$, the selectivities are obtained from the following calculation; $\alpha_{CD} = \mu(3M^-)/\mu(3C^-)$, $\kappa = K(3C^-)/K(3M^-)$ and $\alpha_{CZE} = \mu_0(3M^-)/\mu_0(3C^-)$. Therefore, for pairs only with the Type III α_{CD} model, the theoretical α_{CZE} used in Eq.(3) for CD-EKC is equal to the reciprocal of the practical α_{CZE} in CZE shown in Table 1, such as 0.976 or 1/1.025 for 3C $^-$ /3M $^-$.

According to theoretical models for α_{CD} in our previous work [25], for the Type I α_{CD} model giving the same $|\mu|$ order in CD-EKC with CZE, an increase in C enhances α_{CD} to a maximum value and then decreases at higher C . Due to the opposite selectivities of α_{CZE} and κ for the Type III α_{CD} model giving the same $|\mu|$ order in CZE with CD-EKC at low C and possibly reversed $|\mu|$ order at high C , an increase in C results in a loss of the separation, starting from $1/\alpha_{CD} > 1$ ($\alpha_{CD} < 1$) to near 1, and then increases the separation ($\alpha_{CD} > 1$) at higher C .

In comparison with CZE, CD-EKC provides the better separation for a pair of $2C^-/2M^-$ with α -CD with the Type I α_{CD} model and other pairs with the Type III α_{CD} model. As previously explained [25], the Type III α_{CD} model can improve the separation with the larger κ than α_{CZE} values and high C . For the following four pairs, such as $2C^-/2M^-$ with DM- β -CD, and 2,6DC $^-/2,6DM^-$ with α -CD, β -CD or DM- β -CD, worse separation in CD-EKC than CZE were observed due to the small ratio of κ/α_{CZE} .

As a result of most cases, the better R_s for C^-/M^- and DC $^-/DM^-$ was achieved with CD-EKC than CZE and MEKC ($\alpha_{CD} > \alpha_{MEKC} > \alpha_{CZE}$). Using a wide range of C , such as 2–60 mM α -CD, 2–16 mM β -CD or 2–50 mM DM- β -CD, the baseline resolution was achieved for a pair of C^-/M^- ($R_s = 1.51$ – 15.8) and DC $^-/DM^-$ ($R_s = 1.66$ – 28.5), except for $2C^-/2M^-$ and 2,6DC $^-/2,6DM^-$ with β -CD or DM- β -CD.

3.4 Simultaneous separation of positional isomers of C^-/M^- and DC $^-/DM^-$

In CZE with 10 mM borate buffer (Fig. 3A), the co-elution of three pairs of C^-/M^- was observed due to similar μ for each positional isomer C^-/M^- . As can be seen from Fig. 3B using an MEKC buffer containing 40 mM SDS, the slightly better separation was obtained for positional isomeric separation C^-/M^- because of slightly higher α_k than α_{CZE} for each pair of C^-/M^- isomers. In comparison with CZE (Fig. 3A) and MEKC (Fig. 3B), the reversed apparent $|\mu|$ order in CD-EKC for $M^- > C^-$, particularly at 20 mM α -CD (Fig. 3C), 16 mM β -CD (Fig. 3D) or 5.0 mM DM- β -CD (Fig. 3E), was observed, except for $2C^-/2M^-$ with 20 mM α -CD and 5.0 mM DM- β -CD. This is due to the stronger binding of C^- than M^- to neutral CD, resulted in the lower apparent $|\mu|$ of analyte and its complex. In comparison with CZE and MEKC, CD-EKC gave the better simultaneous separation for similar μ compounds of C^-/M^- due to greater α_{CD} resulting from higher κ than α_{CZE} and α_k . Over a wide range of 15–60 mM α -CD, e.g. 20 mM (Fig. 3C), in the buffer, CD-EKC achieved the baseline resolution for simultaneous separation of C^-/M^- .

The similar trend was also found for the better simultaneous separation of DC $^-/DM^-$ with CD-EKC (Fig. 3F–3H) than CZE and MEKC (data not shown for CZE and MEKC). Using 40 mM DM- β -CD (Fig. 3H), the baseline separation of positional isomeric separation of DC $^-/DM^-$ was achieved, except for 2,3DM $^-/2,5DM^-$ and 2,6DC $^-/2,6DM^-$. It should be noted that simultaneous separation of positional isomers of DC $^-/DM^-$ may be improved by the addition of organic solvents, the change of CD types and concentrations or the use of dual CDs.

3.5 Application to phenoxy acid herbicides

The separation selectivity was also compared for phenoxy acid herbicides using three CE modes: CZE, MEKC and CD-EKC. Initial study is focused on the separation of 2,4-DB/MCPB and 2,4-D/MCPA which have only one different substituent of chloro and methyl group on a benzene ring. For CZE separation in Fig. 4A, the co-elution peaks of 2,4-DB/MCPB and 2,4-D/MCPA were observed due to their similar μ or small α_{CZE} , which is consistent with the previous work [23]. In MEKC with 40 mM SDS in Fig. 4B, these two pairs were also co-eluted. With the addition of MeOH or ACN up to 20 %v/v in the CZE or MEKC buffer, the baseline resolution was not obtained for 2,4-DB/MCPB and 2,4-D/MCPA (data not shown). Using CD-EKC with various types and concentrations of CD, the values of K , κ and $\alpha_{CD, \max}$ and types of α_{CD} model for 2,4-DB/MCPB and 2,4-D/MCPA are listed in Table 2. According to theoretical models for α_{CD} [25], in comparison with CZE, an increase in α_{CD} for 2,4-DB/MCPB and 2,4-D/MCPA with α -CD is consistent with the Type III α_{CD} model ($\kappa \geq 1 > \alpha_{CZE}$), whereas the Type I α_{CD} model ($\kappa > \alpha_{CZE} \geq 1$) for these analytes with β -CD or DM- β -CD. Due to the small κ of the analytes to β -CD (1.06 for 2,4-DB/MCPB and 1.02 for 2,4-D/MCPA), co-elution of two pairs was observed (data not shown). In comparison with β -CD, α -CD and DM- β -CD have the much higher separation selectivity (α -CD with 1.61 for 2,4-DB/MCPB and 1.39 for 2,4-D/MCPA, and DM- β -CD with 1.30 for 2,4-DB/MCPB and 1.41 for 2,4-D/MCPA). Baseline resolution was achieved over a wide range of C , for example, 2.0–30 mM α -CD for 2,4-DB/MCPB, 2.0–15 mM α -CD for 2,4-D/MCPA, 2.0–8.0 mM DM- β -CD for 2,4-DB/MCPB, and 2.0–50 mM DM- β -CD for 2,4-D/MCPA. Using 2.0–15 mM α -CD, the simultaneous separation of 2,4-DB/MCPB, 2,4-D/MCPA and other six phenoxy acid herbicides was not achieved. With 2.0–8.0 mM DM- β -CD for simultaneous separation of ten phenoxy acid herbicides, 3.0 mM DM- β -CD gave the achieved baseline resolution for all analytes within 4.0 min as shown in Fig. 4D.

4 Concluding remarks

CE separation selectivity for two analytes having similar μ , such as C^-/M^- and DC $^-/DM^-$, were compared in three CE modes: CZE, MEKC and CD-EKC. Small α_{CZE} was obtained for each pair of C^-/M^- and DC $^-/DM^-$. A slightly higher α_{MEKC} than α_{CZE} was observed due to the small difference in partitioning of C^-/M^- and DC $^-/DM^-$ into micelles. With the addition of organic solvents in the buffer of CZE or MEKC, a slight decrease in α_{CZE} and α_{MEKC} was observed. In comparison with CZE and MEKC, CD-EKC gave the higher α_{CD} than α_{CZE} and α_{MEKC} for C^-/M^- and DC $^-/DM^-$ because of large different in binding constant of analytes to CD. The better simultaneous separation of positional isomers of C^-/M^- and DC $^-/DM^-$ was also

observed using CD-EKC than CZE or MEKC. In addition, the baseline separation for 2,4-DB/MCPB and 2,4-D/MCPA, two pairs of phenoxy acid herbicides having the difference in chloro and methyl substituents on a benzene ring, was achieved in CD-EKC using α -CD or DM- β -CD, while not achieved in CZE and MEKC. The results imply that CD-EKC can be used as the better alternative to separate compounds having the different substituents only by chloro and methyl groups, in comparison with CZE and MEKC.

The authors gratefully acknowledge the financial support provided by the Thailand Research Fund (RMU5080054 to TN), the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (PHD00252550 to WS) and the Nation Research University Project of CHE and the Rachadaphiseksomphot Endowment Fund (FW648I). We extend our thanks to the Thai Government Stimulus Package 2(TKK25), under the Project for Establishment of Comprehensive Center for Innovative Food, Health Products and Agriculture (PERFECTA), for CE instrument support, and the Center of Petroleum, Petrochemicals and Advanced Materials, CU, for partial support.

References

- [1] Khaledi, M. G., *High Performance Capillary Electrophoresis*, John Wiley & Sons, New York 1998.
- [2] Chankvetadze, B., *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*, John Wiley & Sons, Chichester 1997.
- [3] Puangpila, C., Petsom, A., Nhujak, T., *Electrophoresis*, doi: 10.1002/elps.201000405.
- [4] Isemura, T., Kitagawa, F., Otsuka, K., *J. Sep. Sci.*, 2009, 32, 381-387.
- [5] Benz, N. J., Fritz, J. S., *J. High Resol. Chromatogr.*, 1995, 18, 175-178.
- [6] Friedl, W., Kenndler, E., *Anal Chem.* 1993, 65, 2003-2009.
- [7] Wren, S. A. C., *J. Microcol. Sep.* 1991, 3, 147-154.
- [8] Terabe, S., Yashima, T., Tanaka, N., Araki, M., *Anal. Chem.* 1988, 60, 1673-1677.
- [9] Reijenga, J. C., Gagliardi, L. G., Kenndler, E., *J. Chromatogr. A*, 2007, 1155, 142-145.
- [10] Yu, L., Qin, W., Li, S. F. Y., *Anal. Chim. Acta*, 2005, 547, 165-171.
- [11] Farran, A., Serra, C., Sepaniak, M. J., *J. Chromatogr. A* 1999, 835, 209-215.
- [12] Sarmini, K., Kenndler, E., *J. Chromatogr. A* 1999, 833, 245-259.
- [13] Sarmini, K., Kenndler, E., *J. Chromatogr. A* 1998, 806, 325-335.
- [14] Sarmini, K., Kenndler, E., *J. Chromatogr. A* 1997, 792, 3-11.
- [15] Lee, Y. J., Price, W. E., Sheil, M. M., *Analyst* 1995, 120, 2689-2694.
- [16] Fujiwara, S., Honda, S., *Anal. Chem.* 1987, 59, 487-490.
- [17] Cigić, I. K., Guček, M., Zupančič-Kralj, L., Pihlar, B., *J. Sep. Sci.* 2003, 26, 1253-1258.
- [18] Ge, L., Yong, J. W. H., Tan, S. N., Yang, X. H., Ong, E. S., *Electrophoresis*, 2005, 26, 1768-1777.
- [19] Chen, M. -H., Ding, W. -H., *J. Chromatogr. A* 2004, 1033, 167-172.
- [20] Kartsova, L. A., Komarova, N. V. *J. Anal. Chem.* 2003, 58, 972-978.
- [21] Ferguson, P. D., Goodall, D. M., Loran, J. S., *J. Chromatogr. A* 1997, 768, 29-38.
- [22] Khaled, M. Y., McNair, H.M., *J. High. Resol. Chromatogr.* 1996, 19, 143-150.
- [23] Hsieh, Y. -Z., Huang, H. -Y., *J. Chromatogr. A* 1996, 745, 217-223.
- [24] Li, D., Lucy, C. A., *Anal Chem* 2001, 73, 1324-1329.
- [25] Soonthorntantikul, W., Leepipatpiboon, N., Srisa-art, M., Nhujak T., Submitted.
- [26] Dean, J. A., *Lange's Handbook of Chemistry*, 13th Edition, McGraw-Hill Book Co., Singapore 1987.
- [27] Tehan, B. G., Lloyd, E. J., Wong, M. G., Pitt, W. R., Montana, J. G., Manallack, D. T., Gancia, E., *Quant. Struct. -Act. Relat.*, 2002, 21, 457-472.
- [28] Nhujak, T., Goodall, D. M., *J. Chromatogr. A* 2001, 907, 313-320.
- [29] Penn, S. G., Bergström, E. T., Knights, I. Lui, G., Ruddick, A., Goodall, D. M., *J. Phys. Chem.* 1995, 99, 3875-3880.

Table 1 Mobilities (μ), mobility selectivities (α_{CZE} and α_{MEKC}) and retention selectivities (α_k) for C^-/M^- and DC^-/DM^- in CZE and MEKC without the addition of organic modifiers.

Analytes (2/1)	CZE ^a		MEKC ^b	
	μ ($10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	α_{CZE} (μ_2/μ_1)	α_{MEKC} (μ_2/μ_1)	α_k (k_2/k_1)
2C ⁻ /2M ⁻	-2.83/-2.78	1.018	1.019	1.031
3C ⁻ /3M ⁻	-2.86/-2.79	1.025	1.027	1.061
4C ⁻ /4M ⁻	-2.82/-2.76	1.022	1.023	1.048
2,3DC ⁻ /2,3DM ⁻	-2.74/-2.67	1.026	1.029	1.050
2,4DC ⁻ /2,4DM ⁻	-2.67/-2.62	1.019	1.021	1.036
2,5DC ⁻ /2,5DM ⁻	-2.73/-2.65	1.030	1.033	1.053
2,6DC ⁻ /2,6DM ⁻	-2.70/-2.62	1.031	1.034	1.056
3,4DC ⁻ /3,4DM ⁻	-2.75/-2.65	1.038	1.046	1.103
3,5DC ⁻ /3,5DM ⁻	-2.72/-2.62	1.038	1.046	1.099

^aCZE buffer contained a 10 mM borate buffer at pH 9.2.^bMEKC buffer contained 40 mM SDS in a 10 mM borate buffer at pH 9.2.**Table 2** Binding constants (K), binding selectivities ($\kappa = K_1/K_2$), maximum mobility selectivities ($\alpha_{\text{CD, max}}$) and Types of α_{CD} model for C^-/M^- , DC^-/DM^- , 2,4-DB/MCPB and 2,4-D/MCPA in CD-EKC.

Analytes ^a	α -CD (0 to 60 mM)				β -CD (0 to 16 mM)				DM- β -CD (0 to 50 mM)			
	K (M ⁻¹)	κ	$\alpha_{\text{CD,max}}$ ([CD] ^b)	Type	K (M ⁻¹)	κ	$\alpha_{\text{CD,max}}$ ([CD] ^b)	Type	K (M ⁻¹)	κ	$\alpha_{\text{CD,max}}$ ([CD] ^b)	Type
2C ⁻ /2M ⁻	2.7±0.5 / 2.9±0.5	1.07	1.036 (60)	I	6.5±0.5/4.8±0.3	1.35	1.021 (16)	III	< 1.0/<1.0	~1.0	1.018 (0)	x
3C ⁻ /3M ⁻	80.7±2.0/22.3±0.6	3.62	1.408 (50)	III	70.8±0.4/29.7±0.2	2.38	1.183 (16)	III	30.7±0.8/8.4±0.2	3.65	1.404 (50)	III
4C ⁻ /4M ⁻	129.0±3.0/27.5±0.6	4.69	1.444 (30)	III	104.7±0.6/84.8±0.3	1.23	1.048 (14)	III	45.4±1.1/29.5±0.5	1.54	1.264 (40)	III
2,3DC ⁻ /2,3DM ⁻	3.5±0.9/2.0±0.8	1.75	1.074 (60)	III	52.9±0.5/45.0±0.9	1.18	1.081 (16)	III	15.2±0.4/8.2±0.5	1.85	1.417 (50)	III
2,4DC ⁻ /2,4DM ⁻	204.5±3.8/35.1±0.8	5.83	1.452 (20)	III	79.7±0.8/50.0±0.6	1.59	1.141 (16)	III	22.7±0.5/15.7±0.5	1.45	1.260 (50)	III
2,5DC ⁻ /2,5DM ⁻	97.3±2.9/37.2±1.1	2.62	1.247 (30)	III	80.5±0.6/43.3±0.7	1.86	1.206 (16)	III	21.0±0.6/2.2±0.3	9.55	1.241 (50)	III
2,6DC ⁻ /2,6DM ⁻	1.2±0.2/1.1±0.4	1.09	1.031 (0)	III	4.5±0.5/4.3±0.7	1.05	1.031 (0)	III	<1.0/<1.0	~1.0	1.031 (0)	x
3,4DC ⁻ /3,4DM ⁻	14.5±2.8/2.1±0.5	6.90	2.025 (60)	III	404.1±3.1/167.6±1.2	2.41	1.217 (6)	III	203.6±3.5/68.5±1.2	2.97	1.679 (50)	III
3,5DC ⁻ /3,5DM ⁻	191.9±5.8/38.8±1.3	4.95	1.444 (20)	III	66.5±0.1/6.2±1.4	10.7	1.298 (16)	III	40.3±0.9/1.9±0.3	21.2	1.627 (50)	III
2,4-DB/MCPB	381.5±12.0/235.9±4.9	1.61	1.157 (6)	III	434.8±9.8/460.4±7.1	1.06	1.027 (10)	I	211.8±4.2/275.4±6.6	1.30	1.077 (6)	I
2,4-D/MCPA	274.3±7.8/197.3±6.0	1.39	1.072 (6)	III	108.2±1.6/110.6±1.3	1.02	1.037 (10)	I	41.9±1.1/59.1±1.1	1.41	1.178 (50)	I

^aAnalyte 2 refers to the former for the α_{CD} Type I, while the latter for the α_{CD} Type III.^bCD concentrations (mM) giving the observed $\alpha_{\text{CD, max}}$ in parenthesis.x refers to non-identified Type due to very small K .

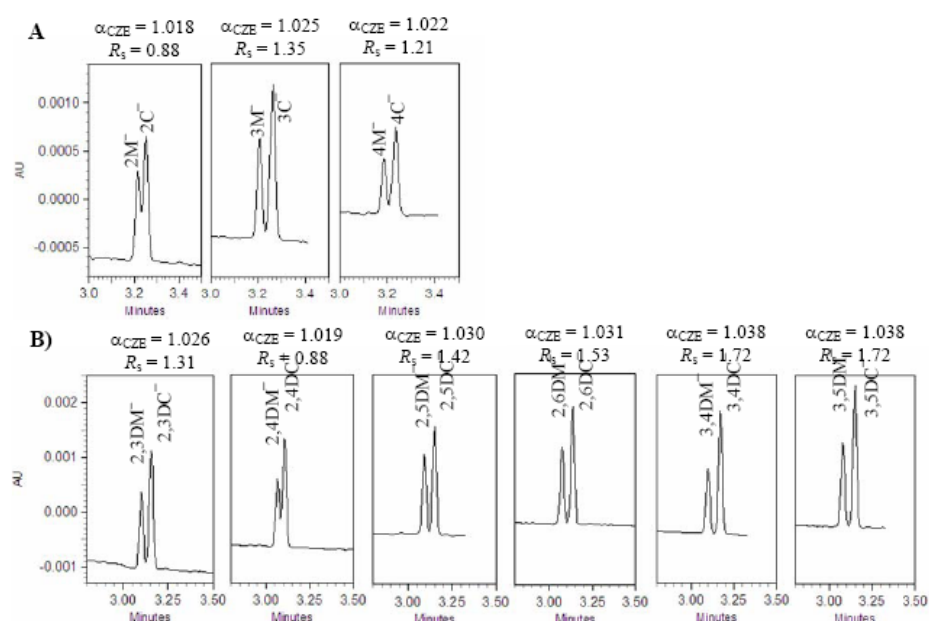


Figure 1 Electropherograms for CZE separation of (A) chlorobenzoate/methylbenzoate; C^-/M^- and (B) dichlorobenzoate/dimethylbenzoate; DC^-/DM^- . CE conditions: a 10-mM borate ($Na_2B_4O_7$) buffer at pH 9.2, 50 μm id $\times$ 40.2 cm (30 cm to detector) uncoated fused-silica capillary, temperature of 25 $^{\circ}C$, applied voltage of 15 kV, UV detection at 214 nm and 0.5 psi pressure injection for 3 s.

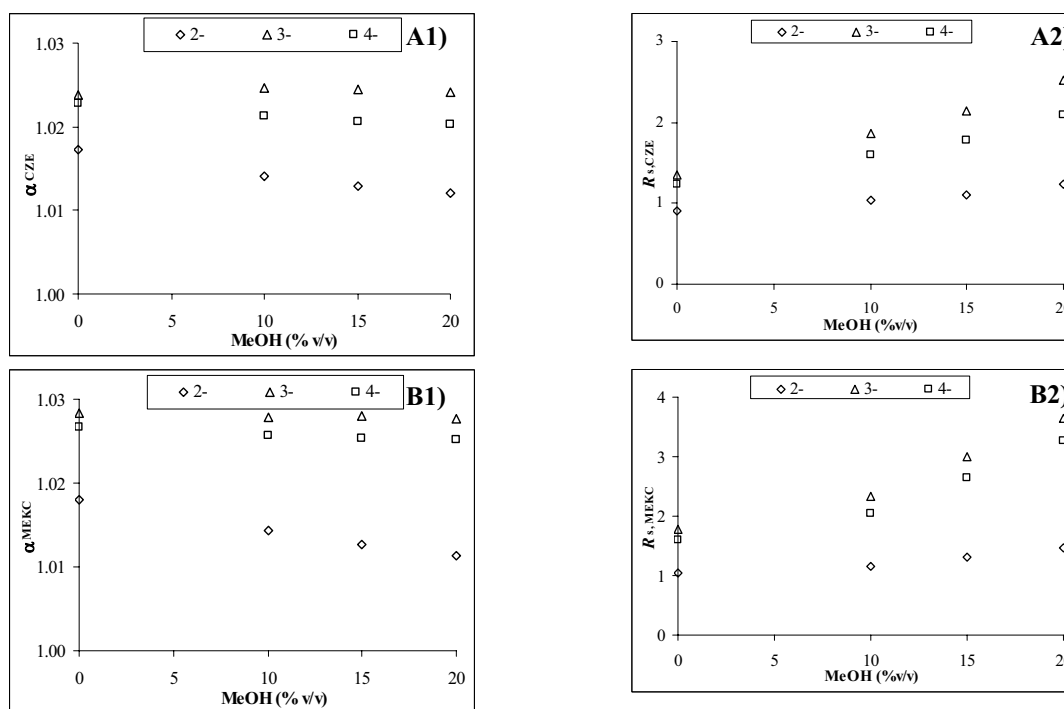


Figure 2 Effect of MeOH in the buffer on mobility selectivity (A1, B1) and resolution (A2, B2) of C^-/M^- in CZE and MEKC: (A1) mobility selectivity in CZE (α_{CZE}), (A2) resolution in CZE ($R_{s,CZE}$), (B1) mobility selectivity in MEKC (α_{MEKC}) and (B2) resolution in MEKC ($R_{s,MEKC}$). A CZE buffer contained a 10-mM borate buffer at pH 9.2 and MeOH. An MEKC buffer contained 40 mM SDS and MeOH in a 10-mM borate buffer at pH 9.2. Other CE conditions as shown in Fig. 1.

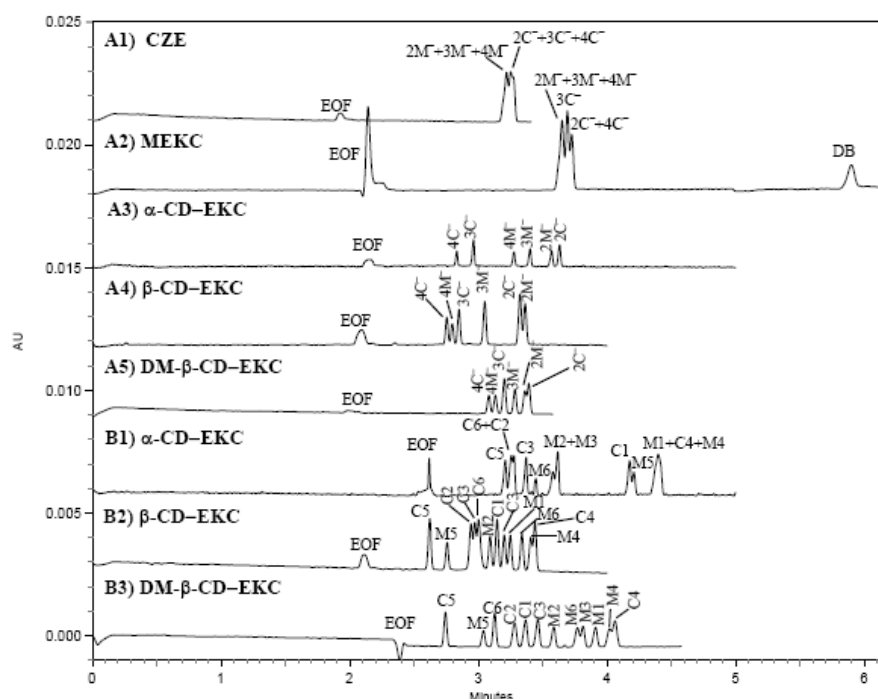


Figure 3 Simultaneous separation of positional isomers of C^-/M^- (A) and DC^-/DM^- (B) in three CE modes at a pH 9.2 buffer: (A1) CZE with 10 mM $Na_2B_4O_7$, (A2) MEKC with 40 mM SDS in 10 mM $Na_2B_4O_7$, and CD-EKC with 10 mM $Na_2B_4O_7$ containing (A3) 20 mM α -CD, (A4) 16 mM β -CD, (A5) 5 mM DM- β -CD, (B1) 60 mM α -CD (B2) 12 mM β -CD and (B3) 40 mM DM- β -CD. (Analytes: 2,3DC $^-$ (C1), 2,4DC $^-$ (C2), 2,5DC $^-$ (C3), 2,6DC $^-$ (C4), 3,4DC $^-$ (C5), 3,5DC $^-$ (C6), 2,3DM $^-$ (M1), 2,4DM $^-$ (M2), 2,5DM $^-$ (M3), 2,6DM $^-$ (M4), 3,4DM $^-$ (M5), 3,5DM $^-$ (M6). Other CE conditions as shown in Fig. 1.

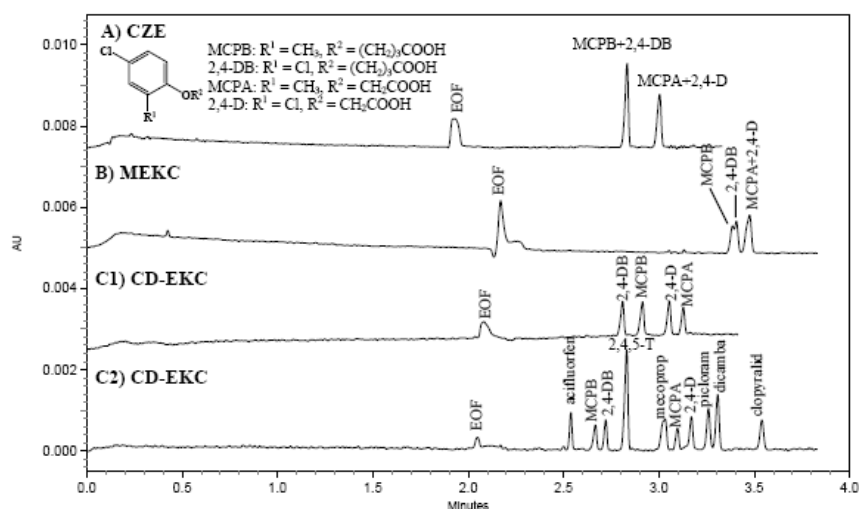


Figure 4 Simultaneous separation of chlorophenoxy acid herbicides in three CE modes at a pH 9.2 buffer: (A) CZE with 10 mM $Na_2B_4O_7$, (B) MEKC with 40 mM SDS in 10 mM $Na_2B_4O_7$ and (C) CD-EKC with 10 mM $Na_2B_4O_7$ containing (C1) 2.0 mM α -CD and (C2) 3.0 mM DM- β -CD. Other CE conditions as shown in Fig. 1.

ภาคผนวก 6

สรุป Output จากโครงการวิจัย

ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

- 1) W. Soonthorntantikul, N. Leepipatpiboon, T. Ikegami, N. Tanaka, T. Nhujak “Selectivity comparisons of monolithic silica capillary columns modified with poly(octadecyl methacrylate) and octadecyl moieties for halogenated compounds in reversed-phase Liquid Chromatography” *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 5868-5874. IF = 4.101.
- 2) S. Angkanasiriporn, W. Singsung, A. Petsom, T. Nhujak, “Comparison and prediction of the retention in micellar electrokinetic chromatography and microemulsion electrokinetic chromatography for disubstituted benzenes” *Electrophoresis*, 31 (2010) 695-701, IF = 3.077.
- 3) C. Puangpila, A. Petsom, T. Nhujak “Theoretical models of separation selectivity for charged compounds in micellar electrokinetic chromatography” *Electrophoresis*, 32 (2011), 203-209. IF = 3.077
- 4) W. Soonthorntantikul, M. Srisa-art, N. Leepipatpiboon, T. Nhujak “Theoretical models of separation selectivity for charged compounds in cyclodextrin electrokinetic chromatography” In preparation for submission.
- 5) W. Soonthorntantikul, N. Leepipatpiboon, M. Srisa-art, T. Nhujak “Comparison of Separation Selectivity in CZE, MEKC and CD-EKC for chlorobenzoates/methylbenzoates, and application to separation of phenoxy acid herbicides” In preparation for submission.

ผลงานนำเสนอในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

- 1) C. Puangpila, A. Petsom, T. Nhujak “Theoretical models of separation selectivity for charged compounds in micellar electrokinetic chromatography” *Poster Presentation*, 10th Tenth Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separation and Analysis, December, 10-13, 2010, Hong Kong.
- 2) W. Soonthorntantikul, M. Srisa-art, N. Leepipatpiboon, T. Nhujak “Theoretical models of separation selectivity for charged compounds in cyclodextrin electrokinetic chromatography”, *Poster Presentation*, 10th Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separation and Analysis, December, 10-13, 2010, Hong Kong.
- 3) W. Soonthorntantikul, N. Leepipatpiboon, M. Srisa-art, T. Nhujak “Comparison of Separation Selectivity in CZE, MEKC and CD-EKC for Chlorobenzoates/ Methylbenzoates, and Application to Separation of Phenoxy Acid Herbicides” *Poster Presentation*, 10th Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separation and Analysis, December, 10-13, 2010, Hong Kong.
- 4) C. Puangpila, A. Petsom, T. Nhujak “Theoretical models of separation selectivity for charged compounds in micellar electrokinetic chromatography” *Poster Presentation*, 17th International Symposium on Electro- and Liquid Phase-separation Techniques, 29 August- 1 October, 2010, Maryland, USA.
- 5) S. Angkanasiriporn, W. Singsung, A. Petsom, T. Nhujak, “Retention of disubstituted benzenes micellar electrokinetic chromatography and microemulsion electrokinetic chromatography, *Poster Presentation*, 24th International Symposium on Microscales Bioseparation, 12-28 October 2009, Dalian, China.
- 6) W. Soonthorntantikul, N. Leepipatpiboon, T. Ikegami, N. Tanaka, T. Nhujak “Selectivity comparisons of monolithic silica capillary columns modified with poly(octadecyl methacrylate) and octadecyl moieties for halogenated compounds in reversed-phase liquid chromatography” *Poster Presentation*, 33rd International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separation and Related Techniques, 2-5 December 2008, Kyoto, Japan.

3. การนำผลงานไปใช้ประโยชน์เชิงวิชาการ

งานวิจัยนี้ใช้เป็นแหล่งอ้างอิงทางวิชาการสำหรับการเรียนการสอนในวิชา 2302443 INSTRU ANAL LAB, 2302549 ELECTROPHORESIS และ 2302649 INSTRU ANAL LAB ในการอธิบายพฤติกรรมและการเคลื่อนที่และการแยกของสาร และได้สร้างนักวิจัยระดับปริญญาเอก 2 คน และปริญญาโท 1 คน

ภาคผนวก 6

สรุป Output จากโครงการวิจัย

ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

- 1) W. Soonthorntantikul, N. Leepipatpiboon, T. Ikegami, N. Tanaka, T. Nhujak “Selectivity comparisons of monolithic silica capillary columns modified with poly(octadecyl methacrylate) and octadecyl moieties for halogenated compounds in reversed-phase Liquid Chromatography” *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 5868-5874. IF = 4.101.
- 2) S. Angkanasiriporn, W. Singsung, A. Petsom, T. Nhujak, “Comparison and prediction of the retention in micellar electrokinetic chromatography and microemulsion electrokinetic chromatography for disubstituted benzenes” *Electrophoresis*, 31 (2010) 695-701, IF = 3.077.
- 3) C. Puangpila, A. Petsom, T. Nhujak “Theoretical models of separation selectivity for charged compounds in micellar electrokinetic chromatography” *Electrophoresis*, 32 (2011), 203-209. IF = 3.077
- 4) W. Soonthorntantikul, M. Srisa-art, N. Leepipatpiboon, T. Nhujak “Theoretical models of separation selectivity for charged compounds in cyclodextrin electrokinetic chromatography” In preparation for submission.
- 5) W. Soonthorntantikul, N. Leepipatpiboon, M. Srisa-art, T. Nhujak “Comparison of Separation Selectivity in CZE, MEKC and CD-EKC for chlorobenzoates/methylbenzoates, and application to separation of phenoxy acid herbicides” In preparation for submission.

ผลงานนำเสนอในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

- 1) C. Puangpila, A. Petsom, T. Nhujak “Theoretical models of separation selectivity for charged compounds in micellar electrokinetic chromatography” *Poster Presentation*, 10th Tenth Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separation and Analysis, December, 10-13, 2010, Hong Kong.
- 2) W. Soonthorntantikul, M. Srisa-art, N. Leepipatpiboon, T. Nhujak “Theoretical models of separation selectivity for charged compounds in cyclodextrin electrokinetic chromatography”, *Poster Presentation*, 10th Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separation and Analysis, December, 10-13, 2010, Hong Kong.
- 3) W. Soonthorntantikul, N. Leepipatpiboon, M. Srisa-art, T. Nhujak “Comparison of Separation Selectivity in CZE, MEKC and CD-EKC for Chlorobenzoates/ Methylbenzoates, and Application to Separation of Phenoxy Acid Herbicides” *Poster Presentation*, 10th Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separation and Analysis, December, 10-13, 2010, Hong Kong.
- 4) C. Puangpila, A. Petsom, T. Nhujak “Theoretical models of separation selectivity for charged compounds in micellar electrokinetic chromatography” *Poster Presentation*, 17th International Symposium on Electro- and Liquid Phase-separation Techniques, 29 August- 1 October, 2010, Maryland, USA.
- 5) S. Angkanasiriporn, W. Singsung, A. Petsom, T. Nhujak, “Retention of disubstituted benzenes micellar electrokinetic chromatography and microemulsion electrokinetic chromatography, *Poster Presentation*, 24th International Symposium on Microscales Bioseparation, 12-28 October 2009, Dalian, China.
- 6) W. Soonthorntantikul, N. Leepipatpiboon, T. Ikegami, N. Tanaka, T. Nhujak “Selectivity comparisons of monolithic silica capillary columns modified with poly(octadecyl methacrylate) and octadecyl moieties for halogenated compounds in reversed-phase liquid chromatography” *Poster Presentation*, 33rd International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separation and Related Techniques, 2-5 December 2008, Kyoto, Japan.

3. การนำผลงานไปใช้ประโยชน์เชิงวิชาการ

งานวิจัยนี้ใช้เป็นแหล่งอ้างอิงทางวิชาการสำหรับการเรียนการสอนในวิชา 2302443 INSTRU ANAL LAB, 2302549 ELECTROPHORESIS และ 2302649 INSTRU ANAL LAB ในการอธิบายพฤติกรรมและการเคลื่อนที่และการแยกของสาร และได้สร้างนักวิจัยระดับปริญญาเอก 2 คน และปริญญาโท 1 คน