บทที่ 2

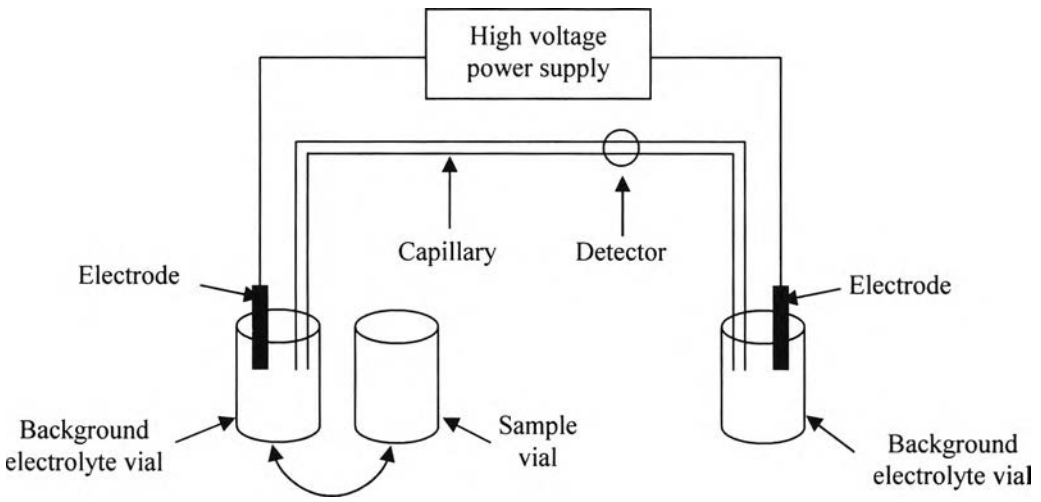
ทฤษฎี

สำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1 คะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส (capillary electrophoresis, CE)

CE เป็นเทคนิคของการแยกสารที่เกิดขึ้นภายในคะพิลลารีขนาดเล็กที่บรรจุด้วยสารละลายอิเล็กโทรไลต์ (background electrolyte, BGE) โดยที่ปลายทั้งสองข้างของคะพิลลารีจุ่มอยู่ในภาชนะบรรจุสารละลายอิเล็กโทรไลต์ เมื่อมีการให้ศักย์ไฟฟ้าจะเกิดการแยกสารภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้า (electric field, E) หลักการแยกสารของ CE อาศัยความแตกต่างของความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร (electrophoretic mobility, μ) ซึ่งขึ้นกับอัตราส่วนระหว่างประจุต่อขนาดของไอออน

2.2 ส่วนประกอบของเครื่อง CE [Weinberger: 2000]



รูปที่ 2.1 ส่วนประกอบอย่างง่ายของเครื่อง CE : ดัดแปลงจาก [Weinberger: 2000]

คะพิลลารี (capillary) ที่ใช้ในกันทั่วไปปัจจุบันเป็น fused silica capillary ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 10 ถึง 200 μm (ที่นิยมใช้ทั่วไป คือ 50 และ 75 μm) ภายนอกของคะพิลลารีเคลือบด้วยพอลิเอไมด์เพื่อป้องกันการแตกหัก และลอกพอลิเอไมด์ออกเฉพาะบริเวณตรวจวัดสำหรับเครื่องตรวจวัดประเภทแสง เช่น ยูวี-วิสิเบิล (UV-visible)

เครื่องกำเนิดไฟฟ้า (voltage supply) กระแสตรงที่ให้ความต่างศักย์ –30 ถึง +30 V และกระแสสูงสุดไม่เกิน 200 ถึง 300 μA ส่วนใหญ่นิยมใช้ความต่างศักย์คงที่ อาจให้ศักย์ไฟฟ้าเป็นบวกโดยด้านเครื่องตรวจวัดหรือด้านปลายออก (outlet) เป็นขั้วลบ (แคโทด) และด้านฉีดสารหรือด้าน

ปลายเข้า (inlet) เป็นขั้วบวก (แอโนด) ซึ่งเรียกแบบนี้ว่าการใช้ศักย์ไฟฟ้าแบบขั้วปกติ (normal polarity of applied voltage) หรือสลับขั้วให้ด้านปลายเป็นขั้วบวก (ศักย์ไฟฟ้าเป็นลบ) เรียกว่าการใช้ศักย์ไฟฟ้าแบบกลับขั้ว (reversed polarity of applied voltage)

ขั้วไฟฟ้า (electrode) ที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นโลหะแพลทินัม

ภาชนะบรรจุ BGE เป็นแก้วขนาด 1 ถึง 5 ml และเป็นพลาสติกขนาดเล็กในระดับ μl (micro vial) สำหรับสารละลายตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยและสารมาตรฐานที่มีราคาแพง

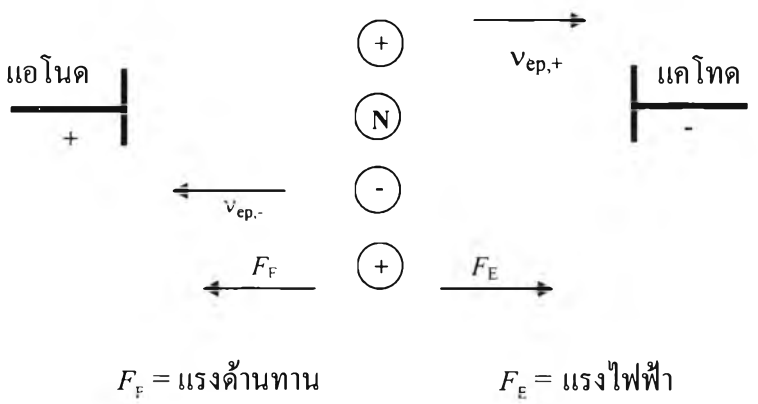
เครื่องตรวจวัด (detector) ที่นิยมใช้กันมากที่สุดใน CE คือ UV-Visible detector

ส่วนควบคุมความดัน (pressure controller) ใช้สำหรับบรรจุสารละลายเข้าไปในคะพิลลารี ระบบอัดความดันอาจใช้แก๊สไนโตรเจน หรือเครื่องอัดอากาศ

ส่วนควบคุมอุณหภูมิของคะพิลลารี (temperature controller) ใช้สำหรับเปลี่ยนอุณหภูมิเพื่อปรับการแยกสาร อีกทั้งช่วยลด Joule heating ที่เกิดขึ้นเมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าในขณะที่แยกสาร

2.3 ทฤษฎีเบื้องต้นของ CE

2.3.1 ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า (electrophoretic mobility, μ) [Foret: 1993]



F_F = แรงด้านทาน F_E = แรงไฟฟ้า

รูปที่ 2.2 แรงไฟฟ้า แรงต้านการเคลื่อนที่และทิศทางการเคลื่อนที่ของสารภายใต้สนามไฟฟ้า

หลักการแยกสารด้วยเทคนิคอิเล็กโทรฟอริซิส คือ สารต่างชนิดกันสามารถเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าด้วยอัตราเร็วที่ต่างกัน ซึ่งหลังจากให้ความต่างศักย์ที่ขั้วไฟฟ้าที่จุ่มอยู่ในภาชนะที่บรรจุสารละลายอิเล็กโทรไลต์ จะเกิดความเข้มของสนามไฟฟ้า (electric field strength, E หน่วยสากลเป็น V m^{-1}) ดังรูปที่ 2.2 และไอออนของสารจะเคลื่อนที่ด้วยแรงไฟฟ้า F_E ดังสมการ

$$F_E = zeE \qquad (2.1)$$

z คือ ค่าประจุของสาร e คือ ค่าประจุของอิเล็กตรอน (1.6×10^{-19} คูลอมบ์)

เกิดแรงต้านการเคลื่อนที่ F_F เนื่องจากความหนืดของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ (η หน่วยสากลเป็น N s m^{-2}) ในกรณีอนุภาคเป็นทรงกลม ค่า F_F มีความสัมพันธ์กับตัวแปรต่างๆ ดังสมการ

$$F_F = 6\pi r_h \eta v_{ep} \qquad (2.2)$$

r_h คือ รัศมีไฮโดรไดนามิกของไอออน (hydrodynamic radius of an ion) ซึ่งเป็นรัศมีของไอออนที่มีโมเลกุลของน้ำล้อมรอบขณะที่ไอออนเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า

v_{ep} คือ ความเร็วในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร (electrophoretic velocity)

ระบบจะสมดุล แรงไฟฟ้าและแรงต้านทานมีค่าเท่ากันแต่มีทิศทางตรงข้ามกัน

$$F_F = F_E \qquad (2.3)$$

$$zeE = 6\pi r_h \eta v_{ep} \qquad (2.4)$$

จากสมการที่ 2.4 ทำให้ได้สมการดังนี้

$$v_{ep} = \frac{ze}{6\pi\eta r_h} E = \mu E \qquad (2.5)$$

ดังนั้นความเร็วในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร (electrophoretic velocity, v_{ep}) ภายใต้ความเข้มของสนามไฟฟ้า 1 V m^{-1} เรียกว่า ค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าหรือความสามารถในการเคลื่อนที่ของสาร (electrophoretic mobility หรือ mobility, μ หน่วยสากลเป็น $m^2V^{-1}s^{-1}$) และในตัวกลางหนึ่งๆ ความสามารถในการเคลื่อนที่ของสารต่างๆ ขึ้นอยู่กับค่าประจุ รัศมีไฮโดรไดนามิกและความหนืดของตัวกลาง ดังสมการ 2.6

$$\mu = \frac{v_{ep}}{E} = \frac{ze}{6\pi\eta r_h} \qquad (2.6)$$

จากสมการดังกล่าวจะเห็นได้ว่า สารที่มีประจุมากและขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าสารที่มีประจุน้อยและขนาดใหญ่ อีกประการหนึ่งคือ สารที่มีประจุตรงกันข้ามจะเคลื่อนที่ไปในทิศทางตรงข้ามกัน

ที่อุณหภูมิ 25 °C และสารละลายอิเล็กโทรไลต์เจือจางมากๆ เรียก ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้านี้ว่า ความสามารถในการเคลื่อนที่สมบูรณ์ (absolute mobility, μ°) ซึ่งเป็นค่าเฉพาะของสารหนึ่งๆ

ปัจจัยที่มีผลต่อค่า μ ได้แก่

1. ความแรงไอออนิก (ionic strength, I, หน่วยเป็น mol kg^{-1}หรือ mol/l) หรือความเข้มข้นของ BGE โดยการเพิ่มความแรงไอออนิกของ BGE ทำให้ z ลดลง และ r_h มากขึ้น (r_h จะเป็นผลรวมของ r_h ของไอออนของสารตัวอย่างและเคาน์เตอร์ไอออน (counter ion)) [Foret: 1993] ดังนั้นค่า μ จะลดลง

2. ความหนืดและอุณหภูมิ จากสมการ 2.6 ค่า μ จะแปรผกผันกับความหนืดของ BGE [Kenndler: 1998] ดังนั้นเมื่อเพิ่มความหนืดค่า μ จะลดลง ในขณะที่การเพิ่มอุณหภูมิทำให้ความหนืดของ BGE ลดลง ดังนั้นค่า μ จะเพิ่มขึ้น

3. pH ของ BGE สำหรับสารตัวอย่างที่เป็นกรดอ่อนหรือเบสอ่อน การเพิ่ม pH ของ BGE จะมีผลต่อการเพิ่มดีกรีการแตกตัวของสาร (the degree of dissociation) ของกรดอ่อน ทำให้ μ ของกรดอ่อนเพิ่มขึ้น และลดดีกรีของโพรโทเนต (the degree of protonation) ของเบสอ่อน ทำให้ μ ของเบสอ่อนลดลง [Kenndler: 1998]

4. ตัวทำละลายอินทรีย์ โดยทั่วไปเมื่อเพิ่มปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์มีผลทำให้ค่า μ ลดลง เนื่องจากดีกรีของการแตกตัวของสารที่เป็นกรดอ่อนหรือเบสอ่อนลดลง จึงทำให้ z ของสารลดลง ดังนั้นมีผลทำให้ลด μ [Kenndler: 1998]

5. ขนาดของคะพิลลารี (d) และความเข้มสนามไฟฟ้า (E) ที่ใช้ จากสมการ 2.6 จะเห็นว่าค่า μ ไม่ขึ้นกับ d และ E แต่ในทางปฏิบัติ การเพิ่ม d และ E ทำให้ μ เพิ่มขึ้น เนื่องจากผลของ Joule heating ที่เพิ่มขึ้น ทำให้คะพิลลารีมีอุณหภูมิเพิ่มขึ้น

2.3.2 การไหลของอิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmotic flow, EOF) [Grossman: 1992]

การไหลของอิเล็กโทรออสโมซิสเป็นลักษณะเฉพาะของ CE เปรียบเทียบได้กับปั๊มใน HPLC กรณีที่คะพิลลารีทำด้วยฟิวส์ซิลิกา (fused silica) ผิวด้านในจะประกอบด้วยหมู่ซิลินอล (-Si-OH) ซึ่งจะแตกตัวเป็นไอออนเมื่อบรรจุสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่มีค่า pH > 3 ทำให้ผิวด้านในของคะพิลลารีมีประจุลบ ทำให้เกิด H^+ หรือ H_3O^+ กระจายอยู่ในสารละลายหรือทำปฏิกิริยากับ OH^- เกิดเป็นโมเลกุลของน้ำ ดังสมการ 2.7 และ 2.8

$$\text{-Si-OH (s)} + OH^-\text{ (aq)} \rightleftharpoons \text{-Si-O}^-\text{ (s)} + H_2O\text{ (l)} \quad (2.7)$$

$$\text{-Si-OH (s)} + H_2O\text{ (l)} \rightleftharpoons \text{-Si-O}^-\text{ (s)} + H_3O^+\text{ (aq)} \quad (2.8)$$

ประจุลบดังกล่าวจะดึงดูดไอออนบวกจากสารละลายอิเล็กโทรไลต์หรือบัฟเฟอร์มาเกาะที่ผิว เกิดเป็นชั้นของไอออน 2 ชั้น (double layers) คือ ชั้นที่เกาะติดแน่นกับผิวของคะพิลลารี (fixed layer หรือ the stern layer) ซึ่งจะไม่เคลื่อนที่เนื่องจากอิทธิพลของแรงไฟฟ้าสถิต (electrostatic force) และ/หรือ แรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der waals force) และชั้นที่เกาะอย่างหลวมๆ (diffuse layer) ส่วนไอออนบวกที่เหลือจะอยู่ใน bulk solution

ผลของการเกิด double layer ทำให้ในสารละลายมีไอออนบวกมากกว่าไอออนลบ เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าที่ปลายทั้งสองข้างของคะพิลลารี (ปลายด้านเครื่องตรวจวัดเป็นขั้วแคโทดหรือขั้วลบ) ไอออนบวกของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่อยู่หนาแน่นแต่เคลื่อนที่ได้ที่ชั้น diffuse layer และ bulk solution ก็จะเคลื่อนที่ไปทางขั้วแคโทดได้ด้วยความเร็วที่เรียกว่า ความเร็วอิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmotic velocity, ν_{eo})

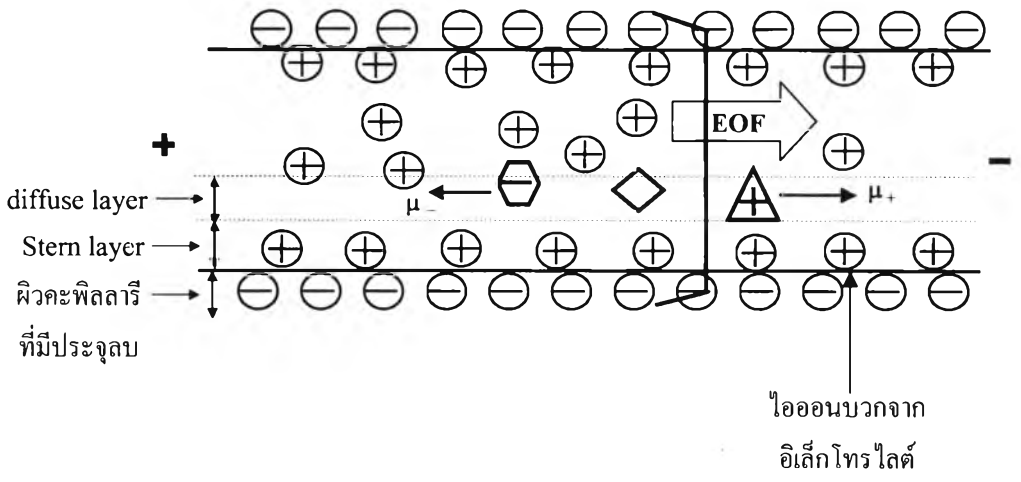
$$\nu_{eo} = -\frac{\varepsilon\zeta}{4\pi\eta}E \quad (2.9)$$

ζ = ศักย์ไฟฟ้าซีต้า (zeta potential) คือ ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ถัดจากรอยต่อระหว่าง stern layer และ diffuse layer

ε = permittivity ของตัวกลาง

η = ความหนืดใน double layer

โดยปกติไอออนบวกของสารละลายอิเล็กโทรไลต์จะมีโมเลกุลของน้ำล้อมรอบ การเคลื่อนที่ของมันทำให้ดึงโมเลกุลของน้ำเคลื่อนที่ไปยังขั้วแคโทดด้วย เกิดเป็นกระแสของสารละลายตัวกลางพัดจากปลายของคะพิลลารีด้านหนึ่ง (ขั้วแอโนดหรือขั้วบวก) ไปยังปลายอีกด้านหนึ่ง (ขั้วแคโทดหรือขั้วลบ) เรียกปรากฏการณ์ของการเคลื่อนของโมเลกุลของน้ำหรือสารละลายนี้ว่า อิเล็กโทรออสโมซิส และเรียกการเคลื่อนที่ด้วยอิทธิพลนี้ว่าการไหลของอิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmotic flow, EOF) ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 การไหลของอิเล็กโทรออสโมซิสในคะพิลลารี: ดัดแปลงจาก [Landers: 1997]

จากสมการที่ 2.9 แสดงให้เห็นว่า v_{eo} ไม่ขึ้นกับรัศมีของคะพิลลารีอาจกล่าวได้ว่า v_{eo} เท่ากันตลอดรัศมีของคะพิลลารี จากสมการที่ 2.9 อัตราส่วนระหว่าง v_{eo} ต่อ E เรียกว่าสัมประสิทธิ์ของอิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmotic mobility หรือ electroosmotic coefficient, μ_{eo}) ดังสมการ 2.10

$$\mu_{eo} = \frac{v_{eo}}{E} = \frac{-\varepsilon\zeta}{4\pi\eta} \qquad (2.10)$$

ปัจจัยที่มีผลต่อค่า EOF ได้แก่

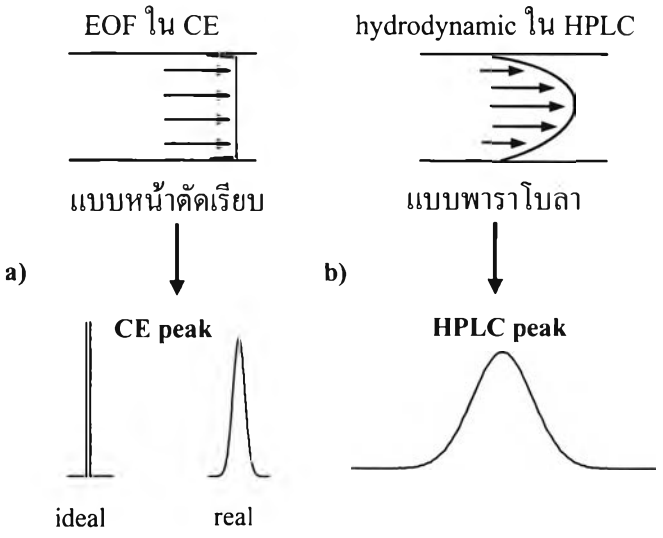
1. pH ของ BGE โดยที่การลด pH ของ BGE ทำให้การแตกตัวของหมู่ซิลินอลที่บริเวณผิวคะพิลลารีลดลง ดังนั้น EOF จะลดลง

2. ความแรงไอออนิกของ BGE ถ้าเพิ่มความแรงไอออนิกของ BGE ทำให้ EOF ลดลง แต่ถ้าเพิ่มขึ้นมากๆ อาจทำให้ EOF เพิ่มขึ้นเนื่องจากผลของ Joule heating

ปัจจัยอื่นๆ เช่น ความหนืด อุณหภูมิ ขนาดของคะพิลลารีและความเข้มของสนามไฟฟ้า มีผลต่อ EOF เช่นเดียวกับค่า μ

2.3.3 ลักษณะการเคลื่อนที่ใน CE

ลักษณะการเคลื่อนที่ของสารใน CE เป็นแบบหน้าดัดเรียบ (flat flow profile) แสดงดังรูปที่ 2.4a ซึ่งต่างจากการไหลใน HPLC ที่ใช้ปั๊มเป็นตัวผลักดันทำให้เกิดการไหลของเฟสเคลื่อนที่ การไหลโดยใช้ปั๊มทำให้มีลักษณะการเคลื่อนที่เป็นพาราโบลา (parabolic flow profile) ในรูปที่ 2.4b ทั้งนี้เนื่องจากอัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่ตรงกลางคอลัมน์จะสูงกว่าที่ผนังซึ่งมีแรงเสียดทาน ด้วยเหตุนี้โซนของสารที่เกิดจากการแยกใน CE จะแคบกว่าใน HPLC จึงทำให้ประสิทธิภาพในการแยก (efficiency) ของ CE ดีกว่าใน HPLC

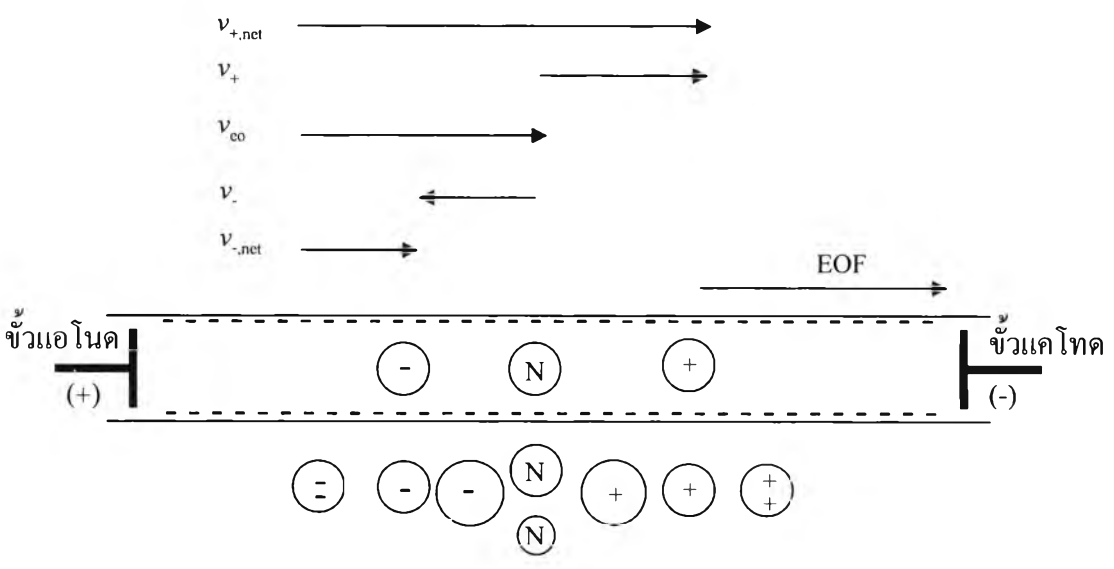


รูปที่ 2.4 เปรียบเทียบลักษณะการไหลของสารและพีกของสารใน CE (a) และ HPLC (b): ดัดแปลงจาก [Chankvetadze: 1997]

2.3.4 พฤติกรรมการเคลื่อนที่ของสารภายใต้ภาวะที่มี EOF มาก

ในกรณีที่มี EOF ผลรวมของความเร็วของสาร (ν_{net}) นิยามเป็นผลรวมของความเร็วในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารและความเร็วอิเล็กโทรออสโมซิส ดังสมการ 2.11

$$\nu_{net} = \nu_{ep} + \nu_{eo} \tag{2.11}$$



รูปที่ 2.5 พฤติกรรมการเคลื่อนที่ของสารภายใต้ภาวะที่มี EOF มาก และกรณีที่ผิวของคะพิลลารีเป็นประจุลบและใช้ขั้วไฟฟ้าปกติ: ดัดแปลงจาก [Li: 1992]

จากรูป 2.5 เมื่อผิวคะพิลลารีเป็นประจุลบและด้านเครื่องตรวจวัดเป็นขั้วแคโทด (ขั้วลบ) EOF จะมีทิศทางไปทางขั้วแคโทด สารตัวอย่างที่เป็นไอออนบวกมีทิศทางของ μ ไปทางขั้วแคโทดเช่นกัน ดังนั้นไอออนบวกจะเคลื่อนที่ไปขั้วแคโทดด้วยความเร็วในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารและ EOF ($v_{+,\,net} = v_{ep,+} + v_{eo}$) โดยที่ไอออนบวกที่มีประจุมากและรัศมีไอออนไฮโดรไดนามิกน้อย (ค่า μ มาก) จะเคลื่อนที่ออกมาก่อน ส่วนสารตัวอย่างที่มีไอออนลบจะมีทิศทางของ μ ไปทางขั้วแอโนด แต่ถ้า v_{eo} มีค่ามากกว่า $v_{ep,-}$ ไอออนลบเคลื่อนที่ไปขั้วแคโทดผ่านเครื่องตรวจวัดได้ โดยลำดับการเคลื่อนที่จะตรงกันข้ามกับไอออนบวก กล่าวคือ ไอออนลบที่มีประจุมากและรัศมีไฮโดรไดนามิกน้อย (ค่า μ มาก) จะเคลื่อนที่ออกมาทีหลัง ส่วนสารที่ไม่มีประจุจะเคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัดได้เนื่องจาก EOF

2.3.5 อิเล็กโทรฟีโรแกรมและไมเกรชันไทม์ (electropherogram and migration time)

ใน CE เมื่อสารตัวอย่างที่บรรจุเคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัดจะแสดงผลออกมา เรียกว่า อิเล็กโทรฟีโรแกรม (electropherogram) ซึ่งเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างไมเกรชันไทม์ (migration time, t_m) กับสัญญาณที่ผ่านเครื่องตรวจวัด

ผลรวมของความสามารถในการเคลื่อนที่ของสาร (μ_{net}) ดังสมการ

$$\mu_{net} = \mu + \mu_{eo} \tag{2.12}$$

โดยที่ $\mu_{eo} = \dfrac{v_{eo}}{E} = \dfrac{lL}{t_{eo}V}$ และ $\mu_{net} = \dfrac{v_{net}}{E} = \dfrac{lL}{t_m E}$

L คือ ความยาวทั้งหมดของคะพิลลารี (m)

l คือ ความยาวจากปลายคะพิลลารีด้านบรรจุสารจนถึงเครื่องตรวจวัด (m)

V คือ ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการแยกสาร (V)

t_m หน่วยในวินาที มีความสัมพันธ์กับตัวแปรต่างๆ ดังสมการ

$$t_m = \frac{l}{v_{net}} = \frac{lL}{(\mu + \mu_{eo})V} \tag{2.13}$$

ในทางปฏิบัติ เมื่อทราบค่า t_m ของสาร จะสามารถคำนวณ μ_{eo} และ μ ได้ดังสมการ

$$\mu_{eo} = \frac{lL}{Vt_{eo}} \tag{2.14}$$

$$\mu = \mu_{net} - \mu_{eo} = \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_{eo}}\right)\frac{lL}{V} \qquad (2.15)$$

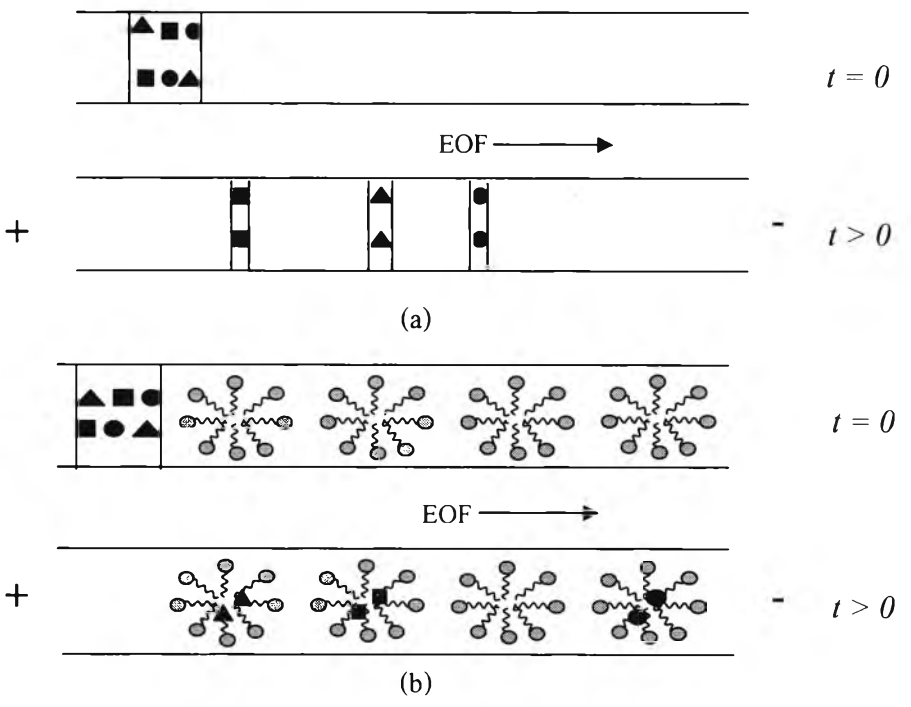
t_{eo} คือ ไมเกรชันไทม์ของสารที่ไม่มีประจุ หรือ EOF marker

2.4 ประเภทของ CE

CE อาจแบ่งได้ออกเป็น 6 ประเภท ตามกลไกของการแยกของสาร คือ

1. Capillary zone electrophoresis (CZE)
2. Micellar electrokinetic chromatrography (MEKC)
3. Capillary electrochromatrography (CEC)
4. Capillary gel electrophoresis (CGE)
5. Capillary isoelectric focusing (CIEF)
6. Capillary isotachophoresis (CITP)

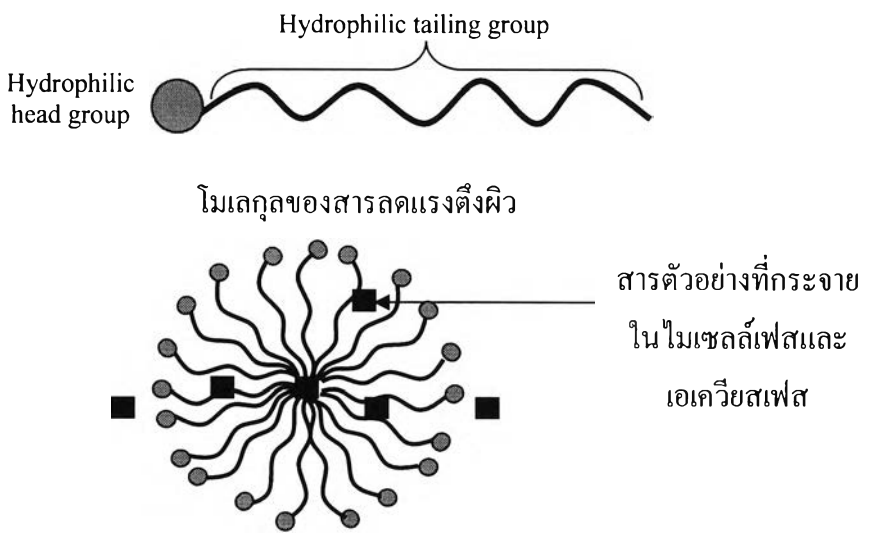
ในงานวิจัยนี้ใช้ CZE และ MEKC ซึ่งจะกล่าวในรายละเอียดต่อไป ส่วน CE แบบอื่นๆ ไม่ขอกล่าวถึง ณ ที่นี้



รูปที่ 2.6 กลไกการแยกสารใน CZE (a) และ MEKC (b): ดัดแปลงจาก [Weston: 1997]

การแยกสารใน CZE (ดังรูป 2.6a) อาศัยความแตกต่างของความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร ซึ่งขึ้นอยู่กับความแตกต่างของอัตราส่วนของค่าประจุต่อขนาดของสารตัวอย่างภายในคะพิลลารีบรรจุด้วยสารละลายอิเล็กโทรไลต์ เมื่อให้ความต่างศักย์ที่ขั้วไฟฟ้าที่จุ่มอยู่ในภาชนะที่บรรจุสารละลายอิเล็กโทรไลต์เพื่อแยกสารตัวอย่าง สารที่มีประจุแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วไฟฟ้าที่มีประจุตรงข้ามเนื่องจากความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า และเนื่องจากภาวะที่มี EOF มากทำให้ทั้งสารที่มีประจุลบและประจุบวกเคลื่อนที่มายังขั้วด้านเครื่องตรวจวัดได้ ส่วนสารที่มีประจุเป็นกลางจะเคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัดได้เนื่องจาก EOF ดังที่ได้กล่าวไว้ในหัวข้อ 2.3.4 ภาวะของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่มีผลต่อความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารตัวอย่าง ได้แก่ ความแรงไอออนิก อุณหภูมิ ความหนืด pH และตัวทำละลายอินทรีย์ เป็นต้น

MEKC เป็นเทคนิคประเภทหนึ่งของ CE ที่มีการเติมสารลดแรงตึงผิว เช่น sodium dodecyl sulfate (SDS) ซึ่งโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวประกอบด้วย ส่วนหัวที่มีประจุหรือมีขั้วซึ่งชอบน้ำ (hydrophilic head group) และส่วนที่ไม่มีขั้วซึ่งไม่ชอบน้ำ (hydrophobic tailing group) เมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวมากขึ้นโดยเติมลงในบัฟเฟอร์ให้มีความเข้มข้นสูงกว่า critical micellar concentration (CMC) ของสารลดแรงตึงผิวชนิดนั้นๆ โมเลกุลเดี่ยวๆ ของสารลดแรงตึงผิวจะรวมตัวกันเป็นไมเซลล์ (micelle) ดังรูปที่ 2.7 และไมเซลล์ทำหน้าที่เป็น pseudo stationary phase ซึ่งคล้ายกับ stationary phase ใน HPLC ยกเว้นแต่ไมเซลล์เคลื่อนที่ได้ กลไกการแยกของสารขึ้นอยู่กับ partitioning ของสารระหว่างไมเซลล์เฟสและเอเควียสเฟส และความสามารถของการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร (electrophoretic mobility, μ) ดังนั้น MEKC สามารถใช้แยกสารทั้งที่มีประจุและไม่มีประจุได้



รูปที่ 2.7 โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวและไมเซลล์: ดัดแปลงจาก [Khaledi: 1998]

ไมเกรชันของสารใน MEKC สามารถอธิบายได้โดยการใช้หลักการของ HPLC และ CZE โดยที่รีเทนชันแฟกเตอร์ (retention factor) หรือ capacity factor ในเทคนิคโครมาโทกราฟี หมายถึง อัตราส่วนของจำนวนโมลของสารในเฟสอยู่กับที่กับเฟสเคลื่อนที่ซึ่งในทางปฏิบัติคำนวณได้จากโครมาโทแกรมดังสมการ

$$k = \frac{t_R - t_o}{t_o} \tag{2.16}$$

t_R คือ รีเทนชันไทม์ของสารตัวอย่าง และ t_o คือ รีเทนชันไทม์ของสารที่ไม่เกิดอันตรกิริยากับเฟสอยู่กับที่

กลไกของ partitioning ใน MEKC ของสารระหว่างไมเซลลาร์เฟสกับเอเควียสเฟส อธิบายได้ดังสมการ 2.17

$$C_{aq} \leftrightarrow C_{mc} \qquad K = \frac{C_{mc}}{C_{aq}} \tag{2.17}$$

C_{mc} และ C_{aq} คือความเข้มข้นของสารตัวอย่างในไมเซลล์เฟสและเอเควียสเฟส ตามลำดับ

ค่า k ในเทคนิค MEKC หมายถึง อัตราส่วนของจำนวนโมลของสารในไมเซลล์เฟส (n_{mc}) กับ เอเควียสเฟส (n_{aq})

$$k = \frac{n_{mc}}{n_{aq}} = K\phi \tag{2.18}$$

K คือ distribution constant ของสารระหว่างไมเซลล์เฟสและเอเควียสเฟส

ϕ คือ อัตราส่วนของปริมาตร (phase ratio) ของไมเซลล์เฟสและเอเควียสเฟส

ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร (μ) ใน MEKC เท่ากับ

$$\mu_{obs,A} = x_{aq}\mu_A + x_{mc}\mu_{mc} \tag{2.19}$$

x_{aq} และ x_{mc} คือ เศษส่วนโมลของสารตัวอย่างในไมเซลล์เฟสและเอเควียสเฟส ตามลำดับ

μ_{aq} และ μ_{mc} คือ ความสามารถในการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างในไมเซลล์เฟสและเอเควียสเฟส ตามลำดับ

ในระบบ MEKC ที่ประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิวประเภทแอนไอออน ในกรณีที่สาร A ไม่มีประจุ $\mu_A = 0$ ดังนั้น

$$\mu_{obs,A} = x_{mc}\mu_{mc} = \frac{n_{mc}}{n_{aq} + n_{mc}}\mu_{mc} = \frac{k}{1+k}\mu_{mc} \quad (2.20)$$

จะได้ว่า

$$k = \frac{\mu_{obs,A}}{\mu_{mc} - \mu_{obs,A}} \quad (2.21)$$

ในสภาวะที่มี EOF

$$\mu_{net,A} = \frac{k}{1+k}\mu_{mc} + \mu_{eo} \quad (2.22)$$

ในกรณีที่สาร A มีประจุ μ_A ไม่เท่ากับ 0 ดังนั้น

$$\mu_{obs,A} = \frac{1}{1+k}\mu_A + \frac{k}{1+k}\mu_{mc} \quad (2.23)$$

$$k = \frac{\mu_{obs,A} - \mu_A}{\mu_{mc} - \mu_{obs,A}} \quad (2.24)$$

ในกรณีที่สาร A ไม่มีประจุ รีเทนชันไทม์ของสาร A ใน MEKC มีค่าดังสมการ 2.25

$$t_R = \frac{(1+k)t_{eo}}{1 + (\frac{t_{eo}}{t_{mc}})k} \quad (2.25)$$

t_{mc} คือ ไมเกรชันไทม์ของไมเซลล์ที่รวมการเคลื่อนที่เนื่องจาก μ_{mc} และ μ_{eo}

ในกรณีที่สาร A มีประจุ รีเทนชันไทม์ของสาร A ใน MEKC มีค่าดังสมการ 2.26

$$t_R = \frac{(1+k)t_o}{1 + (\frac{t_o}{t_{mc}})k} \quad (2.26)$$

t_o คือ ไมเกรชันไทม์ของสาร A ใน BGE ที่ไม่มีไมเซลล์ ซึ่งรวมเวลาที่เคลื่อนที่ด้วย electrophoretic mobility และ EOF

สารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ โซเดียมโดเด็กซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS) ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุลบ มีสูตรทางเคมีเป็น $CH_3(CH_2)_{11}OSO^-_3Na^+$ เป็นสารที่มีความบริสุทธิ์สูง มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดี ค่า CMC ต่ำ ดูดกลืนแสงช่วงยูวี-วิสิเบิลต่ำ หาง่าย ราคาถูก สารที่ไม่มีประจุสามารถเคลื่อนที่ด้วยความเร็วต่างกันและแยกได้ออกเป็นโซนๆ ใน CE ประเภทนี้ เนื่องจากผลรวมของความสามารถของการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของไมเซลล์และความแตกต่างของ partitioning ของสารระหว่างไมเซลล์เฟสและเอเควียสเฟสในบัฟเฟอร์ สารจะเคลื่อนที่ออกมาเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับความสามารถใน partitioning ของสารในไมเซลล์ สารที่มีขั้วมากและไม่มี partitioning ในไมเซลล์เลย จะออกมาเร็วที่สุดพร้อมกับ EOF ในขณะที่สารที่จับกับไมเซลล์ได้ดีจะออกมาช้าที่สุดพร้อมกับไมเซลล์

2.5 คุณภาพและปริมาณวิเคราะห์ด้วย CE (Qualitative and Quantitative Analysis in CE)

กรณีที่สงสัยว่าพีกไหนเป็นพีกของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ใน CE สามารถทำได้โดยใช้ spiking techniques โดยทำการเติมสารที่ต้องการวิเคราะห์ลงไป ถ้าพีกใดมีพื้นที่ใต้พีกเพิ่มขึ้นแสดงว่าพีกนั้นเป็นพีกของสารที่ต้องการวิเคราะห์ และในกรณีที่ใช้ photodiode array detector สามารถเปรียบเทียบยูวีสเปกตรัมได้ สำหรับคุณภาพวิเคราะห์ใน CE สามารถทำได้โดยเปรียบเทียบจากค่าไมเกรชันไทม์ (t_m) และค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร (electrophoretic mobility, μ) ซึ่งสารชนิดเดียวกันจะให้ค่าเท่ากัน

ปริมาณของสารที่เคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัด (Q) มีความสัมพันธ์กับตัวแปรต่างๆ ดังสมการที่ 2.27

$$Q\ (\text{mole}) = \frac{\textit{Peak area}\ (\text{AUs}) \times V_F\ (\text{m}^3\text{s}^{-1})}{\textit{Response factor}\ (\text{AU mol}^{-1}\ \text{m}^{-3})} \qquad (2.27)$$

V_F คือ volume flow ของสารตัวอย่างที่เคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัด

สำหรับใน HPLC ปริมาณสารที่เคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัด (Q) จะขึ้นกับ peak area เนื่องจากความเร็วของสารตัวอย่างที่ผ่านเครื่องตรวจวัดมีค่าคงที่

สำหรับใน CE ปริมาณสารที่เคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัด (Q) จะไม่ขึ้นกับ peak area เนื่องจากความเร็วของสารตัวอย่างที่ผ่านเครื่องตรวจวัด (V_F) ขึ้นกับหลายปัจจัยไม่ว่าจะเป็นผลรวมของ electrophoretic velocity (v_{ep}) กับ electroosmotic velocity (v_{eo}) ซึ่งเป็นไปตังสมการที่ 2.28

ดังนั้นค่า Q จึงขึ้นกับพื้นที่ใต้พีกส่วนไมเกรชันไทม์ นิยามเป็น corrected peak area ดังสมการที่ 2.28 ดังนั้นใน CE ใช้พื้นที่ใต้พีกส่วนไมเกรชันไทม์ (หรือ corrected peak area) ในการทำปริมาณวิเคราะห์

$$V_{\mathrm{F}} = \frac{\pi r^2 l}{t_{\mathrm{m}}} \tag{2.28}$$

ตัวแปรต่างๆ นิยามดังที่กล่าวมาแล้ว

ดังนั้น

$$Q \propto \frac{\text{Peak area (AUs)}}{t_{\mathrm{m}}\ (\mathrm{s})} \tag{2.29}$$

แม้จะมีงานวิจัยกล่าวว่าปริมาตรของสารที่บรรจุด้วยการอัดความดันใน CE มีความเที่ยงสูง [Mayer: 2001] แต่อย่างไรก็ตามความไม่เที่ยงของปริมาตรที่บรรจุขึ้นกับความเที่ยงของความดัน เวลา และความหนืดของบัฟเฟอร์ในคะพิลลารีที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนอุณหภูมิของคะพิลลารีในส่วนที่ไม่ได้ควบคุมอุณหภูมิ สำหรับงานวิจัยโดยทั่วไปของการทำปริมาณวิเคราะห์ (Quantitative Analysis) ที่ใช้คำนวณหรือหาปริมาณสาร คือ การทำกราฟมาตรฐาน (Calibration Curve) ซึ่งใช้วิธีต่างๆ กัน ดังนี้

1. External Standard

เป็นการสร้างกราฟเส้นตรง ($y = mx + c$) โดยมีความสัมพันธ์ระหว่าง corrected peak area (แกน y) กับความเข้มข้นต่างๆ (แกน x) สำหรับการหาปริมาณสารตัวอย่างทำโดยนำ corrected peak area ของพีกหรือพื้นที่ใต้พีกที่วิเคราะห์ได้ มาคำนวณหาความเข้มข้นจากสมการเส้นตรง

2. Internal standard

การใช้ internal standard ซึ่งเป็นสารมาตรฐานอีกชนิดหนึ่งที่ไม่ใช่สารตัวที่ต้องการวิเคราะห์และเติมลงไปในสารตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐานในปริมาณที่เท่ากัน จากนั้นนำ corrected peak area ของสารตัวอย่างและ corrected peak area ของ internal standard ที่ได้ไปทำกราฟมาตรฐานโดยสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนของ corrected peak area ของสารตัวอย่างต่อ corrected peak area ของ internal standard (แกน y) และความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (แกน x) ดังนั้นในการฉีดสารแต่ละครั้ง ถ้าสารมีความเข้มข้นเท่ากัน อัตราส่วนของปริมาณสารต่อ internal standard จะคงที่