การวิเคราะห์ทางแอมเพอโรเมตรีด้วยขั้วทองแดงในการตรวจหาปริมาณกรดอะมิโน

นางสาวอรุณี ทับเที่ยง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2530

012831

I 10299208

AMPEROMETRIC ANALYSIS WITH A COPPER ELECTRODE FOR DETERMINATION OF AMINO ACIDS

Miss Arunee Taptiang

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Department of Chemistry
Graduate School
Chulalongkorn University
1987

ISBN 974-567-890-2

Copyright of the Graduate School, Chulalongkorn University

Thesis Title	Amperometric Analysis with a Copper Electrode for Determination of Amino Acids
By	Miss Arunee Taptiang
Department	Chemistry
Thesis Advisor	Umaporn Titapiwatanakul, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

Thavorn Vajrabhaya Dean of the Graduate School

(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee

Padet Sidisunthorn ..... Chairman

(Professor Padet Sidisunthorn, Ph.D.)

Rucha Phongpetchara ..... Member

(Rucha Phongpetchara, Ph.D.)

S. Leepipatpiboon ..... Member

(Sittichai Leepipatpiboon, Ph.D.)

U. Titapiwatanakul ..... Member

(Umaporn Titapiwatanakul, Ph.D.)

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์ทางแอมเพอโรเมตรีด้วยขั้วทองแดงในการตรวจหาปริมาณกรดอะมิโน
ชื่อนิสิต	นางสาวอรุณี ทับเที่ยง
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. อุมาภรณ์ ฐิตาภิวัฒนกุล
ภาควิชา	เคมี
ปีการศึกษา	2529

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ แสดงการศึกษาของพฤติกรรมทางแอมเพอโรเมตรีของขั้วทองแดงซึ่งมีต่อกรดอะมิโน ในระบบแบทช์ และระบบที่มีการไหล ในระบบแบทช์ได้มีการศึกษาถึงผลของสารละลายบัฟเฟอร์ อัตราเร็วในการคนสารละลาย และผลของความเข้มข้นกรดอะมิโน ซึ่งพบว่าฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะที่สุด ค่ากระแสไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้นจะเพิ่มตามความเข้มข้นของกรดอะมิโน ซึ่งมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 10^{-5}-10^{-4} โมลาร์ และ ขีดจำกัดในการวิเคราะห์อยู่ในช่วง 10^{-7}-10^{-8} โมลาร์ ในระบบที่มีการไหล ได้มีการศึกษาถึง ผลของอัตราเร็วของการไหล ผลของระยะเวลาที่สารตัวอย่างอยู่ในระบบ ผลของความเข้นข้นกรดอะมิโน และปริมาตรของสารตัวอย่างที่ฉีด เมื่อใช้สารละลายไกลซีน และ ทรีออนีน เข้มข้นช่วง 10^{-4}-10^{-1} โมลาร์ และ ซีสทีอีน 10^{-5}-10^{-3} โมลาร์ ฉีดด้วยปริมาตร 10 ไมโครลิตร ได้ความสัมพันธ์ ระหว่างกระแสไฟฟ้ากับความเข้มข้นเป็นเส้นตรง โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 1.0-1.5% และขีดจำกัดในการวิเคราะห์อยู่ในช่วง 10^{-5} โมลาร์

ในการประยุกต์ใช้งานของขั้วทองแดง เพื่อใช้เป็นดีเทคเตอร์ของ reverse - phase high performance liquid chromatography ในการวิเคราะห์กรดอะมิโน 5 ชนิด ได้แก่ ทรีออนีน เมไธออนีน อาร์จีนีน ฟีนิลอะลานีน และ ทริปโตแฟน ขีดจำกัดของการวิเคราะห์อยู่ในช่วง 10^{-5} โมลาร์ และ เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์อยู่ระหว่าง 3 ถึง 11 นาที

Thesis Title Amperometric Analysis with a Copper Electrode for Determination of Amino Acids

Name Miss Arunee Taptiang

Thesis Advisor Umaporn Titapiwatanakul, Ph.D.

Department Chemistry

Academic Year 1986

ABSTRACT

This thesis presents a study on the amperometric behaviour of a copper electrode towards amino acids in batch and flow system. In batch system, the effect of buffer solution, stirred speed and amino acids concentration were studied. It was found that phosphate buffer pH 7.0 was the most suitable buffer. The increase of the current caused by amino acids was linearly in the range of 10^{-5} -10^{-4} M and detection limit was in the range of 10^{-7} -10^{-8} M. In flow system, the influences of flow rate, residence time, amino acid concentration and sample injection volume were examined. Injection of 10^{-4} -10^{-1} M glycine and threonine, and 10^{-5} -10^{-3} M cysteine in volume of 10 µL gave sharp response peaks in the linear range; the relative standard deviation for peak-height measurements was 1.0-1.5% and the detection limits of 10^{-5} M were obtained.

Finally, the application of a copper electrode as an amperometric detector for amino acids in reverse-phase high performance liquid chromatography was demonstrated. For the separation of five amino acids, viz. threonine, methionine, arginine, phenylalanine and tryptophan, detection limits in the range of 10^{-5} M were determined with retention times varying from 3-11 min.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENT

The auther wishes to express her deepest graditude to her advisor, Dr. Umaporn Titapiwatanakul, for her generous guidance, understanding, and encouragement throughout the course of this research. She is grateful to Dr. Sittichai Leepipatpaiboon for his valuable suggestions on HPLC. Appreciations are also expressed to other people at Department of Chemistry, Chulalongkorn University for their encouragement and assistance in all case and to Professor Dr. Tab Nilanidhi Foundation for granting a scholarship. In addition, she wishes to thank the thesis committee for their comments.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

PAGE

ABSTRACT (IN THAI) iv

ABSTRACT (IN ENGLISH) v

ACKNOWLEDGEMENTS vi

LIST OF TABLES x

LIST OF FIGURES xii

CHAPTER I: INTRODUCTION..... 1

1.1 Introduction to Amino Acids..... 2

1.2 DC Voltammetry..... 5

1.3 Amperometry..... 6

1.4 Flow System..... 8

1.4.1 Flow Injection Analysis (FIA)..... 10

1.5 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)..... 14

1.5.1 Types of Liquid Chromatography..... 15

1.5.2 Detection Methods in HPLC..... 16

1.6 Aim of The Thesis..... 19

CHAPTER II: EXPERIMENTAL..... 19

2.1 Instrumentation..... 21

2.1.1 Voltammetric Instrumentation..... 21

2.1.2 Instrumentation for Batch Analysis..... 21

2.1.3 Instrumentation for Flow Injection Analysis.... 21

2.1.4 Instrumentation for HPLC..... 24

2.1.5 Other Instrumentation..... 24

2.2 Reagent and Stock Solution..... 25

2.2.1 Buffer Solution..... 25

PAGE

2.2.1.1 Phosphate Buffer Solution..... 25
2.2.1.2 Borate Buffer Solution..... 26
2.2.1.3 Carbonate Buffer Solution..... 26
2.2.2 Stock Standard Solutions..... 27
2.3 Proceduces..... 27
2.3.1 Preparation and Conditioning of Working Electrode..... 27
2.3.2 Preparation of Reference Electrode..... 27
2.3.3 Precedure for Voltammetric and Amperometric Analysis..... 28
2.3.3.1 Batch System..... 29
2.3.3.2 Flow System..... 29
2.3.4 Procedure for Study of Copper-Amino Acid Ratio in Complex..... 29
2.3.4.1 Anodic Limiting Current Method..... 29
2.3.4.2 Cathodic Limiting Current Method..... 30
2.3.5 Measurement of Peak Height..... 31
2.3.6 Measurement of Flow Rate..... 31
2.3.7 Response Studies..... 31
2.3.8 Measurement of Carryover..... 32
2.3.9 Measurement of Reproducibility..... 32
2.3.10 Measurement of Detection Limit..... 32
CHAPTER III: Results and Discussion..... 33
3.1 Electrode Response for Amino Acid in Batch Analysis... 33
3.1.1 Effect of Buffer..... 33
3.1.2 Effect of Stirred Speed..... 37
3.1.3 Study of Copper(II)-Amino Acid Ratio in Complex 38

PAGE

3.1.4 Sensitivity and Linear Range..... 44

3.1.5 Reproducibility and Detection Limit..... 47

3.2 Electrode Response for Amino Acids in FIA..... 48

3.2.1 Effect of Flow Rate..... 49

3.2.2 Effect of Residence Time..... 52

3.2.3 Effect of Sampling Rate on Reproducibility and Carryover..... 53

3.2.4 Sensitivity, Linear Range and Detection Limit.. 56

3.2.5 Effect of Sample Injection Volume..... 62

3.3 Application of a Copper Electrode as an Amperometric Detector in Amino Acids Analysis by HPLC..... 64

3.3.1 Effect of Percentage of MeOH in Mobile Phase... 64

3.3.2 Sensitivity and Linear Range..... 66

3.3.3 Reproducibility and Detection Limit..... 71

CHAPTER IV: CONCLUSION..... 72

REFERENCES..... 78

VITA..... 90

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
2.1	Composition of phosphate buffer pH 6.2-8.2.....	26
3.1	Anodic limiting current at copper electrode in various supporting electrolytes.....	36
3.2	Effect of pH on background current and signal current.	36
3.3	Effect of stirred speed on limiting current and background current.....	37
3.4	Determination of copper(II)-amino acid complex ratio by anodic limiting current method.....	43
3.5	Determination of copper(II)-amino acid complex ratio by cathodic limiting current method.....	43
3.6	Effect of cysteine concentration on the signal current	44
3.7	Effect of glycine concentration on the signal current	45
3.8	Effect of threonine concentration on the signal current.....	45
3.9	Electrode characteristics in batch analysis.....	47
3.10	Reproducibility of limiting current.....	48
3.11	Effect of flow rate on background current, peak current and reproducibility.....	50
3.12	Effect of flow rate on sample peak width.....	52
3.13	Effect of residence time in term of tube length on background current and peak current.....	53
3.14	Effect of sampling rate on reproducibility and carryover.....	56
3.15	Effect of glycine concentration on peak current in FIA	58

TABLE		PAGE
3.16	Effect of threonine concentration on peak current in FIA.....	59
3.17	Effect of cysteine concentration on peak current in FIA.....	59
3.18	Hydrodynamic electrochemical characteristics at a copper electrode in phosphate buffer pH 7.0.....	61
3.19	Effect of sample injection volume on peak current.....	63
3.21	Effect of percentage of methanol in the mobile phase on retention time and peak current.....	66
3.20	Effect of amino acid concentration on the peak current in HPLC.....	67
3.22	Electrode characteristics in HPLC.....	70
3.23	Reproducibility of amino acids in HPLC.....	71
4.1	Comparison of sensitivity of detection methods for amino acid in HPLC.....	76

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURE

FIGURE		PAGE
1.1	General formula for α-amino acids.....	3
1.2	Simple automated flow analysis systems.....	10
2.1	Diagram of batch system.....	22
2.2	Diagram of the flow-injection system.....	23
2.3	Injector for flow-injection analysis.....	23
2.4	Flow cell constructed of high density polyethylene.	24
2.5	Saturated calomel electrode.....	28
3.1	Voltammograms in (A) phosphate buffer pH 7.0, (B) borate buffer pH 8.5, and (C) carbonate buffer pH 10.2	34
3.2	Effect of stirred speed on S/B.....	38
3.3	Anodic and cathodic current for cysteine.....	41
3.4	Anodic and cathodic current for glycine.....	41
3.5	Anodic and cathodic current for threonine.....	42
3.6	Calibration curve of cysteine in phosphate buffer pH 7.0.....	46
3.7	Calibration curve of glycine in phosphate buffer pH 7.0.....	46
3.8	Calibration curve of threonire in phosphate buffer pH 7.0.....	47
3.9	Effect of flow rate on sample peak.....	51
3.10	Effect of sampling rate on reproducibility and carryover.....	54
3.11	Effect of sampling rate on reproducibility and carryover.....	55

FIGURE		PAGE
3.12	Effect of amino acid concentration on sample peak.....	57
3.13	Calibration of glycine in the concentration range of 5.00×10^{-4} -1.00×10^{-1} M.....	60
3.14	Calibration of threonine in the concentration range of 5.00×10^{-4} -1.00×10^{-1} M.....	60
3.15	Calibration of cysteine in the concentration range of 5.00×10^{-4} -1.00×10^{-1} M.....	61
3.16	Effect of sample injection volume on sample peak.....	62
3.17	Calibration curve of glycine by varying injection volume.....	63
3.18	Chromatograms of the separation of five amino acids...	65
3.19	Calibration plot of threonine.....	68
3.20	Calibration plot of methionine.....	68
3.21	Calibration plot of arginine.....	69
3.22	Calibration plot of phenylalanine.....	69
3.23	Calibration plot of tryptophan.....	70

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย