การหาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกโดยเทคนิคคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส

นางสาวมนพิชา ศรีสะอาด

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-3656-8

DETERMINATION OF GIBBERELLIC ACID BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Miss Monpichar Srisa-art

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the requirements
for the Degree of Master of Science in Chemistry
Department of Chemistry
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2003

ISBN 974-17-3656-8

Thesis Title	Determination of Gibberellic Acid by Capillary Electrophoresis
By	Miss Monpichar Srisa-art
Department	Chemistry
Thesis Advisor	Thumnoon Nhujak, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Vasana Tolieng

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

..... Dean of Faculty of Science
(Associate Professor Wanchai Phothiphichitr, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Professor Sophon Roengsumran, Ph.D.)

..... Thesis Advisor
(Thumnoon Nhujak, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor
(Vasana Tolieng)

..... Member
(Associate Professor Amorn Petsom, Ph.D.)

..... Member
(Assistant Professor Kanyarat Kalampakorn)

มนพิชา ศรีสะอาด: การหาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกด้วยเทคนิคคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส. (DETERMINATION OF GIBBERELLIC ACID BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS) อาจารย์ที่ปรึกษา: ดร. ธรรมนูญ หนูจักร, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: อาจารย์วาสนา โตเลี้ยง 76 หน้า. ISBN 974-17-3656-8

ได้พัฒนาเทคนิคไมเซลลาร์อิเล็กโทรไคเนทิกโครมาโทกราฟีเพื่อใช้เป็นวิธีหาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกในน้ำหมักและในผลิตภัณฑ์ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด โดยใช้ไดโซเดียมเททระบอเรตเป็นบัฟเฟอร์ที่ค่าพีเอช 9.2 และโซเดียมโดเดคซิลซัลเฟตเป็นไมเซลลาร์เฟส การแยกของพีกของกรดจิบเบอเรลลิกจากพีกของสารอื่น ๆ ในน้ำหมักประสบความสำเร็จโดยใช้สภาวะของไมเซลลาร์อิเล็กโทรไคเนทิกโครมาโทกราฟีดังนี้: ความเข้มข้นของบอเรตบัฟเฟอร์ 25 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นของโซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต 100 มิลลิโมลาร์ และใช้ศักย์ไฟฟ้าในการแยก +30 กิโลโวลต์ พบว่าปริมาณของกรดจิบเบอเรลลิกที่วิเคราะห์โดยเทคนิคไมเซลลาร์อิเล็กโทรไคเนทิกโครมาโทกราฟีสอดคล้องกับที่วิเคราะห์โดยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี นอกจากนี้ยังประยุกต์เทคนิคไมเซลลาร์อิเล็กโทรไคเนทิกโครมาโทกราฟี เพื่อใช้ในการหาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกในผลิตภัณฑ์ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด ข้อดีของเทคนิคนี้ คือ ใช้เวลาในการวิเคราะห์เร็ว ให้ความถูกต้องและความเที่ยงสูง และไม่ต้องมีขั้นตอนการเตรียมสารตัวอย่าง ยกเว้นการกรองและการเจือจาง

ภาควิชา.....เคมี..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....เคมี..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2546..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

447 23711 23 : MAJOR CHEMISTRY

KEY WORD: GIBBERELLIC ACID/ CAPILLARY ELECTROPHORESIS/ MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY

MONPICHAR SRISA-ART: DETERMINATION OF GIBBERELLIC ACID BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS. THESIS ADVISOR: THUMNOON NHUJAK, Ph.D., THESIS COADVISOR: VASANA TOLIENG, 76 pp. ISBN 974-17-3656-8.

Micellar electrokinetic chromatography (MEKC) was developed as a method for quantitative determination of gibberellic acid (GA_3) in fermentation broth, using disodium tetraborate ($Na_2B_4O_7$) as a buffer at pH 9.2 and sodium dodecylsulfate (SDS) as a micellar phase. Baseline resolution of GA_3 from other compounds in the fermentation broth was achieved using the following MEKC conditions: 25 mM $Na_2B_4O_7$, 100 mM SDS and separation voltage of +30 kV. The amount of GA_3 in the fermentation broths determined by MEKC was found to be in good agreement with that by high performance liquid chromatography. The MEKC method was also applied for quantitative determination of GA_3 in commercial products. Advantages of this method include fast analysis, high accuracy and precision and no sample preparation except for filtration and dilution.

Department.....Chemistry..... Student's signature.....Monpichar Sri-T

Field of study.....Chemistry..... Advisor's signature.....Thumnoon Nhujak

Academic year.....2003..... Co-advisor's signature.....V. Tolieng

ACKNOWLEDGEMENTS

First of all, I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Dr Thumnoon Nhujak, for his professionalism, discerning suggestion, forbearance, encouragement, and critical reading. I also greatest thank to my co-advisor, Vasana Tolieng, for her helpfulness, generous guidance and encouragement throughout this research. Special thanks are extended to the thesis committee for their valuable comments.

This research was financially supported by the Grants for Development of New Faculty Staff to Dr Thumnoon Nhujak, Department of Chemistry and the Graduate School, Chulalongkorn University. Research facilities provided by the Institute of Biotechnology and Genetic Engineering (IBGE) are appreciatively and thankfully acknowledge.

In addition, my scholarship provided by the Development and Promotion of Science and Technology Talent Project (DPST) has been greatly valuable to my study and research.

Futhermore, I specially thank to all members of Separation and Chromatography Research Group for their valuable suggestions. Also, I am thankful to all members of CE group for their helpfulness and encouragement. Moral supports and cheerful willingness of my friends are truly appreciated.

Finally, I am eternally grateful to my beloved parents and the rest of family members for their enormously ever-willing support. Thanks are also extended to everyone who has contributed suggestions and supports throughout this research.

Monpichar Srisa-art

CONTENTS

PAGE

PAGE

PAGE

LIST OF TABLES

TABLES **PAGE**

LIST OF FIGURES

FIGURES **PAGE**

LIST OF ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

AMBA	3-amino-4-methylbenzoic acid
AP	3-acetamidophenol
BGE	background electrolyte
CE	capillary electrophoresis
CEC	capillary electrochromatography
CMC	critical micelle concentration
CZE	capillary zone electrophoresis
EMD	electromigration dispersion
EOF	electroosmotic flow
GA_3	gibberellic acid
HPLC	high performance liquid chromatograhy
HPTLC	high performance thin layer chromatography
I.D.	internal diameter
MEKC	micellar electrokinetic chromatography
MS	mass spectrometry
RSD	relative standard deviation
SDS	sodium dodecylsulfate
A	peak area
A_{corr}	corrected peak area
A_{asym}	asymmetry factor
c	concentration of sample
c_{st}	concentration of analyte after stacking
D	diffusion coefficient
D_{th}	thermal dispersion coefficient
E	electric field strength
E_{opt}	optimum electric field
e	electronic charge
F	Faraday's constant
f_T	temperature factor
I	ionic strength
I_A	electric current

k	Boltzmann's constant
k'	retention factor
L	total capillary length
l	the length of capillary to detector
l_{inj}	length of analyte injected
l_{det}	detection width
l_{st}	sample zone length after stacking
N	the number of theoretical plate, or peak efficiency
n_{aq}	the amount of analyte in aqueous phase
n_{mc}	the amount of analyte in micellar phase
P_{EMD}	percentage of EMD
ΔP	pressure difference across the capillary
Q_{inj}	quantity of sample injected
R	gas constant
R_s	resolution
r_c	internal capillary radius
r_h	hydrodynamic radius
S	cross-sectional area of capillary
t_{eo}	migration time of EOF
t_{inj}	injection time
t_m	migration time of an analyte
t_{mc}	migration time of micelle
V	applied voltage
V_{inj}	volume of sample injected
v_{eo}	electroosmotic velocity
v_{ep}	electrophoretic velocity
v_{net}	total electrophoretic velocity
w_b	peak width at base
w_h	peak width at half height
x_{aq}	mole fraction of analyte in aqueous phase
x_{mc}	mole fraction of analyte in micellar phase
z	charge of an ion
α	separation factor

γ_{st}	a factor of sample stacking
η	viscosity
κ_c	electrical conductivity
λ_s	thermal conductivity
μ	electrophoretic mobility
μ^o	electrophoretic mobility at zero ionic strength
μ_{eo}	electroosmotic mobility
μ_{obs}	observed mobility
μ_{mc}	electrophoretic mobility of micelle
μ_{net}	total mobility
σ	standard deviation of peak in distance unit
σ^2	peak variance
σ^2_{EMD}	peak variance due to electromigration dispersion
σ^2_{det}	peak variance due to detection width
σ^2_{diff}	peak variance due to longitudinal diffusion
σ^2_{inj}	peak variance due to injection length
σ^2_{tc}	peak variance due to time constant
σ^2_{th}	peak variance due to thermal dispersion
σ^2_{tot}	total peak variance
τ	standard deviation of peak in time unit
τ_{tc}	time constant
ζ	zeta potential