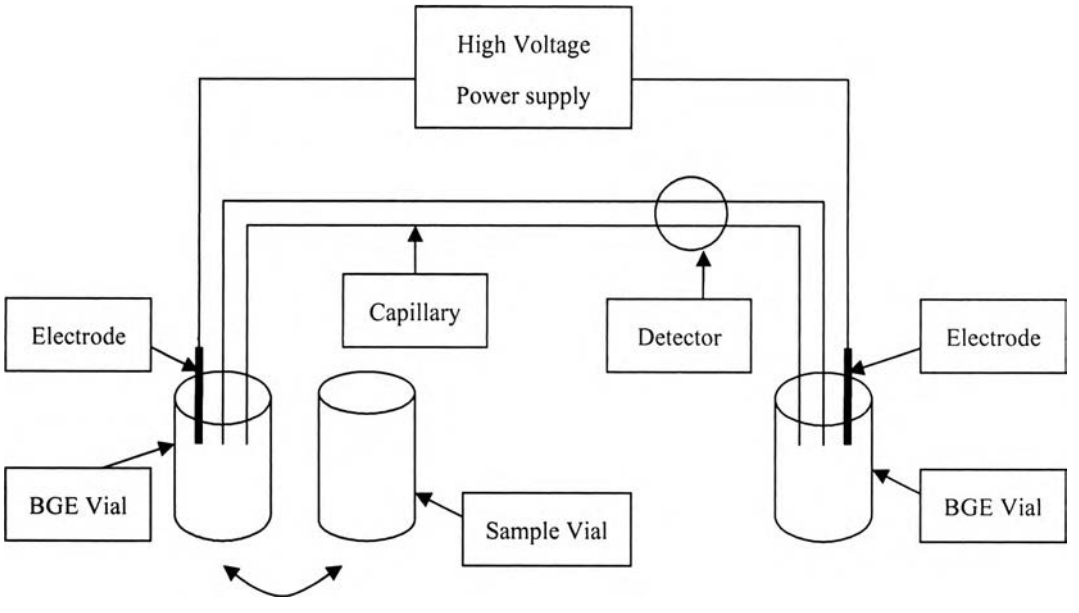
สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 2
# ทฤษฎี

## 2.1 คะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส (Capillary Electrophoresis, CE)

คะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส (capillary electrophoresis, CE) เป็นเทคนิคที่มีการแยกสารภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้าในหลอดคะพิลลารีที่บรรจุสารละลายอิเล็กโทรไลต์ หลักการแยกสารอาศัยความแตกต่างของความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า (electrophoretic mobility, $\mu$) ซึ่งขึ้นอยู่กับความแตกต่างของอัตราส่วนของค่าประจุต่อขนาดของไอออน

## 2.2 ส่วนประกอบของเครื่อง CE




**รูปที่ 2.1** ส่วนประกอบอย่างง่ายของเครื่อง CE: ดัดแปลงจาก [Weinberger, 2000]

### 1) คะพิลลารี (capillary)

คะพิลลารีที่ใช้ทั่วไปในปัจจุบันเป็น fused silica capillary ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 10 ถึง 200 $\mu$m (ที่นิยมใช้ทั่วไป 50 และ 75 $\mu$m) และยาวประมาณ 20 ถึง 100 cm (นิยมใช้ 30 ถึง 60 cm) ภายนอกของคะพิลลารีเคลือบด้วยพอลิเอไมด์เพื่อป้องกันการแตกหักของคะพิลลารี และลอกพอลิเอไมด์ออกเฉพาะตรงบริเวณตรวจวัดในกรณีที่ใช้เครื่องตรวจวัดประเภทแสง เช่น ยูวี-วิสิเบิล (UV-Visible) หรือ ฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence)

**2) เครื่องกำเนิดศักย์ไฟฟ้า (voltage supply)**

เครื่องกำเนิดศักย์ไฟฟ้ากระแสตรงที่ให้ความต่างศักย์ -30 ถึง +30 kV ในการแยกสารส่วนใหญ่นิยมใช้ความต่างศักย์คงที่ อาจให้ศักย์ไฟฟ้าเป็นบวก โดยด้านเครื่องตรวจวัดหรือด้านปลาย (outlet) เป็นขั้วลบ (แคโทด) และด้านที่ฉีดสาร (inlet) เป็นขั้วบวก (แอโนด) ลักษณะนี้เรียกว่าการใช้ศักย์ไฟฟ้าแบบปกติ (normal polarity of applied voltage) หรือการใช้ศักย์ไฟฟ้าแบบกลับขั้ว (reverse polarity of applied voltage) โดยให้ด้านปลายเป็นขั้วบวก (ศักย์ไฟฟ้าเป็นลบ)

**3) ขั้วไฟฟ้า (electrode)**

ขั้วไฟฟ้าที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นโลหะแพลทินัม

**4) สารละลายอิเล็กโทรไลต์ (background electrolyte, BGE)**

ส่วนใหญ่เป็นบัฟเฟอร์ เช่น ฟอสเฟต อะซิเตต หรือ บอเรต เป็นต้น ซึ่ง BGE อาจประกอบด้วยสารเติมแต่ง เช่น ตัวทำละลายอินทรีย์ เป็นต้น โดย BGE จะบรรจุอยู่ใน vial ที่มีปลายทั้งสองข้างของคะพิลลารีจุ่มอยู่

**5) เครื่องตรวจวัด (detector)**

ในงานวิจัยนี้ใช้เครื่องตรวจวัดเป็น UV-Visible และทำการตรวจวัดสารบนคอลัมน์

**6) ระบบการบรรจุสารตัวอย่าง (sample injection)**

ระบบการบรรจุสารอาจให้ศักย์ไฟฟ้า (electrokinetic injection) หรือให้ความดัน (pressure injection) ซึ่งในงานวิจัยนี้จะใช้ความดันในการบรรจุสาร ทำได้โดยอัดความดัน (ใช้แก๊สไนโตรเจนหรือเครื่องอัดความดันอัตโนมัติ) เข้าไปในภาชนะที่บรรจุสารตัวอย่างเป็นระยะเวลาหนึ่ง (injection time, $t_{inj}$) เพื่อบรรจุสารละลายเข้าไปในคะพิลลารี

## 2.3 ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า (electrophoretic mobility, μ)

ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า (electrophoretic mobility หรือ mobility, μ) มีหน่วยสากลเป็น $m^2V^{-1}s^{-1}$ นิยามเป็นความเร็วในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร (electrophoretic velocity, $v_{ep}$) ภายใต้ความเข้มของสนามไฟฟ้า (electric field strength, $E$) 1 V $m^{-1}$ และมีความสัมพันธ์กับตัวแปรต่าง ๆ ดังสมการที่ 2.1 [Kuhr, 1993]

$$\mu = \frac{v_{ep}}{E} = \frac{ze}{6\pi\eta r_h} \qquad (2.1)$$

$z$ คือ ค่าประจุของสาร

$e$ คือ ค่าประจุของอิเล็กตรอน ( $1.6 \times 10^{-19}$ คูลอมบ์)

η คือ ความหนืดของสารละลาย

$r_h$ คือ รัศมีไฮโดรไดนามิกของไอออน (hydrodynamic radius of ion) ซึ่งเป็นรัศมีของไอออนที่มีโมเลกุลของน้ำล้อมรอบขณะที่ไอออนเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า

ที่อุณหภูมิ 25 °C และสารละลายอิเล็กโทรไลต์เจือจางมากๆ หรือที่ความแรงไอออนิก (ionic strength, $I$, หน่วย mol $kg^{-1}$ หรือ mol $l^{-1}$) ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์มีค่าใกล้ศูนย์ เรียกความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้านี้ว่า ความสามารถในการเคลื่อนที่สัมบูรณ์ (absolute electrophoretic mobility, $\mu^\circ$) ซึ่งเป็นค่าเฉพาะของสารหนึ่งๆ

ปัจจัยที่มีผลต่อค่า $\mu$ ได้แก่ [Kenndler, 1998]

1) ผลของความแรงไอออนิก (ionic strength) โดยเมื่อเพิ่มความแรงไอออนิกของ BGE ทำให้เคาน์เตอร์ไอออนมาล้อมรอบไอออนของสารตัวอย่างมากขึ้น ทำให้ effective charge ($z$) ลดลง และมี $r_h$ เพิ่มขึ้น (โดย $r_h$ จะเป็นผลรวมของไอออนของสารตัวอย่างและเคาน์เตอร์ไอออน (counter ion) ดังนั้นค่า $\mu$ จึงลดลง

2) ผลของความหนืดและอุณหภูมิ จากสมการที่ 2.1 ค่า $\mu$ จะแปรผกผันกับความหนืด ดังนั้นเมื่อเพิ่มความหนืดของ BGE จะทำให้ค่า $\mu$ ของสารลดลง ส่วนการเพิ่มอุณหภูมิจะทำให้ความหนืดของ BGE ลดลง ดังนั้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นค่า $\mu$ จะเพิ่มขึ้น

3) ผลของ pH ของ BGE สำหรับสารตัวอย่างที่เป็นกรดอ่อนหรือเบสอ่อน ค่า pH ของ BGE จะมีผลต่อดีกรีการแตกตัวของสาร (the degree of dissociation, $\alpha$) โดยค่า $\mu$ จะแปรผันตามค่า $\alpha$

4) ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) โดยทั่วไปเมื่อเติมตัวทำละลายอินทรีย์เพิ่มขึ้นจะทำให้ค่า $\mu$ ลดลง แล้วเมื่อเติมตัวทำละลายอินทรีย์เพิ่มจนถึงปริมาณหนึ่งค่า $\mu$ จะเพิ่มขึ้นได้

5) ผลของความต่างศักย์และขนาดคะพิลลารี จากสมการที่ 2.1 จะเห็นว่าค่า $\mu$ ของสารไม่ขึ้นกับขนาดของคะพิลลารี ($d$) และความต่างศักย์ไฟฟ้า ($E$) แต่ในทางปฏิบัติ การเพิ่ม $d$ และ $E$ อาจทำให้ค่า $\mu$ เพิ่มขึ้นได้ เนื่องจากผลของการเพิ่ม Joule heating

**2.4 อิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmosis)**

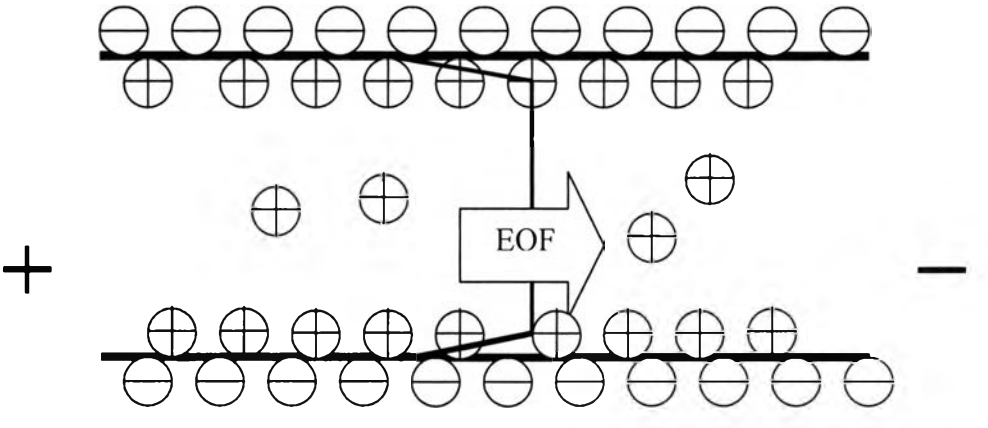
**2.4.1 การเกิดอิเล็กโทรออสโมซิส**

ที่ผิวด้านในของคะพิลลารีประกอบด้วยหมู่ซิลานอล (-Si-OH) เมื่อสัมผัสกับสารละลายอิเล็กโทรไลต์หรือบัฟเฟอร์ที่มี pH > 2 จะเกิดการไอออไนซ์ขึ้น ทำให้ผิวด้านในของคะพิลลารีมีประจุลบ ($-Si-O^-$) ดังสมการ

$$-Si-OH + OH^- \longrightarrow -Si-O^- + H_2O$$

$$\text{-Si-OH} + H_2O \longrightarrow \text{-Si-O}^- + H_3O^+$$

การไอออไนซ์ดังกล่าวทำให้เกิด $H^+$ กระจายอยู่ในสารละลายหรือรวมกับ $OH^-$ เกิดเป็นโมเลกุลของน้ำ แคทไอออนจากสารละลายอิเล็กโทรไลต์ในคะพิลลารีจะเกิดเป็น double electric layer ขึ้นดังรูปที่ 2.2 โดยมีปริมาณแคทไอออนในสารละลายมากกว่าแอนไอออนจำนวนมาก แคทไอออนบางส่วนจะติดอยู่ที่ผิวของคะพิลลารี เกิดเป็น stern layer ซึ่งจะไม่เคลื่อนที่เนื่องจากอิทธิพลของไฟฟ้าสถิต (electrostatic force) และ/หรือ แรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der Waals force) แคทไอออนบางส่วนจะกระจายอยู่ในสารละลาย เรียกว่า diffusion layer และไอออนบวกที่เหลือจะอยู่ใน bulk solution เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าที่ปลายทั้งสองข้างของคะพิลลารี (โดยปลายด้านเครื่องตรวจวัดเป็นขั้วแคโทดหรือขั้วลบ) ไอออนบวกในสารละลาย ซึ่งมีจำนวนมากกว่าไอออนลบจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วลบ และพาเอาโมเลกุลของน้ำหรือตัวทำละลายที่ล้อมรอบไอออนบวกเคลื่อนที่ไปด้วย เรียกปรากฏการณ์ของการเคลื่อนที่ของน้ำหรือสารละลายนี้ว่า อิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmosis) และเรียกการเคลื่อนที่ของน้ำหรือตัวทำละลายว่า electroosmotic flow (EOF)




**รูปที่ 2.2** Electroosmotic flow (EOF) : ดัดแปลงจาก [Landers, 1997]

ความเร็วของอิเล็กโทรออสโมซิสในความเข้มสนามไฟฟ้า 1 V $m^{-1}$ เรียกว่า ความสามารถในการเคลื่อนที่ของอิเล็กโทรออสโมซิสหรือสัมประสิทธิ์ของอิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmotic mobility หรือ electroosmotic coefficient, $\mu_{eo}$) แสดงดังสมการที่ 2.2

$$\mu_{eo} = \frac{v_{eo}}{E} = \frac{-\varepsilon\xi}{4\pi\eta} \qquad (2.2)$$

**2.4.2 ลักษณะการเคลื่อนที่ (flow profile) ใน CE**

EOF เริ่มเกิดที่ผิวของคะพิลลารีและเพิ่มขึ้นมีค่าสูงสุดที่ระยะห่างจากผิวคะพิลลารีประมาณ 15 nm [Landers, 1997] โดยคะพิลลารีที่ใช้ทั่วไปใน CE มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 ถึง 100 μm (50,000 ถึง 100,000 nm) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า EOF เท่ากันตลอดพื้นที่หน้าตัดของคะพิลลารี การไหลของสารใน CE จึงเป็นแบบแบน (flat flow profile) ดังรูปที่ 2.3 ด้วยเหตุนี้พีกของสารใน CE จึงแคบกว่าใน HPLC

ปัจจัยที่มีผลต่อค่า EOF ได้แก่

1) ชนิดของคะพิลลารี และค่า pH ของ BGE ที่ค่า pH เท่ากัน คะพิลลารีแต่ละชนิดให้ค่า $\mu_{eo}$ ต่างกันเนื่องจากความหนาแน่นของประจุลบที่ผิวคะพิลลารีต่างกัน และ $\mu_{eo}$ เพิ่มขึ้นตามค่า pH เนื่องจากผิวคะพิลลารีมีประจุลบมากขึ้น ดังนั้นที่ค่า pH ของ BGE ต่ำๆ จะทำให้การไอออไนซ์ของหมู่ซิลานอลบริเวณผิวคะพิลลารีลดลง มีผลทำให้ค่า EOF ลดลง

2) ความแรงไอออนิกของ BGE ถ้าเพิ่มความแรงไอออนิกจะทำให้ค่า EOF ลดลง แต่อย่างไรก็ตามถ้าเพิ่มความแรงไอออนิกของ BGE มากไป อาจทำให้ค่า EOF เพิ่มขึ้นได้ เนื่องจากผลของ Joule heating

นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆ เช่น ความหนืด อุณหภูมิ ตัวทำละลายอินทรีย์ ขนาดของคะพิลลารีและความเข้มของสนามไฟฟ้า ก็มีผลต่อค่า EOF เช่นเดียวกันกับค่า μ

**รูปที่ 2.3** ลักษณะการไหลของสารและรูปร่างของพีกใน CE: ดัดแปลงจาก [Li, 1992]

**2.5 ประเภทของเทคนิค CE**

เทคนิค CE แบ่งออกได้เป็น 6 ประเภท ตามกลไกของการแยกสาร

1) Capillary Zone Electrophoresis (CZE)

2) Micellar Electrokinetic Chromatography (MEKC) และ Microemulsion Electrokinetic Chromatography (MEEKC)

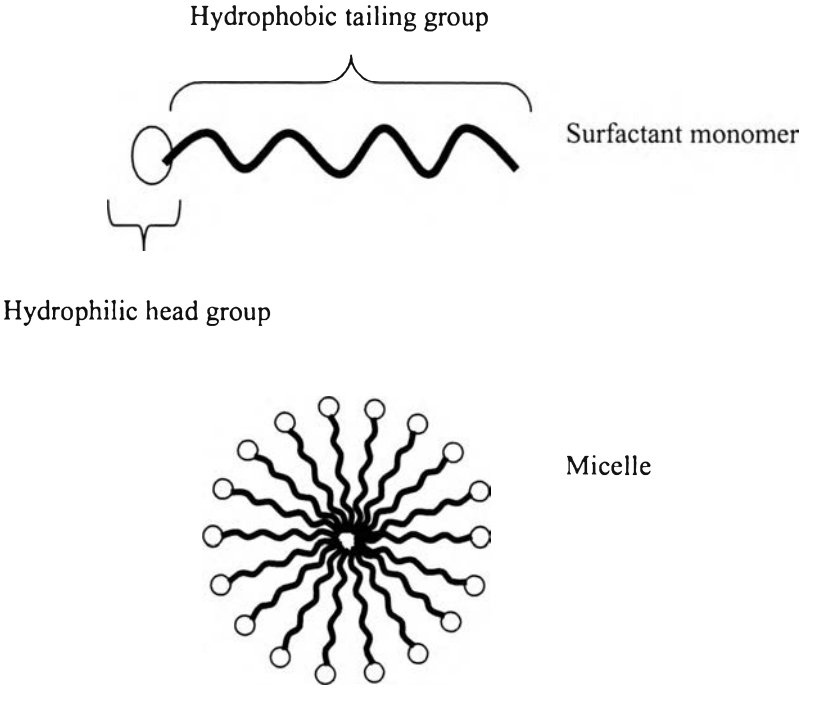
3) Capillary Electrochromatography (CEC)

4) Capillary Gel Electrophoresis (CGE)

5) Capillary Isoelectric Focusing (CIEF)

6) Capillary Isotachophoresis (CITP)

งานวิจัยนี้จะเกี่ยวข้องกับเทคนิค CE 2 แบบ คือ MEKC และ MEEKC โดยเทคนิค MEKC จะมีการเติมสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ลงไปใน BGE ให้มีความเข้มข้นสูงกว่า critical micellar concentration (CMC) ของสารลดแรงตึงผิวชนิดนั้นๆ โมเลกุลเดี่ยวๆ ของสารลดแรงตึงผิวจะรวมตัวกันเป็นไมเซลล์ (micelle) ดังรูปที่ 2.4 และทำหน้าที่เป็น pseudo-stationary phase ซึ่งคล้ายกับ stationary phase ใน HPLC แต่ว่าไมเซลล์เคลื่อนที่ได้

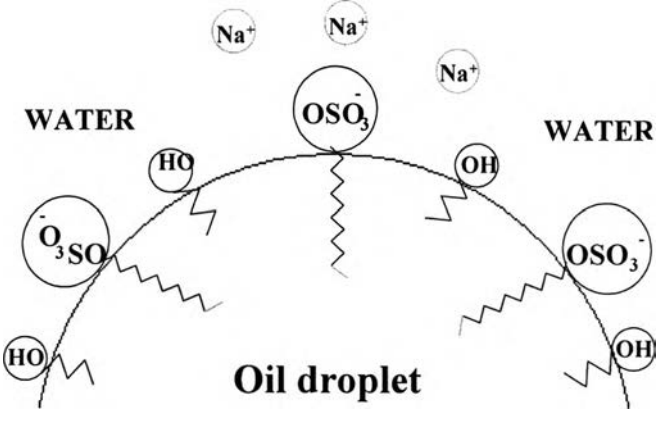



**รูปที่ 2.4** สารลดแรงตึงผิวและไมเซลล์: ดัดแปลงจาก [Patrick, 1993]

ในขณะที่เทคนิค MEEKC ใน BGE ประกอบด้วยหยดน้ำมัน, สารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วม (co-surfactant) โดยสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมจะไปล้อมรอบหยดน้ำมัน ดังรูปที่ 2.5 หยดน้ำมันจะมีขนาดเป็นนาโนเมตรและกระจายอยู่ในบัฟเฟอร์ ซึ่งลักษณะนี้เรียกว่า ไมโครอิมัลชัน (microemulsion) ในเทคนิค MEEKC หยดน้ำมันที่ล้อมรอบด้วยสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุ (charged oil droplets) ทำหน้าที่เป็น pseudo-stationary phase เช่นเดียวกับไมเซลล์

ของเทคนิค MEKC แต่ว่า charged oil droplets ในเทคนิค MEEKC จะมีความคงตัวของผิวน้อยกว่าไมเซลล์ในเทคนิค MEKC ทำให้สารที่ละลายน้ำได้น้อยสามารถเข้าไปอยู่ใน charged oil droplets ได้ง่ายกว่าในไมเซลล์ของเทคนิค MEKC

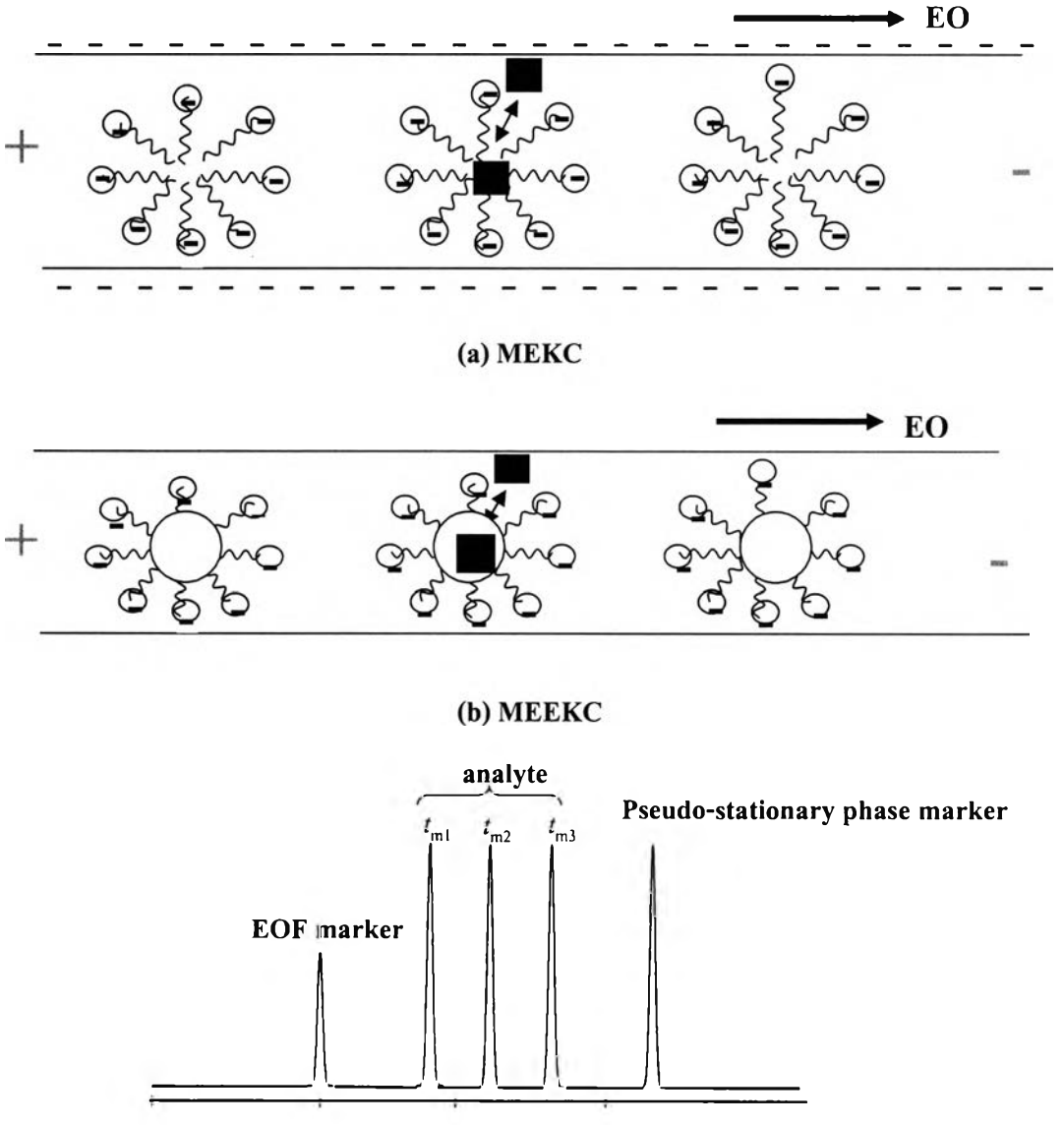
สำหรับการแยกสารด้วยเทคนิค MEKC และ MEEKC มีหลักการเหมือนกัน โดยใช้หลักของอิเล็กโทรฟอริซิสรวมกับโครมาโทกราฟี กลไกการแยกขึ้นอยู่กับความแตกต่างการเกิด partitioning ของสารระหว่าง pseudo-stationary phase กับ aqueous phase และความแตกต่างของ electrophoretic mobility ของสาร ดังนั้นเทคนิค MEKC และ MEEKC จึงสามารถใช้แยกได้ทั้งสารที่มีประจุและไม่มีประจุ




**รูปที่ 2.5** หยดน้ำมันที่มีสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมมาล้อมรอบ: ดัดแปลงจาก [Altria, 2000]

**2.6 การเคลื่อนที่ของสารในเทคนิค MEKC และ MEEKC ในภาวะที่มี EOF มาก**

สำหรับกรณีแยกสารที่ไม่มีประจุและใช้สารลดแรงตึงผิวประเภทแอนไอออนภายใต้ภาวะที่มี EOF มาก ซึ่งมีทิศทางไปทางขั้วแคโทด (ขั้วลบ) ใน MEKC และ MEEKC ดังรูปที่ 2.6a และ 2.6b ตามลำดับ pseudo-stationary phase จึงมีค่า $\mu$ เป็นลบ แต่อย่างไรก็ตาม pseudo-stationary phase สามารถเคลื่อนที่ไปยังขั้วแคโทดได้เนื่องจาก $\mu_{eo}$ มากกว่า $\mu_{ps}$ ลำดับการเคลื่อนที่จากก่อนไปหลัง คือ EOF marker, สารตัวอย่าง และ pseudo-stationary phase marker




**รูปที่ 2.6** ลักษณะการเคลื่อนที่ของสารใน a) เทคนิค MEKC และ b) MEEKC โดยใช้บัฟเฟอร์ภาวะที่เป็นเบส: ดัดแปลงจาก [Khaledi, 1998: p. 78]

ไมเกรชันหรือรีเทนชันของสารใน MEKC สามารถอธิบายได้โดยการใช้หลักการของ HPLC และ CZE โดยที่รีเทนชันแฟกเตอร์ (retention factor) หรือ capacity factor ในเทคนิคโครมาโทกราฟี หมายถึงอัตราส่วนของจำนวนโมลของสารในเฟสคงที่กับเฟสเคลื่อนที่ ในทางปฏิบัติคำนวณได้จากโครมาโทแกรมดังสมการ

$$k = \frac{t_m - t_o}{t_o} \qquad (2.3)$$

$t_m$ คือ ไมเกรชันไทม์ของสารตัวอย่าง และ $t_o$ คือ รีเทนชันไทม์ของสารที่ไม่เกิดอันตรกิริยากับเฟสคงที่

กลไกของ partitioning ใน MEKC และ MEEKC ของสารระหว่าง pseudo-stationary phase กับ aqueous phase อธิบายได้ดังสมการ 2.4

$$C_{aq} \leftrightarrow C_{ps} \qquad K = \frac{C_{ps}}{C_{aq}} \tag{2.4}$$

$K$ คือ distribution constant ของสารระหว่าง pseudo-stationary phase และ aqueous phase

$C_{ps}$ และ $C_{aq}$ คือ ความเข้มข้นของสารตัวอย่างใน pseudo-stationary phase และ aqueous phase ตามลำดับ

ค่า $k$ ในเทคนิค MEKC และ MEEKC หมายถึง อัตราส่วนของจำนวนโมลของสารใน pseudo-stationary phase ($n_{ps}$) กับ aqueous phase ($n_{aq}$)

$$k = \frac{n_{ps}}{n_{aq}} = K\varphi \tag{2.5}$$

$\varphi$ คือ อัตราส่วนของปริมาตร (phase ratio) ของ pseudo-stationary phase และเอเควียสเฟส

เมื่อสารตัวอย่างเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุลบ จะได้ว่า electrophoretic mobility ของ complex ระหว่าง pseudo-stationary phase และสารตัวอย่างเท่ากับ electrophoretic mobility ของ pseudo-stationary phase ($\mu_{ps}$) ดังนั้น observed electrophoretic mobility ($\mu$) ของสารตัวอย่าง A ดังสมการ

$$\mu_{obs,A} = x_{aq}\mu_A + x_{ps}\mu_{ps} \tag{2.6}$$

$x_{aq}$ และ $x_{ps}$ คือ เศษส่วนโมลของสารตัวอย่างใน pseudo-stationary phase และ aqueous phase ตามลำดับ

และในกรณีที่สารไม่มีประจุ มี $\mu_A = 0$ ดังนั้น

$$\mu_{obs,A} = x_{ps}\mu_{ps} = \frac{n_{ps}}{n_{aq} + n_{ps}}\mu_{ps} = \frac{k}{1+k}\mu_{ps} \tag{2.7}$$

ภายใต้ภาวะ EOF มาก มีผลรวมของความสามารถในการเคลื่อนที่ของสาร ($\mu_{net}$) ดังสมการ

$$\mu_{net,A} = \frac{k}{1+k}\mu_{ps} + \mu_{eo} \tag{2.8}$$

และค่า $t_R$ ของสารแต่ละชนิดมีความสัมพันธ์กับตัวแปรต่างๆ ดังสมการ

$$t_m = \frac{(1+k)t_{eo}}{1+(t_{eo}/t_{ps})k} \tag{2.9}$$

$t_{eo}$ คือไมเกรชันไทม์ของ EOF marker และ $t_{ps}$ คือ ไมเกรชันไทม์หรือรีเทนชันไทม์ของ pseudo-stationary phase ที่รวมทั้งจากการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าและอิเล็กโทรออสโมซิส

ในกรณีที่สารไม่มีประจุและมีค่า $k$ มากกว่า จะมีค่า $\mu$ มากกว่า และในกรณีที่ใช้สารลดแรงตึงผิวประเภทแอนไอออน ค่า $\mu_{net}$ จะมีค่าน้อย $t_R$ จะนาน จึงเคลื่อนที่ออกมาทีหลัง ดังนั้นถ้า $k_3 > k_2 > k_1$ จะได้ว่า $t_{m3} > t_{m2} > t_{m1}$ ดังรูปที่ 2.6

จากสมการที่ 2.6 สำหรับกรณีที่สาร A มีประจุ $\mu_A$ ไม่เท่ากับ 0 ดังนั้น

$$\mu_{obs,A} = \frac{1}{1+k}\mu_A + \frac{k}{1+k}\mu_{ps} \tag{2.10}$$

และมีไมเกรชันไทม์ของสาร ดังสมการ

$$t_m = \frac{(1+k)t_o}{1+(t_o/t_{ps})k} \tag{2.11}$$

$t_o$ คือไมเกรชันไทม์ของสารในภาวะที่ไม่มี pseudo-stationary phase หรือในสภาวะของ CZE นั่นเอง

**2.7 อิเล็กโทรฟีโรแกรมและไมเกรชันไทม์ (electropherogram and migration time)**

เมื่อสารตัวอย่างเคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัดจะแสดงผล (คล้ายกับโครมาโทแกรม) เรียกว่า อิเล็กโทรฟีโรแกรม (electropherogram) และระยะเวลาที่สารสามารถเคลื่อนที่จากปลายคะพิลลารีด้านบรรจุสารจนถึงเครื่องตรวจวัด เรียกว่า ไมเกรชันไทม์ (migration time, $t_m$) ในกรณีที่เป็น MEKC และ MEEKC อาจเรียกเป็นรีเทนชันไทม์ (retention time, $t_R$) ดังที่กล่าวมาแล้ว ในทางปฏิบัติเมื่อทราบค่า $t_m$ ของสาร จะสามารถคำนวณค่า electroosmotic mobility ($\mu_{eo}$) และ electrophoretic mobility ($\mu_{obs}$) ของสารดังสมการ

$$\mu_{net} = \frac{v_{net}}{E} = \frac{lL}{t_m V}, \quad \mu_{eo} = \frac{v_{eo}}{E} = \frac{lL}{t_{eo} V} \quad \text{และ} \quad \mu_{net} = \mu + \mu_{eo} \tag{2.12}$$

$\mu_{net}$ คือ ความสามารถของการเคลื่อนที่รวม (net mobility)

$t_m$ คือ ไมเกรชันไทม์ของสาร และ $t_{eo}$ คือ ไมเกรชันไทม์ของ EOF marker

$l$ คือ ความยาวจากปลายคะพิลลารีด้านที่บรรจุสารจนถึงเครื่องตรวจวัด (m)

$L$ คือ ความยาวทั้งหมดของคะพิลลารี (m)

$V$ คือ ศักย์ไฟฟ้า (V) และ $E$ คือ ความเข้มของสนามไฟฟ้า

**2.8 ค่าการแยก ประสิทธิภาพการแยกและความจำเพาะของสาร** [Li, 1992]

ค่าการแยกของสองพีกที่ติดกัน (resolution, $R_s$) หมายถึง ระยะห่างของกึ่งกลางของพีก ($\Delta x$) ต่อค่าเฉลี่ยของความกว้างของฐานพีก (ในหน่วยระยะทาง) หรือหมายถึงความแตกต่างของรีเทนชันไทม์ของสาร ($\Delta t_m$) ต่อค่าเฉลี่ยความกว้างของฐานพีก (ในหน่วยเวลา)

$$R_s = \frac{\Delta x}{0.5(w_1 + w_2)} = \frac{\Delta t_m}{0.5(w_1 + w_2)} \tag{2.13}$$

$w_1$ และ $w_2$ คือ ความกว้างของฐานพีกของสาร 1 และ 2 ตามลำดับ (หน่วยระยะทางสำหรับ $\Delta x$ หรือหน่วยเวลาสำหรับ $\Delta t_m$ ใน CE)

สำหรับเทคนิค CE ในภาวะที่มี EOF มาก มีค่าการแยกของสารสองพีกที่ติดกัน ดังสมการ

$$R_s = \frac{1}{4}\frac{\Delta\mu}{\bar{\mu}_{net}}\sqrt{\bar{N}} \quad \text{หรือ} \quad R_s = \frac{1}{4}\frac{\Delta\mu}{\left(\bar{\mu}+\mu_{eo}\right)}\sqrt{\bar{N}} \tag{2.14}$$

$\bar{N}$ คือ ค่าเฉลี่ยของประสิทธิภาพการแยกของสารสองพีกที่ติดกัน

$\bar{\mu}$ คือ ค่าเฉลี่ยของ $\mu$ ของสาร ในที่นี้คือ $\bar{\mu}_{obs,A}$ ในสมการ 2.10

$\Delta\mu$ คือ ความแตกต่างของ $\mu$ ของสาร

โดยประสิทธิภาพการแยกของสาร(efficiency หรือ theoretical plates, $N$) คำนวณได้จาก

$$N = \left(\frac{t_m}{w}\right)^2 \tag{2.15}$$

จากสมการที่ 2.14 และสมการที่ 2.7 ถึง 2.9 ค่าการแยกของสารที่ไม่มีประจุใน MEKC และ MEEKC ในภาวะที่มี EOF มาก มีความสัมพันธ์กับค่าประสิทธิภาพของการแยก ความจำเพาะของการแยก (separation selectivity, $\alpha$) และรีเทนชันแฟกเตอร์ ดังสมการ [Li, 1992]

$$R_s = \left(\frac{\sqrt{N}}{4}\right)\left(\frac{\alpha-1}{\alpha}\right)\left(\frac{k_2}{1+k_2}\right)\left(\frac{1-t_{eo}/t_{ps}}{1+(t_{eo}/t_{ps})k_1}\right) \tag{2.16}$$

และสำหรับในกรณีที่สารตัวอย่างมีประจุ $t_{eo}$ จะเป็น $t_o$ แทน

กำหนดให้ $\alpha$ เป็น selectivity ของสาร คำนวณดังสมการ

เมื่อ $k_2 > k_1$; $\qquad \alpha = \frac{K_2}{K_1} = \frac{k_2}{k_1}$ (2.17)

$N$ อาจนิยามให้เป็นอัตราส่วนของความยาวของคะพิลลารีถึงเครื่องตรวจวัด ($l$) ต่อความสูงของเพลตเชิงทฤษฎี (total theoretical plates height, $H$) ซึ่งเกิดจากผลรวมของความสูงของเพลตเชิงทฤษฎีที่เกิดการกระจายตัวจากปัจจัยแต่ละชนิด ดังสมการ

$$N = \frac{H}{l} \quad \text{และ} \quad H = H_l + H_{mc} + H_{aq} + H_t + H_{pd} \tag{2.18}$$

$H_l$ คือ ค่า $H$ ที่เกิดจาก longitudinal diffusion

$H_{mc}$ คือ ค่า $H$ ที่เกิดจาก sorption-desorption kinetics in micellar solubilisation

$H_{aq}$ คือ ค่า $H$ ที่เกิดจาก intermicellar mass transfer in the aqueous phase

$H_t$ คือ ค่า $H$ ที่เกิดจาก thermal dispersion

$H_{pd}$ คือ ค่า $H$ ที่เกิดจาก polydispersity of micelles

ในเทคนิค MEKC ค่า $H_{mc}$ จะมีค่าน้อยมากจนไม่ต้องคำนึงถึงเลยสำหรับสารที่มีการกระจายตัวเข้าไปในไมเซลล์ได้มาก ส่วนค่า $H_l$ จะมีค่ามากขึ้นเมื่อสารมีไมเกรชันไทม์มากขึ้นและมีสัมประสิทธิ์การแพร่กระจายสูง ค่า $H_{aq}$ และ $H_{pd}$ จะมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวเพิ่มมากขึ้น และ $H_t$ เพิ่มขึ้นเนื่องจากการที่ Joule heating เพิ่มขึ้น โดยการเพิ่มความเข้นข้นของ BGE, อุณหภูมิและศักย์ไฟฟ้า สำหรับเทคนิค MEEKC ก็จะอธิบายได้ในลักษณะเดียวกันกับเทคนิค MEKC ดังนั้นถ้าความสูงของเพลตเชิงทฤษฎียิ่งมีค่าน้อย ประสิทธิภาพการแยกของสารก็จะมากขึ้น

**2.9 คุณภาพและปริมาณวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE (Qualitative and Quantitative Analysis in CE)**

คุณภาพวิเคราะห์ใน CE สามารถทำได้โดยเปรียบเทียบจากค่าไมเกรชันไทม์ ($t_m$) และค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร (electrophoretic mobility, $\mu$) ซึ่งสารชนิดเดียวกันจะให้ค่าเท่ากัน นอกจากนี้ยังสามารถทำได้โดยใช้ spiking techniques ซึ่งใช้เมื่อสงสัยว่าพีกไหนเป็นพีกของสารที่ต้องการวิเคราะห์ โดยทำการเติมสารที่ต้องการวิเคราะห์ลงไป ถ้าพีกใดมีพื้นที่ได้พีกเพิ่มขึ้นแสดงว่าพีกนั้นเป็นพีกของสารที่ต้องการวิเคราะห์ และสำหรับในกรณีที่ใช้ photodiode array detector สามารถเปรียบเทียบยูวีสเปกตรัมได้

ปริมาณของสารที่เคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัด ($Q$) มีความสัมพันธ์กับตัวแปรต่างๆ ดังสมการที่ 2.19

$$Q(\text{mole}) = \frac{\text{Peak area} \times V_F\,(\text{m}^3\text{s}^{-1})}{\text{Response factor}\,(\text{AU mol}^{-1}\text{m}^{-3})} \qquad (2.19)$$

$V_F$ 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 ($v_{eo}$) ซึ่งเป็นไปดังสมการที่ 2.20 ดังนั้นค่า $Q$ จึงขึ้นกับพื้นที่ใต้พีกส่วนไมเกรชันไทม์ นิยามเป็น corrected peak area ดังสมการที่ 2.21 ดังนั้นใน CE ใช้พื้นที่ใต้พีกส่วนไมเกรชันไทม์ (หรือ corrected peak area) ในการทำปริมาณวิเคราะห์

$$V_F = \frac{\pi r^2 l}{t_m} \tag{2.20}$$

ตัวแปรต่างๆ นิยามดังที่กล่าวมาแล้ว

ดังนั้น
$$Q \propto \frac{\text{Peak area (AUs)}}{t_m \text{ (s)}} \tag{2.21}$$

แม้จะมีงานวิจัยกล่าวว่าปริมาตรของสารที่บรรจุด้วยการอัดความดันในเทคนิค CE มีความเที่ยงสูง [Mayer, 2001] แต่อย่างไรก็ตามความไม่เที่ยงของปริมาตรที่บรรจุขึ้นกับความเที่ยงของความดัน เวลา และความหนืดของบัฟเฟอร์ในคะพิลลารีที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนอุณหภูมิของคะพิลลารีในส่วนที่ไม่ได้ควบคุมอุณหภูมิ สำหรับงานวิจัยโดยทั่วไปของการทำปริมาณวิเคราะห์ (quantitative analysis) ที่ใช้คำนวณหรือหาปริมาณสาร คือ การทำกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ซึ่งใช้วิธีต่างๆ กัน ดังนี้

1) External Standard

เป็นการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง corrected peak area (แกน y) กับความเข้มข้นต่างๆ (แกน x) จะได้กราฟเส้นตรง (y = mx + c) สำหรับการหาปริมาณสารตัวอย่าง ทำโดย corrected peak area ของพีกหรือพื้นที่ใต้พีกที่วิเคราะห์ได้ มาคำนวณหาความเข้มข้นจากสมการเส้นตรง

2) Internal Standard

สารที่เป็น internal standard จะเป็นสารมาตรฐานอีกชนิดหนึ่งที่ไม่ใช่สารตัวที่ต้องการวิเคราะห์และเติมลงไปในสารตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐานในปริมาณที่เท่ากัน การทำกราฟมาตรฐานทำได้โดยสร้างกราฟความสัมพันธ์โดยที่แกน y เป็นสัดส่วนของ corrected peak area ของสารตัวอย่างต่อ corrected peak area ของ internal standard และแกน x เป็นความเข้มข้นของสารตัวอย่าง ดังนั้นในการฉีดสารแต่ละครั้ง ถ้าสารมีความเข้มข้นเท่ากัน อัตราส่วนของปริมาณสารต่อ internal standard จะคงที่

**2.10 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction หรือ liquid-phase extraction)**

การสกัดด้วยตัวทำละลาย หมายถึง การแยกกลุ่มของสารที่สนใจออกเมทริกซ์ของตัวอย่าง โดยทำให้กลุ่มของสารที่สนใจดังกล่าวถ่ายเทจากเฟสสารตัวอย่าง (sample phase) ซึ่งอาจเป็นของแข็งหรือของเหลว เป็นต้น ไปสู่เฟสใหม่ที่เป็นของเหลว (โดยทั่วไปหมายถึง ตัวทำละลายอินทรีย์) หรืออาจเรียกว่า การสกัดด้วยเฟสของเหลว (liquid-phase extraction) เทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลายจึงเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ในขั้นตอนการเตรียมสารตัวอย่างก่อนที่วิเคราะห์สารด้วยเครื่องมือต่างๆ เพื่อกำจัดเมทริกซ์ที่อาจรบกวนการวิเคราะห์หรือเพิ่มความเข้มข้นของสารที่สนใจ กรณีที่เฟสตัวอย่างเป็นของแข็ง เรียกว่า liquid-solid extraction หรือถ้าเฟสตัวอย่างเป็นของเหลวที่ไม่ละลายรวมเป็นเนื้อเดียวกับเฟสใหม่ที่เป็นของเหลว เรียกว่า liquid-liquid extraction เนื่องจากซอสพริกมีลักษณะเป็นของเหลวข้น หลักการของการสกัดด้วยตัวทำละลายอาจสามารถอธิบายได้เช่นเดียวกับ liquid-liquid extraction โดยทั่วไปเฟสตัวอย่างจะเป็นน้ำและอีกเฟสหนึ่งเป็นเฟสตัวทำละลายอินทรีย์

สมดุลของการกระจายตัวของสารในเฟสตัวอย่าง เช่น ของเหลว กับเฟสตัวทำละลายอินทรีย์ ดังสมการ

$$A_s \longleftrightarrow A_{org}$$

A คือ สารที่ต้องการสกัด (analyte)

s คือ เฟสของสารตัวอย่าง (sample phase)

org คือ เฟสของตัวทำละลายอินทรีย์ (organic phase)

การสกัดด้วยตัวทำละลายเป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้ในการแยกสารประกอบที่สนใจออกจากของผสม โดยอาศัยหลักการของการกระจายของตัวถูกละลาย (solute) หรือสารที่สนใจระหว่างเฟสตัวทำละลาย 2 ชนิดที่ไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณของตัวถูกละลายที่ละลายได้ในแต่ละเฟสขึ้นอยู่กับชนิดของตัวถูกละลายและตัวทำละลาย อัตราส่วนความเข้มข้นของตัวถูกละลาย อัตราส่วนความเข้มข้นของตัวถูกละลายในตัวทำละลายที่ 1 ต่อความเข้มข้นของตัวถูกละลายในตัวทำละลายที่ 2 ที่สมดุล คือค่าคงที่ของสมดุลของการกระจาย (distribution constant) หรือ สัมประสิทธิ์ของการกระจาย (distribution coefficient, $K_d$) หรือสัมประสิทธิ์ของการแบ่งส่วน (partition coefficient, $P$) ซึ่งเป็นค่าคงที่เฉพาะตัวถูกละลายชนิดหนึ่งๆ สำหรับตัวทำละลายคู่หนึ่งๆ ที่อุณหภูมิหนึ่งๆ ดังสมการ [Morrison and Freiser: 1962]

$$K_d = \frac{C_{org}}{C_s} \tag{2.22}$$

$C_{org}$ คือ ความเข้มข้นของสารในเฟสตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent)

$C_s$ คือ ความเข้มข้นของสารในเฟสตัวอย่าง (sample)

จากสมการ ถ้า $K_d$ มีค่ามาก แสดงว่าสารมีความสามารถในการละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้มาก ในทางกลับกัน ถ้า $K_d$ มีค่าน้อย แสดงว่าสารมีความสามารถในการละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้น้อย ดังนั้น $K_d$ ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ที่จะนำมาเป็นตัวสกัด ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมจะต้องให้ค่า $K_d$ มากๆ โดยประสิทธิภาพของการสกัด (extraction efficiency, $E$) หรือ Recovery ($R$) หาได้จากสมการ

$$E = \frac{W_{org}}{W_0} \tag{2.23}$$

$W_{org}$ คือ ปริมาณสารในเฟสตัวทำละลายอินทรีย์

$W_0$ คือ ปริมาณสารเริ่มต้น

ประสิทธิภาพของการสกัดสามารถคำนวณจากปริมาณของสารในตัวทำละลายอินทรีย์ต่อปริมาณสารเริ่มต้น ถ้าตัวทำละลายอินทรีย์สามารถสกัดสารออกมาได้มาก ประสิทธิภาพของการสกัดก็จะมีค่ามาก ดังนั้นค่าประสิทธิภาพการสกัดนี้ จะบ่งบอกถึงความสามารถของตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัดสาร

$$E = \frac{C_{org}V_{org}}{\left(C_{org}V_{org} + C_sV_s\right)} \tag{2.24}$$

$V_{org}$ คือ ปริมาตรของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัด

$V_s$ คือ ปริมาตรของตัวอย่างที่นำมาสกัด

$$E = \frac{K_d\beta}{\left(1 + K_d\beta\right)} \tag{2.25}$$

$\beta$ คือ Phase ratio ซึ่งเป็นอัตราส่วนของปริมาตรของเฟสตัวทำละลายอินทรีย์ต่อเฟสตัวอย่าง ($V_{org}/V_s$)

**2.11 Salting-Out Effect**

Salting-out effect เป็นผลที่เกิดขึ้นจากการเติมเกลือลงไปในเฟสตัวอย่างเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่เฟสตัวอย่างเป็นน้ำหรือมีน้ำเป็นองค์ประกอบและเฟสที่ใช้สกัดเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ โดยที่เกลือจะไปเพิ่มความแรงไอออน (ionic strength) ในเฟสตัวอย่าง ทำให้ความสามารถในการละลายของสารในเฟสตัวอย่างลดลง แต่เพิ่มความสามารถในการละลายของสารในเฟสตัวทำละลายอินทรีย์ หรือ ค่า $K_d$ เพิ่มขึ้น นั่นเอง ดังนั้นจึงทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด ดังสมการที่ 2.22 ถึง 2.25

เกลือที่นิยมใช้กัน เช่น โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) แมกนีเซียมซัลเฟต (anhydrous $MgSO_4$) [Morrison and Freiser, 1962; Anastassiades *et. al.*, 2003; Majors, 2008] ในกรณีใช้เกลือที่ผ่านการกำจัดความชื้น (อาจใช้ในรูป anhydrous หรืออบแห้ง) ในปริมาณที่พอควรจะทำให้เกิดการอิ่มตัวของเกลือในเฟสตัวอย่างที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ จะช่วยทำให้การแยกชั้นระหว่างน้ำกับตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดีและเร็วขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดดีขึ้น