

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

รีเทนชันแฟกเตอร์และประสิทธิภาพของการแยกสารประกอบประเภท
อนุกรมโฮโมโลกส์ในไมโครอิมัลชันอิเล็กโทรไคเนติกโครมาโทกราฟี

Retention Factor and Efficiency of Homologous Series Compounds in

Microemulsion Electrokinetic Chromatography

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชรรมนุญ หนูจักร

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตุลาคม 2549

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

รีเทนชันแฟกเตอร์และประสิทธิภาพของการแยกสารประกอบประเภท
อนุกรมโฮโมโลกส์ในไมโครอิมัลชันอิเล็กโทรโครมาโทกราฟี
Retention Factor and Efficiency of Homologous Series Compounds in
Microemulsion Electrokinetic Chromatography

โดย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชรรมนุญ หนูจักร
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตุลาคม 2549

บทคัดย่อ

ได้ศึกษารีเทนชันแฟกเตอร์ รีเทนชันอินเดก และประสิทธิภาพของการแยกของสารประกอบประเภทอนุกรมไฮโมโลกัส ได้แก่ อัลคิลเบนซีน (BZ) อัลคิลลอร์ลิตีโตน (PN) อัลคิลเบนโซเอท (BA) และอัลคิลพาราเบน (PB) ในเทคนิคไมโครอิมัลชันอิเล็กโตรโครมาโทกราฟี (MEEKC) ในภาวะที่กำจัดอิเล็กโตรออสโมซิส ที่ความเข้มข้นของโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต ([SDS]) อุณหภูมิ และศักย์ไฟฟ้าต่างๆ บัฟเฟอร์ของ MEEKC ที่ใช้ประกอบด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 2.5, นอร์มัลออกเทน 1.0% โดยปริมาตรเป็นหยคน้ำมัน, SDS 100 ถึง 200 มิลลิโมลาร์เป็นสารลดแรงตึงผิว และ 1-บิวทานอล 890 มิลลิโมลาร์เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม

พบว่าค่ารีเทนชันอินเดกไม่ขึ้นกับ [SDS] อุณหภูมิและศักย์ไฟฟ้าในการแยกสาร ในขณะที่ k มีค่าเพิ่มขึ้นเชิงเส้นตรงกับการเพิ่ม [SDS] แต่จะมีค่าลดลงเชิงเส้นตรงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิหรือศักย์ไฟฟ้า สำหรับค่าประสิทธิภาพของการแยกสารจะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่ม [SDS] แต่จะลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิหรือศักย์ไฟฟ้า นอกจากนี้เมื่อให้ [SDS], อุณหภูมิและศักย์ไฟฟ้าคงที่ พบว่าค่า N ของสารประกอบประเภทอนุกรมไฮโมโลกัสเดียวกันมีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก แต่จะมีค่าแตกต่างกันสำหรับสารประกอบประเภทอนุกรมไฮโมโลกัสต่างกัน

ที่ [SDS], อุณหภูมิและศักย์ไฟฟ้าใดๆ ได้ความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงระหว่างค่า $\log k$ กับจำนวนคาร์บอนของสาร (z) ได้ปรับปรุงสมการของ $\log k$ เป็นฟังก์ชันกับ [SDS] และ z เพื่อทำนายค่า $\log k$ ของสารประกอบประเภทอนุกรมไฮโมโลกัส พบว่าที่ [SDS] ใดๆ ค่า $\log k$ ของสารที่ได้จากการทดลองและการทำนายมีความสอดคล้องกันมาก

เมื่อใช้ BZ เป็นสารมาตรฐาน ได้กราฟสอบเทียบเชิงเส้นตรงระหว่างค่า $\log K_{ow}$ กับ $\log k$ หรือค่า $\log K_{ow}$ กับ I ที่ [SDS] ต่างๆ และสามารถทำนายค่า $\log K_{ow}$ ของ PN, BA และ PB ได้จากค่า $\log k$ หรือ I โดยที่ K_{ow} คือ ค่าคงที่ของการกระจายตัวของสารในนอร์มัลออกเทนอลและน้ำ เมื่อใช้การประเมินผลทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าค่า $\log K_{ow}$ ที่ทำนายได้จากค่า $\log k$ และ I ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ค่า $\log K_{ow}$ ที่ทำนายได้มีความสอดคล้องกับค่าที่มีผู้รายงานไว้

เลขานุ

เลขทะเบียน C 1,3471

รับ. เดือน. ปี 25 ม.ค. 51

ABSTRACT

Retention factor (k), retention index (I) and efficiency (N) for homologous series compounds, such as alkylbenzenes (BZ), alkylaryl ketones (PN), alkylbenzoates (BA) and alkylparabens (PB), in microemulsion electrokinetic chromatography (MEEKC) with suppressed electroosmosis were investigated in a wide range of the concentration of sodium dodecyl sulphate ([SDS]), separation temperature and applied voltage. An MEEKC buffer used contained a phosphate buffer at pH 2.5, 1.0% v/v *n*-octane as oil, 100 to 200 mM SDS as surfactant and 890 mM 1-butanol as co-surfactant.

Retention index is independent of [SDS], temperature and applied voltage, while k linearly increases with increasing [SDS], but linearly decreases with increasing temperature and applied voltage. The efficiency increases with increasing [SDS], while decreases with higher temperature and applied voltage. At given [SDS], temperature and applied voltage, the values of N are insignificantly different for each homologous series, while different for different homologous series.

Over a wide range of [SDS], temperature and applied voltage, the linear relationship between $\log k$ and number of carbons (z) is obtained. The equation of $\log k$ as a function of z and [SDS] was modified to predict the values of $\log k$ of homologous series compounds. At given [SDS], excellent agreement was found between observed and predicted values of $\log k$ of analytes in MEEKC.

Using BZ as standards, the linear calibration plots between $\log K_{ow}$ versus $\log k$ or $\log K_{ow}$ versus I were obtained over a wide range of [SDS], and the values of $\log K_{ow}$ for PN, BA and PB were predicted from $\log k$ and I , where $\log K_{ow}$ is the logarithm of octanol-water distribution constant. Using paired t -test analysis at 95% confidence interval of the mean, non significant difference was found for the predicted values of $\log K_{ow}$ obtained from $\log k$ and I . In addition, good agreement was also found for the predicted and literature values of $\log K_{ow}$ for each analyte.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จล่วงได้ด้วยดี โดยได้รับการสนับสนุน คำแนะนำและความช่วยเหลือจากบุคคลและหน่วยงาน ดังต่อไปนี้

ขอขอบพระคุณอย่างยิ่งสำหรับทุนวิจัย “กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช” จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ฉัฐฉนัญ ลิขิตพัฒนไพบุลย์ ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่างๆ ตลอดงานวิจัย

ขอขอบคุณนางสาวเกียรติกฤดา ปุตุศรี ผู้ช่วยวิจัย ที่มีส่วนร่วมในการทำการทดลองและจัดพิมพ์รายงานฉบับสมบูรณ์นี้ และขอบคุณคณาจารย์ในกลุ่มวิจัยเทคนิคการแยกสารและการวิเคราะห์เชิงโครมาโทกราฟี ที่ให้คำแนะนำต่างๆ รวมทั้ง reviewers ที่ให้คำแนะนำและแก้ไขเนื้อหาของงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสาร Electrophoresis

ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่เอื้อเฟื้อสถานที่เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณลูกศิษย์นิสิตปริญญาโทในกลุ่มวิจัยที่มีส่วนช่วยเหลือในผลงานวิจัย และรายงานวิจัยฉบับนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดาและพี่น้องทุกคนเป็นอย่างสูง ที่เป็นกำลังตลอดเวลาในการทำงานวิจัยนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ii
Abstract	iii
กิตติกรรมประกาศ	iv
สารบัญ	v
สารบัญตาราง	vii
สารบัญรูป	viii
สัญลักษณ์และคำย่อ	ix
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 มูลเหตุจูงใจของงานวิจัย	1
1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
1.3 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	4
1.4 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	5
1.5 ขอบเขตของงานวิจัย	5
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
บทที่ 2 ทฤษฎีของคะพิลลารีอิเล็กทรอนิกส์ โทรฟอริซิส	7
2.1 ส่วนประกอบของเครื่อง CE	7
2.2 ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า	8
2.3 อิเล็กโทรอสโมซิส	9
2.4 ประเภทของเทคนิค CE	11
2.5 การเคลื่อนที่ของสารในเทคนิค MEEKC ที่ภาวะเป็นกรด	13
2.6 ประสิทธิภาพของการแยกสาร	15
2.7 รีเทนชันอินเดก	16
2.8 ค่าคงที่ของการกระจายตัวของสารระหว่างออกทานอลและน้ำ	17
บทที่ 3 การทดลอง	18
3.1 เครื่องมือ	18
3.2 สารเคมีและอุปกรณ์	18
3.3 การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง CE	19

3.3.1	ภาวะของ CE สำหรับการทดลอง	19
3.3.2	การเตรียมไมโครอิมัลชันบัพเฟอร์	19
3.3.3	การเตรียมสารทดสอบ	19
3.4	ภาวะที่ใช้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อรีเทนชันแฟกเตอร์ รีเทนชันอินเดก และประสิทธิภาพของการแยกสารกลุ่ม homologous series ของ MEEKC	20
3.4.1	ความเที่ยงของค่า k และ I	20
3.4.2	ผลของความเข้มข้นของ SDS	20
3.4.3	ผลของอุณหภูมิ	20
3.4.4	ผลของศักย์ไฟฟ้า	20
3.5	การหาค่าคงที่ของการกระจายตัวของสารระหว่างออกทานอลและน้ำ	21
3.6	การทำนายรีเทนชันแฟกเตอร์ของ homologous series	21
บทที่ 4	ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	22
4.1	ความเที่ยงของค่า k และ I	22
4.2	ผลของความเข้มข้นของ SDS	26
4.3	ผลของอุณหภูมิ	32
4.4	ผลของศักย์ไฟฟ้า	38
4.5	ค่าคงที่ของการกระจายตัวของสารระหว่างออกทานอลและน้ำ	43
4.6	การทำนายรีเทนชันแฟกเตอร์ของ homologous series	46
บทที่ 5	สรุปผลงานวิจัย	47
5.1	สรุปผลการทดลอง	47
5.2	งานที่น่าสนใจต่อไป	49
เอกสารอ้างอิง		50
ภาคผนวก		53
	ภาคผนวก ก การทดสอบข้อมูลทางสถิติ	53
	ภาคผนวก ข การเผยแพร่ผลงานวิจัย	82
	ภาคผนวก ค ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ	83

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	Intraday และ interday precision ของค่า k และ I ของ homologous series ใน MEEKC โดยใช้ 180 mM SDS และภาวะอื่นๆ ดังรูปที่ 4.1	25
4.2	ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างค่า $\log k$ และ z ของ homologous series ใน MEEKC เมื่อใช้ความเข้มข้นของ SDS ตั้งแต่ 100 ถึง 200 mM	29
4.3	ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างค่า $\log k$ และ z ของ homologous series ใน MEEKC เมื่อใช้อุณหภูมิตั้งแต่ 15 ถึง 40°C	35
4.4	ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างค่า $\log k$ และ z ของ homologous series ใน MEEKC เมื่อใช้ศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ -10 ถึง -20 kV	40
4.5	สมการเส้นตรงของกราฟสอบเทียบของค่า $\log K_{ow}$ กับ $\log k$ หรือ $\log K_{ow}$ กับ I ของ homologous series ที่ได้จาก MEEKC โดยใช้ BZ เป็นสารมาตรฐาน	44
4.6	ค่า $\log K_{ow}$ ของ homologous series ที่ได้จากการทำนายใน MEEKC โดยใช้ BZ เป็นสารมาตรฐาน	45

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	โครงสร้างของสาร homologous series ประเภท (a) alkylbenzenes (BZ), (b) alkylbenzoates (BA), (c) alkylparabens (PB) และ (d) alkylaryl ketones (PN)	2
2.1	ส่วนประกอบอย่างง่ายของเครื่อง CE	7
2.2	Electroosmotic flow (EOF)	10
2.3	ลักษณะการไหลของสารและรูปร่างของพีกใน CE	11
2.4	หยดน้ำมันที่มีสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวรวมมาล้อมรอบ	12
2.5	ลักษณะการเคลื่อนที่ของสารในเทคนิค Microemulsion electrokinetic chromatography โดยใช้บัฟเฟอร์ภาวะที่เป็นกรด	13
4.1	อิเล็กโทรฟีโรแกรมของ homologous series (a) BZ, (b) PN, (c) BA และ (d) PB ใน MEEKC ภาวะที่กำจัด EOF	24
4.2	ผลของความเข้มข้น SDS ต่อ (a) รีเทนชันแฟกเตอร์ และ (b) รีเทนชันอินเดกซ์ของ homologous series	28
4.3	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ SDS กับ N	30
4.4	กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง N กับ k ที่ความเข้มข้นของ SDS คงที่	31
4.5	ผลของอุณหภูมิต่อ (a, b) รีเทนชันแฟกเตอร์ และ (c) รีเทนชันอินเดกซ์ของ homologous series	34
4.6	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกับ N	36
4.7	กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง N กับ k ที่อุณหภูมิกคงที่	37
4.8	ผลของศักย์ไฟฟ้าต่อ (a) รีเทนชันแฟกเตอร์ และ (b) รีเทนชันอินเดกซ์ของ homologous series	39
4.9	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างศักย์ไฟฟ้ากับ N	41
4.10	กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง N กับ k ที่ศักย์ไฟฟ้าคงที่	42
4.11	กราฟสอบเทียบแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\log K_{ow}$ กับ $\log k$ และ I ของ homologous series ของ BZ ใน MEEKC	44
4.12	กราฟแสดงความสัมพันธ์ของค่า $\log k$ ของ homologous series ที่ได้จากการทดลอง และทำนาย MEEKC โดยใช้ (a) 130 และ (b) 190 mM SDS	46

สัญลักษณ์และคำย่อ

BA	อัลคิลเบนโซเอต (alkylbenzoates)
BZ	อัลคิลเบนซีน (alkylbenzenes)
CE	capillary electrophoresis
CEC	capillary electrochromatography
CGE	capillary gel electrophoresis
CIEF	capillary isoelectric focusing
CITP	capillary isotachopheresis
CMC	critical micelle concentration
CZE	capillary zone electrophoresis
DB	โดเดคซิลเบน (dodecylbenzene)
EOF	electroosmotic flow
HPLC	ไฮเพอฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี
I.D.	เส้นผ่านศูนย์กลางด้านใน
M	Microemulsion marker
MEEKC	ไมโครอิมัลชันอิเล็กโตรโครมาโทกราฟี
MEKC	ไมเซลล์อิเล็กโตรโครมาโทกราฟี
PB	อัลคิลพาราเบน (alkylparabens)
PN	อัลคิลลอร์คีโตน (alkylaryl ketones)
RSD	ค่าส่วนเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ (relative standard deviation)
SDS	โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต (sodium dedecyl sulphate)
C_{aq}	ความเข้มข้นของสารใน aqueous phase
C_{mc}	ความเข้มข้นของสารใน oil phase
D	diffusion coefficient
D_{aq}	diffusion coefficient ของสารใน aqueous phase
D_{mc}	diffusion coefficient ของสารใน micelle (microemulsion) phase
d	ขนาดของกะพืดลารี
e	ประจุของอิเล็กตรอน (1.6×10^{-19} คูลอมบ์)
E	ความเข้มของสนามไฟฟ้า (electric field strength)
F	ค่าคงที่ฟาราเดย์

H	ความสูงของเพลตเชิงทฤษฎี (total theoretical plates height)
H_{aq}	ค่า H ที่เกิดจาก intermicellar mass transfer in the aqueous phase
H_l	ค่า H ที่เกิดจาก longitudinal diffusion
H_{mc}	ค่า H ที่เกิดจาก sorption-desorption kinetics in micellar solubilisation
H_{pd}	ค่า H ที่เกิดจาก polydispersity of micelles
H_t	ค่า H ที่เกิดจาก thermal dispersion
ΔH°	เอนทาลปีและเอนโทรปีที่สภาวะมาตรฐาน
I	รีเทนชันอินเด็ก (retention factor)
i	ความแรงไอออนิก (ionic strength)
I_A	กระแสไฟฟ้า (electric current)
k	รีเทนชันแฟกเตอร์ (retention factor)
K	ค่าคงที่ของการกระจาย (distribution constant)
k_d	desorption rate constants
K_{ow}	ค่าคงที่ของการกระจายตัวของสารระหว่างออกทานอลและน้ำของสาร
K_s	sorption rate constants
l	ความยาวจากปลายคะพิลลารีด้านที่บรรจุสารจนถึงเครื่องตรวจวัด
L	ความยาวทั้งหมดของคะพิลลารี
l_{inj}	ความยาวของโชนสารที่ทำการบรรจุเข้าคอลัมน์
n_{aq}	จำนวน โมลของสาร ใน aqueous phase
n_{mc}	จำนวน โมลของสาร ใน oil phase
N	ประสิทธิภาพของการแยกสาร (efficiency หรือ theoretical plates)
R	ค่าคงที่ของแก๊ส (gas constant)
r_h	รัศมีไฮโดรไดนามิกของไอออน (hydrodynamic radius of ion) ซึ่งเป็นรัศมีของไอออนที่มีโมเลกุลของน้ำล้อมรอบขณะที่ไอออนเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า
ΔS°	เอนโทรปีที่สภาวะมาตรฐาน
T	อุณหภูมิ
t_{inj}	เวลาที่ใช้บรรจุสาร (injection time)
t_{mc}	รีเทนชันไทม์ของ microemulsion marker
t_R	รีเทนชันไทม์ (retention time) ของสาร
v_{eo}	ความเร็วในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของ EOF (electroosmosis velocity)
v_{ep}	ความเร็วในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร (electrophoretic velocity)
v_{net}	ความเร็วรวมในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร (total electrophoretic velocity)

V	ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้แยกสาร (applied voltage)
\bar{v}	partial molar volume of the micells
V_{inj}	ปริมาตรของสารที่บรรจุเข้าคอลัมน์
V_{aq}	ปริมาตรของ aqueous phase
V_F	ความเร็ว โดยปริมาตรของสารตัวอย่างที่เคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัด
V_{mc}	ปริมาตรของ oil phase
w	ความกว้างของฐานพีคของสาร
x_{aq}	เศษส่วนจำนวน โมลของสารใน aqueous phase
x_{mc}	เศษส่วนจำนวน โมลของสารตัวอย่างใน oil phase
z	จำนวนคาร์บอน
Z	ประจุบน ไอออน (electronic charge)
$\Delta\mu$	ความแตกต่างของค่า μ ของสาร
α_{CH_2}	methylene selectivity
ϕ	อัตราส่วนปริมาตรของ oil phase ต่อปริมาตรของ aqueous phase (V_{mc}/V_{aq})
η	ความหนืดของสารละลาย
κ	electrical conductivity
λ	thermal conductivity
μ	ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า (electrophoretic mobility)
μ°	ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าที่ความแรงของไอออนิกใกล้เคียงศูนย์ (absolute electrophoretic mobility)
μ_{eo}	ความสามารถในการเคลื่อนที่ของอิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmotic mobility)
μ_{obs}	observed mobility
μ_{net}	total mobility
μ_{mc}	electrophoretic mobility ของ oil phase

บทที่ 1

บทนำ

1.1 มุมเหตุจูงใจของงานวิจัย

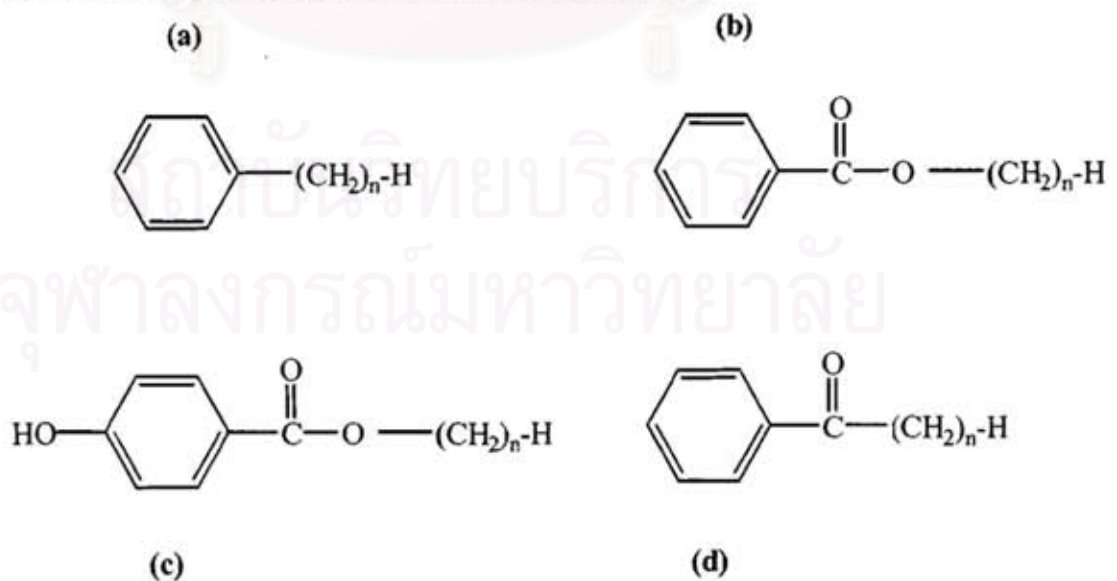
กะพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (capillary electrophoresis, CE) เป็นเทคนิคการแยกสารภายใต้ อิทธิพลของไฟฟ้าในหลอดกะพิลลารีที่บรรจุสารละลายอิเล็กโทรไลต์ (background electrolyte, BGE) หลักการแยกสารอาศัยความแตกต่างของค่าความสามารถของการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า (electrophoretic mobility, μ) ซึ่งขึ้นกับอัตราส่วนระหว่างประจุต่อขนาดของไอออน [Khaledi: 1998, Camilleri: 1993] ปัจจุบันเทคนิค CE สามารถประยุกต์ใช้กับการแยกสารได้หลากหลายชนิด ทั้งสารที่มีประจุ และไม่มีประจุ สารที่ละลายน้ำได้ และสารที่ละลายน้ำได้ยาก โดย CE มีข้อดีคือ เป็นเทคนิคที่ สะดวก รวดเร็ว รวมทั้งประหยัดสารตัวอย่างและสารละลายอิเล็กโทรไลต์

CE แบ่งออกได้หลายประเภทตามกลไกของการแยกสาร เช่น กะพิลลารีโซนอิเล็กโทรโฟรีซิส (capillary zone electrophoresis, CZE) เป็นเทคนิคที่ BGE ในกะพิลลารีเป็นบัฟเฟอร์ทั่วๆ ไป และ นิยมใช้แยกสารที่มีประจุ สำหรับการแยกสารที่เป็นกลางด้วย CE ที่เป็นที่รู้จักกันทั่วไป คือ ไมเซลล์ลารีอิเล็กโทรโครมาโทกราฟี (micellar electrokinetic chromatography, MEKC) โดยที่ BGE ของ MEKC ประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิว รวมกันเป็นไมเซลล์ลาร์เฟส (micellar phase) ทำหน้าที่เป็น pseudo stationary phase ซึ่งคล้ายกับเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ในไฮเพอฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโทกราฟี (HPLC) แต่ในช่วง 3-4 ปีที่ผ่านมาเทคนิค CE อีกประเภทหนึ่งที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่ง คือ ไมโครอิมัลชันอิเล็กโทรโครมาโทกราฟี (microemulsion electrokinetic chromatography, MEEKC) [Watarai: 1991, Terabe *et al.*: 1992, Altria *et al.*: 2000] โดยที่ BGE ประกอบด้วยหยดไขมัน สารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วม ซึ่งเกิดเป็นเฟสน้ำมันที่มีประจุ (charged oil phase) และทำหน้าที่เป็น pseudo stationary phase คล้ายไมเซลล์ใน MEKC กลไกการแยกของสารในเทคนิค MEKC และ MEEKC ขึ้นกับค่าคงที่ของการกระจาย (distribution constant, K) ของสารระหว่าง pseudo stationary phase และเอควีเฟส (aqueous phase) โดยที่เทคนิค MEEKC เหมาะกับการแยกสารทั้งที่ละลายน้ำได้ง่ายและละลายน้ำได้ยาก ในขณะที่เทคนิค MEKC เหมาะกับ สารที่ละลายน้ำได้ดีถึงปานกลาง เป็นที่ทราบกันดีว่าพฤติกรรมเคลื่อนที่และการแยกของสารใน MEKC สามารถอธิบายได้โดยใช้หลักการและทฤษฎีของ HPLC และได้มีรายงานการศึกษาเบื้องต้นว่า ทฤษฎีของเทคนิคทาง HPLC และ MEKC สามารถนำมาใช้กับ MEEKC ได้เช่นกัน

ผลงานของกลุ่มวิจัยที่ผ่านมาได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการแยกของสารกลุ่มเทอร์โมอินฮิบิเตอร์ (สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในขมิ้นชัน) โดยใช้เทคนิค MEEKC [Nhujak *et al.*: 2006, Warangkana:

2004] และได้ค้นพบองค์ความรู้ใหม่ว่าสมการการแยกของสารไม่เป็นไปตามสมการที่เคยมีรายงานมาก่อน และสมการของเราที่ได้สอดคล้องกับการทดลอง และสามารถใช้สมการในการอธิบายปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการแยกของสารได้ ในขณะที่สมการที่เคยมีรายงานไว้ให้ค่าการแยกของสารมากกว่าความเป็นจริงหลายเท่า (2 ถึง 10 เท่า ขึ้นอยู่กับภาวะของ MEEKC ที่ใช้) นอกจากนี้ยังประยุกต์เทคนิค MEEKC สำหรับวิเคราะห์ปริมาณแคปไซซินและโคไฮโดรแคปไซซินในตัวอย่างพริก [ปัญหาและคณะ: 2547] และพบว่าปริมาณที่วิเคราะห์ได้สอดคล้องกับเทคนิค HPLC โดยที่ MEEKC มีข้อได้เปรียบเหนือเทคนิค HPLC คือ ไม่ต้องมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยาก ยกเว้นการกรองและการเจือจางสารเท่านั้น ในขณะที่เทคนิค HPLC ต้องมีขั้นตอนการกำจัดสารที่อาจจะติดในคอลัมน์โดยการผ่านขั้นตอน solid phase extraction ซึ่งเสียเวลาและสิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย จากผลงานวิจัยของเราจึงพบว่าพฤติกรรมการรีเทนของสารยังขาดข้อมูลและทฤษฎีที่ใช้ในการอธิบายการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมเคลื่อนที่ของสารที่เป็นฟังก์ชันกับตัวแปรต่างๆ ทั้งนี้เนื่องจากเทคนิค MEEKC เป็นเทคนิคใหม่ดังที่กล่าวมาแล้ว

งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะนำทฤษฎีทาง HPLC และ MEKC มาศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อพฤติกรรมรีเทนชันและประสิทธิภาพในการแยกของสารในเทคนิค MEEKC โดยที่ใช้ค่ารีเทนชันแฟกเตอร์ (retention factor, k) ค่ารีเทนชันอินเดกซ์ (retention index, I) และประสิทธิภาพของการแยกสาร (efficiency, N) มาใช้ในการอธิบาย โดยกลุ่มสารที่สนใจจะเป็นประเภท homologous series ที่มีจำนวนคาร์บอนเพิ่มขึ้นในโมเลกุล โดยที่ในงานวิจัยนี้ใช้สารทดสอบดังสูตรโครงสร้างรูปที่ 1.1 ได้แก่ อัลคิลเบนซีน (alkylbenzenes, BZ) อัลคิลลอริลคีโตน (alkylaryl ketones, PN) อัลคิลเบนโซเอท (alkylbenzoates, BA) และอัลคิลพาราเบน (alkylparabens, PB)



รูปที่ 1.1 โครงสร้างของสาร homologous series ประเภท (a) alkylbenzenes (BZ), (b) alkylbenzoates (BA), (c) alkylparabens (PB) และ (d) alkylaryl ketones (PN); โดยที่ n คือ จำนวนคาร์บอน

1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ที่ผ่านมางานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ MEKC และ MEEKC ที่มีการศึกษาปัจจัยที่มีผลการเปลี่ยนแปลงค่า k และ N เนื่องจากปัจจัยต่างๆ เช่น ความเข้มข้นของ SDS [Altria *et al.*: 2000, Hansen: 2003, Nhujak *et al.*: 2006, Seelanan *et al.*: 2006, Ishihama *et al.*: 1996, Song *et al.*: 1995, Harang *et al.*: 2004, Muijselaar *et al.*: 1994, Siren *et al.*: 2003] อุณหภูมิ [Nhujak *et al.*: 2006, Seelanan *et al.*: 2006, Harang: 2004, Muijselaar *et al.*: 1994, Huang *et al.*: 2003] และศักย์ไฟฟ้าที่ใช้แยกสาร [Terabe *et al.*: 1992, Zhou *et al.*: 1999, Nhujak *et al.*: 2006, Song *et al.*: 1995] โดยใช้สารทดสอบที่มีสูตรโครงสร้างแตกต่างกันไป

ในเทคนิค MEKC [Muijselaar *et al.*: 1994, Quirino *et al.*: 1999] และ MEEKC [Nhujak *et al.*: 2006] พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว (C) เช่น SDS ทำให้ค่า k เพิ่มขึ้น เนื่องจากค่า ϕ เพิ่มขึ้น โดยที่ในเทคนิค MEKC [Muijselaar *et al.*: 1994] พบว่าค่า k และ C มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง โดยมีจุดตัดแกน x เป็นความเข้มข้นของ SDS ที่จุด CMC (critical micellar concentration) ส่วนในระบบของ MEEKC พบว่าความสัมพันธ์ของค่า k กับ C (50-100 mM) มีลักษณะเพิ่มขึ้นคล้ายเป็นเส้นตรง [Song *et al.*: 1995]

สำหรับอุณหภูมิที่ใช้ในการแยกสารมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่า K และ k โดยทั่วไปเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นสารสามารถละลายได้ดีขึ้นในเฟสเคลื่อนที่หรือเอเควีเอสเฟส ดังนั้นค่า K และ k จึงลดลง ในกรณีของเทคนิค MEEKC ได้มีรายงานว่าค่าการเพิ่มอุณหภูมิในการแยกสารมีผลต่อการลดลงของค่า k [Nhujak *et al.*: 2006, Seelanan *et al.*: 2006, Harang *et al.*: 2004]

ในทางทฤษฎีความต่างศักย์ไม่มีผลต่อรีเทนชันแฟกเตอร์ของสาร แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มศักย์ไฟฟ้าอาจส่งผลให้เกิด Joule heating อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรีเทนชันแฟกเตอร์ได้

ในเทคนิค MEKC และ MEEKC ได้มีรายงานว่าค่า k ของสารมีความสัมพันธ์กับ K_{ow} ของสาร โดยที่ K_{ow} เป็นค่าคงที่ของการกระจายตัวของสารระหว่างออกทานอลและน้ำ (octanol-water distribution constant or partition coefficients) [Gong *et al.*: 2004, Klotz *et al.*: 2001, Muijselaar *et al.*: 1994, Gluck *et al.*: 1996, Jia *et al.*: 2003, Poole *et al.*: 2000 และ 2003] ทำให้ทำนาย $\log k$ ของสารที่สนใจได้

ในกรณีของเทคนิค MEKC ได้มีรายงานว่าค่า $\log K_{ow}$ มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงกับ $\log k$ และ $\log k$ มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงกับจำนวนคาร์บอนของสารในกลุ่ม homologous series ประเภทอัลคิลเบนซีน และอัลคิลอริลคีโตน [Muijselaar *et al.*: 1994] แต่ยังไม่พบว่ามีรายงานความสัมพันธ์ดังกล่าวของสาร homologous series หลายนอกกลุ่มในเทคนิค MEEKC นอกจากนี้ภาวะของ MEEKC ที่ใช้เป็นที่ภาวะที่เลือกที่ภาวะเดียว หรือเป็นภาวะ pH ของบัฟเฟอร์ที่ pH 2.0 หรือ 12.0 ซึ่งไม่นิยมใช้ใน CE และยังไม่ปรากฏรายงานความสัมพันธ์ระหว่างค่า k และ N ในลักษณะของสารกลุ่ม homologous series

งานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการหาค่ารีเทนชันอินเดกซ์ของการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MEKC ในภาวะที่มี EOF มากและใช้ BZ หรือ PN เป็นสารมาตรฐานอ้างอิง [Muijselaar *et al.*: 1994] พบว่าค่า I ที่ได้จะไม่เปลี่ยนแปลงตามความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว แต่จะมีค่าเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยตามการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ และค่า I สามารถใช้พิสูจน์ทราบสารที่ไม่มีประจุได้ นอกจากนี้พบว่าค่า I และ $\log K_{ow}$ มีความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรง ในเทคนิค MEKC เมื่อใช้สารลดแรงตึงผิวต่างชนิดกัน ค่า ΔI ที่ได้จากระบบที่ใช้สารลดแรงตึงผิวต่างชนิดกันสามารถใช้อธิบายความจำเพาะของหมู่ฟังก์ชันของระบบไมเซลล์ที่ใช้สารลดแรงตึงผิวต่างชนิดกัน และใช้แบ่งประเภทของ pseudo stationary phase ใน MEKC ได้ ดังอย่างไรก็ตามจนถึงขณะนี้ยังไม่มียานวิจัยที่ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อค่ารีเทนชันอินเดกซ์ของสารในเทคนิค MEEKC

1.3 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เนื่องจากเทคนิค MEEKC เป็นเทคนิคที่สามารถใช้แยกสารทั้งที่ละลายน้ำได้ง่ายและละลายน้ำได้ยาก รวมทั้งเป็นเทคนิคที่สะดวก รวดเร็ว ประหยัด มีขั้นตอนในการเตรียมสารตัวอย่างไม่ยุ่งยาก และเป็นเทคนิคที่ใช้เวลาน้อยในการวิเคราะห์คือตัวอย่าง ซึ่งโดยทั่วไปประกอบด้วย การเจือจางตัวอย่างให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม และกรองตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์เพื่อป้องกันการอุดตันของคอลลัมน์ ดังนั้น จึงทำให้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MEEKC ได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่งในปัจจุบันนี้

ดังอย่างไรก็ตาม เนื่องจากเทคนิค MEEKC เป็นเทคนิคใหม่ ทำให้ผลงานวิจัยส่วนใหญ่ที่ผ่านมาขาดข้อมูลและทฤษฎีที่ใช้ในการอธิบายการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมการรีเทนชันของสาร งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะนำทฤษฎีทาง HPLC และ MEKC มาศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อพฤติกรรมการรีเทนชันของสารในเทคนิค MEEKC โดยที่ใช้ค่ารีเทนชันแฟกเตอร์ (retention factor, k) ค่ารีเทนชันอินเดกซ์ (retention index, I) และประสิทธิภาพของการแยกสาร (efficiency, N) มาใช้ในการอธิบาย เนื่องจากมีงานวิจัยในเทคนิค MEKC ที่รายงานว่าค่า k และ I สามารถใช้ที่ใช้อธิบายพฤติกรรมในการรีเทนชันของสารและสามารถใช้พิสูจน์ทราบสารที่ไม่มีประจุได้ นอกจากนี้ในเทคนิค MEKC พบว่ามีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงระหว่างค่า $\log K_{ow}$ กับ I ทำให้สามารถทำนายความไม่มีขั้วของสารได้ แต่จนถึงขณะนี้ยังไม่มียานวิจัยที่ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อค่ารีเทนชันอินเดกซ์ของสารในเทคนิค MEEKC

งานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะทำการศึกษาเชิงทฤษฎีเพื่อใช้อธิบายที่เกี่ยวกับปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ ความเข้มข้นของ SDS อุณหภูมิ และศักย์ไฟฟ้าที่มีผลต่อรีเทนชันแฟกเตอร์ รีเทนชันอินเดกซ์ และประสิทธิภาพของการแยกสารในเทคนิค MEEKC โดยกลุ่มสารที่สนใจจะเป็นประเภท homologous series ที่มีจำนวนคาร์บอนเพิ่มขึ้นในโมเลกุล ซึ่งค่า k หรือ I มาก แสดงว่าสารชอบ partitioning หรือละลายใน pseudo stationary phase ที่เป็นหยดน้ำมันได้ดี โดยกลุ่มสารที่สนใจจะเป็น

ประเภท homologous series ที่มีจำนวนคาร์บอนเพิ่มขึ้นในโมเลกุล ได้แก่ อัลคิลเบนซีน อัลคิลลอร์โธลีน อัลคิลเบนโซเอท และอัลคิลพาราเบน โดยจะหาความสัมพันธ์ระหว่าง k , I และ N กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ความเข้มข้นของสารลดแรงดึงผิวที่เป็นโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) อุณหภูมิ และศักย์ไฟฟ้า และหาความสัมพันธ์ระหว่าง ค่า k กับ N และ $\log k$ กับจำนวนคาร์บอน จากนั้นจะหาค่า $\log K_{ow}$ ในเทคนิค MEEKC โดยใช้ข้อมูลของค่า k และ I ที่ได้จากการทดลองด้วยเทคนิค MEEKC นอกจากนี้จะทำนายค่า $\log k$ ของสาร โดยใช้สมการที่ได้คิดขึ้นมาใหม่ในงานวิจัยนี้

1.4 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อรีเทนชันแฟกเตอร์ รีเทนชันอินเดก และประสิทธิภาพของการแยกสารกลุ่ม homologous series ในไมโครอิมัลชันอิเล็กโตรโคโนมิคโครมาโทกราฟี
- 2) หาความสัมพันธ์ระหว่างรีเทนชันแฟกเตอร์กับจำนวนคาร์บอนในสารกลุ่ม homologous series รีเทนชันแฟกเตอร์กับประสิทธิภาพของการแยกสาร และรีเทนชันแฟกเตอร์หรือรีเทนชันอินเดกกับค่าคงที่ของการกระจายตัวของสารระหว่างออกทานอลและน้ำ
- 3) ทำนายรีเทนชันแฟกเตอร์ในการแยกสารที่สนใจ โดยใช้สมการที่ได้คิดขึ้นมาใหม่ในงานวิจัยนี้

1.5 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเชิงทฤษฎีที่ใช้อธิบายเกี่ยวกับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ความเข้มข้นของ SDS อุณหภูมิ และศักย์ไฟฟ้า ที่มีผลต่อรีเทนชันแฟกเตอร์ รีเทนชันอินเดก และประสิทธิภาพของการแยกสารในเทคนิค MEEKC โดยใช้สารทดสอบในกลุ่มอัลคิลเบนซีน อัลคิลลอร์โธลีน อัลคิลเบนโซเอท และอัลคิลพาราเบนเป็นสารทดสอบ โดยจะหาความสัมพันธ์ระหว่าง k , I และ N กับปัจจัยต่างๆ และหาความสัมพันธ์ระหว่าง ค่า k กับ N และ $\log k$ กับจำนวนคาร์บอน จากนั้นจะหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่าง $\log K_{ow}$ (จากข้อมูลที่รายงานไว้) กับ $\log k$ และ I ที่ได้จากการทดลองนี้โดยใช้อัลคิลเบนซีนเป็นสารมาตรฐานแล้วเปรียบเทียบกับค่า $\log K_{ow}$ ที่ได้จากการทดลอง และจากข้อมูลที่รายงานไว้ นอกจากนี้จะทำนายค่า $\log k$ ของสาร โดยใช้สมการที่ได้คิดขึ้นมาใหม่ในงานวิจัยนี้

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ทราบปัจจัยที่มีผลต่อรีเทนชันแฟกเตอร์ รีเทนชันอินเดก และประสิทธิภาพของการแยกสารกลุ่ม homologous series ใน MEEKC
- 2) ได้องค์ความรู้ใหม่ว่าทฤษฎีทางด้าน HPLC และ MEKC สามารถนำมาใช้ในการอธิบายรีเทนชันแฟกเตอร์ และประสิทธิภาพของการแยกสาร ได้หรือไม่

- 3) สามารถหาค่าคงที่ของการกระจายตัวของสารระหว่างออกทานอลและน้ำของสารกลุ่ม homologous series โดยอาศัยค่ารีเทนชันแฟคเตอร์ หรือ รีเทนชันอินเดกซ์ที่ได้จาก MEEKC
- 4) สามารถทำนายรีเทนชันแฟคเตอร์ของสารใน MEEKC จากสมการที่ได้คิดขึ้นมาใหม่ในงานวิจัยนี้
- 5) คาดว่าผลงานวิจัยสามารถนำไปใช้ในการพิสูจน์ทราบสารตัวอย่างว่าเป็นสารที่เราสนใจหรือไม่ โดยเทียบกับค่ารีเทนชันแฟคเตอร์ในระบบต่างๆ ของ MEEKC และเป็นแนวทางในการหาภาวะที่เหมาะสมของ MEEKC สำหรับแยกสารที่สนใจได้
- 6) ผลงานวิจัยนี้จะเป็พื้นฐานของงานวิจัยของกลุ่มวิจัยของเราที่จะใช้ในการอธิบายผลของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีผลต่อพฤติกรรมเคลื่อนที่และการแยกของสารในกลุ่มอื่นๆ ต่อไป



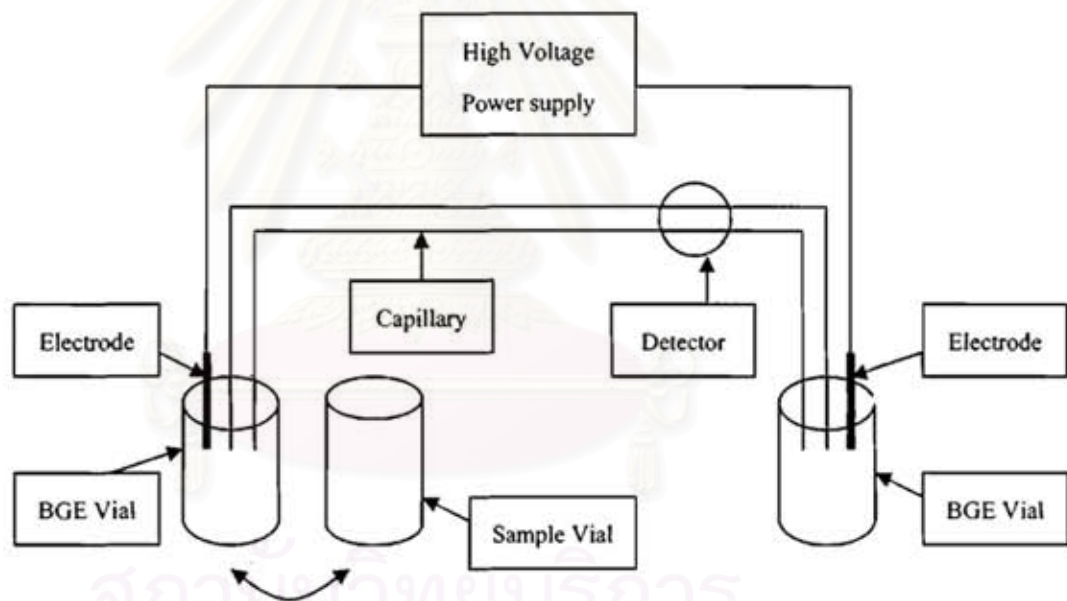
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

ทฤษฎีของกะพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส

กะพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Capillary Electrophoresis, CE) เป็นเทคนิคที่มีการแยกสาร ภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้าในหลอดกะพิลลารีที่บรรจุสารละลายอิเล็กโทรไลต์ หลักการแยกสาร อาศัยความแตกต่างของความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า (electrophoretic mobility, μ) ซึ่ง ขึ้นกับอัตราส่วนระหว่างประจุต่อขนาดของไอออน

2.1 ส่วนประกอบของเครื่อง CE



รูปที่ 2.1 ส่วนประกอบอย่างง่ายของเครื่อง CE: คัดแปลงจาก [Weinberger: 2000]

1) กะพิลลารี (capillary) ที่ใช้ทั่วไปในปัจจุบันเป็น fused silica capillary ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 ถึง 200 μm และยาว 20 ถึง 100 cm ภายนอกของกะพิลลารีเคลือบด้วยพอลิเอไมด์ (polyamide) เพื่อป้องกันการแตกหักของกะพิลลารี และลอกพอลิเอไมด์ออกเฉพาะตรงบริเวณตรวจวัดในกรณีที่ใช้เครื่องตรวจวัดประเภทแสง เช่น UV-Visible

2) สารละลายอิเล็กโทรไลต์ (background electrolyte, BGE) ส่วนใหญ่จะเป็นบัฟเฟอร์ ซึ่งบรรจุอยู่ใน vial ที่มีปลายทั้งสองข้างของกะพิลลารีจุ่มอยู่

i

3. เครื่องกำเนิดศักย์ไฟฟ้า (voltage supply) เครื่องกำเนิดศักย์ไฟฟ้ากระแสตรงที่ให้ค่าต่างศักย์ -30 ถึง +30 kV การแยกสารส่วนใหญ่นิยมใช้ความต่างศักย์ลบที่ อาจให้ศักย์ไฟฟ้าเป็นบวก โดยด้านเครื่องตรวจวัดหรือด้านปลาย (outlet) เป็นขั้วลบ (แคโทด) และด้านที่ฉีดสาร (inlet) เป็นขั้วบวก (แอโนด) ลักษณะนี้เรียกว่า normal polarity หรือสลับขั้วให้ด้านปลายเป็นขั้วบวก (ศักย์ไฟฟ้าเป็นลบ) เรียกว่า reversed polarity

4. ขั้วไฟฟ้า (electrode) ส่วนใหญ่เป็นโลหะแพลทินัม

5. เครื่องตรวจวัด (detector) ในงานวิจัยนี้ใช้เครื่องตรวจวัดเป็น UV-Visible

6. ระบบการบรรจุสารตัวอย่าง (sample injection) มี 2 วิธี คือ การใช้ไฟฟ้า (electrokinetic injection) และการใช้ความดัน (pressure injection) ซึ่งในงานวิจัยนี้จะใช้ความดันในการบรรจุสาร ทำได้โดยอัดความดัน (ใช้แก๊สไนโตรเจนหรือเครื่องอัดความดันอัตโนมัติ) เข้าไปในภาชนะที่บรรจุสาร ตัวอย่างเป็นระยะเวลาหนึ่ง (injection time, t_{inj}) เพื่อบรรจุสารละลายเข้าไปในกะพืดลารี่

2.2 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]

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

z คือ ค่าประจุของสาร

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

η คือ ความหนืดของสารละลาย

r_h คือ รัศมีไฮโดรไดนามิกของไอออน (hydrodynamic radius of ion) ซึ่งเป็นรัศมีของไอออนที่มีโมเลกุลของน้ำล้อมรอบขณะที่ไอออนเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า

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

ปัจจัยที่มีผลต่อค่า μ ได้แก่

1) ความแรงไอออนิก (ionic strength) โดยเมื่อเพิ่มความแรงไอออนิกของ BGE ทำให้ effective charge (z) ลดลง และมี r_h เพิ่มขึ้น (โดย r_h จะเป็นผลรวมของไอออนของสารตัวอย่างและ counter ion) ดังนั้นค่า μ จะลดลง

2) ความหนืดและอุณหภูมิ จากสมการที่ 2.1 ค่า μ จะแปรผกผันกับความหนืด ดังนั้นเมื่อเพิ่มความหนืดของ BGE จะทำให้ค่า μ ของสารลดลง ส่วนการเพิ่มอุณหภูมิจะทำให้ความหนืดของ BGE ลดลง ดังนั้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นค่า μ จะเพิ่มขึ้น

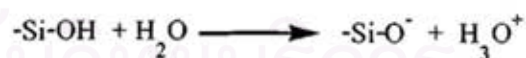
3) pH ของ BGE สำหรับสารตัวอย่างที่เป็นกรดอ่อนหรือเบสอ่อน ค่า pH ของ BGE จะมีผลต่อดีกรีการแตกตัวของสาร (the degree of dissociation, α) โดยค่า μ จะแปรผันตามค่า α

4) ตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) โดยทั่วไปเมื่อเติมตัวทำละลายอินทรีย์เพิ่มขึ้นจะทำให้ค่า μ ลดลง แล้วเมื่อเติมตัวทำละลายอินทรีย์เพิ่มจนถึงปริมาณหนึ่งค่า μ จะเพิ่มขึ้นได้

จากสมการที่ 2.1 จะเห็นว่าค่า μ ไม่ขึ้นกับขนาดของกะพิลลารี (d) และความเข้มศักย์ไฟฟ้า (E) แต่ในทางปฏิบัติ การเพิ่ม d และ E ทำให้ค่า μ เพิ่มขึ้น เนื่องจากผลของการเพิ่ม Joule Heating

2.3 อิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmosis)

ผิวด้านในของกะพิลลารีประกอบด้วยหมู่ซิลานอล (-Si-OH) เมื่อสัมผัสกับสารละลายอิเล็กโทรไลต์หรือบัฟเฟอร์ที่มี $\text{pH} > 2$ จะเกิดการไอออไนซ์ขึ้น ทำให้ผิวด้านในของกะพิลลารีมีประจุลบ (-Si-O⁻) ดังสมการ



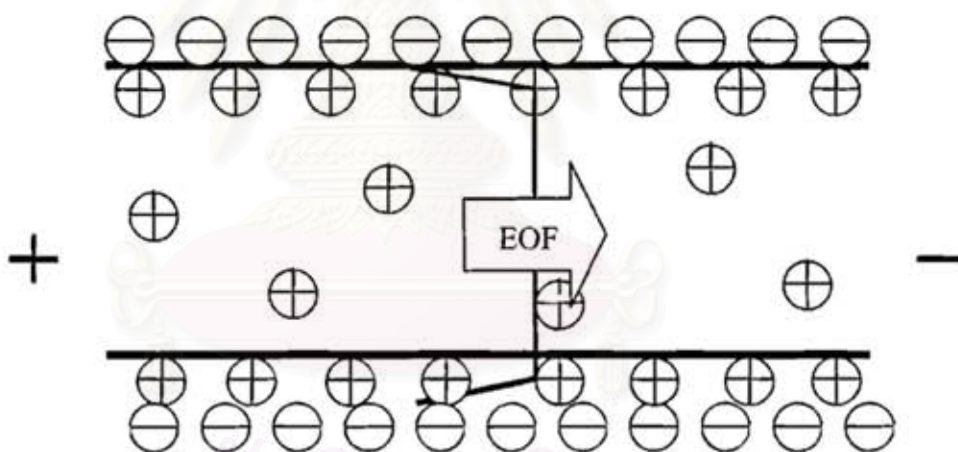
การไอออไนซ์ดังกล่าวทำให้เกิด H^+ กระจายอยู่ในสารละลายหรือรวมกับ OH^- เกิดเป็นโมเลกุลของน้ำ แคทไอออนจากสารละลายอิเล็กโทรไลต์ในกะพิลลารีจะเกิดเป็น double electric layer ขึ้นดังรูปที่ 2.2 โดยมีปริมาณแคทไอออนในสารละลายมากกว่าแอนไอออนจำนวนมาก แคทไอออนบางส่วนจะติดอยู่ที่ผิวของกะพิลลารี เกิดเป็น stern layer ซึ่งจะไม่เคลื่อนที่เนื่องจากอิทธิพลของไฟฟ้าสถิต (electrostatic force) และ/หรือ แรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der Waals force) แคทไอออนบางส่วนจะกระจายอยู่ในสารละลาย เรียกว่า diffusion layer และไอออนบวกที่เหลือจะอยู่ใน bulk solution เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าที่ปลายทั้งสองข้างของกะพิลลารี (โดยปลายด้านเครื่องตรวจวัดเป็นขั้วแคโทดหรือขั้วลบ) ไอออนบวกในสารละลาย ซึ่งมีจำนวนมากกว่าไอออนลบจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วลบด้วย หรืออาจกล่าวได้ว่าเกิดการเคลื่อนที่ของสารละลาย เรียกปรากฏการณ์ของการเคลื่อนที่ของน้ำหรือสารละลายนี้ว่า

อิเล็กโทรออสโมซิส(electroosmosis) และเรียกการเคลื่อนที่ของน้ำหรือตัวทำละลายว่า electroosmotic flow (EOF)

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

ความเร็วของอิเล็กโทรออสโมซิสในความเข้มสนามไฟฟ้า 1 V m^{-1} เรียกว่า ความสามารถในการเคลื่อนที่ของอิเล็กโทรออสโมซิสหรือสัมประสิทธิ์ของอิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmotic mobility หรือ electroosmotic coefficient, μ_{∞}) แสดงดังสมการที่ 2.2

$$\mu_{\infty} = \frac{v_{\text{eof}}}{E} = \frac{-\epsilon \zeta}{4\pi\eta} \quad (2.2)$$



รูปที่ 2.2 Electroosmotic flow (EOF) : คัดแปลงจาก [Landers: 1997]



รูปที่ 2.3 ลักษณะการไหลของสารและรูปร่างของพีกใน CE : คัดแปลงจาก [Li: 1992]

ปัจจัยที่มีผลต่อค่า EOF ได้แก่

1) pH ของ BGE ถ้ามีการลด pH ของ BGE จะทำให้การไอออนไนซ์ของหมู่ซิลานอล บริเวณผิวคะพิลลารีลดลง มีผลทำให้ค่า EOF ลดลง

2) ความแรงไอออนิกของ BGE ถ้าเพิ่มความแรงไอออนิกจะทำให้ค่า EOF ลดลง แต่ถ้าเพิ่มความแรงไอออนิกมากๆ อาจทำให้ค่า EOF เพิ่มขึ้น เนื่องจากผลของ Joule heating

นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆ เช่น ความหนืด อุณหภูมิ ตัวทำละลายอินทรีย์ ขนาดของคะพิลลารี และความเข้มของสนามไฟฟ้า ก็มีผลต่อค่า EOF เช่นเดียวกับค่า μ

2.4 ประเภทของเทคนิค CE

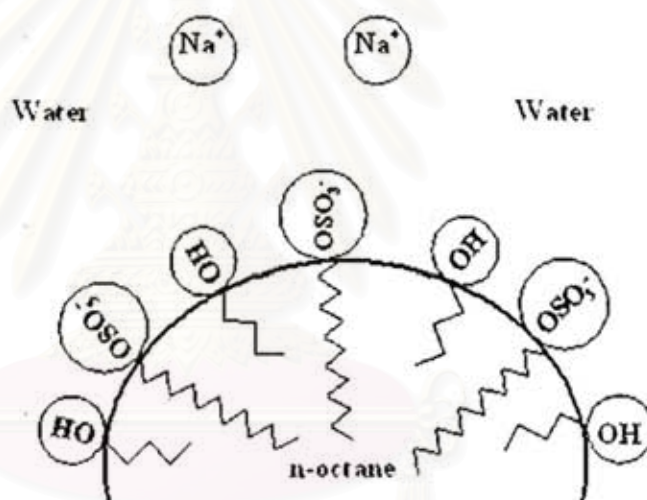
เทคนิค CE แบ่งออกได้เป็น 6 ประเภท ตามกลไกของการแยกสาร

- 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 Isotachopheresis (CITP)

งานวิจัยนี้จะเกี่ยวข้องกับเทคนิค MEEKC เป็นเทคนิคที่มีหลักการเหมือนกับเทคนิค MEKC โดยเทคนิค MEKC จะมีการเติมสารลดแรงดึงผิว (surfactant) ลงไปใน BGE เพื่อให้สารลดแรงดึงผิวรวมตัวกันเป็นไมเซลล์ (micelle) และทำหน้าที่เป็น pseudo stationary phase ซึ่งคล้ายกับ stationary phase ใน HPLC แต่ว่าไมเซลล์เคลื่อนที่ได้

สำหรับเทคนิค MEEKC ใน BGE ประกอบด้วยหยดน้ำมัน, สารลดแรงดึงผิวและสารลดแรงดึงผิวร่วม (co-surfactant) โดยสารลดแรงดึงผิวและสารลดแรงดึงผิวร่วมจะไปล้อมรอบหยดน้ำมัน

(ดังรูปที่ 2.4) ลักษณะนี้เรียกว่า ไมโครอิมัลชัน (microemulsion) ซึ่งมีขนาดเป็นนาโนเมตรและทำให้กระจายอยู่ในบัฟเฟอร์ได้ ในเทคนิค MEEKC หยคน้ำมันที่ล้อมรอบด้วยสารลดแรงดึงผิวที่มีประจุ (charged oil phase) ทำหน้าที่เป็น pseudo stationary phase เช่นเดียวกับไมเซลล์ของเทคนิค MEKC แต่ที่เฟสของหยคน้ำมันที่มีประจุในเทคนิค MEEKC จะมีความคงตัวของฝั่วน้อยกว่าไมเซลล์ในเทคนิค MEKC ทำให้สารที่ละลายน้ำได้น้อยสามารถเข้าไปอยู่ในเฟสของหยคน้ำมัน ได้ง่ายกว่าในไมเซลล์ของเทคนิค MEKC สำหรับการแยกสารด้วยเทคนิค MEEKC จะใช้หลักของอิเล็กโทรโฟรีซิสรวมกับโครมาโทกราฟี โดยที่กลไกการแยกขึ้นอยู่กับความแตกต่างของ μ ของสารและการเกิด partitioning ของสารระหว่างเฟสของหยคน้ำมันที่มีประจุ และเอควิวสเฟส (aqueous phase) ดังนั้นเทคนิค MEEKC จึงเหมาะสำหรับใช้แยกสารที่ละลายน้ำได้น้อยจนถึงสารที่ละลายน้ำได้ดี ทั้งที่มีประจุและไม่มีประจุ

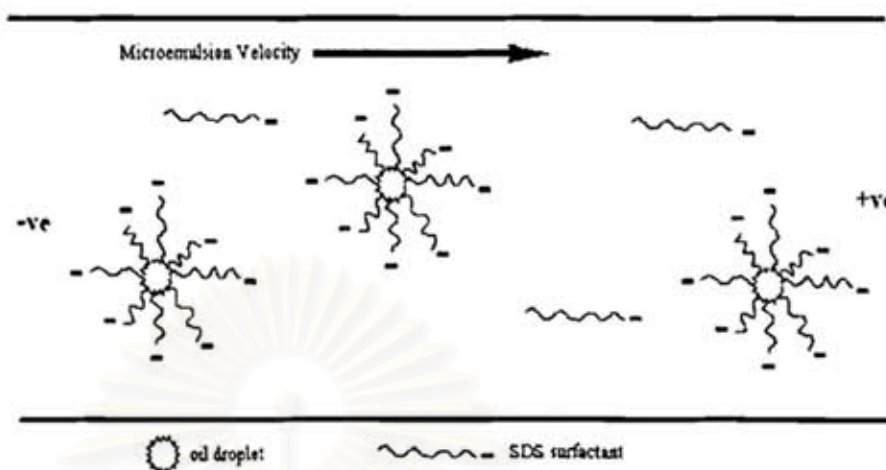


รูปที่ 2.4 หยคน้ำมันที่มีสารลดแรงดึงผิวและสารลดแรงดึงผิวร่วมมาล้อมรอบ: คัดแปลงจาก

[Altria: 2000]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.5 การเคลื่อนที่ของสารในเทคนิค MEEKC ที่ภาวะเป็นกรด



รูปที่ 2.5 ลักษณะการเคลื่อนที่ของสารในเทคนิค Microemulsion electrokinetic chromatography โดยใช้เฟสเฟอร์ภาวะที่เป็นกรด : คัดแปลงจาก [Altria: 2000]

เมื่อผิวแก้วด้านในของกะพิลลารีสัมผัสกับบัฟเฟอร์ pH 2.5 จะเกิดการแตกตัวของหมู่ซิลานอลน้อยมาก จึงคิดว่าที่ภาวะนี้จะไม่มี EOF ดังนั้นจึงมีแค่การเคลื่อนที่ของหยดน้ำมันที่ล้อมรอบด้วยสารลดแรงดึงผิวที่มีประจุเป็นลบเท่านั้น เมื่อมีการให้ศักย์ไฟฟ้าโดยให้ปลายด้านเครื่องตรวจวัดเป็นขั้วบวก เฟสหยดน้ำมันซึ่งมีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปยังด้านปลายของเครื่องตรวจวัด ดังรูปที่ 2.5 สำหรับกรณีที่เป็นกรดการแยกสารที่ไม่มีประจุ กลไกการแยกสารขึ้นอยู่กับ partitioning ของสารระหว่างเฟสหยดน้ำมันซึ่งมีประจุและเอควิวสเฟส โดยสารที่ละลายน้ำได้น้อยจะชอบเข้าไปอยู่ในเฟสหยดน้ำมันซึ่งมีประจุมากกว่าในเอควิวสเฟส ทำให้เคลื่อนที่ไปพร้อมกับเฟสหยดน้ำมันซึ่งมีประจุไปยังด้านเครื่องตรวจวัดก่อนสารที่ละลายน้ำได้มาก ซึ่งจะ partitioning ออกมาอยู่ในเอควิวสเฟสมากกว่า ดังนั้นที่ภาวะนี้สารที่ละลายน้ำได้น้อยจะเคลื่อนที่ออกมาก่อนสารที่ละลายน้ำได้มาก

เมื่อสารตัวอย่างเคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัดจะแสดงผล (คล้ายกับโครมาโทแกรม) เรียกว่า อิเล็กโทรฟีโรแกรม (electropherogram) และระยะเวลาที่สารสามารถเคลื่อนที่จากปลายกะพิลลารีด้านบรรจุสารจนถึงเครื่องตรวจวัด เรียกว่า ไมเกรชันไทม์ (migration time, t_m) ในกรณีที่เป็น MEKC และ MEEKC อาจเรียกเป็นรีเทนชันไทม์ (retention time, t_R) ในทางปฏิบัติเมื่อทราบค่า t_m ของสาร จะสามารถคำนวณค่า electrophoretic mobility ของ oil phase (μ_{mc}) จากพิกของ microemulsion marker และ observed electrophoretic mobility (μ_{obs}) ของสารดังกล่าว

$$\mu_{mc} = \frac{v_{mc}}{E} = \frac{IL}{t_{mc}V} \quad \text{และ} \quad \mu_{obs} = \frac{v}{E} = \frac{IL}{t_R V} \quad (2.3)$$

t_{mc} คือ ไมเกรชันไทม์ (migration time) หรือรีเทนชันไทม์ (retention time) ของ microemulsion marker

l คือ ความยาวจากปลายคะพิลลารีด้านที่บรรจุสารจนถึงเครื่องตรวจวัด (m)

L คือ ความยาวทั้งหมดของคะพิลลารี (m)

V คือ ศักย์ไฟฟ้า (V)

สำหรับเทคนิค MEEKC มีกลไกการเกิด partitioning ของสารตัวอย่างระหว่างเฟสหยดน้ำมันที่มีประจุและเอควิวสเฟส อธิบายได้ดังสมการที่ 2.4

$$C_{aq} \longleftrightarrow C_{mc} \quad K = \frac{C_{mc}}{C_{aq}} \quad (2.4)$$

C_{mc} คือ ความเข้มข้นของสารตัวอย่างในเฟสหยดน้ำมันที่มีประจุ

C_{aq} คือ ความเข้มข้นของสารตัวอย่างในเอควิวสเฟส

K คือ ค่าคงที่ของการกระจาย (distribution constant) ของสารในสองเฟส

สำหรับรีเทนชันแฟกเตอร์ หรือค่า k ใน MEEKC หมายถึง อัตราส่วนจำนวน โมลของสารในเฟสหยดน้ำมันที่มีประจุ (n_{mc}) ต่อจำนวน โมลของสารในเอควิวสเฟส (n_{aq}) ดังสมการที่ 2.5

$$k = \frac{n_{mc}}{n_{aq}} = \frac{C_{mc}V_{mc}}{C_{aq}V_{aq}} = K \phi \quad (2.5)$$

V_{mc} คือ ปริมาตรของหยดน้ำมันที่มีประจุ

V_{aq} คือ ปริมาตรของเอควิวสเฟส

ϕ คือ อัตราส่วนปริมาตรของเฟสหยดน้ำมันที่มีประจุต่อปริมาตรของเอควิวสเฟส

ในกรณีที่สารตัวอย่างเป็นสารที่ไม่มีประจุและสารลดแรงดึงผิวมีประจุลบ จะได้ว่า μ ของ complex ระหว่างเฟสหยดน้ำมันที่มีประจุและสารตัวอย่างเท่ากับ μ ของเฟสหยดน้ำมันที่มีประจุ (μ_{mc}) ดังนั้น observed electrophoretic mobility (μ) ของสารตัวอย่าง A ดังสมการ

$$\mu = x_{aq} \mu_A + x_{me} \mu_{me} \quad (2.6)$$

x_{aq} คือ เศษส่วนจำนวน โมลของสารตัวอย่างในเอควิวสเฟส

x_{me} คือ เศษส่วนจำนวน โมลของสารตัวอย่างในเฟสหยดน้ำมันที่มีประจุ

และในกรณีที่สารไม่มีประจุ มี $\mu_A = 0$ ดังนั้น

$$\mu = x_{me} \mu_{me} = \frac{n_{me}}{n_{aq} + n_{me}} \mu_{me} \quad (2.7)$$

จากสมการที่ 2.5 และ 2.7 จะได้ว่าสำหรับภาวะที่ไม่มี EOF

$$\mu = \frac{k}{1+k} \mu_{me} \quad (2.8)$$

$$k = \frac{\mu}{\mu_{me} - \mu} \quad (2.9)$$

ดังนั้น $k = \frac{t_{me}}{t_R - t_{me}}$ หรือ $k = \frac{1}{\frac{t_R}{t_{me}} - 1}$ (2.10)

และรีเทนชัน ไทม์ของสารที่ไม่มีประจุในเทคนิค MEEKC มีค่าดังสมการ

$$t_R = \left(\frac{1+k}{k} \right) t_{me} \quad (2.11)$$

2.6 ประสิทธิภาพของการแยกสาร

สำหรับเทคนิค CE ค่าประสิทธิภาพของการแยกสาร (efficiency หรือ theoretical plates, N) คำนวณได้จาก

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 \quad (2.12)$$

เมื่อ w เป็นความกว้างของฐานพีกของสาร

N นิยามให้เป็นอัตราส่วนของความยาวของกะพืดลาร์ถึงเครื่องตรวจวัด (l) ต่อ ความสูงของเพลตเชิงทฤษฎี (total theoretical plates height, H) ซึ่งเกิดจากผลรวมของความสูงของเพลตเชิงทฤษฎีที่เกิดการกระจายตัวจากปัจจัยแต่ละชนิด ลักษณะเดียวกับในเทคนิค MEKC ดังสมการ

$$H = H_l + H_{mc} + H_{aq} + H_t + H_{pd} \quad (2.13)$$

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 จะมีค่ามากขึ้นเมื่อสารมีรีเทนชัน ไทม์มากขึ้นและมีสัมประสิทธิ์การแพร่กระจายสูง ค่า H_{aq} และ H_{pd} จะมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวเพิ่มมากขึ้น และ H_t เพิ่มขึ้นเนื่องจากการที่ Joule heating เพิ่มขึ้น โดยการเพิ่มความเข้มข้นของ BGE, อุณหภูมิและศักย์ไฟฟ้า สำหรับเทคนิค MEEKC ก็จะอธิบายได้ในลักษณะเดียวกันกับเทคนิค MEKC ดังนั้นถ้าความสูงของเพลตเชิงทฤษฎีมีค่าน้อย ประสิทธิภาพการแยกของสารก็จะมากขึ้น

2.7 รีเทนชันอินเดกซ์

ค่ารีเทนชันอินเดกซ์ (retention index, I) เป็นค่าที่ใช้อธิบายพฤติกรรมในการรีเทนของสาร โดยค่า I เป็นตัวเลขที่คำนวณได้จากความสัมพันธ์ระหว่างค่า adjusted retention time หรือ retention time (โดยปกตินิยมใช้ค่าลอการิทึม) ของสารเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากสารมาตรฐานสองชนิดที่เคลื่อนที่ออกมาก่อนและหลังสารนั้น ซึ่งคำนวณได้ดังสมการ [Muijselaar *et al.*: 1994]

$$I = 100z + 100 \frac{\log k_A - \log k_z}{\log k_{z+1} - \log k_z} \quad (2.14)$$

เมื่อ k_z และ k_{z+1} คือ ค่า k ของ homologous series ที่มีจำนวนคาร์บอน z และ $z+1$ ตามลำดับ และค่า k_A เป็นค่า k ของสารทดสอบ

หรือ

$$I = 100z + 100 \frac{\log\left(\frac{t_{mc}}{t_{m,\lambda} - t_{mc}}\right) - \log\left(\frac{t_{mc}}{t_z - t_{mc}}\right)}{\log\left(\frac{t_{mc}}{t_{z+1} - t_{mc}}\right) - \log\left(\frac{t_{mc}}{t_z - t_{mc}}\right)} \quad (2.15)$$

ซึ่งสมการของ Martin ค่า I ของ homologous series มีค่าเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มจำนวนของหมู่เมทิลีน และความสัมพันธ์ระหว่าง $\log k$ และ z มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงดังสมการ [Muijselaar *et al.*: 1994]

$$\log k = az + b \quad (2.16)$$

เมื่อ a และ b เป็นค่าความชันและจุดตัดแกน y ตามลำดับ ดังนั้นจากสมการที่ 2.14 และ 2.16 จึงสามารถคำนวณค่า I ได้ดังสมการ [Muijselaar *et al.*: 1994]

$$I = \frac{100(\log k - b)}{a} \quad (2.17)$$

2.8 ค่าคงที่ของการกระจายตัวของสารระหว่างออกทานอลและน้ำ

ค่าคงที่ของการกระจายตัวของสารระหว่างออกทานอลและน้ำของสาร (octanol-water distribution constant, K_{ow}) ในเทคนิค MEKC และ MEEKC มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงกับค่า $\log k$ หรือ I ของสาร ดังสมการ [Gong *et al.*: 2004, Klotz *et al.*: 2001, Muijselaar *et al.*: 1994 และ 1997, Ishihama *et al.*: 1995]

$$\log K_{ow} = c \log k + d \quad (2.18)$$

$$\log K_{ow} = eI + f \quad (2.19)$$

เมื่อ c กับ e คือความชัน และ d กับ f คือจุดตัดแกน y ตามลำดับ ดังนั้นถ้าทราบค่า c กับ d หรือ e กับ f จากสมการที่ 2.18 หรือ 2.19 ตามลำดับ โดยใช้สารมาตรฐานอ้างอิงที่ทราบค่า $\log K_{ow}$ และหาค่า k และ I ของสารจากการทดลอง จะทำให้ทราบค่า $\log K_{ow}$ ของสารที่สนใจได้ โดยที่ค่า c กับ d หรือ e กับ f จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับภาวะของ MEEKC ที่ใช้

บทที่ 3

การทดลอง

3.1 เครื่องมือ

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

3.2 สารเคมีและอุปกรณ์

- 1) อัลคิลเบนซีน (BZ) ได้แก่ benzene (BZ6), methylbenzene (BZ7), ethylbenzene (BZ8) และ propylbenzene (BZ9) ของบริษัท Fluka
- 2) อัลคิลลอริติโตน (PN) ได้แก่ acetophenone (PN8), propiophenone (PN9), butyrophenone (PN10) และ valerophenone (PN11) ของบริษัท Fluka
- 3) อัลคิลเบนโซเอท (BA) ได้แก่ methylbenzoate (BA8), ethylbenzoate (BA9), propylbenzoate (BA10) และ butylbenzoate (BA11) ของบริษัท Sigma-Aldrich
- 4) อัลคิลพาราเบน (PB) ได้แก่ methylparaben (PB8), ethylparaben (PB9), propylparaben (PB10) และ butylparaben (PB11) ของบริษัท Sigma-Aldrich
- 5) โคเด็กซิลเบนซีน (DB) ของบริษัท Sigma-Aldrich
- 6) *n*-ออกเทน ของบริษัท Fluka
- 7) โซเดียมโคเด็กซิลซัลเฟต (SDS) ของบริษัท Sigma
- 8) 1-บิวทานอล ของบริษัท Fluka
- 9) กรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) ของบริษัท Merck
- 10) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Fluka
- 11) เอทานอล ของบริษัท Merck
- 12) 45 μ m membrane filter
- 13) น้ำ Milli Q

3.3 การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง CE

3.3.1 ภาวะของ CE สำหรับการทดลอง

ภาวะของ CE ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ดังต่อไปนี้ คือ (ในกรณีที่แตกต่างไปจากนี้จะระบุ)

เครื่อง CE	: Beckman รุ่น MDQ
กะพิลลารี	: 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 190-600 nm และตรวจวัดที่ 214 nm
Capillary rinse	: ก่อนการทดลองแต่ละวัน ล้างภายในกะพิลลารีด้วยเอทานอล, 0.1 M โซเดียมไฮดรอกไซด์และน้ำอย่างละ 5 นาที และไมโครอิมัลชันบัฟเฟอร์ 15 นาที และก่อนการวิเคราะห์แต่ละครั้งล้างด้วยเอทานอล, 0.1 M โซเดียมไฮดรอกไซด์และน้ำอย่างละ 2 นาที และไมโครอิมัลชัน 3 นาที
อุณหภูมิของกะพิลลารี	: 25°C
ศักย์ไฟฟ้า	: -15 kV
BGE	: 50 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 2.5 ที่ประกอบด้วย SDS, 1-บิวทานอล และ <i>n</i> -ออกเทน

3.3.2 การเตรียมไมโครอิมัลชันบัฟเฟอร์

- 500 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 2.5 โดยการปีเปิดกรดฟอสฟอริกปริมาณที่เหมาะสม ใส่ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำประมาศ 90 ml ปรับสารละลายกรดให้มี pH 2.5 ด้วย 1.0 NaOH จากนั้นถ่ายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 ml แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วยน้ำ Milli Q

- เตรียมไมโครอิมัลชันบัฟเฟอร์โดยปีเปิด 500 mM SDS และ 500 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 2.5 ปริมาตรที่เหมาะสมลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 ml จากนั้นปีเปิด 1-บิวทานอล และ *n*-ออกเทนปริมาตรที่เหมาะสมลงในขวดวัดปริมาตรเดียวกัน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli Q หลังจากนั้นนำไป sonicate ประมาณ 30 นาที แล้วกรองไมโครอิมัลชันบัฟเฟอร์ผ่าน 0.45 μm membrane filter ก่อนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MEEKC

3.3.3 การเตรียมสารทดสอบ

เตรียมสารทดสอบเป็นชุด โดยแต่ละชุดเป็นสารผสมของสาร homologous series เดียวกันร่วมกับ DB โดยเตรียมสารทดสอบแต่ละ homologous series และ DB ความเข้มข้น 0.2 mM โดยปีเปิดมาจากสารทดสอบและ microemulsion marker (DB) ที่มีความเข้มข้น 10 mM ในเอทานอล แล้วปรับปริมาตรด้วยไมโครอิมัลชันที่ประกอบด้วย 180 mM SDS, 890 mM 1-บิวทานอล และ 1.1% v/v

n-ออกเทนที่ไม่มีฟอสเฟตบัฟเฟอร์ หลังจากนั้นนำไป กรองผ่าน 0.45 μm membrane filter ก่อนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MEEKC

3.4 ภาวะที่ใช้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อรีเทนชันแฟกเตอร์ รีเทนชันอินเดกและประสิทธิภาพของการแยกสารกลุ่ม homologous series ของ MEEKC

3.4.1 ความเที่ยงของค่า *k* และ *I*

เตรียมไมโครอิมัลชันบัฟเฟอร์จำนวน 5 ชุด ที่ประกอบด้วย 50 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 2.5, 180 mM SDS, 890 mM 1-บิวทานอล และ 1.0 % v/v *n*-ออกเทน แล้วใช้เป็น BGE สำหรับวิเคราะห์สารด้วย CE โดยใช้ภาวะอื่นของ CE ในหัวข้อ 3.3.1 โดย BGE แต่ละชุดทำการวิเคราะห์ด้วย MEEKC จำนวน 2 ครั้ง ผลการทดลองที่ได้ดังหัวข้อ 4.1

3.4.2 ผลของความเข้มข้นของ SDS

เตรียมไมโครอิมัลชันบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 50 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 2.5, 890 mM 1-บิวทานอล, 1.0 % v/v *n*-ออกเทน และ SDS ความเข้มข้นตั้งแต่ 100 ถึง 200 mM แล้วใช้เป็น BGE สำหรับวิเคราะห์สารด้วย CE โดยใช้ภาวะอื่นของ CE ในหัวข้อ 3.3.1 ผลการทดลองที่ได้ดังหัวข้อ 4.2

3.4.3 ผลของอุณหภูมิ

เตรียมไมโครอิมัลชันบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 50 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 2.5, 180 mM SDS, 890 mM 1-บิวทานอล และ 1.0 % v/v *n*-ออกเทน ใช้เป็น BGE สำหรับวิเคราะห์สารด้วย CE โดยใช้ภาวะอื่นของ CE ในหัวข้อ 3.3.1 แต่ใช้อุณหภูมิตั้งแต่ 15 ถึง 40 °C ผลการทดลองที่ได้ดังหัวข้อ 4.3

3.4.4 ผลของศักย์ไฟฟ้า

เตรียมไมโครอิมัลชันบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 50 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 2.5, 180 mM SDS, 890 mM 1-บิวทานอล, และ 1.0 % v/v *n*-ออกเทน ใช้เป็น BGE สำหรับวิเคราะห์สารด้วย CE โดยใช้ภาวะอื่นของ CE ในหัวข้อ 3.3 แต่ใช้ศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ -15 ถึง -20 kV ผลการทดลองที่ได้ดังหัวข้อ 4.4

3.5 การหาค่าคงที่การกระจายของสารระหว่างออกทานอลและน้ำ

เตรียมไมโครอิมัลชันบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 50 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 2.5, 890 mM 1-บิวทานอล, 1.0% v/v *n*-ออกเทน และ SDS ความเข้มข้นตั้งแต่ 100 ถึง 200 mM แล้วใช้เป็น BGE สำหรับวิเคราะห์สารด้วย CE โดยใช้ภาวะอื่นของ CE ในหัวข้อ 3.3.1 ผลการทดลองที่ได้ดังหัวข้อ 4.5

3.6 การทำนายค่ารีเทนชันแฟกเตอร์ของ homologous series

เตรียมไมโครอิมัลชันบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 50 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 2.5, 890 mM 1-บิวทานอล, 1.0% v/v *n*-ออกเทน และ SDS ความเข้มข้น 130 และ 190 mM แล้วใช้เป็น BGE สำหรับวิเคราะห์สารด้วย CE โดยใช้ภาวะอื่นของ CE ในหัวข้อ 3.3.1 ผลการทดลองที่ได้ดังหัวข้อ 4.6



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ความเที่ยงของค่า k และ I

ได้ทำการทดลองหาความเที่ยงของ k และ I ของ homologous series ใน MEEKC โดยใช้ไมโครอิมัลชันบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 50 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 2.5, 1.0 % v/v n -ออกเทน (หยคน้ำมัน), 180 mM SDS (สารลดแรงตึงผิว) และ 890 mM 1-บิวทานอล (สารลดแรงตึงผิวร่วม) โดยมีวิธีทดลองเพื่อหาความเที่ยงของ k และ I ของ homologous series ของการวิเคราะห์สารภายในวันเดียวกัน (intraday precision) และต่างวันกัน (interday precision) แบ่งออกเป็น 4 แบบดังนี้

แบบที่ 1) หาความเที่ยงของการวิเคราะห์สารภายในวันเดียวกัน โดยใช้บัฟเฟอร์ชุดเดียวกัน และทำการวิเคราะห์สารทดสอบซ้ำ 5 ครั้ง ($n = 5$)

แบบที่ 2) หาความเที่ยงของการวิเคราะห์สารภายในวันเดียวกัน โดยใช้บัฟเฟอร์ต่างชุดกัน จำนวน 5 ชุด และแต่ละชุดทำการวิเคราะห์สารทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง ($n = 10$)

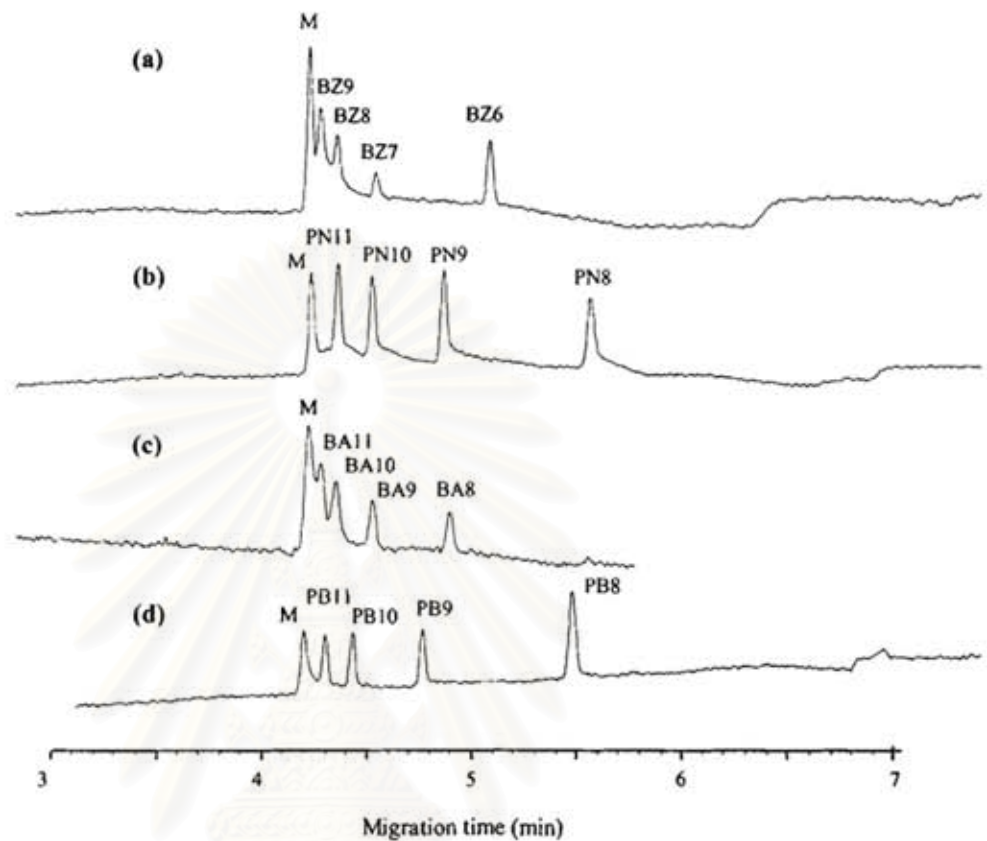
แบบที่ 3) หาความเที่ยงของการวิเคราะห์สารต่างวันกันจำนวน 5 วัน โดยใช้บัฟเฟอร์ชุดเดียวกัน และแต่ละวันทำการวิเคราะห์สารทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง ($n = 10$)

แบบที่ 4) หาความเที่ยงของการวิเคราะห์สารต่างวันกันจำนวน 5 วัน โดยใช้บัฟเฟอร์ต่างชุดกัน (เตรียมบัฟเฟอร์วันละ 1 ชุด) และแต่ละวันทำการวิเคราะห์สารทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง ($n = 10$)

ตัวอย่างอิเล็กโทรฟีโรแกรมแสดงในรูปที่ 4.1 โดยที่โดเดซิลเบนซีน (dodecylbenzene, DB) เป็น microemulsion marker เนื่องจาก DB เป็นสารที่ไม่มีขั้วมากจึง partitioning เข้าไปในเฟสหยคน้ำมันที่มีประจุได้คิมากจึงเคลื่อนที่พร้อมกับหยคน้ำมันได้ นอกจากนี้ในการทดลองได้ใช้บัฟเฟอร์ที่ pH 2.5 ซึ่งในภาวะของบัฟเฟอร์ที่เป็นกรดนี้การแตกตัวของหมู่ซิลานอลที่ผิวคะทิลลารีจะเกิดขึ้นน้อยมากทำให้ EOF ที่เกิดขึ้นน้อยมากเมื่อเทียบกับค่า μ ของสาร ดังนั้นจึงคิดได้ว่าที่ภาวะนี้ไม่มี EOF เกิดขึ้น ในการทดลองนี้ได้แยกวิเคราะห์สารในแต่ละกลุ่มของ homologous series เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาของการซ้อนทับกันของพีกสารที่มีค่า k ใกล้เคียงกันซึ่งทำให้ยากในการระบุชนิดของสารและค่าโมเรชัน

ค่า k และ I ของสารมาตรฐาน (BZ) และสารทดสอบ (PN, BA และ PB) จากการทดลองหาได้จากอิเล็กโทรฟีโรแกรมและคำนวณโดยใช้สมการที่ 2.10 สำหรับหาค่า k และสมการที่ 2.17 สำหรับหาค่า I โดยที่ใช้ BZ เป็นสารมาตรฐานอ้างอิงสำหรับการหาค่า I ซึ่งผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.1 เมื่อพิจารณาค่า k ของ BZ ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน พบว่าค่าความชัน (a) และค่าจุดตัดแกน y (b) ของสมการ $\log k = az + b$ สำหรับ homologous series ของ BZ ที่ใช้บัฟเฟอร์ชุดเดียวกันและต่างชุด

กัน ที่วิเคราะห์สารภายในวันเดียวกันและต่างวันกันมีค่าไม่แตกต่างกันมากนักและเมื่อใช้การประเมินผลทางสถิติ พบว่าค่า a และ b ที่ได้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตาราง ผ1 ถึง ผ4 ในภาคผนวก ก) แสดงให้เห็นว่ามีความเที่ยงสูงของค่า k ของ BZ ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบระหว่างค่า I ของ BZ ที่ได้จากการคำนวณ (จากการวิเคราะห์สารภายในวันเดียวกันและต่างวันกัน หรือโดยใช้บัพเฟอร์ชุดเดียวกันและต่างชุดกัน) และค่า nominal values ของค่า I ของ BZ (มีค่า 600, 700, 800 และ 900 สำหรับ BZ6, BZ7, BZ8 และ BZ9 ตามลำดับ) โดยใช้การประเมินผลทางสถิติ พบว่าค่า I ของ BZ ที่ได้จากการคำนวณและค่า nominal values ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตาราง ผ5 ถึง ผ8 ในภาคผนวก ก) ซึ่งชี้ให้เห็นถึงความแม่นยำสูงของค่า k ของ BZ ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน เมื่อพิจารณาค่า k และ I ของสารทดสอบ (PN, BA และ PB) พบว่าค่าส่วนเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ (relative standard deviation, RSD) ของค่า k และ I ของสารทดสอบจากการใช้บัพเฟอร์ชุดเดียวกันและต่างชุดกันและทำการวิเคราะห์สารภายในวันเดียวกันมีค่าต่างกันเพียงเล็กน้อย ในขณะที่ RSD ของ k และ I ของสารทดสอบจากการใช้บัพเฟอร์ชุดเดียวกันและต่างชุดกัน และทำการวิเคราะห์สารต่างวันกัน มีค่ามากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ การวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน การที่ RSD ของ k และ I ของสารทดสอบจากการวิเคราะห์สารต่างวันกัน มีค่ามาก อาจเนื่องมาจากสมบัติทางเคมีของพื้นผิวอะทิลลารีในแต่ละวันแตกต่างกัน มีผลทำให้ EOF และค่า k ที่คำนวณได้เปลี่ยนไป [Ntujak *et al.*: 2006] แต่อย่างไรก็ตามเมื่อใช้การประเมินผลทางสถิติ พบว่าค่า \bar{k} และ \bar{I} ของสารทดสอบจากการวิเคราะห์สารภายในวันเดียวกันและต่างวันกัน หรือ บัพเฟอร์ชุดเดียวกันและต่างชุดกัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตาราง ผ9 ถึง ผ16 ในภาคผนวก ก) นอกจากนี้ความเที่ยงของค่า k และ I ในงานวิจัยนี้ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ด้วย MEEKC ในภาวะที่ไม่มี EOF จะมีความเที่ยงอยู่ในช่วงเดียวกัน ในขณะที่งานวิจัยที่ผ่าน มามีการวิเคราะห์ด้วย MEEKC ในภาวะที่มี EOF มาก จะมีค่าความเที่ยงที่ต่ำกว่า [Ishihama *et al.*: 1995] ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในงานวิจัยนี้ใช้ออกเทนเป็นหยคน้ำมัน ส่วนงานวิจัยที่ผ่านมาใช้เฮปเทน เป็นหยคน้ำมันซึ่งจะระเหยได้ง่ายกว่าและไมโครอิมัลชันที่ได้มีความเสถียรน้อยกว่า



รูปที่ 4.1 อิเล็กโทรฟีโรแกรมของ homologous series (a) BZ, (b) PN, (c) BA และ (d) PB ใน MEEKC ภาวะที่กำจัด EOF: ไมโครอิมัลชันบัฟเฟอร์ประกอบด้วย 50 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 2.5, 180 mM SDS, 1.0 %v/v *n*-ออกเทนและ 890 mM 1-บิวทานอล, และภาวะอื่นๆ ของ CE คือ คัพลลารี ขนาด 50 μm i.d. \times 40.2 cm (30 cm ถึงเครื่องตรวจวัด), อุณหภูมิของคอลัมน์ 25 $^{\circ}\text{C}$, ศักย์ไฟฟ้า -15 kV, บรรจุสารด้วยการอัดความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 3 s ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 214 nm; M = microemulsion marker (DB)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.1 Intraday และ interday precision ของค่า k และ I ของ homologous series ใน MEEKC โดยใช้ 180 mM SDS และ ภาวะอื่นๆ ดังรูปที่ 4.1

	% RSD และค่าเฉลี่ยของ k				% RSD และค่าเฉลี่ยของ I			
	ตัวอย่างชุดเดียวกัน		ตัวอย่างต่างชุดกัน		ตัวอย่างชุดเดียวกัน		ตัวอย่างต่างชุดกัน	
	intraday ^a	interday ^b	intraday ^c	interday ^b	intraday ^a	interday ^b	intraday ^c	interday ^b
สารมาตรฐาน								
BZ6	0.5 (6.05)	2.0 (5.84)	0.8 (6.04)	1.6 (6.02)	0.1 (600)	0.1 (599)	0.1 (601)	0.3 (599)
BZ7	0.5 (15.66)	1.3 (15.59)	1.5 (15.32)	3.4 (15.91)	0.1 (702)	0.2 (703)	0.2 (701)	0.2 (703)
BZ8	0.9 (38.42)	1.6 (38.04)	1.7 (37.20)	3.8 (38.78)	0.1 (798)	0.2 (798)	0.1 (797)	0.2 (798)
BZ9	0.8 (100.08)	0.9 (99.05)	1.0 (99.07)	1.0 (99.90)	0.1 (901)	0.1 (900)	0.1 (902)	0.2 (900)
สารทดสอบ								
PN8	0.2 (3.35)	1.6 (3.30)	1.5 (3.36)	2.4 (3.37)	0.1 (536)	0.3 (538)	0.3 (537)	0.8 (536)
PN9	0.8 (7.18)	1.9 (7.19)	1.1 (7.18)	1.3 (7.14)	0.2 (618)	0.5 (621)	0.2 (619)	0.6 (617)
PN10	0.9 (15.31)	2.4 (15.58)	1.3 (15.42)	1.1 (15.29)	0.2 (699)	0.4 (703)	0.2 (702)	0.4 (699)
PN11	0.7 (34.79)	1.4 (34.84)	1.3 (34.87)	0.8 (34.54)	0.1 (787)	0.2 (789)	0.2 (790)	0.3 (786)
BA8	0.3 (7.97)	2.9 (7.82)	0.7 (7.93)	2.0 (7.83)	0.1 (629)	0.6 (630)	0.1 (630)	0.7 (627)
BA9	0.2 (17.93)	2.0 (17.61)	1.0 (17.31)	1.7 (17.48)	0.1 (716)	0.3 (716)	0.1 (714)	0.5 (713)
BA10	0.8 (40.58)	1.5 (40.68)	1.3 (39.99)	1.8 (40.26)	0.1 (804)	0.3 (805)	0.2 (804)	0.4 (803)
BA11	0.3 (88.55)	0.5 (88.61)	0.8 (88.93)	0.7 (89.06)	0.1 (888)	0.1 (888)	0.2 (890)	0.2 (888)
PB8	0.5 (3.97)	1.5 (3.90)	1.4 (3.94)	2.2 (3.93)	0.1 (554)	0.4 (556)	0.3 (555)	0.8 (553)
PB9	0.6(8.85)	2.7(8.67)	1.4(8.86)	2.3(8.75)	0.1(640)	0.5(641)	0.2(642)	0.7(639)
PB10	0.5(21.46)	2.3(21.70)	1.5 (21.69)	1.5(21.53)	0.1(736)	0.4(738)	0.2(738)	0.4(735)
PB11	0.4(51.42)	1.7(52.08)	0.8 (51.31)	0.7 (51.45)	0.1(829)	0.3(832)	0.1(831)	0.4(829)

ค่าเฉลี่ยอยู่ในวงเล็บ, homologous series ของอัลคิลเบนซีน (BZ6, BZ7, BZ8 และ BZ9) ใช้เป็นสารมาตรฐานอ้างอิงสำหรับการหาค่า I . ^aค่าจากการวิเคราะห์ซ้ำ 5 ครั้ง ($n = 5$), ^bค่าจากการวิเคราะห์ 5 วันและวันละ 2 ครั้ง ($n = 10$) และ ^cค่าจากการวิเคราะห์ 5 ชุดและชุดละ 2 ครั้ง ($n = 10$), ผลการประเมินทางสถิติแสดงในตาราง ผ1 ถึง

4.2 ผลของความเข้มข้นของ SDS

ได้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของ SDS ([SDS]) ตั้งแต่ 100 ถึง 200 mM ที่มีต่อค่า k , I และ N ของ homologous series ใน MEEKC ในภาวะที่กำจัด EOF โดยใช้บัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย ความเข้มข้นของ SDS ตั้งแต่ 100 ถึง 200 mM ในไมโครอิมัลชันบัฟเฟอร์และใช้ช่องประกอบอื่น ๆ และภาวะของ CE ดังรูปที่ 4.1 โดยที่ความเข้มข้นของ SDS ต่ำกว่า 100 mM จะได้พิทกว้างและให้ความเที่ยงต่ำในการวัดค่าไมเกรชันทั้งนี้เนื่องจากไมโครอิมัลชันที่ได้ไม่เสถียร [Nhujak *et al.*: 2006]

จากรูปที่ 4.2a ได้รับความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงระหว่างค่า k และ [SDS] โดยที่ค่า $r^2 > 0.99$ ยกเว้นสำหรับ BZ8, BZ9, BA11 และ PB8 ที่มี ค่า $r^2 \sim 0.98$ ซึ่งใน MEKC [Muijselaar *et al.*: 1994] ค่า k เพิ่มขึ้นเชิงเส้นตรงกับ [SDS] ดังสมการ $k = K\phi = K\bar{v}([SDS] - cmc)$ เมื่อ K คือค่าคงที่ของการกระจาย (distribution constant) ของสารระหว่าง pseudo stationary phase และเอควิวสเฟส, ϕ คือ phase ratio ซึ่งเป็นอัตราส่วนของปริมาตรไมเซลลาร์เฟสและเอควิวสเฟส, \bar{v} คือ ปริมาตรต่อโมลของไมเซลล์ (partial molar volume of the micelles) และ cmc คือ critical micellar concentration อย่างไรก็ตามยังไม่มีการพิสูจน์ว่าสมการดังกล่าวนี้นำมาใช้อธิบายได้ใน MEEKC เนื่องจากค่า \bar{v} และ cmc ใน MEEKC ยากที่จะคำนวณ โดยมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่สมมติว่าค่า \bar{v} และ cmc ใน MEEKC มีค่าเท่ากับใน MEKC เมื่อใช้ความเข้มข้นของ SDS และ 1-บิวทานอลเท่ากัน อย่างไรก็ตามจากงานวิจัยที่ผ่านมาก็ได้ความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงระหว่างค่า k และ [SDS] ใน MEEKC [Ishihama *et al.*: 1995, Nhujak *et al.*: 2006] ทั้งนี้ค่า k เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่ม [SDS] เนื่องจาก ϕ เพิ่มขึ้น สารจึง partitioning เข้าไปใน pseudo stationary phase นานขึ้น

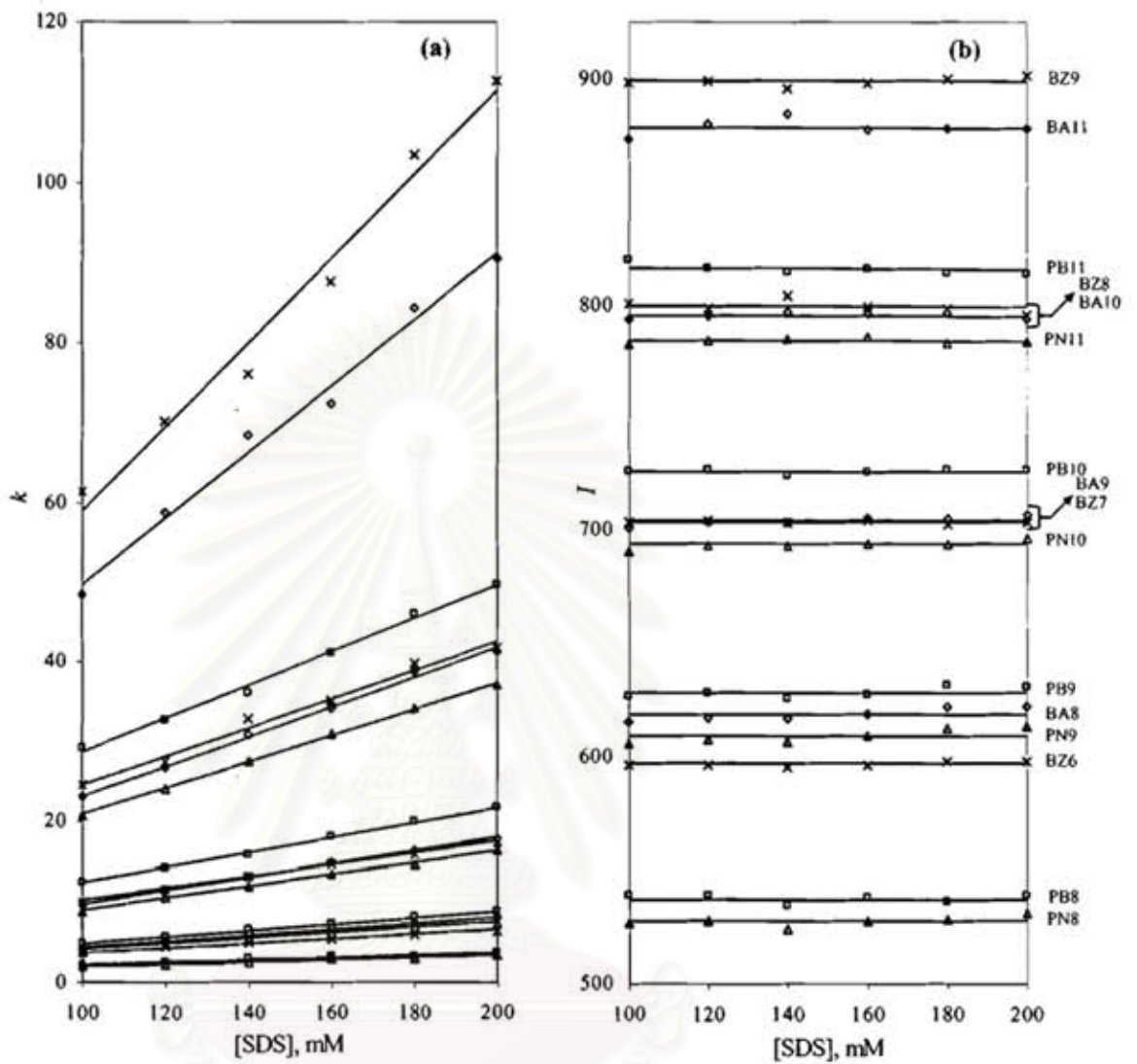
เมื่อใช้ BZ เป็นสารมาตรฐานสามารถคำนวณหาค่า I ของ homologous series ได้ (ดังสมการที่ 2.17) (แสดงเป็นสัญลักษณ์ดังรูปที่ 4.2b) ซึ่งพบว่าค่า I ของ BZ ที่คำนวณได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ความเข้มข้นของ SDS ตั้งแต่ 100 ถึง 200 mM มีความสอดคล้องกับค่า nominal values โดยที่ค่า $|\Delta I| < 0.7\%$ เมื่อใช้การประเมินผลทางสถิติ พบว่าค่าความชันของสมการเส้นตรง I กับ [SDS] และค่าศูนย์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตาราง ๘17 ในภาคผนวก ก) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าค่า I ของสารแต่ละชนิดไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของ SDS ดังนั้นในรูปที่ 4.2b จึงแสดงเป็นค่าเฉลี่ยของ I ของสารแต่ละชนิด (เส้นทึบ) ที่ความเข้มข้นของ SDS ตั้งแต่ 100 ถึง 200 mM (RSD < 0.5%) จากงานวิจัยก่อนหน้านี้เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MEKC ในภาวะที่มี EOF มากและใช้ BZ เป็นสารมาตรฐานพบว่าค่า I จะไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของ SDS เช่นกัน [Muijselaar *et al.*: 1994]

จากตารางที่ 4.2 เมื่อใช้ความเข้มข้นของ SDS ตั้งแต่ 100 ถึง 200 mM ในไมโครอิมัลชันบัฟเฟอร์และที่ [SDS] ใดๆ ได้รับความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงระหว่างค่า $\log k$ และ z ของสารแต่ละ homologous series ตามสมการของ Martin (สมการที่ 2.16) [Muijselaar *et al.*: 1994] เนื่องจากการเพิ่มความยาวของสายโซ่คาร์บอนของสาร ทำให้สารมีความเป็นไฮโดรโฟบิก (hydrophobicity) มาก

ขึ้น ดังนั้นสารจึง partitioning เข้าไปในหยดน้ำมันได้ดีทำให้ค่า $\log k$ เพิ่มขึ้น ที่ [SDS] ต่างกันในช่วง 100 ถึง 200 mM ความชันที่ได้จากกราฟของสารใน homologous series เดียวกัน (ดังในตารางที่ 4.2) มีค่าที่ไม่แตกต่างกันมากนัก (RSD < 1.5%) แสดงว่าความเข้มข้นของ SDS ไม่ได้เปลี่ยนแปลง methylene selectivity (α_{CH_2}) ของสารใน homologous series โดยที่ค่า $\log \alpha_{CH_2} = a$ เมื่อ a เป็นความชันของกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\log k$ และ z ของ homologous series [Mertzman *et al.*: 2005] เมื่อพิจารณาสารที่มีค่า z เท่ากันแต่อยู่ต่างกลุ่ม homologous series พบว่าค่า $\log \alpha_{CH_2}$ ที่ได้มีลำดับดังนี้ BZ > PB > BA > PN การที่ค่า $\log \alpha_{CH_2}$ ลดลงอาจเนื่องมาจากหมู่ฟังก์ชันที่มีขั้วของสารแตกต่างกันในแต่ละ homologous series

เมื่อใช้ค่าเฉลี่ยของความชัน (\bar{a}) ที่ได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\log k$ และ z จะได้ค่าจุดตัดแกน y ที่ปรับค่าแล้ว (b') ซึ่ง b' มีค่าเพิ่มขึ้นเชิงเส้นตรงกับการเพิ่มความเข้มข้นของ SDS (แสดงดังในตารางที่ 4.2) ผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ [Muijselaar *et al.*: 1994] ที่ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MEKC ในภาวะที่มี EOF มาก โดยพบว่าความชันของสมการ $\log k = az + b$ สำหรับ BZ มีค่าค่อนข้างคงที่ ในขณะที่จุดตัดแกน y จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ SDS

จากอิเล็กทรอนิกส์โปรแกรมและสมการที่ 2.12 สามารถหาค่า N ของสารได้ 10 ชนิด คือ BZ6, BZ7, PN8, PN9, PN10, BA8, BA9, PB8, PB9 และ PB10 สำหรับสารอื่นไม่สามารถหาค่า N ได้อย่างถูกต้อง เนื่องจากเกิดการซ้อนทับกันระหว่างพีกสารกับ DB จากผลของความเข้มข้นของ SDS ค่า N ที่แสดงดังรูปที่ 4.3 พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ SDS ในช่วง 100 ถึง 200 mM ทำให้ค่า N เพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจาก N แปรผกผันกับ H (ดังที่กล่าวในหัวข้อที่ 2.6) และการเพิ่มความเข้มข้นของ SDS จะไปลด H_{∞} ซึ่งสอดคล้องกับที่ได้รายงานไว้ในการศึกษาด้วยเทคนิค MEKC และ MEEKC ในภาวะที่มี EOF มาก [Terabe *et al.*: 1989 และ 1992] นอกจากนี้การเพิ่มความเข้มข้นของ SDS จะไปลด H_1 ด้วย (เนื่องจากรีเทนชันไทม์ลดลง) อย่างไรก็ตามการเพิ่มความเข้มข้นของ SDS อาจทำให้ค่า H_1 เพิ่มขึ้นเนื่องจากการเพิ่ม Joule heating แต่จากผลการทดลองนี้แสดงว่าผลของ H_1 มีน้อยกว่าการเพิ่ม H_{∞} และ H_1 และเมื่อเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า N และ k ที่ความเข้มข้นของ SDS คงที่ แสดงดังในรูปที่ 4.4 พบว่าสารที่เป็น homologous ซูลเลียวกันโดยส่วนมากมีค่า N แตกต่างกันไม่มากนักแต่สำหรับสารที่เป็น homologous ต่างจุดกันจะมีค่า N แตกต่างกันซึ่งยังไม่อาจสรุปได้แน่ชัดว่าเป็นเพราะเหตุใดเพราะมีหลายปัจจัยที่มีผลต่อค่า N ดังที่กล่าวมาแล้วในหัวข้อที่ 2.6



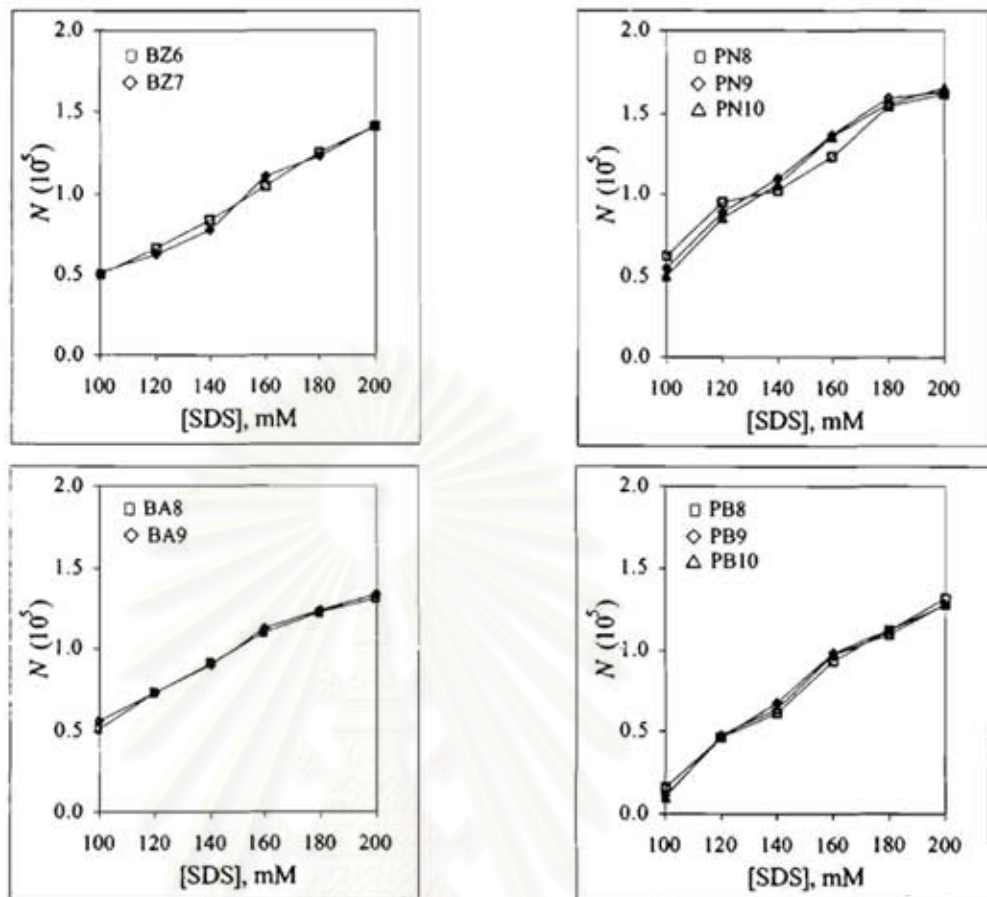
รูปที่ 4.2 ผลของความเข้มข้น SDS ต่อ (a) รีเทนชันแฟกเตอร์ และ (b) รีเทนชันอินเดกซ์ของ homologous series: ภาวะอื่นๆ ของ CE แสดงดังรูปที่ 4.1 สัญลักษณ์ \times , Δ , \diamond และ \square แสดงถึง homologous series ของ BZ, PN, BA และ PB ตามลำดับ เส้นตรงสำหรับ k คือ linear fit และเส้นตรงสำหรับ I คือ ค่าเฉลี่ยเมื่อใช้ SDS ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 100 ถึง 200 mM: ค่าความชัน (a) และจุดตัดแกน y (b) ของความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง $\log k = az + b$ ของรูป 4.2a แสดงดังในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างค่า $\log k$ และ z ของ homologous series ใน MEEKC เมื่อใช้ความเข้มข้นของ SDS ตั้งแต่ 100 ถึง 200 mM (กราฟในรูป 4.2a)

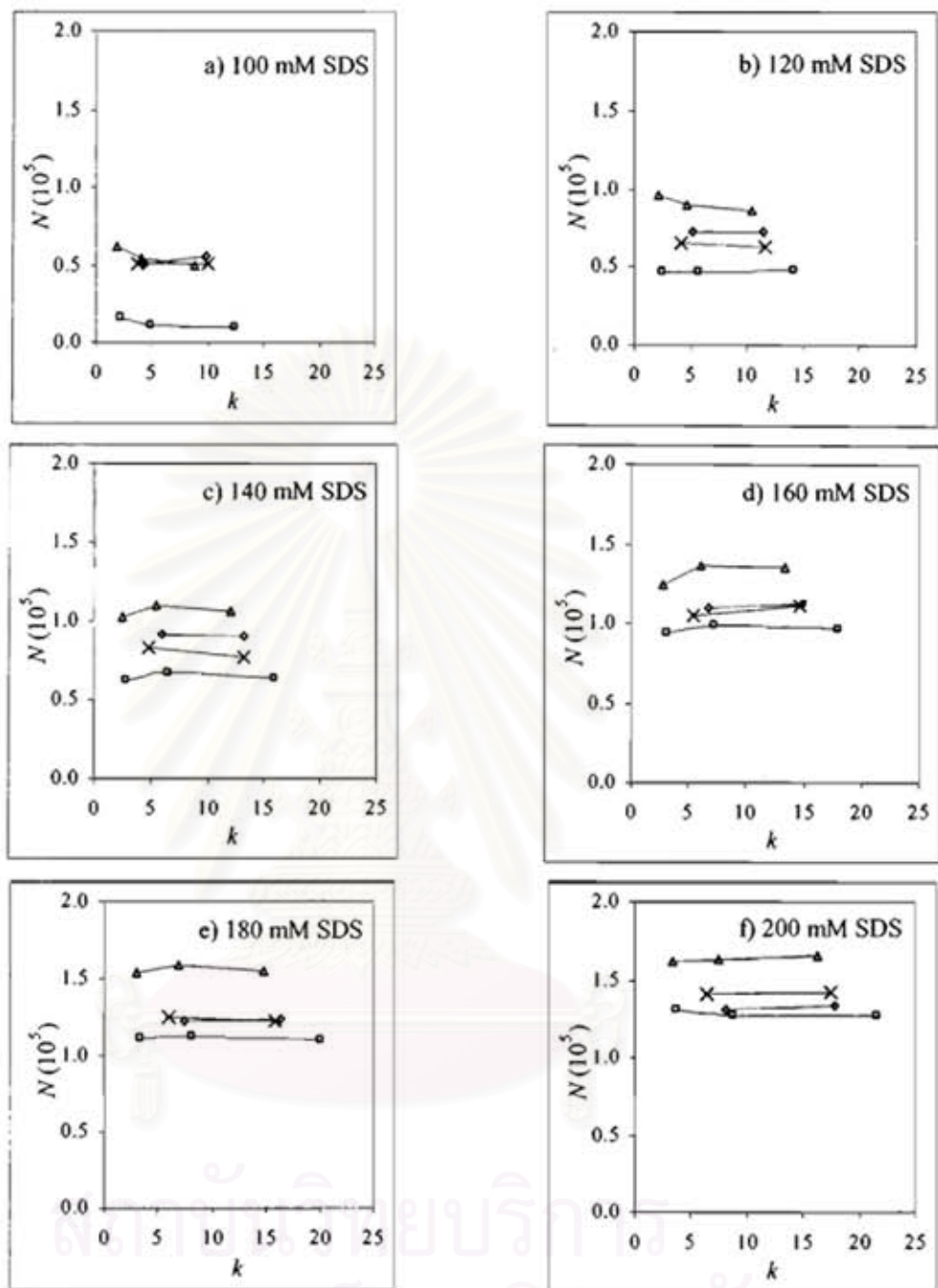
[SDS], mM	$\log k = az+b$	BZ	PN	BA	PB
100	a	0.405	0.345	0.350	0.381
	b	-1.847	-2.491	-2.151	-2.728
	r^2	0.9994	0.9989	0.9995	0.9995
	b'	-1.843	-2.488	-2.164	-2.686
120	a	0.402	0.344	0.353	0.375
	b	-1.768	-2.406	-2.112	-2.604
	r^2	0.9993	0.9993	0.9997	0.9996
	b'	-1.784	-2.420	-2.092	-2.626
140	a	0.396	0.344	0.354	0.372
	b	-1.664	-2.352	-2.059	-2.527
	r^2	0.9987	0.9996	0.9998	0.9997
	b'	-1.726	-2.361	-2.028	-2.575
160	a	0.399	0.343	0.346	0.373
	b	-1.642	-2.292	-1.935	-2.482
	r^2	0.9994	0.9994	0.9996	0.9996
	b'	-1.681	-2.309	-1.987	-2.523
180	a	0.412	0.348	0.354	0.383
	b	-1.696	-2.304	-1.961	-2.542
	r^2	0.9998	0.9997	0.9995	0.9995
	b'	-1.633	-2.272	-1.934	-2.485
200	a	0.410	0.346	0.351	0.379
	b	-1.647	-2.241	-1.896	-2.464
	r^2	0.9993	0.9998	0.9999	0.9997
	b'	-1.599	-2.231	-1.901	-2.447
\bar{a}		0.404±0.006	0.345±0.002	0.351±0.003	0.377±0.004
b'		0.00245[SDS]- 2.079 $r^2 = 0.9920$	0.00254[SDS]- 2.728 $r^2 = 0.9866$	0.00261[SDS]- 2.410 $r^2 = 0.9845$	0.00239[SDS]- 2.915 $r^2 = 0.9920$

\bar{a} คือ ค่าเฉลี่ยของความชันที่ได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\log k$ และ z เมื่อใช้ความเข้มข้นของ SDS ตั้งแต่ 100 ถึง 200 mM, ส่วน b' คือ ค่าจุดตัดแกน y ที่ปรับค่าแล้วซึ่งได้จากกราฟเส้นตรงระหว่าง $\log k$ และ z โดยให้ \bar{a} มีค่าคงที่

ศูนย์บริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ SDS กับ N : เมื่อใช้ไมโครอิมัลชันบัพเฟอร์ที่มีความเข้มข้นของ SDS ตั้งแต่ 100 ถึง 200 mM และภาวะอื่นๆ ของ CE แสดงดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.4 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง N กับ k ที่ความเข้มข้นของ SDS คงที่: ภาวะอื่นๆ ของ CE แสดงดังรูปที่ 4.1 ใช้ข้อมูลของค่า N จากรูปที่ 4.3, \times (BZ6, BZ7), \triangle (PN8, PN9, PN10), \diamond (BA8, BA9), \square (PB8, PB9, PB10) และสำหรับ homologous series ชุดเดียวกัน ค่า k เพิ่มขึ้นตามจำนวนคาร์บอน

4.3 ผลของอุณหภูมิ

ได้ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิตั้งแต่ 15 ถึง 40 °C (298 ถึง 313 K) ค่อกำหนดค่า k , I และ N ของ homologous series ใน MEEKC โดยใช้บัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 50 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 2.5, 1.0 % v/v *n*-ออกเทน, 180 mM SDS และ 890 mM 1-บิวทานอล ที่แต่ละอุณหภูมิได้ใช้กระแสคงที่ที่ 95 μ A เพื่อลดผลที่เกิดจาก Joule heating ที่มากเกินไป [Muijselaar *et al.*: 1994] โดยมีกำลังไฟฟ้าต่ำกว่า 1.5 วัตต์ ที่อุณหภูมิสูงกว่า 25 °C ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.5 พบว่าการเพิ่มอุณหภูมิทำให้ค่า k ของสารลดลงอย่างเป็นเส้นตรง โดยที่ค่า $r^2 > 0.96$ (รูปที่ 4.5a) ซึ่งสอดคล้องกับสมการ van't Hoff [Muijselaar *et al.*: 1994] โดยที่ $\ln K$ และ $\ln k$ มีความสัมพันธ์กับ $1/T$ ดังสมการ

$$\ln K = \frac{-\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} \quad (4.2)$$

$$\ln k = \frac{-\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} + \ln \phi \quad (4.3)$$

เมื่อ ΔH^0 และ ΔS^0 คือ เอนทาลปีและเอนโทรปีที่สภาวะมาตรฐาน ตามลำดับ R คือ ค่าคงที่ของแก๊ส

ค่า ϕ ใน MEEKC ขากที่จะคำนวณดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MEEKC ในภาวะที่มี EOF สูง โดยใช้โคเดคออกซิลาร์บอนิลวาไลน์ (dodecoxycarbonylvaline, DDCV) เป็นสารลดแรงตึงผิว, เอทิลอะซิเตท (ethylacetate) เป็นหยคน้ำมัน และ 1-บิวทานอลเป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของ DDCV เป็น 1% การเพิ่ม $1/T$ ทำให้ค่า K เพิ่มขึ้นเชิงเส้นตรง ในขณะที่เมื่อใช้ความเข้มข้นของ DDCV เป็น 4% ได้ความสัมพันธ์ที่ไม่เป็นเส้นตรงระหว่าง ค่า K และ $1/T$ ซึ่งอธิบายได้ว่า DDCV 4% เป็นการใส่สารลดแรงตึงผิวที่มีความเข้มข้นสูงและทำให้ค่า ϕ มีค่ามาก การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจึงส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่า ϕ และรูปร่างของไมโครอิมัลชันได้มาก [Mertzman *et al.*: 2005] ดังนั้นความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงระหว่าง $\ln k$ และ $1/T$ ในงานวิจัยนี้ (ดังรูปที่ 4.5b) อาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยหรือไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงค่า ϕ ใน MEEKC ซึ่งให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับงานวิจัยของกลุ่มเราก่อนหน้านี้ที่ทำการศึกษากับเคอร์คูมินอยด์และอะเวอรัมกับเทคนิค MEEKC ในภาวะที่กำจัด EOF [Seelanan *et al.*: 2006, Nhujak *et al.*: 2006]

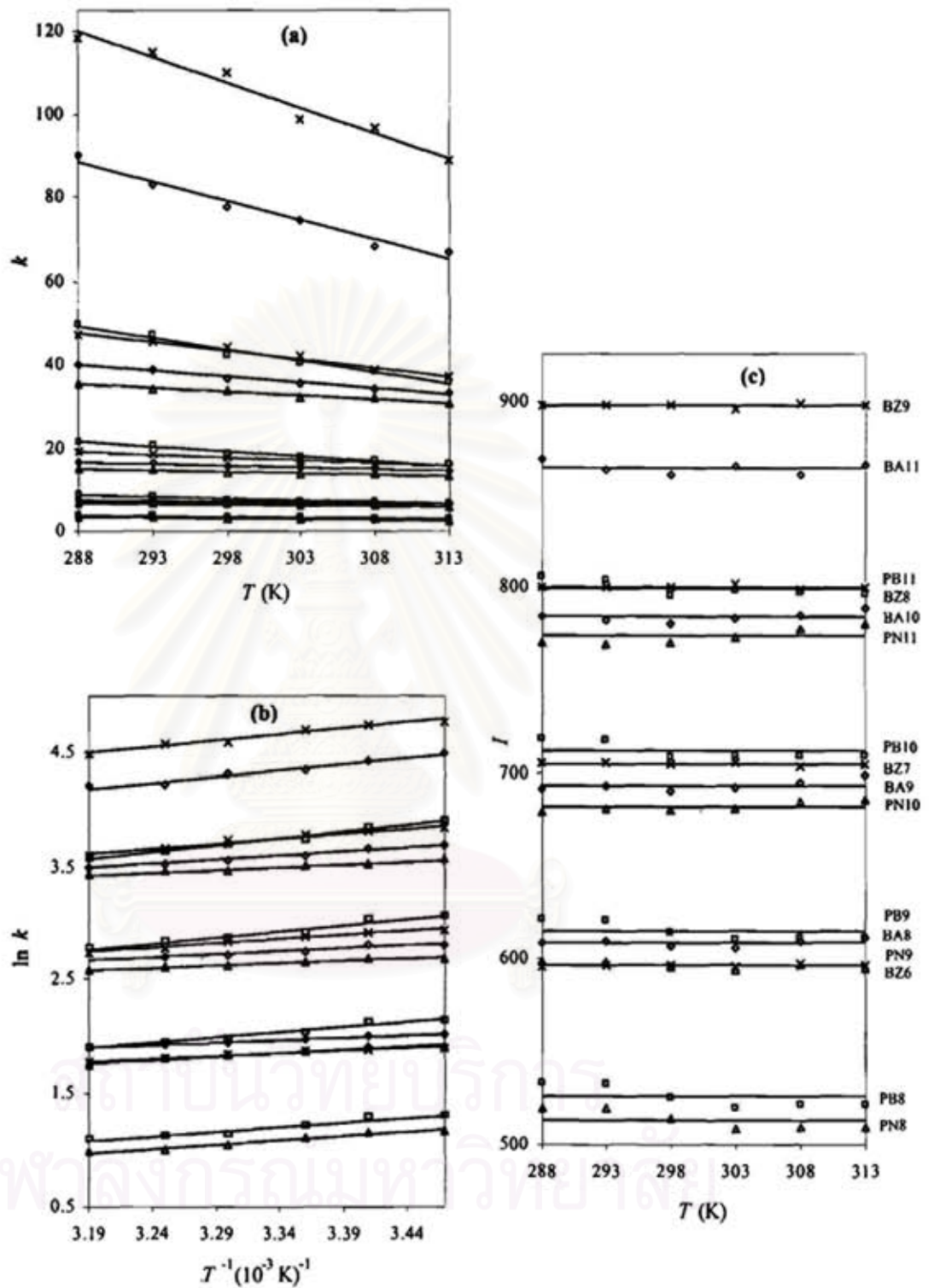
นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาค่า $\ln k$ ของ BZ ใน MEEKC โดยใช้อุณหภูมิตั้งแต่ 15 ถึง 40 °C และใช้กำลังไฟฟ้าคงที่เป็น 1.5 วัตต์ พบว่าที่อุณหภูมิสูงกว่า 25 °C และกำลังไฟฟ้าคงที่เป็น 1.5 วัตต์ ได้ค่า $\ln k$ มากกว่าเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กระแสไฟฟ้าคงที่เป็น 95 μ A ($|\Delta k| < 1.5\%$)

ในขณะที่เมื่อใช้อุณหภูมิต่ำกว่า 25 °C พบว่าการใช้กำลังไฟฟ้าคงที่เป็น 1.5 วัตต์ ได้ค่า $\ln k$ น้อยกว่าเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กระแสไฟฟ้าคงที่เป็น 95 μA ($|\Delta k| < 2\%$) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อใช้การประเมินผลทางสถิติที่อุณหภูมิเดียวกัน พบว่าค่า $\ln k$ ของ BZ ที่ได้จากการใช้กระแสไฟฟ้าคงที่และกำลังไฟฟ้าคงที่ไม่มีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตาราง 4.18 ในภาคผนวก ก) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่มีความแตกต่างของการเปลี่ยนแปลง $\ln k$ อันมีสาเหตุมาจากผลของ Joule heating ที่เกิดขึ้นจากการใช้กระแสไฟฟ้าคงที่และกำลังไฟฟ้าคงที่ นอกจากนี้เมื่อเขียนกราฟระหว่าง $\ln k$ และ $1/T$ ที่ใช้กำลังไฟฟ้าคงที่ พบว่าสมการเส้นตรงที่ได้มีค่า $r^2 > 0.97$ อย่างไรก็ตามอาจใช้กระแสไฟฟ้าที่ต่ำกว่า 95 μA หรือกำลังไฟฟ้าต่ำกว่า 1.5 วัตต์ เพื่อให้ Joule heating เกิดน้อยที่สุด แต่ก็ทำให้เสียเวลาในการวิเคราะห์สารนานขึ้น

เมื่อใช้ BZ เป็นสารมาตรฐานสามารถคำนวณหาค่า I ของ homologous series ได้ (คังสมการที่ 2.17) (แสดงเป็นสัญลักษณ์ดังรูปที่ 4.5c) เมื่อใช้การประเมินผลทางสถิติ พบว่าค่าความชันของสมการเส้นตรง I กับ T และค่าศูนย์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตาราง 4.19 ในภาคผนวก ก) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าค่า I ของสารแต่ละชนิดไม่ขึ้นกับอุณหภูมิ ดังนั้นในรูปที่ 4.5c จึงแสดงเป็นค่าเฉลี่ยของ I ของสารแต่ละชนิด (เส้นทึบ) ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 15 ถึง 40 °C (RSD < 1.2%) จากงานวิจัยก่อนหน้านี้เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MEKC ในภาวะที่มี EOF มาก โดยใช้ BZ เป็นสารมาตรฐานและใช้กระแสไฟฟ้าคงที่พบว่าค่า I จะเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยเมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนแปลง [Muijselaar *et al.*: 1994]

จากตารางที่ 4.3 เมื่อใช้อุณหภูมิตั้งแต่ 15 ถึง 40 °C พบว่าที่อุณหภูมิกงที่ได้ความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงระหว่างค่า $\log k$ และ z ของสารแต่ละ homologous series คังสมการของ Martin (สมการที่ 2.16) [Muijselaar *et al.*: 1994] เช่นเดียวกับการใช้ความเข้มข้นของ SDS คงที่

จากรูปที่ 4.6 การเพิ่มอุณหภูมิทำให้ค่า N ลดลง เนื่องจากทำให้ H_e เพิ่มขึ้นเป็นผลมาจาก Joule heating ที่เพิ่มขึ้น เมื่อเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า N และ k ที่อุณหภูมิกงที่แสดงดังในรูปที่ 4.7 พบว่าสารที่เป็น homologous ชุดเดียวกันโดยส่วนมากมีค่า N แตกต่างกันไม่มากนักแต่สำหรับสารที่เป็น homologous ต่างชุดกันจะมีค่า N แตกต่างกันซึ่งยังไม่อาจสรุปได้แน่ชัดว่าเป็นเพราะเหตุใดเพราะมีหลายปัจจัยที่มีผลต่อค่า N เช่นเดียวกับการใช้ความเข้มข้นของ SDS คงที่

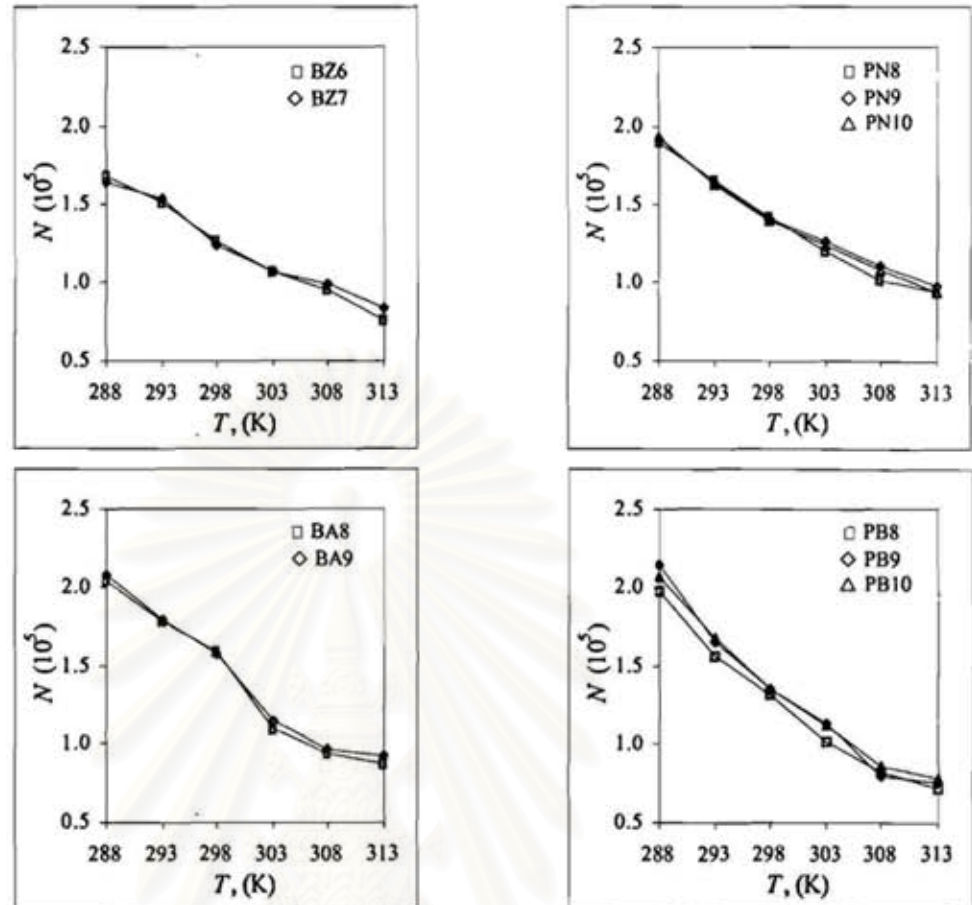


รูปที่ 4.5 ผลของอุณหภูมิคือ (a, b) รีเทนชันแฟกเตอร์ และ (c) รีเทนชันอินเดกของ homologous series: ภาวะอื่นๆ ของ CE แสดงดังรูปที่ 4.1 สัญลักษณ์ต่างๆ แสดงดังรูปที่ 4.2 เส้นตรงสำหรับ k คือ linear fit และเส้นตรงสำหรับ T คือ ค่าเฉลี่ยเมื่อใช้ข้อมูลตั้งแต่ 15 ถึง 40 °C

ตารางที่ 4.3 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างค่า $\log k$ และ z ของ homologous series ใน MEEKC เมื่อใช้ อุณหภูมิตั้งแต่ 15 ถึง 40 °C (กราฟในรูป 4.5a)

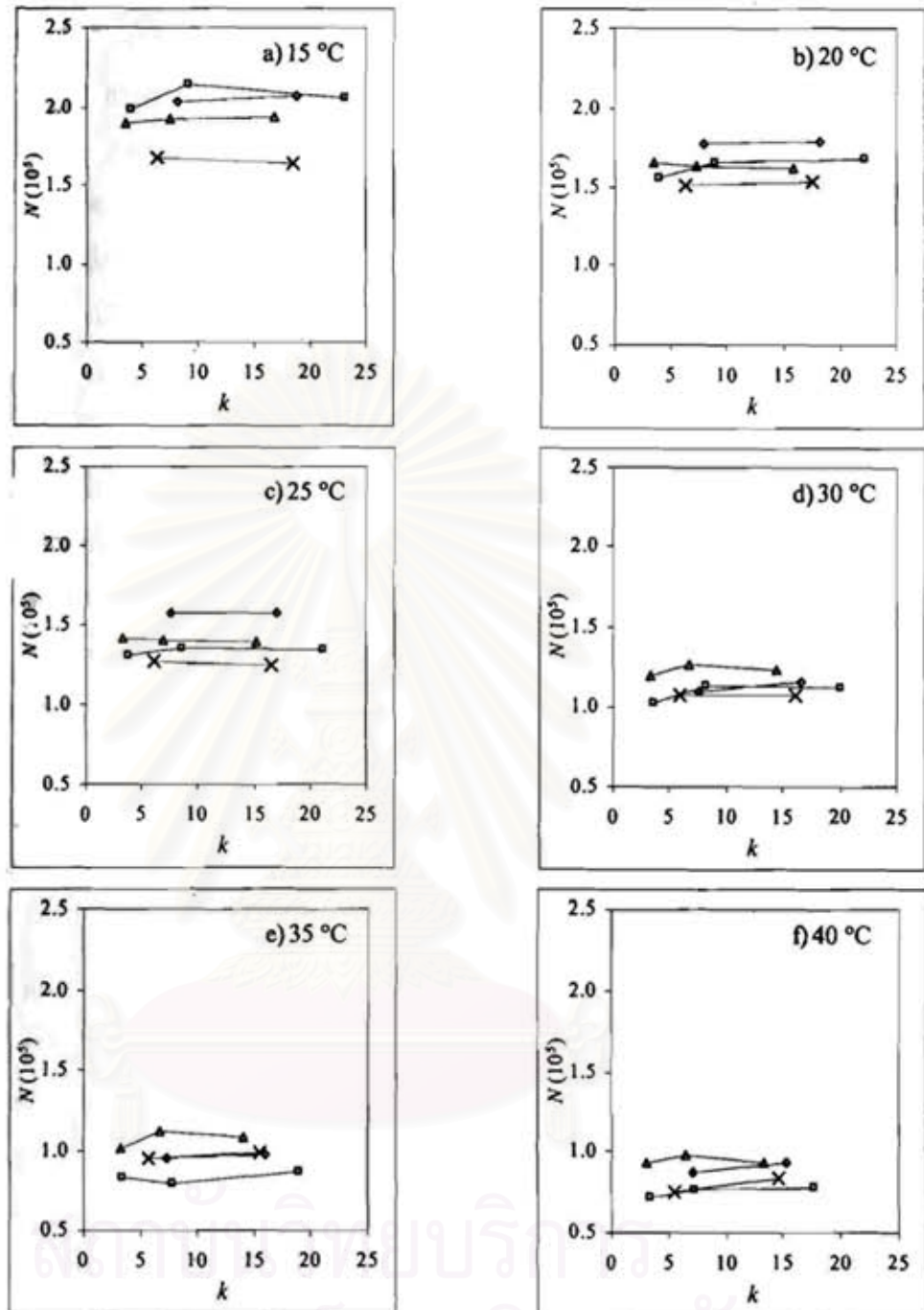
อุณหภูมิ, °C	$\log k = az+b$	BZ	PN	BA	PB
15	a	0.414	0.347	0.361	0.379
	b	-1.643	-2.277	-2.019	-2.466
	r^2	0.9990	0.9988	0.9996	0.9996
20	a	0.411	0.343	0.350	0.374
	b	-1.633	-2.254	-1.930	-2.435
	r^2	0.9991	0.9994	0.9996	0.9996
25	a	0.407	0.348	0.347	0.368
	b	-1.614	-2.313	-1.919	-2.423
	r^2	0.9992	0.9994	0.9996	0.9998
30	a	0.397	0.351	0.345	0.372
	b	-1.567	-2.356	-1.921	-2.479
	r^2	0.9987	0.9998	0.9996	0.9997
35	a	0.397	0.355	0.335	0.367
	b	-1.584	-2.406	-1.837	-2.455
	r^2	0.9995	0.9997	0.9988	0.9996
40	a	0.392	0.355	0.335	0.362
	b	-1.572	-2.421	-1.844	-2.424
	r^2	0.9994	0.9995	0.9992	0.9997

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.6 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกับ N : เมื่อใช้ไมโครอิมัลชันบัพเฟอร์ที่มีความเข้มข้นของ SDS 180 mM และภาวะอื่นๆ ของ CE แสดงดังรูปที่ 4.1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.7 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง N กับ k ที่อุณหภูมิคงที่: ภาวะอื่นๆ ของ CE แสดงดังรูปที่ 4.1 ใช้ข้อมูลของค่า N จากรูปที่ 4.6, x (BZ6, BZ7), Δ (PN8, PN9, PN10), \diamond (BA8, BA9), \square (PB8, PB9, PB10) และสำหรับ homologous series ชุดเดียวกัน ค่า k เพิ่มขึ้นตามจำนวนคาร์บอน

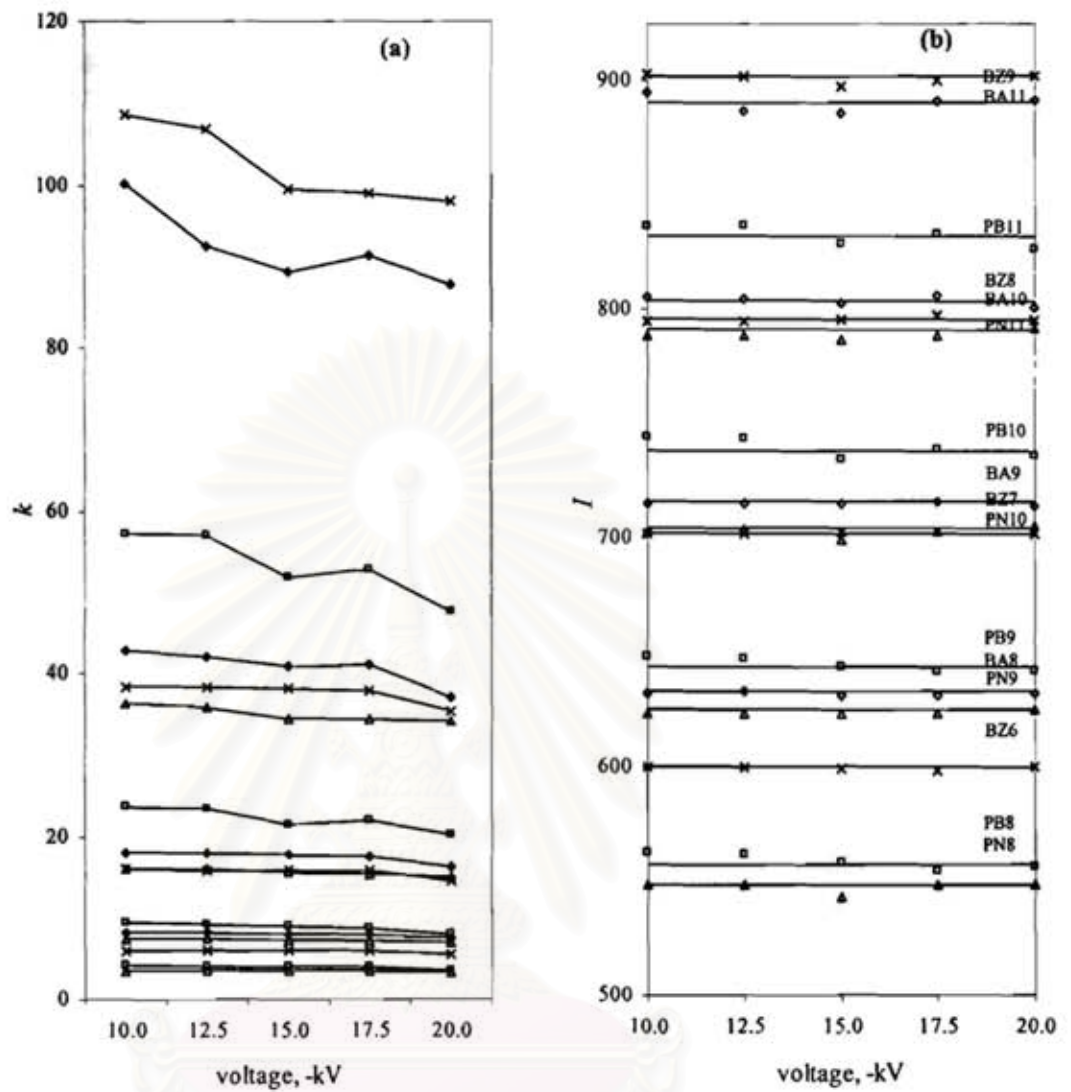
4.4 ผลของศักย์ไฟฟ้า

ได้ทำการศึกษาผลของศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ -10 ถึง -20 kV ต่อค่า k , I และ N ของ homologous series ใน MEEKC ในภาวะที่ไม่มี EOF โดยใช้บัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 50 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 2.5, 1.0 % v/v n -ออกเทน, 180 mM SDS และ 890 mM 1-บิวทานอล การใช้ศักย์ไฟฟ้ามากกว่า -20 kV อิเล็กโทรโฟเรซิสโรแกรมที่ได้จะมีสัญญาณรบกวนค่อนข้างมากและพิกที่ได้จะกว้าง จากผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.8a พบว่าเมื่อเพิ่มศักย์ไฟฟ้าทำให้ค่า k ลดลง ซึ่งตามทฤษฎีแล้วศักย์ไฟฟ้าไม่ควรจะมีผลต่อค่า k แต่ที่ผลการทดลองเป็นเช่นนี้เนื่องจากผลของการเพิ่มอุณหภูมิเนื่องจาก Joule heating ที่เพิ่มขึ้น

เมื่อใช้ BZ เป็นสารมาตรฐานสามารถคำนวณหาค่า I ของ homologous series ได้ (ดังสมการที่ 2.17) (แสดงเป็นสัญลักษณ์ดังรูปที่ 4.8b) เมื่อใช้การประเมินผลทางสถิติ พบว่าค่าความชันของสมการเส้นตรง I กับ T และค่าศูนย์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตาราง 4.20 ในภาคผนวก ก) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าค่า I ของสารแต่ละชนิดไม่ขึ้นกับศักย์ไฟฟ้า ดังนั้นในรูปที่ 4.8b จึงแสดงเป็นค่าเฉลี่ยของ I ของสารแต่ละชนิด (เส้นทึบ) ที่ศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ -10 ถึง -20 kV (RSD < 0.6%)

จากตารางที่ 4.4 เมื่อใช้ศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ -10 ถึง -20 kV พบว่าที่ศักย์ไฟฟ้าคงที่ได้ ความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงระหว่างค่า $\log k$ และ z ของสารแต่ละ homologous series ดังสมการของ Martin (สมการที่ 2.16) [Muijselaar *et al.*: 1994] เช่นเดียวกับการใช้ความเข้มข้นของ SDS คงที่

จากรูปที่ 4.9 การเพิ่มศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ -10 ถึง -15 kV ทำให้ค่า N เพิ่มขึ้น เนื่องจากการลดลงของ longitudinal diffusion ซึ่งเป็นผลมาจากเวลาในการเคลื่อนที่ลดลง แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มศักย์ไฟฟ้าสูงขึ้นอีกตั้งแต่ -15 ถึง -20 kV ทำให้ค่า N ลดลงซึ่งเป็นผลของ Joule heating เมื่อเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า N และ k ที่ศักย์ไฟฟ้าคงที่แสดงดังในรูปที่ 4.10 พบว่าสารที่เป็น homologous ชุดเดียวกันโดยส่วนมากมีค่า N แตกต่างกันไม่มากนักแต่สำหรับสารที่เป็น homologous ต่างชุดกันจะมีค่า N แตกต่างกันซึ่งยังไม่อาจสรุปได้แน่ชัดว่าเป็นเพราะเหตุใดเพราะมีหลายปัจจัยที่มีผลต่อค่า N เช่นเดียวกับการใช้ความเข้มข้นของ SDS คงที่



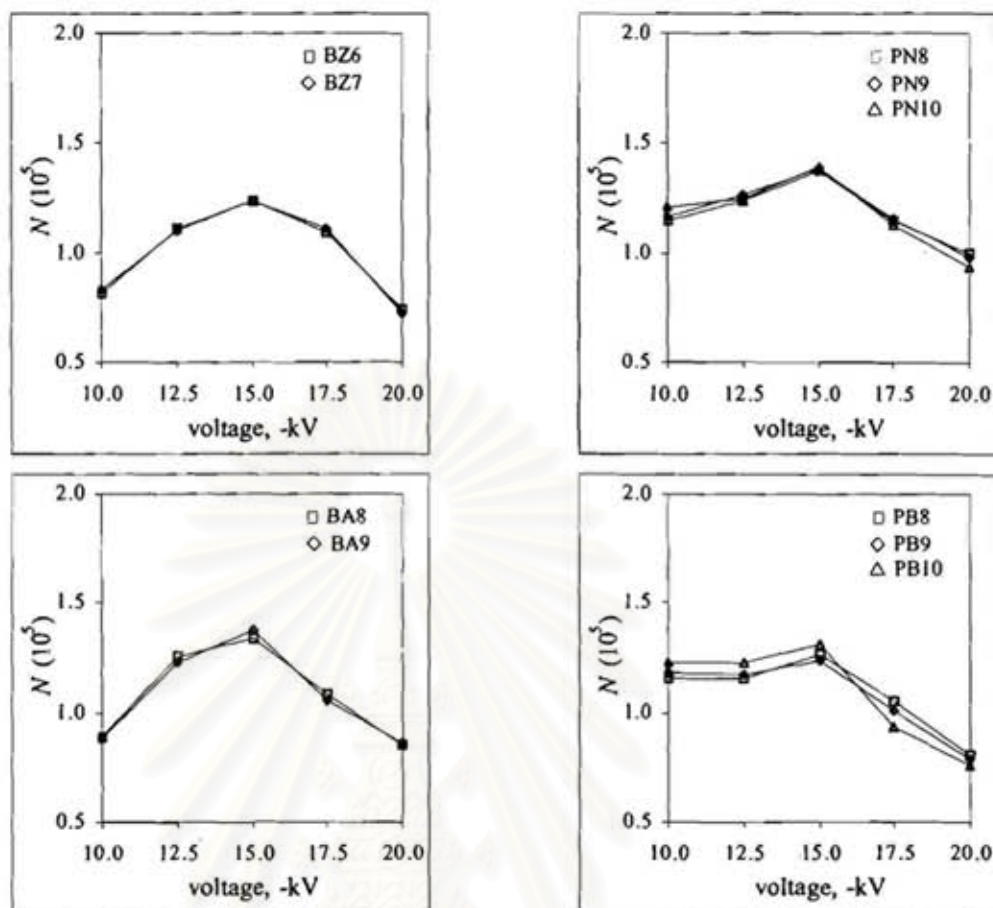
รูปที่ 4.8 ผลของศักย์ไฟฟ้าต่อ (a) รีเทนชันแฟกเตอร์ และ (b) รีเทนชันอินเดกของ homologous series: ภาวะอื่นๆ ของ CE แสดงดังรูปที่ 4.1 สัญลักษณ์ต่างๆ แสดงดังรูปที่ 4.2 เส้นตรงสำหรับ I คือค่าเฉลี่ย เมื่อใช้ศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ -10 ถึง -20 kV

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.4 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างค่า $\log k$ และ z ของ homologous series ใน MEEKC เมื่อใช้ศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ -10 ถึง -20 kV (กราฟในรูป 4.8a)

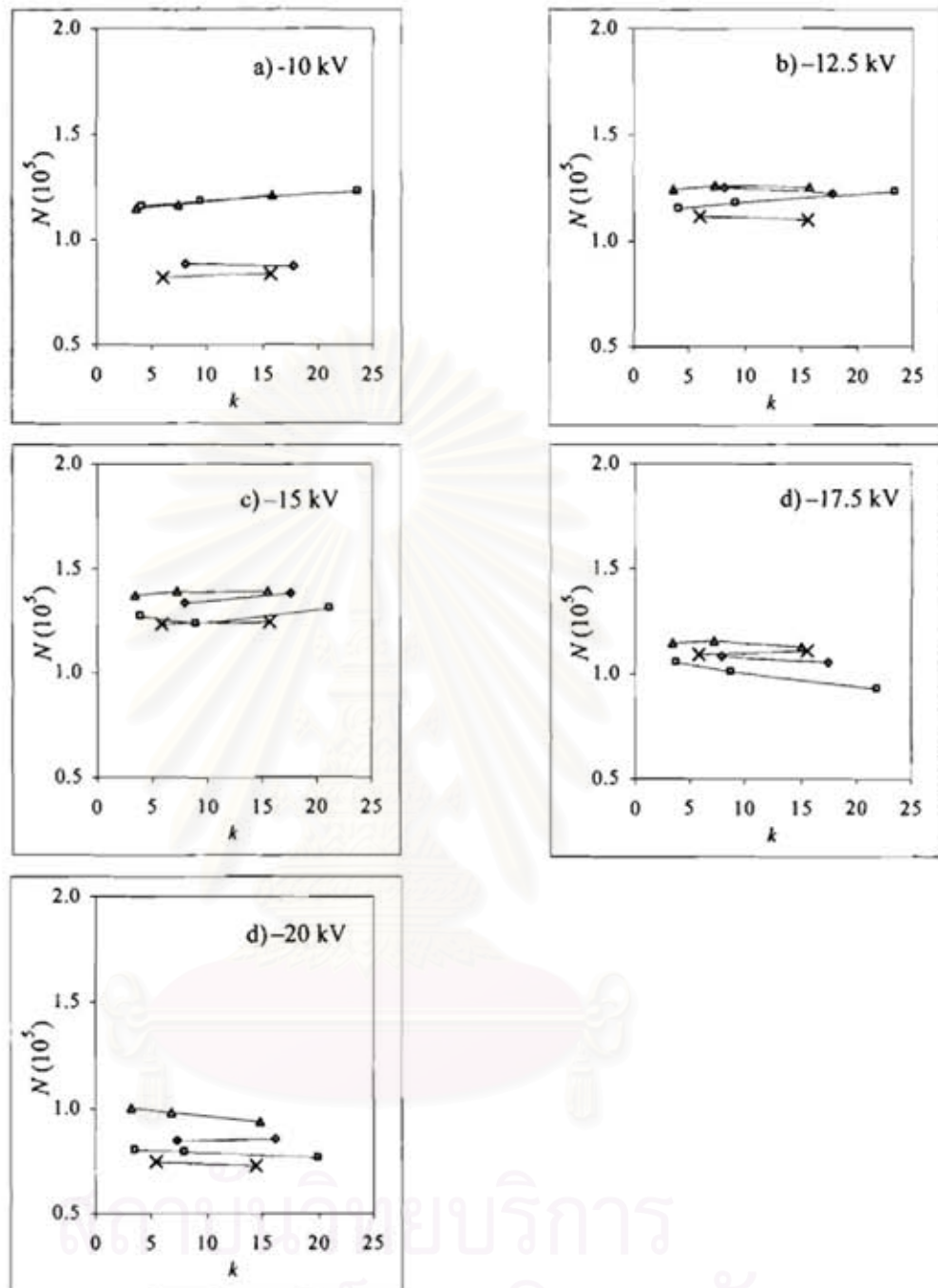
ศักย์ไฟฟ้า, -kV	$\log k = az+b$	BZ	PN	BA	PB
10	a	0.417	0.334	0.366	0.384
	b	-1.729	-2.130	-2.028	-2.466
	r^2	0.9991	0.9991	0.9996	0.9995
12.5	a	0.416	0.334	0.355	0.384
	b	-1.725	-2.129	-1.931	-2.475
	r^2	0.9993	0.9993	0.9998	0.9994
15	a	0.413	0.331	0.352	0.373
	b	-1.671	-2.115	-1.922	-2.396
	r^2	0.9996	0.9997	0.9998	0.9995
17.5	a	0.407	0.331	0.355	0.381
	b	-1.671	-2.115	-1.948	-2.467
	r^2	0.9997	0.9991	0.9998	0.9996
20	a	0.415	0.338	0.359	0.377
	b	-1.758	-2.193	-2.010	-2.472
	r^2	0.9994	0.9992	0.9996	0.9997

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.9 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างศักย์ไฟฟ้ากับ N : เมื่อใช้ไมโครอิมัลชันบัพเฟอร์ที่มีความเข้มข้นของ SDS 180 mM และภาวะอื่นๆ ของ CE แสดงดังรูปที่ 4.1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



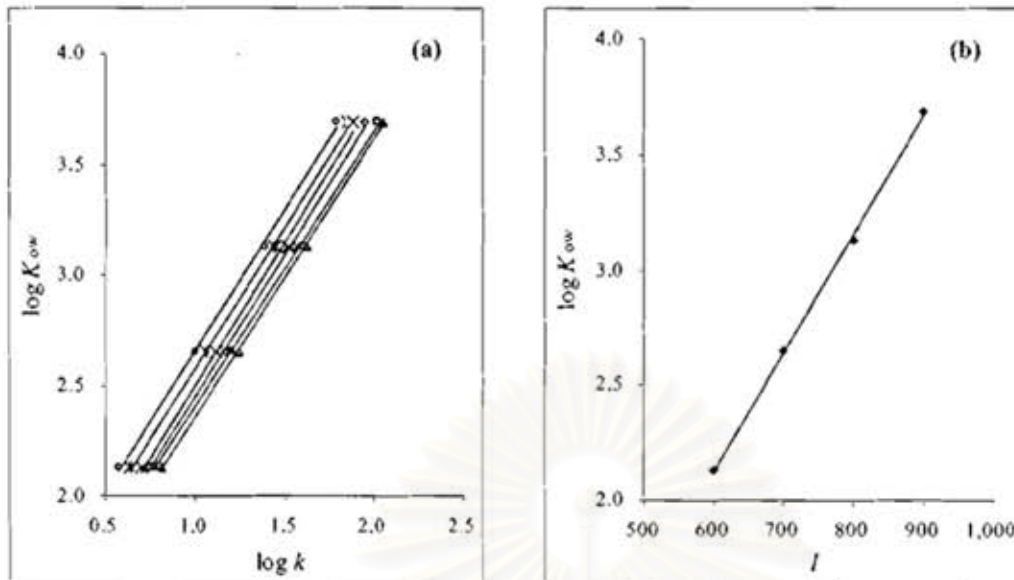
รูปที่ 4.10 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง N กับ k ที่ศักย์ไฟฟ้าคงที่: ภาวะอื่นๆ ของ CE แสดงดังรูปที่ 4.1 ใช้ข้อมูลของค่า N จากรูปที่ 4.11, \times (BZ6, BZ7), \triangle (PN8, PN9, PN10), \diamond (BA8, BA9), \square (PB8, PB9, PB10) และสำหรับ homologous series จุดเดียวกัน ค่า k เพิ่มขึ้นตามจำนวนคาร์บอน

4.5 ค่าคงที่ของการกระจายตัวของสารระหว่างออกทานอลและน้ำ (K_{ow})

เมื่อใช้ความเข้มข้นของ SDS ตั้งแต่ 100 ถึง 200 mM โดยใช้ BZ เป็นสารมาตรฐานซึ่งทราบค่า $\log K_{ow}$ (2.13, 2.65, 3.13 และ 3.69 สำหรับ BZ6, BZ7, BZ8 และ BZ9 ตามลำดับ) พบว่าค่า $\log k$ หรือ I ของสาร (ดังสมการที่ 2.18 และ 2.19) มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงกับค่า $\log K_{ow}$ แสดงดังรูปที่ 4.11 และตารางที่ 4.5 จากผลการทดลองในตารางที่ 4.2 ที่พบว่าค่า I ของ BZ ที่ได้ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของ SDS และมีค่าไม่แตกต่างกับค่า nominal value ของ I (600, 700, 800 และ 900 สำหรับ BZ6, BZ7, BZ8 และ BZ9 ตามลำดับ) ดังนั้นกราฟสอบเทียบของ $\log K_{ow}$ กับ I ในรูปที่ 4.11b จึงใช้ค่า nominal value ของ I ของ BZ ส่วนกราฟในรูปที่ 4.11a ใช้ค่า $\log k$ ของ BZ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของ SDS

จากตารางที่ 4.6 ได้ค่าเฉลี่ยของ $\log K_{ow}$ ของ homologous series ที่ทำนายได้จากกราฟสอบเทียบของค่า $\log K_{ow}$ กับ $\log k$ โดยใช้ BZ เป็นสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ของ SDS (แสดงในรูปที่ 4.11a และตารางที่ 4.9) และได้ค่า $\log K_{ow}$ ที่ทำนายได้จากกราฟสอบเทียบของค่า $\log K_{ow}$ กับ I โดยใช้ BZ เป็นสารมาตรฐาน (แสดงในรูปที่ 4.11b และตารางที่ 4.9) เมื่อใช้การประเมินทางสถิติพบว่าค่า $\log K_{ow}$ ของสารที่ทำนายได้จากค่า $\log k$ หรือ I ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตาราง ผ21 ในภาคผนวก ก) นอกจากนี้ยังพบว่าค่า $\log K_{ow}$ ของสารที่ทำนายได้จากค่า $\log k$ หรือ I และค่าที่มีผู้รายงานไว้ [Ishihama *et al.*: 1995, Poole *et al.*: 2000, Hansen: 2000] ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตาราง ผ22 และ ผ23 ในภาคผนวก ก) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบวิธีการทำนายค่า $\log K_{ow}$ ของสารระหว่างการทำนายโดยใช้ค่า $\log k$ และ I นั้น การใช้ค่า I สามารถทำนายได้ง่ายกว่า เนื่องจากสามารถใช้กราฟสอบเทียบของค่า $\log K_{ow}$ กับ I ที่เป็น nominal value และค่า I ของสารที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของ SDS (ตั้งแต่ 100 ถึง 200 mM) ไม่แตกต่างกันในขณะที่ k ของสารต่างกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.11 กราฟเปรียบเทียบแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\log K_{ow}$ และ $\log k$ และ I ของ homologous series ของ BZ ใน MEEKC: โดยใช้ความเข้มข้นของ SDS 100 ถึง 200 mM และภาวะอื่นๆ ของ CE แสดงดังรูปที่ 4.1 สัญลักษณ์ในรูป (a) o, *, x, \diamond , \square , \triangle แสดงถึงความเข้มข้นของ SDS ที่ 100, 120, 140, 160, 180 และ 200 mM ตามลำดับ

ตารางที่ 4.5 สมการเส้นตรงของกราฟเปรียบเทียบของค่า $\log K_{ow}$ กับ $\log k$ หรือ $\log K_{ow}$ กับ I ของ homologous series ที่ได้จาก MEEKC โดยใช้ BZ เป็นสารมาตรฐาน

[SDS], mM	$\log K_{ow} = c \log k + d$			$\log K_{ow} = eI + f$		
	c	d	r^2	e	f	r^2
100	1.275	1.387	0.9985			
120	1.284	1.301	0.9990			
140	1.301	1.203	0.9965			
160	1.293	1.156	0.9986	0.00516	-0.970	0.9992
180	1.251	1.152	0.9992			
200	1.257	1.101	0.9997			

c และ d คือ ค่าความชันและจุดตัดแกน y ตามลำดับที่ได้จากกราฟเปรียบเทียบของค่า $\log K_{ow}$ กับ $\log k$ โดยใช้ BZ เป็นสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ของ SDS และ e และ f คือ ค่าความชันและจุดตัดแกน y ตามลำดับที่ได้จากกราฟเปรียบเทียบของค่า $\log K_{ow}$ กับ I โดยใช้ BZ เป็นสารมาตรฐาน: $\log K_{ow}$ มีค่า 2.13, 2.65, 3.13 และ 3.69 สำหรับ BZ6, BZ7, BZ8 และ BZ9 ตามลำดับ [Muijselaar *et al.*: 1994]

ตารางที่ 4.6 ค่า $\log K_{ow}$ ของ homologous series ที่ได้จากการทำนายใน MEEKC โดยใช้ BZ เป็นสารมาตรฐาน

analyte	$\log K_{ow}$		
	การทำนาย		อ้างอิง
	$\log K_{ow} = c \log k + d$	$\log K_{ow} = e\bar{I} + f$	
PN8	1.72 ± 0.05	1.72 ± 0.05	1.58 [Ishihama <i>et al.</i> : 1995]
PN9	2.13 ± 0.06	2.13 ± 0.06	2.20 [Ishihama <i>et al.</i> : 1995]
PN10	2.56 ± 0.05	2.56 ± 0.05	2.66 [Ishihama <i>et al.</i> : 1995]
PN11	3.02 ± 0.05	3.02 ± 0.05	3.11 [Poole <i>et al.</i> : 2000]
BA8	2.19 ± 0.07	2.18 ± 0.05	2.12 [Poole <i>et al.</i> : 2000]
BA9	2.62 ± 0.04	2.62 ± 0.04	2.64 [Poole <i>et al.</i> : 2000]
BA10	3.11 ± 0.06	3.11 ± 0.06	ไม่มีข้อมูล
BA11	3.56 ± 0.05	3.56 ± 0.05	ไม่มีข้อมูล
PB8	1.78 ± 0.04	1.78 ± 0.04	1.96 [Hansen: 2000]
PB9	2.24 ± 0.05	2.24 ± 0.05	ไม่มีข้อมูล
PB10	2.75 ± 0.04	2.75 ± 0.04	ไม่มีข้อมูล
PB11	3.22 ± 0.03	3.22 ± 0.03	ไม่มีข้อมูล

c และ d คือ ค่าความชันและจุดตัดแกน y ตามลำดับที่ได้จากกราฟสอบเทียบของค่า $\log K_{ow}$ กับ $\log k$ โดยใช้ BZ เป็นสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ของ SDS (แสดงในรูปที่ 4.11a และตารางที่ 4.5) และ e และ f คือ ค่าความชันและจุดตัดแกน y ตามลำดับที่ได้จากกราฟสอบเทียบของค่า $\log K_{ow}$ กับ I โดยใช้ BZ เป็นสารมาตรฐาน (แสดงในรูปที่ 4.11b และตารางที่ 4.5); \bar{I} คือ ค่าเฉลี่ยของ I ของแต่ละสารเมื่อใช้ความเข้มข้นของ SDS 100 ถึง 200 mM *ค่าเฉลี่ยเมื่อใช้ความเข้มข้นของ SDS 100 ถึง 200 mM

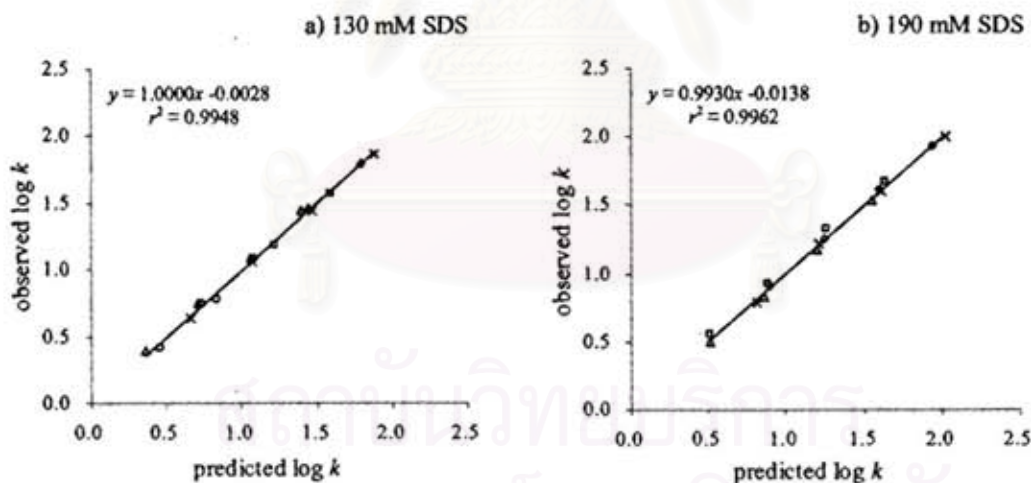
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.6 การทำนายค่ารีเทนชันแฟกเตอร์ของ homologous series

เพื่อที่จะทำนายค่า k ของ homologous series ใน MEEKC ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของ SDS เมื่ออาศัยข้อมูลจากความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างค่า $\log k$ และ z ดังสมการที่ 2.16 และตารางที่ 4.2 จะได้สมการขึ้นมาใหม่เพื่อใช้ทำนายค่า k ของ homologous series ดังสมการ

$$\log k = \bar{a}z + b' \quad (4.3)$$

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.12 พบว่าเมื่อใช้สมการที่ 4.3 และข้อมูลของค่า \bar{a} และ b' จากตารางที่ 4.2 สามารถทำนายค่า $\log k$ ของ homologous series ใน MEEKC ที่ความเข้มข้นของ SDS 130 และ 190 mM ได้ ซึ่งพบว่าได้กราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของค่า $\log k$ ที่ได้จากการทดลองและการทำนายที่มีความชันเป็น 1.000 ($r^2 = 0.995$) และ 0.993 ($r^2 = 0.996$) ที่ความเข้มข้นของ SDS 130 และ 190 mM ตามลำดับ เมื่อใช้การประเมินผลทางสถิติ พบว่าค่า $\log k$ ของสารที่ได้จากการทดลองและการทำนายไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตาราง ๓24 และ ๓25 ในภาคผนวก ก) ซึ่งชี้ให้เห็นถึงความแม่นยำของค่า $\log k$ ของ homologous series ที่ได้จากการทำนายโดยใช้สมการที่ 4.3 และข้อมูลของค่า \bar{a} และ b' จากตารางที่ 4.2



รูปที่ 4.12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\log k$ ของ homologous series ที่ได้จากการทดลองและทำนายใน MEEKC โดยใช้ (a) 130 และ (b) 190 mM SDS: ภาวะอื่นๆ ของ CE แสดงดังรูปที่ 4.1 สัญลักษณ์แสดงถึงค่า $\log k$ ที่ได้จากการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.2 และเส้นตรงแสดงถึงค่า $\log k$ ที่ได้จากการทำนายโดยใช้สมการที่ 4.1 และตารางที่ 4.2

บทที่ 5

สรุปผลงานวิจัย

5.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ความเข้มข้นของ SDS ([SDS]) อุณหภูมิ และศักย์ไฟฟ้า ที่มีผลต่อรีเทนชันแฟกเตอร์ (k) รีเทนชันอินเดก (I) และประสิทธิภาพของการแยกสาร (N) ในเทคนิค MEEKC ในภาวะที่ไม่มี EOF โดยสารที่สนใจเป็นกลุ่มสารประเภทไฮโมโลกัส ได้แก่ อัลคิลเบนซีน (BZ) อัลคิลลอริลโทน (PN) อัลคิลเบนโซเอท (BA) และอัลคิลพาราเบน (PB)

ระบบ MEEKC ที่ใช้ประกอบด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่พีเอช 2.5, นอร์มัลออกเทน 1.0 % โดยปริมาตรเป็นหยดน้ำมัน, SDS ในช่วง 100 ถึง 200 มิลลิโมลาร์เป็นสารลดแรงตึงผิว และ I-บิวทานอล 890 มิลลิโมลาร์เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม

จากการทดลองสามารถหาความเที่ยงของ k และ I ของ homologous series ของการวิเคราะห์สารภายในวันเดียวกัน (intraday precision) และต่างวันกัน (interday precision) และใช้บัฟเฟอร์ชุดเดียวกันและต่างชุดกัน โดยใช้ไมโครอิมัลชันบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 50 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 2.5, 1.0 % v/v n -ออกเทน, 180 mM SDS และ 890 mM I-บิวทานอล เมื่อพิจารณาว่า k ของ BZ ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานพบว่าให้ค่าความชัน (a) และค่าจุดตัดแกน y (b) ของสมการ $\log k = az + b$ สำหรับ homologous series ของ BZ ที่ใช้บัฟเฟอร์ชุดเดียวกันและต่างชุดกัน ที่วิเคราะห์สารภายในวันเดียวกันและต่างวันกันมีค่าไม่แตกต่างกันมากนักและเมื่อใช้การประเมินผลทางสถิติพบว่าค่า a และ b ที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แสดงให้เห็นว่ามีความเที่ยงสูงของค่า k ของ BZ ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบระหว่างค่า I ของ BZ ที่ได้จากการคำนวณ (จากการวิเคราะห์สารภายในวันเดียวกันและต่างวันกัน หรือโดยใช้บัฟเฟอร์ชุดเดียวกันและต่างชุดกัน) และค่า nominal values ของค่า I ของ BZ โดยใช้การประเมินผลทางสถิติ พบว่าค่า I ของ BZ ที่ได้จากการคำนวณและค่า nominal values ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่งชี้ให้เห็นถึงความแม่นยำสูงของค่า k ของ BZ ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน เมื่อพิจารณาค่า k และ I ของสารทดสอบ (PN, BA และ PB) พบว่าค่าส่วนเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ (relative standard deviation, RSD) ของค่า k และ I ของสารทดสอบจากการใช้บัฟเฟอร์ชุดเดียวกันและต่างชุดกันและทำการวิเคราะห์สารภายในวันเดียวกันมีค่าต่างกันเพียงเล็กน้อย ในขณะที่ RSD ของ k และ I ของสารทดสอบจากการใช้บัฟเฟอร์ชุดเดียวกันและต่างชุดกัน และทำการวิเคราะห์สารต่างวันกัน มีค่ามากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน การที่ RSD ของ k และ I ของสารทดสอบจากการวิเคราะห์สารต่างวันกันมีค่ามาก อาจเนื่องมาจากสมบัติทางเคมีของพื้นผิวคะพิลลารีในแต่ละวัน

แตกต่างกัน มีผลทำให้ EOF และค่า k ที่คำนวณได้เปลี่ยนไป [Nhujak *et al.*: 2006] แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้การประเมินผลทางสถิติ พบว่าค่า \bar{k} และ \bar{I} ของสารทดสอบจากการวิเคราะห์สารภายในวัน เดียวกันและต่างวันกัน หรือบัพเฟอร์ชุดเดียวกันและต่างชุดกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

นอกจากนี้เมื่อใช้ BZ เป็นสารมาตรฐาน ค่า I ของสารทดสอบ (PN, BA และ PB) ที่ได้จะไม่ เปลี่ยนแปลงเมื่อใช้ความเข้มข้นของ SDS ตั้งแต่ 100 ถึง 200 mM (RSD < 0.5%) อุณหภูมิตั้งแต่ 15 ถึง 40 °C (RSD < 0.2%) และศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ -10 ถึง -20 kV (RSD < 0.6%)

ค่า k มีค่าเพิ่มขึ้นเชิงเส้นตรงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ SDS ตั้งแต่ 100 ถึง 200 mM เนื่องจาก อัตราส่วนของปริมาตรของเฟสหยคน้ำมันต่อปริมาตรของเอเควีเอสเฟสเพิ่มมากขึ้น แต่จะมีค่าลดลง เมื่อเพิ่มอุณหภูมิตั้งแต่ 15 ถึง 40 °C ทั้งนี้เป็นผลมาจากความสามารถในการละลายของสารในเอเควีเอส เฟสมีมากขึ้น จำนวนโมลของสารที่อยู่ในเฟสหยคน้ำมันที่มีประจุลดลง นอกจากนี้การเพิ่มศักย์ไฟฟ้า ตั้งแต่ -15 ถึง -20 kV ทำให้ค่า k ลดลง ซึ่งตามทฤษฎีแล้วศักย์ไฟฟ้าไม่ควรจะมีผลต่อค่า k แต่ที่ผลการ ทดลองเป็นเช่นนี้เนื่องจากการเพิ่มอุณหภูมิที่เป็นผลมาจาก Joule heating ที่เพิ่มขึ้น

ในงานวิจัยนี้สามารถหาค่า N ของสารได้ 10 ชนิด คือ BZ6, BZ7, PN8, PN9, PN10, BA8, BA9, PB8, PB9 และ PB10 สำหรับสารอื่นไม่สามารถหาค่า N ได้อย่างถูกต้อง เนื่องจากเกิดการ ข้อนทับกันระหว่างพีกสารกับ DB เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ SDS ในช่วง 100 ถึง 200 mM ทำให้ค่า N เพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจาก N แปรผกผันกับ H และการเพิ่มความเข้มข้นของ SDS จะไปลด H_{pl} ซึ่ง สอดคล้องกับที่ได้รายงานไว้ใน การแยกสารด้วยเทคนิค MEKC และ MEEKC ในภาวะที่มี EOF มาก นอกจากนี้การเพิ่มความเข้มข้นของ SDS จะไปลด H_{pl} ด้วย อย่างไรก็ตามการเพิ่มความเข้มข้นของ SDS อาจทำให้ค่า H_{pl} เพิ่มขึ้นเนื่องจากการเพิ่ม Joule heating แต่จากผลการทดลองนี้แสดงว่าผลของ H_{pl} มี น้อยกว่าการเพิ่ม H_{pl} และ H_{pl} ส่วนการเพิ่มอุณหภูมิตั้งแต่ 15 ถึง 40 °C ทำให้ค่า N ลดลง เนื่องจากการ เพิ่มอุณหภูมิ ทำให้ H_{pl} เพิ่มขึ้นเป็นผลมาจาก Joule heating ที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้การเพิ่มศักย์ไฟฟ้า ตั้งแต่ -10 ถึง -15 kV ทำให้ค่า N เพิ่มขึ้น เนื่องจากการลดลงของ longitudinal diffusion ซึ่งเป็นผลมา จากเวลาในการเคลื่อนที่ลดลง แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มศักย์ไฟฟ้าสูงขึ้นอีกตั้งแต่ -15 ถึง -20 kV ทำให้ ค่า N ลดลงซึ่งเป็นผลของ Joule heating นอกจากนี้เมื่อเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า N และ k ที่ความเข้มข้นของ SDS, อุณหภูมิหรือศักย์ไฟฟ้าคงที่ พบว่าสารที่เป็น homologous ชุดเดียวกัน โดยส่วนมากมีค่า N แตกต่างกันไม่มากนักแต่สำหรับสารที่เป็น homologous ต่างชุดกันจะมีค่า N แตกต่างกันซึ่งยังไม่อาจสรุปได้แน่ชัดว่าเป็นเพราะเหตุใดเพราะมีหลายปัจจัยที่มีผลต่อค่า N

เมื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\log k$ และ z (จำนวนคาร์บอนของสารในกลุ่ม homologous series) พบว่าได้ความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงระหว่างค่า $\log k$ กับ z ดังสมการของ Martin; $\log k = az + b$ [Muijselaar *et al.*: 1994] ที่ความเข้มข้นของ SDS คงที่ในช่วง 100 ถึง 200 mM หรือ

อุณหภูมิคงที่ในช่วง 15 ถึง 40 °C หรือศักย์ไฟฟ้าคงที่ในช่วง -15 ถึง -20 kV โดยที่ความชัน (a) และ จุดตัดแกน y (b) ขึ้นอยู่กับชนิดของ homologous series โดยที่ค่า a ของสารในกลุ่ม homologous เดียวกันไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของ SDS แต่ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและศักย์ไฟฟ้าที่ใช้แยกสาร ในขณะที่ค่า b ขึ้นกับทั้งความเข้มข้นของ SDS อุณหภูมิและศักย์ไฟฟ้าที่ใช้แยกสาร

เมื่อใช้ความเข้มข้นของ SDS ตั้งแต่ 100 ถึง 200 mM โดยใช้ BZ เป็นสารมาตรฐานซึ่งทราบค่า $\log K_{ow}$ พบว่าค่า $\log k$ หรือ I ของสาร มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงกับค่า $\log K_{ow}$ และสามารถทำนายค่า $\log K_{ow}$ ของสารทดสอบได้ โดยอาศัยกราฟสอบเทียบของค่า $\log K_{ow}$ กับ $\log k$ หรือ $\log K_{ow}$ กับ I โดยใช้ BZ เป็นสารมาตรฐาน ซึ่งพบว่าค่า $\log K_{ow}$ ของสารที่ทำนายได้จากค่า $\log k$ หรือ I ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และนอกจากนี้ยังพบว่าค่า $\log K_{ow}$ ของสารที่ทำนายได้จากค่า $\log k$ หรือ I และค่าที่มีผู้รายงานไว้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบวิธีการทำนายค่า $\log K_{ow}$ ของสารระหว่างการทำนายโดยใช้ค่า $\log k$ และ I นั้น การใช้ค่า I สามารถทำนายได้ง่ายกว่า เนื่องจากสามารถใช้กราฟสอบเทียบของค่า $\log K_{ow}$ กับ I ที่เป็น nominal value และค่า I ของสารที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของ SDS (ตั้งแต่ 100 ถึง 200 mM) ไม่แตกต่างกันในขณะที่ k ของสารต่างกัน

นอกจากนี้ได้ทำนายค่า $\log k$ ของสารโดยใช้สมการที่ปรับปรุง ($\log k = \bar{a}z + b'$) ซึ่งพบว่ากราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของค่า $\log k$ ที่ได้จากการทดลองและการทำนายที่มีความชันเป็น 1.000 ($r^2 = 0.995$) และ 0.993 ($r^2 = 0.996$) ที่ความเข้มข้นของ SDS 130 และ 190 mM ตามลำดับ และเมื่อใช้การประเมินผลทางสถิติพบว่าค่า $\log k$ ของสารที่ได้จากการทดลองและการทำนายไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แสดงให้เห็นถึงความแม่นยำสูงของค่า $\log k$ ของ homologous series ที่ได้จากการทำนายโดยใช้สมการที่ปรับปรุง

กล่าวโดยสรุปได้ว่าค่ารีเทนชันแฟกเตอร์และรีเทนชันอินเดกซ์สามารถใช้ในการยืนยันพิกของสารได้ และปัจจัยที่มีผลต่อค่าทั้งสองสามารถอธิบายได้โดยใช้หลักการทางโครมาโทกราฟีและอิเล็กโตรโครมาโทกราฟี

5.2 งานที่น่าสนใจต่อไป

นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีต่อรีเทนชันแฟกเตอร์ของสาร ซึ่งรายละเอียดของผลการทดลองไม่ปรากฏอยู่ในรายงานฉบับสมบูรณ์นี้ แต่มีอยู่ในผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสาร Electrophoresis ดังในภาคผนวก ค และงานวิจัยที่ควรศึกษาต่อไป ได้แก่ พฤติกรรมการเคลื่อนที่และการแยกของสารประเภทอื่นที่ไม่ใช่สารประกอบประเภทอนุกรมโฮโมโลกัสรวมทั้งแนวทางในการหาภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารดังกล่าว

เอกสารอ้างอิง

- ปัญญา เจ็มโนธรรม และวสุรา สุนทรคันนิกุล. คัพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสสำหรับหาปริมาณ แคปไซซินและโคไฮโครแคปไซซิน. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2547.
- Altria, K. D., Clark, B. J. and Mahuzier, P. -E., "The effect of operating variables in microemulsion electrokinetic capillary chromatography", *Chromatographia* 2000, 52, 758-768.
- Camilleri, P., "Capillary electrophoresis", CRC Press, Boca Raton, 1993.
- Gluck, S. J., Benko, M. H., Hallberg, R.K. and Steele, K. P., "Indirect determination of octanol-water partition coefficients by microemulsion electrokinetic chromatography", *J. Chromatogr. A* 1996, 744, 141-146.
- Gong, S., Bo, T., Huang, L., Li, K. A. and Liu, H., "Separation and determination of biphenyl nitrile compounds by microemulsion electrokinetic chromatography with mixed surfactants", *Electrophoresis* 2004, 25, 1058-1064.
- Hansen, S. H., "Recent applications of microemulsion electrokinetic chromatography", *Electrophoresis*", *Electrophoresis* 2003, 24, 3900-3907.
- Harang, V., Eriksson, J., Sanger-van de Griend, C. E., Jacobsson, S. P. and Westerlund, D., "Microemulsion electrokinetic chromatography of drugs varying in charge and hydrophobicity: I. Impact of parameters on separation performance evaluated by multiple linear regression models", *Electrophoresis* 2004, 25, 80-93.
- Huang, H., Lai, Y., Chiu, C. and Yeh, J., "Comparing micellar electrokinetic chromatography and microemulsion electrokinetic chromatography for the analysis of preservatives in pharmaceutical and cosmetic products", *J. Chromatogr. A* 2003, 993, 153-164.
- Ishihama, Y., Oda, Y. and Asakawa, N., "A hydrophobicity scale based on the migration index from microemulsion electrokinetic chromatography of anionic solutes", *Anal. Chem.* 1996, 68, 1028-1032.
- Ishihama, Y., Oda, Y., Uchikawa, K. and Asakawa, N., "Evaluation of solute hydrophobicity by microemulsion electrokinetic chromatography", *Anal. Chem.* 1995, 67, 1588-1595.

- Jia, Z., Mei, L., Lin, F., Huang, S. and Killion, R. B., "Screening of octanol-water partition coefficients for pharmaceuticals by pressure-assisted microemulsion electrokinetic chromatography", *J. Chromatogr. A* 2003, 1007, 203-208.
- Khaledi, M. G. (ed.), "High performance capillary electrophoresis: Theory, technique and applications", New York: John Wiley and Sons, 1998, pp. 3-5, 35-38, 77-87, 113-115, 142-157, 330-401, 449-464.
- Klotz, W. L., Schure, M. R. and Foley, J. P., "Determination of octanol-water partition coefficients of pesticides by microemulsion electrokinetic chromatography", *J. Chromatogr. A* 2001, 930, 145-154.
- Kuhn, R. and Hoffstetter-Kuhn, S., "Capillary electrophoresis: Theory", Springer-Verlag, Berlin, 1993.
- Landers, J.P., "Handbook of capillary electrophoresis", 2nd Edn, CRC Press, Boca Raton, 1997.
- Mertzman, M. D. and Foley, J. P., "Temperature effects on chiral microemulsion electrokinetic chromatography employing the chiral surfactant dodecoxycarbonylvaline", *J. Chromatogr. A* 2005, 1073, 181-189.
- Muijselaar, P. G. H. M., Claessens, H. A. and Cramers, C. A., "Application of the retention index concept in micellar electrokinetic capillary chromatography", *Anal. Chem.* 1994, 66, 635-644.
- Muijselaar, P. G., Claessens, H. A. and Cramers, C. A., "Characterization of Pseudostationary phases in micellar electrokinetic chromatography by applying linear solvation energy relationships and retention indexes", *Anal. Chem.* 1997, 69, 1184-1191.
- Nhujak, T., Saisuwan, W., Srisa-art, M. and Petsom, A., "Microemulsion electrokinetic chromatography for separation and analysis of curcuminoids in turmeric samples", *J. Sep. Sci.* 2006, 29, 666-676.
- Poole, S. K. and Poole, C. F., "Separation methods for estimation octanol-water partition coefficients", *J. Chromatogr. B* 2003, 797, 3-19.
- Poole, S. K., Durham, D. and Kibbey, C., "Rapid method for estimating the octanol-water partition coefficient ($\log P_{ow}$) by microemulsion electrokinetic chromatography", *J. Chromatogr. B* 2000, 745, 117-126
- Quirino, J. P., and Terabe, S., "Electrokinetic chromatography", *J. Chromatogr. A* 1999, 856, 465-482.

- Seelanan, P., Srisa-art, M., Petsom, A. and Nhujak, T., "Determination of avermectins in commercial formulations using microemulsion electrokinetic chromatography", *Anal. Chim. Acta.* 2006, 570, 8-14.
- Siren, H. and Karttunen, A., "Microemulsion electrokinetic chromatographic analysis of some polar compounds", *J. Chromatogr. A.* 2003, 783, 113-124.
- Song, L., Ou, Q., Yu, W., and Li, G., "Separation of six phenylureas and chlorsulfuron standards by micellar, mixed micellar and microemulsion electrokinetic chromatography", *J. Chromatogr. A.* 1995, 699, 371-382.
- Terabe, S., Otsuka, K. and Ando, T., "Band broadening in electrokinetic chromatography with micellar solutions and open-tubular capillaries", *Anal. Chem.* 1989, 61, 251-260.
- Terabe, S., Matsubara, N., Ishihama, Y. and Okada, Y., "Microemulsion electrokinetic chromatography: comparison with micellar electrokinetic chromatography", *J. Chromatogr.* 1992, 608, 23-29.
- Warangkana, S., "Capillary electrophoresis for quantitative analysis of curcuminoids", Thesis, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University. 2004.
- Watarai, H., "Microemulsion electrokinetic chromatography", *Chem. Lett.* 1991, 231, 391-394.
- Zhou, G., Luo, G. and Zhang, X., "Microemulsion electrokinetic chromatography of proteins", *J. Chromatogr.* 1999, 853, 277-284.

ภาคผนวก ก
การทดสอบข้อมูลทางสถิติ

ตาราง ผ1 เปรียบเทียบค่าความชัน (a) และค่าจุดตัดแกน y (b) ของสมการ $\log k = az + b$ สำหรับ homologous series ของ BZ ที่ได้จากการวิเคราะห์สารภายในวันเดียวกันโดยใช้บัพเฟอร์ชุดเดียวกัน โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำ 5 ครั้ง ($n = 5$) (ข้อมูลของ k จากตาราง 4.1)

ครั้งที่	a	b
1	0.4054	-1.6497
2	0.4057	-1.6533
3	0.4039	-1.6411
4	0.4031	-1.6334
5	0.4049	-1.6446

Anova: Single Factor

SUMMARY

ครั้งที่	Count	Sum	Average	Variance
1	2	-1.2443	-0.6222	2.1117
2	2	-1.2476	-0.6238	2.1197
3	2	-1.2372	-0.6186	2.0910
4	2	-1.2303	-0.6152	2.0737
5	2	-1.2397	-0.6199	2.1002

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	8.9054E-05	4	2.2264E-05	1.0605E-05	1	5.1922
Within Groups	10.4964	5	2.0993			
Total	10.4965	9				

สรุป $F (1.0605E-05)$ น้อยกว่า $F_{crit} (5.1922)$

ดังนั้นค่าความชันและค่าจุดตัดแกน y ของสมการ $\log k = az + b$ สำหรับ homologous series ของ BZ ที่ได้จากการวิเคราะห์สารภายในวันเดียวกันโดยใช้บัพเฟอร์ชุดเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตาราง ม2 เปรียบเทียบค่าความชัน (a) และค่าจุดตัดแกน y (b) ของสมการ $\log k = az + b$ สำหรับ homologous series ของ BZ ที่ได้จากการวิเคราะห์สารต่างวันกันโดยใช้ฟิโพรซูดเดียวกัน โดยทำการวิเคราะห์ 5 วันและซ้ำวันละ 2 ครั้ง ($n = 10$) (ข้อมูลของ k จากตาราง 4.1)

ครั้งที่	a	b	ครั้งที่	a	b
1	0.4084	-1.6768	6	0.4071	-1.6701
2	0.4066	-1.6669	7	0.4098	-1.6898
3	0.4096	-1.6946	8	0.4086	-1.6847
4	0.4090	-1.6877	9	0.4054	-1.6497
5	0.4052	-1.6535	10	0.4057	-1.6533

Anova: Single Factor

SUMMARY

ครั้งที่	Count	Sum	Average	Variance
1	2	-1.2684	-0.6342	2.1740
2	2	-1.2603	-0.6302	2.1497
3	2	-1.2850	-0.6425	2.2138
4	2	-1.2787	-0.6394	2.1981
5	2	-1.2483	-0.6242	2.1191
6	2	-1.2630	-0.6315	2.1574
7	2	-1.2800	-0.6400	2.2042
8	2	-1.2761	-0.6381	2.1910
9	2	-1.2443	-0.6222	2.1117
10	2	-1.2476	-0.6238	2.1197

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0.0009917	9	0.0001102	5.0922E-05	1	3.0204
Within Groups	21.6387	10	2.1639			
Total	21.6397	19				

สรุป $F(5.0922E-05)$ น้อยกว่า $F_{crit}(3.0204)$

ดังนั้นค่าความชันและค่าจุดตัดแกน y ของสมการ $\log k = az + b$ สำหรับ homologous series ของ BZ ที่ได้จากการวิเคราะห์สารต่างวันกันโดยใช้ฟิโพรซูดเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตาราง ผ3 เปรียบเทียบค่าความชัน (a) และค่าจุดตัดแกน y (b) ของสมการ $\log k = az + b$ สำหรับ homologous series ของ BZ ที่ได้จากการวิเคราะห์สารวันเดียวกันโดยใช้บัพเฟอร์ต่างชุดกัน โดยใช้บัพเฟอร์ 5 ชุดและซ้ำชุดละ 2 ครั้ง ($n = 10$) (ข้อมูลของ k จากตาราง 4.1)

ครั้งที่	a	b	ครั้งที่	a	b
1	0.4026	-1.6387	6	0.4020	-1.6360
2	0.3991	-1.6106	7	0.4029	-1.6355
3	0.4014	-1.6323	8	0.4030	-1.6341
4	0.4049	-1.6551	9	0.4068	-1.6657
5	0.4015	-1.6290	10	0.4066	-1.6643

Anova: Single Factor

SUMMARY

ครั้งที่	Count	Sum	Average	Variance
1	2	-1.2361	-0.6181	2.0835
2	2	-1.2115	-0.6058	2.0194
3	2	-1.2309	-0.6155	2.0680
4	2	-1.2502	-0.6251	2.1218
5	2	-1.2275	-0.6138	2.0615
6	2	-1.2340	-0.6170	2.0767
7	2	-1.2326	-0.6163	2.0775
8	2	-1.2311	-0.6156	2.0749
9	2	-1.2589	-0.6295	2.1476
10	2	-1.2577	-0.6289	2.1443

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0.0009620	9	0.0001069	5.1204E-05	1	3.0204
Within Groups	20.8752	10	2.0875			
Total	20.8762	19				

สรุป $F(5.1204E-05)$ น้อยกว่า $F_{crit}(3.0204)$

ดังนั้นค่าความชันและค่าจุดตัดแกน y ของสมการ $\log k = az + b$ สำหรับ homologous series ของ BZ ที่ได้จากการวิเคราะห์สารภายในวันเดียวกันโดยใช้บัพเฟอร์ต่างชุดกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตาราง ๙4 เปรียบเทียบค่าความชัน (a) และค่าจุดตัดแกน y (b) ของสมการ $\log k = az + b$ สำหรับ homologous series ของ BZ ที่ได้จากการวิเคราะห์สารต่างวันกันโดยใช้บัพเฟอร์ต่างจุดกัน โดยใช้บัพเฟอร์ 5 ชุดและซ้ำชุดละ 2 ครั้ง ($n = 10$) (ข้อมูลของ k จากตาราง 4.1)

ครั้งที่	a	b	ครั้งที่	a	b
1	0.4026	-1.6387	6	0.4054	-1.6366
2	0.3991	-1.6106	7	0.4076	-1.6746
3	0.4044	-1.6335	8	0.4072	-1.6667
4	0.4049	-1.6375	9	0.4054	-1.6497
5	0.4047	-1.6296	10	0.4057	-1.6533

Anova: Single Factor

SUMMARY

ครั้งที่	Count	Sum	Average	Variance
1	2	-1.2361	-0.6181	2.0835
2	2	-1.2115	-0.6058	2.0194
3	2	-1.2291	-0.6146	2.0765
4	2	-1.2326	-0.6163	2.0857
5	2	-1.2249	-0.6125	2.0692
6	2	-1.2312	-0.6156	2.0849
7	2	-1.2670	-0.6335	2.1678
8	2	-1.2595	-0.6298	2.1505
9	2	-1.2443	-0.6222	2.1117
10	2	-1.2476	-0.6238	2.1197

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0.0012329	9	0.0001370	6.5328E-05	1	3.0204
Within Groups	20.9690	10	2.0969			
Total	20.9702	19				

สรุป $F(6.5328E-05)$ น้อยกว่า $F_{crit}(3.0204)$

ดังนั้นค่าความชันและค่าจุดตัดแกน y ของสมการ $\log k = az + b$ สำหรับ homologous series ของ BZ ที่ได้จากการวิเคราะห์สารต่างวันกันโดยใช้บัพเฟอร์ต่างจุดกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตาราง ผ5 เปรียบเทียบค่า I ของ BZ ที่ได้จากการคำนวณ (จากการวิเคราะห์สารภายในวันเดียวกันโดยใช้แฟลโพรซูดเดียวกัน) และค่า nominal value ของ I ของ BZ (600, 700, 800 และ 900 สำหรับ BZ6, BZ7, BZ8 และ BZ9 ตามลำดับ) โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำ 5 ครั้ง ($n = 5$)

ครั้งที่	ค่า I ที่ได้จากการคำนวณ (ข้อมูลของ I จากตาราง 4.1)			
	BZ6	BZ7	BZ8	BZ9
1	600	701	799	900
2	599	702	797	901
3	600	702	798	901
4	599	702	799	900
5	600	701	798	901

ตัวอย่าง เปรียบเทียบค่า I ของ BZ ที่ได้จากการคำนวณครั้งที่ 1 และค่า nominal value

t-Test: Paired Two Sample for Means		
	ค่า I ที่ได้จากการคำนวณครั้งที่ 1	nominal value
Mean	750.0342	750
Variance	16669.027	16666.67
Observations	4	4
Pearson Correlation	0.9999764	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	3	
t Stat	0.07714	
P(T<=t) one-tail	0.4716827	
t Critical one-tail	2.353363	
P(T<=t) two-tail	0.9433653	
t Critical two-tail	3.1824	

สรุป t Stat (0.07714) น้อยกว่า t Critical two-tail (3.1824)

ดังนั้นค่า I ของ BZ ที่ได้จากการคำนวณครั้งที่ 1 และค่า nominal value ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เมื่อใช้วิธีทางสถิติในทำนองเดียวกันนี้ จะได้ผลการเปรียบเทียบค่า I ของ BZ ที่ได้จากการคำนวณครั้งที่ 2 ถึง 5 และค่า nominal value ซึ่งสรุปผลได้ดังนี้

t-Test: Paired Two Sample for Means

ครั้งที่	t Stat	t Critical two-tail	สรุป
1	0.07714	3.1824	t Stat น้อยกว่า t Critical two-tail แสดงว่าค่า I ของ BZ ที่ได้จากการคำนวณ (จากการวิเคราะห์สารภายในวันเดียวกันโดยใช้บัพเฟอร์ชุดเดียวกัน) และค่า nominal value ของ BZ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
2	0.06774	3.1824	
3	0.04441	3.1824	
4	0.05195	3.1824	
5	0.10741	3.1824	



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง ผ6 เปรียบเทียบค่า I ของ BZ ที่ได้จากการคำนวณ (จากการวิเคราะห์สารต่างวันกันโดยใช้ บัพเฟอร์ชุดเดียวกัน) และค่า nominal value ของ I ของ BZ (600, 700, 800 และ 900 สำหรับ BZ6, BZ7, BZ8 และ BZ9 ตามลำดับ) โดยทำการวิเคราะห์ 5 วันและซ้ำวันละ 2 ครั้ง ($n = 10$)

ครั้งที่	ค่า I ที่ได้จากการคำนวณ (ข้อมูลของ I จากตาราง 4.1)			
	BZ6	BZ7	BZ8	BZ9
1	597	705	798	900
2	598	705	798	900
3	599	704	796	901
4	598	704	797	900
5	599	703	798	901
6	598	704	798	900
7	598	703	800	899
8	599	702	801	899
9	600	701	799	900
10	599	702	797	901

ตัวอย่าง เปรียบเทียบค่า I ของ BZ ที่ได้จากการคำนวณครั้งที่ 1 และค่า nominal value

t-Test: Paired Two Sample for Means		
	ค่า I ที่ได้จากการคำนวณครั้งที่ 1	nominal value
Mean	750.02826	750
Variance	16678.688	16666.67
Observations	4	4
Pearson Correlation	0.9996846	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	3	
t Stat	0.01743	
P(T<=t) one-tail	0.4935956	
t Critical one-tail	2.353363	
P(T<=t) two-tail	0.9871911	
t Critical two-tail	3.1824	

สรุป t Stat (0.01743) น้อยกว่า t Critical two-tail (3.1824)

ดังนั้นค่า t ของ BZ ที่ได้จากการคำนวณครั้งที่ 1 และค่า nominal value ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เมื่อใช้วิธีทางสถิติในทำนองเดียวกันนี้ จะได้ผลการเปรียบเทียบค่า t ของ BZ ที่ได้จากการคำนวณครั้งที่ 2 ถึง 10 และค่า nominal value ซึ่งสรุปผลได้ดังนี้

t-Test: Paired Two Sample for Means

ครั้งที่	t Stat	t Critical two-tail	สรุป
1	0.01743	3.1824	t Stat น้อยกว่า t Critical two-tail แสดงว่าค่า t ของ BZ ที่ได้จากการคำนวณ (จากการวิเคราะห์สารต่างวันกันโดยใช้บัพเฟอร์ชุดเดียวกัน) และค่า nominal value ของ BZ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
2	0.05161	3.1824	
3	-0.04953	3.1824	
4	-0.04365	3.1824	
5	-0.06277	3.1824	
6	0.01967	3.1824	
7	0.01652	3.1824	
8	-0.07493	3.1824	
9	0.07714	3.1824	
10	0.06774	3.1824	

ตาราง ผ7 เปรียบเทียบค่า I ของ BZ ที่ได้จากการคำนวณ (จากการวิเคราะห์สารวันเดียวกันโดยใช้ บัพเฟอร์ต่างชุดกัน) และค่า nominal value ของ I ของ BZ (600, 700, 800 และ 900 สำหรับ BZ6, BZ7, BZ8 และ BZ9 ตามลำดับ) โดยใช้บัพเฟอร์ 5 ชุดและซ้ำชุดละ 2 ครั้ง ($n = 10$)

ครั้งที่	ค่า I ที่ได้จากการคำนวณ (ข้อมูลของ I จากตาราง 4.1)			
	BZ6	BZ7	BZ8	BZ9
1	601	700	798	902
2	601	701	795	903
3	600	702	796	902
4	601	702	795	903
5	601	701	796	902
6	601	700	796	903
7	599	703	796	902
8	599	702	797	901
9	601	700	798	902
10	601	699	798	902

ตัวอย่าง เปรียบเทียบค่า I ของ BZ ที่ได้จากการคำนวณครั้งที่ 1 และค่า nominal value

t-Test: Paired Two Sample for Means

	ค่า I ที่ได้จากการคำนวณครั้งที่ 1	nominal value
Mean	750.0635	750
Variance	16672.719	16666.67
Observations	4	4
Pearson Correlation	0.9999039	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	3	
t Stat	0.07096	
P(T<=t) one-tail	0.4739474	
t Critical one-tail	2.353363	
P(T<=t) two-tail	0.9478948	
t Critical two-tail	3.1824	

สรุป t Stat (0.07096) น้อยกว่า t Critical two-tail (3.1824)

ดังนั้นค่า t ของ BZ ที่ได้จากการคำนวณครั้งที่ 1 และค่า nominal value ไม่มีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เมื่อใช้วิธีทางสถิติในทำนองเดียวกันนี้ จะได้ผลการเปรียบเทียบค่า t ของ BZ ที่ได้จากการคำนวณครั้งที่ 2 ถึง 10 และค่า nominal value ซึ่งสรุปผลได้ดังนี้

t-Test: Paired Two Sample for Means			
ครั้งที่	t Stat	t Critical two-tail	สรุป
1	0.07096	3.1824	t Stat น้อยกว่า t Critical two-tail แสดงว่าค่า t ของ BZ ที่ได้จากการคำนวณ (จากการวิเคราะห์สารวันเดียวกัน โดยใช้บัพเฟอร์ต่างชุดกัน) และค่า nominal value ของ BZ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
2	0.02433	3.1824	
3	-0.03259	3.1824	
4	0.01623	3.1824	
5	0.04931	3.1824	
6	0.06449	3.1824	
7	0.00822	3.1824	
8	-0.03728	3.1824	
9	0.06478	3.1824	
10	0.00088	3.1824	

ตาราง ผ8 เปรียบเทียบค่า I ของ BZ ที่ได้จากการคำนวณ (จากการวิเคราะห์สารต่างวันกันโดยใช้ บัพเฟอร์ต่างชุดกัน) และค่า nominal value ของ I ของ BZ (600, 700, 800 และ 900 สำหรับ BZ6, BZ7, BZ8 และ BZ9 ตามลำดับ)

ครั้งที่	ค่า I ที่ได้จากการคำนวณ (ข้อมูลของ I จากตาราง 4.1)			
	BZ6	BZ7	BZ8	BZ9
1	601	700	798	902
2	601	701	795	903
3	597	704	799	899
4	598	704	800	899
5	597	705	801	898
6	597	704	801	898
7	599	704	797	901
8	598	704	799	900
9	600	701	799	900
10	599	702	797	901

ตัวอย่าง เปรียบเทียบค่า I ของ BZ ที่ได้จากการคำนวณครั้งที่ 1 และค่า nominal value

t-Test: Paired Two Sample for Means		
	ค่า I ที่ได้จากการคำนวณครั้งที่ 1	nominal value
Mean	750.0635	750
Variance	16672.719	16666.67
Observations	4	4
Pearson Correlation	0.9999039	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	3	
t Stat	0.07096	
P(T<=t) one-tail	0.4739474	
t Critical one-tail	2.353363	
P(T<=t) two-tail	0.9478948	
t Critical two-tail	3.1824	

สรุป t Stat (0.07096) น้อยกว่า t Critical two-tail (3.1824)

คั้งนั้นค่า t ของ BZ ที่ได้จากการคำนวณครั้งที่ 1 และค่า nominal value ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เมื่อใช้วิธีทางสถิติในทำนองเดียวกันนี้ จะได้ผลการเปรียบเทียบค่า t ของ BZ ที่ได้จากการคำนวณครั้งที่ 2 ถึง 10 และค่า nominal value ซึ่งสรุปผลได้ดังนี้

t -Test: Paired Two Sample for Means

No.	t Stat	t Critical two-tail	สรุป
1	0.07096	3.1824	t Stat น้อยกว่า t Critical two-tail แสดงว่าค่า t ของ BZ ที่ได้จากการคำนวณ (จากการวิเคราะห์สารต่างวันกันโดยใช้บัพเฟอร์ต่างชุดกัน) และค่า nominal value ของ BZ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
2	0.02433	3.1824	
3	-0.06157	3.1824	
4	0.00916	3.1824	
5	-0.02968	3.1824	
6	-0.03015	3.1824	
7	0.02713	3.1824	
8	0.01176	3.1824	
9	0.07714	3.1824	
10	0.06774	3.1824	

ตาราง ๘9 เปรียบเทียบค่า k ของ homologous series ที่ได้จากการวิเคราะห์สารภายในวันเดียวกันโดยใช้บัพเฟอร์ชุดเดียวกัน โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำ 5 ครั้ง ($n = 5$) (ข้อมูลของ k จากตาราง 4.1)

PN11	PN10	PN9	PN8	BA11	BA10	BA9	BA8	PB11	PB10	PB9	PB8
34.814	15.444	7.194	3.364	88.978	40.040	17.955	7.992	51.558	21.344	8.822	3.962
34.568	15.335	7.245	3.354	88.578	40.673	17.955	7.940	51.506	21.554	8.813	3.974
34.684	15.430	7.132	3.348	88.533	40.653	17.946	7.984	51.338	21.484	8.943	3.993
35.165	15.203	7.107	3.345	88.222	40.928	17.883	7.956	51.558	21.576	8.862	3.986
34.698	15.132	7.200	3.354	88.444	40.612	17.928	7.976	51.128	21.326	8.804	3.945

Anova: Single Factor

SUMMARY

ครั้งที่	Count	Sum	Average	Variance
1	12	301.468	25.1223	641.262
2	12	301.497	25.1247	637.779
3	12	301.467	25.1223	636.292
4	12	301.791	25.1493	636.287
5	12	300.547	25.0456	635.218

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0.0739818	4	0.01850	2.90185E-05	1.00000	2.539686
Within Groups	35055.211	55	637.367			
Total	35055.285	59				

สรุป $F (2.90185E-05)$ น้อยกว่า $F_{crit} (2.539686)$

ดังนั้นค่า k ของ homologous series ที่ได้จากการวิเคราะห์สารภายในวันเดียวกันโดยใช้บัพเฟอร์ชุดเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตาราง ม10 เปรียบเทียบค่า k ของ homologous series ที่ได้จากการวิเคราะห์สารต่างวันกันโดยใช้ บัฟเฟอร์ชุดเดียวกัน โดยทำการวิเคราะห์ 5 วันและซ้ำวันละ 2 ครั้ง ($n = 10$) (ข้อมูลของ k จากตาราง 4.1)

PN11	PN10	PN9	PN8	BA11	BA10	BA9	BA8	PB11	PB10	PB9	PB8
34.786	15.710	7.058	3.251	88.388	39.734	17.324	7.720	52.756	21.310	8.287	3.911
34.832	15.833	7.080	3.264	88.265	40.046	17.163	7.682	52.732	21.093	8.252	3.895
34.488	15.314	7.190	3.327	88.490	40.906	17.844	7.985	52.474	22.005	8.840	3.894
35.232	15.031	7.149	3.208	88.224	41.567	17.717	7.976	52.468	22.320	8.978	3.949
34.232	15.228	7.015	3.289	88.735	40.259	17.254	7.407	51.160	21.361	8.651	3.805
34.885	15.822	7.117	3.354	88.061	41.095	17.260	7.491	50.378	21.516	8.624	3.811
35.967	16.178	7.351	3.325	89.347	41.302	17.512	7.974	52.679	21.770	8.655	3.911
34.592	15.956	7.455	3.258	89.000	41.142	18.095	8.031	53.075	22.706	8.791	3.924
34.814	15.444	7.194	3.364	88.978	40.040	17.955	7.992	51.558	21.344	8.822	3.962
34.568	15.335	7.245	3.354	88.578	40.673	17.955	7.940	51.506	21.554	8.813	3.974

Anova: Single Factor

SUMMARY

ครั้งที่	Count	Sum	Average	Variance
1	12	300.2359	25.0197	643.422
2	12	300.1364	25.0114	643.158
3	12	302.7574	25.2298	642.289
4	12	303.8196	25.3183	642.962
5	12	298.3966	24.8664	641.266
6	12	299.4142	24.9512	631.442
7	12	305.9724	25.4977	656.099
8	12	306.0256	25.5021	649.440
9	12	301.4678	25.1223	641.262
10	12	301.4965	25.1247	637.779

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	5.22124	9	0.58014	9.02360E-04	1.00000	1.966054
Within Groups	70720.3	110	642.912			
Total	70725.5	119				

สรุป $F(9.02360E-04)$ น้อยกว่า $F_{crit}(1.966054)$

ดังนั้นค่า k ของ homologous series ที่ได้จากการวิเคราะห์สารต่างวันกันโดยใช้บัฟเฟอร์ชุดเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตาราง ม11 เปรียบเทียบค่า k ของ homologous series ที่ได้จากการวิเคราะห์สารวันเดียวกันโดยใช้
บัพเฟอร์ต่างชุดกัน โดยใช้บัพเฟอร์ 5 ชุดและซ้ำชุดละ 2 ครั้ง ($n = 10$) (ข้อมูลของ k จากตาราง 4.1)

PN11	PN10	PN9	PN8	BA11	BA10	BA9	BA8	PB11	PB10	PB9	PB8
34.078	15.146	7.116	3.392	88.102	39.245	17.268	7.950	51.759	21.918	8.931	3.981
34.704	15.329	7.158	3.397	88.265	40.046	17.300	7.980	51.578	22.067	8.975	3.997
35.211	15.413	7.218	3.337	88.469	39.771	17.134	7.911	51.393	21.585	8.864	3.925
34.648	15.413	7.194	3.339	88.265	40.802	17.300	7.921	51.310	21.990	8.868	3.940
35.352	15.459	7.224	3.313	89.729	39.880	17.580	7.961	51.082	21.078	8.649	3.846
35.645	15.570	7.249	3.320	89.449	39.486	17.054	7.785	50.337	21.221	8.641	3.848
34.704	15.329	7.158	3.386	89.542	40.547	17.192	7.930	51.530	21.601	8.855	3.931
34.632	15.297	7.167	3.403	89.500	40.528	17.323	7.970	51.434	21.781	8.912	3.971
34.967	15.370	7.017	3.281	89.667	39.486	17.355	7.985	51.434	21.892	8.987	3.997
34.763	15.899	7.286	3.441	88.306	40.065	17.589	7.954	51.214	21.727	8.907	3.940

Anova: Single Factor

SUMMARY

ครั้งที่	Count	Sum	Average	Variance
1	12	298.8877	24.9073	629.724
2	12	300.7967	25.0664	633.042
3	12	300.2311	25.0193	635.900
4	12	300.9901	25.0825	634.485
5	12	301.1532	25.0961	650.143
6	12	299.6055	24.9671	643.785
7	12	301.7054	25.1421	650.235
8	12	301.9184	25.1599	648.319
9	12	301.4375	25.1198	648.412
10	12	301.0915	25.0910	630.648

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0.67723	9	0.07525	1.17489E-04	1.00000	1.966054
Within Groups	70451.6	110	640.469			
Total	70452.3	119				

สรุป $F(1.17489E-04)$ น้อยกว่า $F_{crit}(1.966054)$

ดังนั้นค่า k ของ homologous series ที่ได้จากการวิเคราะห์สารวันเดียวกันโดยใช้บัพเฟอร์ต่าง
ชุดกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตาราง ผ12 เปรียบเทียบค่า k ของ homologous series ที่ได้จากการวิเคราะห์สารต่างวันกันโดยใช้ บัพเฟอร์ต่างชุดกัน โดยทำการวิเคราะห์ 5 วันและซ้ำวันละ 2 ครั้ง ($n = 10$) (ข้อมูลของ k จากตาราง 4.1)

PN11	PN10	PN9	PN8	BA11	BA10	BA9	BA8	PB11	PB10	PB9	PB8
34.078	15.146	7.116	3.392	88.102	39.245	17.268	7.950	51.759	21.918	8.931	3.981
34.704	15.329	7.158	3.397	88.265	40.046	17.300	7.980	51.578	22.067	8.975	3.997
34.250	15.166	7.026	3.244	89.778	41.224	17.489	7.623	51.375	21.632	8.371	3.941
34.814	15.103	7.120	3.237	89.578	41.133	17.526	7.606	50.741	21.862	8.745	3.963
34.793	15.199	7.040	3.373	89.447	39.290	17.089	7.672	51.220	21.212	8.537	3.760
34.744	15.177	7.007	3.374	89.362	39.623	17.143	7.692	51.171	21.192	8.528	3.767
34.420	15.634	7.237	3.486	89.543	40.382	17.528	7.876	51.848	21.223	8.924	3.957
34.168	15.419	7.239	3.475	89.000	40.940	17.571	7.934	51.747	21.292	8.868	3.957
34.814	15.444	7.194	3.364	88.978	40.040	17.955	7.992	51.558	21.344	8.822	3.962
34.568	15.335	7.245	3.354	88.578	40.673	17.955	7.940	51.506	21.554	8.813	3.974

Anova: Single Factor

SUMMARY

ครั้งที่	Count	Sum	Average	Variance
1	12	298.8877	24.9073	629.724
2	12	300.7967	25.0664	633.042
3	12	301.1175	25.0931	656.670
4	12	301.4259	25.1188	650.509
5	12	298.6313	24.8859	647.865
6	12	298.7786	24.8982	647.443
7	12	302.0578	25.1715	649.307
8	12	301.6094	25.1341	643.920
9	12	301.4678	25.1223	641.262
10	12	301.4965	25.1247	637.779

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	1.31731	9	0.14637	2.27367E-04	1.00000	1.966054
Within Groups	70812.7	110	643.752			
Total	70814.1	119				

สรุป $F (2.27367E-04)$ น้อยกว่า $F_{crit} (1.966054)$

ดังนั้นค่า k ของ homologous series ที่ได้จากการวิเคราะห์สารต่างวันกันโดยใช้บัพเฟอร์ต่างชุดกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตาราง ผ13 เปรียบเทียบค่า I ของ homologous series ที่ได้จากการวิเคราะห์สารถภายในวันเดียวกัน โดยใช้บัพเฟอร์ชุดเดียวกัน โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำ 5 ครั้ง ($n = 5$) (ข้อมูลของ I จากตาราง 4.1)

PN11	PN10	PN9	PN8	BA11	BA10	BA9	BA8	PB11	PB10	PB9	PB8
787	700	618	537	888	802	716	630	829	735	640	554
787	700	620	537	888	804	717	629	829	736	640	555
788	701	618	536	888	805	717	630	830	736	642	555
789	698	616	535	888	805	716	629	830	736	640	554
787	698	618	536	887	803	716	629	828	734	639	553

Anova: Single Factor

SUMMARY

ครั้งที่	Count	Sum	Average	Variance
1	12	8437.22	703.102	12217.8
2	12	8442.20	703.517	12206.7
3	12	8444.52	703.710	12300.3
4	12	8437.10	703.092	12416.9
5	12	8428.55	702.379	12255.5

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	12.569525	4	3.14238	2.55906E-04	1.00000	2.539686
Within Groups	675367.82	55	12279.4			
Total	675380	59				

สรุป $F(2.55906E-04)$ น้อยกว่า $F_{crit}(2.539686)$

ดังนั้นค่า I ของ homologous series ที่ได้จากการวิเคราะห์สารถภายในวันเดียวกันโดยใช้บัพเฟอร์ชุดเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตาราง ม14 เปรียบเทียบค่า I ของ homologous series ที่ได้จากการวิเคราะห์สารต่างวันกันโดยใช้ บัฟเฟอร์ชุดเดียวกัน โดยทำการวิเคราะห์ 5 วันและซ้ำวันละ 2 ครั้ง ($n = 10$) (ข้อมูลของ I จากตาราง 4.1)

PN11	PN10	PN9	PN8	BA11	BA10	BA9	BA8	PB11	PB10	PB9	PB8
788	703	618	536	887	802	714	628	832	736	635	556
789	705	619	536	889	804	714	628	833	736	635	555
789	703	623	541	889	807	719	634	834	741	645	558
791	700	622	536	888	808	718	633	833	742	646	558
787	700	617	536	889	804	713	623	830	736	639	551
789	705	620	539	888	807	714	625	828	738	640	553
792	707	624	540	888	807	716	632	832	739	641	557
789	707	626	538	889	807	720	634	834	744	643	558
787	700	618	537	888	802	716	630	829	735	640	554
787	700	620	537	888	804	717	629	829	736	640	555

Anova: Single Factor

SUMMARY

ครั้งที่	Count	Sum	Average	Variance
1	12	8436.182	703.0152	12351.891
2	12	8443.142	703.5952	12471.751
3	12	8483.535	706.9613	12120.728
4	12	8476.663	706.3886	12292.071
5	12	8424.895	702.0746	12545.848
6	12	8445.799	703.8166	12336.390
7	12	8475.286	706.2739	12208.584
8	12	8489.624	707.4687	12253.426
9	12	8437.224	703.1020	12217.752
10	12	8442.204	703.5170	12206.675

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	404.77	9	44.97445	3.65631E-03	1.00000	1.966054
Within Groups	1353056	110	12300.512			
Total	1353461	119				

สรุป $F(3.65631E-03)$ น้อยกว่า $F_{crit}(1.966054)$

ดังนั้นค่า I ของ homologous series ที่ได้จากการวิเคราะห์สารต่างวันกันโดยใช้บัฟเฟอร์ชุดเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตาราง ฅ15 เปรียบเทียบค่า I ของ homologous series ที่ได้จากการวิเคราะห์สารวันเดียวกันโดยใช้
บัพเฟอร์ต่างชุดกัน โดยใช้บัพเฟอร์ 5 ชุดและซ้ำชุดละ 2 ครั้ง ($n = 10$) (ข้อมูลของ I จากตาราง 4.1)

PN11	PN10	PN9	PN8	BA11	BA10	BA9	BA8	PB11	PB10	PB9	PB8
788	700	619	539	890	803	714	631	833	740	643	556
790	701	618	537	891	805	714	630	833	740	642	554
792	703	621	537	892	805	714	630	833	739	643	555
789	702	620	538	889	807	715	631	831	740	643	556
791	702	620	535	892	804	716	630	831	735	639	551
793	704	621	537	892	804	713	629	830	737	640	553
788	700	618	537	890	805	713	629	831	737	641	553
787	699	618	537	890	804	713	629	830	738	641	554
789	701	617	536	889	802	714	631	830	739	644	557
788	705	621	541	888	804	716	631	830	738	643	556

Anova: Single Factor

SUMMARY

ครั้งที่	Count	Sum	Average	Variance
1	12	8455.538	704.6281	12268.226
2	12	8453.615	704.4679	12518.392
3	12	8462.592	705.2160	12495.563
4	12	8460.961	705.0801	12294.938
5	12	8447.899	703.9916	12632.653
6	12	8452.558	704.3798	12565.115
7	12	8443.598	703.6332	12426.801
8	12	8441.297	703.4414	12353.605
9	12	8450.967	704.2473	12222.136
10	12	8460.270	705.0225	12025.669

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	39.226	9	4.35844	3.52046E-04	1.00000	1.966054
Within Groups	1361834	110	12380.310			
Total	1361873	119				

สรุป $F(3.52046E-04)$ น้อยกว่า $F_{crit}(1.966054)$

ดังนั้นค่า I ของ homologous series ที่ได้จากการวิเคราะห์สารวันเดียวกันโดยใช้บัพเฟอร์ต่าง
ชุดกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตาราง ม16 เปรียบเทียบค่า I ของ homologous series ที่ได้จากการวิเคราะห์สารต่างวันกันโดยใช้ บัฟเฟอร์ต่างชุดกัน โดยทำการวิเคราะห์ 5 วันและซ้ำวันละ 2 ครั้ง ($n = 10$) (ข้อมูลของ I จากตาราง 4.1)

PN11	PN10	PN9	PN8	BA11	BA10	BA9	BA8	PB11	PB10	PB9	PB8
788	700	619	539	890	803	714	631	833	740	643	556
790	701	618	537	891	805	714	630	833	740	642	554
783	696	613	530	887	803	711	622	827	734	632	551
785	696	615	530	887	803	712	622	826	735	637	552
784	695	612	533	885	797	707	621	825	730	633	545
784	695	612	534	885	798	708	622	825	731	633	546
788	704	622	544	890	805	716	631	832	736	644	557
786	701	620	542	888	805	715	630	830	735	642	556
787	700	618	537	888	802	716	630	829	735	640	554
787	700	620	537	888	804	717	629	829	736	640	555

Anova: Single Factor

SUMMARY

ครั้งที่	Count	Sum	Average	Variance
1	12	8455.538	704.6281	12268.226
2	12	8453.615	704.4679	12518.392
3	12	8390.861	699.2384	12647.813
4	12	8399.479	699.9566	12524.275
5	12	8366.716	697.2264	12492.775
6	12	8373.499	697.7916	12457.304
7	12	8468.027	705.6689	11999.631
8	12	8451.834	704.3195	12020.973
9	12	8437.224	703.1020	12217.752
10	12	8442.204	703.5170	12206.675

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	1051.85	9	116.87252	9.47458E-03	1.00000	1.966054
Within Groups	1356892	110	12335.382			
Total	1357944	119				

สรุป $F(9.47458E-03)$ น้อยกว่า $F_{crit}(1.966054)$

ดังนั้นค่า I ของ homologous series ที่ได้จากการวิเคราะห์สารต่างวันกัน โดยใช้บัฟเฟอร์ต่างชุดกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตาราง ผ17 เปรียบเทียบค่าความชันของสมการเส้นตรง I กับ [SDS] และค่าศูนย์ (เมื่อใช้ความเข้มข้นของ SDS ตั้งแต่ 100 ถึง 200 mM) (ข้อมูลของค่า I จากรูป 4.2b)

ค่าความชัน		ค่าความชัน	
BZ6	0.0195	BA8	0.0780
BZ7	-0.0102	BA9	0.0491
BZ8	-0.0338	BA10	0.0115
BZ9	0.0278	BA11	0.0221
PN8	0.0387	PB8	-0.0065
PN9	0.0084	PB9	0.0502
PN10	0.0482	PB10	0.0046
PN11	0.0087	PB11	-0.0439

t-Test: Paired Two Sample for Means

	ความชันของสมการเส้นตรง I กับ [SDS]	ค่าศูนย์
Mean	0.017025	0
Variance	0.001024	0
Observations	16	16
Pearson Correlation	#DIV/0!	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	15	
t Stat	2.1285	
P(T<=t) one-tail	0.025142	
t Critical one-tail	1.753051	
P(T<=t) two-tail	0.050284	
t Critical two-tail	2.1315	

สรุป t Stat (2.1285) น้อยกว่า t Critical two-tail (2.1315)

ดังนั้นค่าความชันของสมการเส้นตรง I กับ [SDS] และค่าศูนย์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตาราง ๗18 เปรียบเทียบค่า $\ln k$ ของ BZ ที่ได้จากการใช้กระแสไฟฟ้าคงที่และกำลังไฟฟ้าคงที่ที่อุณหภูมิเดียวกัน

อุณหภูมิ, °C	ค่า $\ln k$ จากการใช้กระแสไฟฟ้าคงที่				ค่า $\ln k$ จากการใช้กำลังไฟฟ้าคงที่			
	B6	BZ7	BZ8	BZ9	BZ6	BZ7	BZ8	BZ9
15	1.851	2.893	3.819	4.749	1.864	2.934	3.852	4.813
20	1.838	2.868	3.768	4.723	1.847	2.877	3.789	4.756
25	1.831	2.844	3.760	4.659	1.814	2.861	3.740	4.635
30	1.786	2.800	3.703	4.609	1.785	2.776	3.699	4.567
35	1.782	2.755	3.634	4.550	1.745	2.722	3.590	4.519
40	1.737	2.696	3.557	4.446	1.712	2.666	3.535	4.434

Anova: Single Factor

SUMMARY

	Count	Sum	Average	Variance
ค่า $\ln k$ จากการใช้กระแสไฟฟ้าคงที่	24	77.65936	3.2358068	1.14821
ค่า $\ln k$ จากการใช้กำลังไฟฟ้าคงที่	24	77.53111	3.2304627	1.157626

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0.000343	1	0.0003427	0.000297	0.986319	4.051742
Within Groups	53.03423	46	1.152918			
Total	53.03457	47				

สรุป $F (0.000297)$ น้อยกว่า $F_{crit} (4.051742)$

ดังนั้นค่า $\ln k$ ของ BZ ที่ได้จากการใช้กระแสไฟฟ้าคงที่และกำลังไฟฟ้าคงที่ที่อุณหภูมิเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตาราง ผ19 เปรียบเทียบค่าความชันของสมการเส้นตรง I กับ T และค่าศูนย์ (เมื่อใช้อุณหภูมิตั้งแต่ 15 ถึง 40 °C) (ข้อมูลของค่า I จากรูป 4.5c)

	ค่าความชัน		ค่าความชัน
BZ6	-0.0471	BA8	0.1577
BZ7	-0.0555	BA9	0.0465
BZ8	0.2600	BA10	0.1107
BZ9	0.1516	BA11	0.0339
PN8	-0.0123	PB8	-0.2947
PN9	0.1017	PB9	-0.2113
PN10	-0.0573	PB10	-0.1456
PN11	0.0842	PB11	-0.2526

t-Test: Paired Two Sample for Means

	ความชันของสมการเส้นตรง I กับ T	ค่าศูนย์
Mean	-0.008131	0
Variance	0.0248418	0
Observations	16	16
Pearson Correlation	#DIV/0!	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	15	
t Stat	-0.2064	
P(T<=t) one-tail	0.4196423	
t Critical one-tail	1.753051	
P(T<=t) two-tail	0.8392846	
t Critical two-tail	2.1315	

สรุป t Stat (-0.2064) น้อยกว่า t Critical two-tail (2.1315)

ดังนั้นค่าความชันของสมการเส้นตรง I กับ T และค่าศูนย์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

นาง ผ20 เปรียบเทียบค่าความชันของสมการเส้นตรง I กับศักย์ไฟฟ้า และค่าศูนย์ (เมื่อใช้ศักย์ไฟฟ้า ตั้งแต่ -10 ถึง 20 kV) (ข้อมูลของค่า I จากรูป 4.8b)

	ค่าความชัน		ค่าความชัน
6	-0.0799	BA8	-0.0870
7	0.0330	BA9	-0.0432
8	0.1927	BA10	-0.3232
9	-0.1318	BA11	-0.0950
8	0.0242	PB8	-0.7715
9	0.1227	PB9	-0.6790
10	0.1741	PB10	-0.8215
11	0.2841	PB11	-0.9237

t-Test: Paired Two Sample for Means

	ความชันของสมการเส้นตรง I กับศักย์ไฟฟ้า	ค่าศูนย์
Mean	-0.19531	0
Variance	0.15237	0
Observations	16	16
Pearson Correlation	#DIV/0!	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	15	
t Stat	-2.0014	
T<=t) one-tail	0.031888	
Critical one-tail	1.753051	
T<=t) two-tail	0.063776	
Critical two-tail	2.1315	

รูป t Stat (-2.0014) น้อยกว่า t Critical two-tail (2.1315)

ดังนั้นค่าความชันของสมการเส้นตรง I กับศักย์ไฟฟ้า และค่าศูนย์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตาราง ผ21 เปรียบเทียบค่า $\log K_{ow}$ ของ homologous series ที่ได้จากการทำนายใน MEEKC โดยใช้กราฟสอบเทียบของ $\log K_{ow}$ กับ $\log k$ และ $\log K_{ow}$ กับ I (ข้อมูลของค่า I จากรูป 4.2b)

	ค่า $\log K_{ow}$		ค่า $\log K_{ow}$		
	ที่ทำนาย	ที่ทำนาย	ที่ทำนาย	ที่ทำนาย	
	จากค่า $\log k$	จากค่า I	จากค่า $\log k$	จากค่า I	
PN8	1.72	1.72	BA10	3.11	3.11
PN9	2.13	2.13	BA11	3.56	3.56
PN10	2.56	2.56	PB8	1.78	1.78
PN11	3.02	3.02	PB9	2.24	2.24
BA8	2.19	2.18	PB10	2.75	2.75
BA9	2.62	2.62	PB11	3.22	3.22

t-Test: Paired Two Sample for Means

	ค่า $\log K_{ow}$ ที่ทำนายจากค่า $\log k$	ค่า $\log K_{ow}$ ที่ทำนายจากค่า I
Mean	2.57500	2.57417
Variance	0.33863	0.33934
Observations	12	12
Pearson Correlation	0.99999	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	11	
t Stat	1.00000	
P(T<=t) one-tail	0.16940	
t Critical one-tail	1.79588	
P(T<=t) two-tail	0.33880	
t Critical two-tail	2.20099	

สรุป t Stat (1.00000) น้อยกว่า t Critical two-tail (2.20099)

ดังนั้นค่า $\log K_{ow}$ ของ homologous series ที่ได้จากการทำนายใน MEEKC โดยใช้กราฟสอบเทียบของ $\log K_{ow}$ กับ $\log k$ และ $\log K_{ow}$ กับ I ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตาราง ผ22 เปรียบเทียบค่า $\log K_{ow}$ ของ homologous series ที่ได้จากการทำนายใน MEEKC โดยใช้กราฟสอบเทียบของ $\log K_{ow}$ กับ $\log k$ และการอ้างอิง (ข้อมูลจากตาราง 4.6)

	ค่า $\log K_{ow}$	
	ที่ทำนายจากค่า $\log k$	จากการอ้างอิง
PN8	1.72	1.58
PN9	2.13	2.20
PN10	2.56	2.66
PN11	3.02	3.11
BA8	2.19	2.12
BA9	2.62	2.64
PB8	1.78	1.96

t-Test: Paired Two Sample for Means

	ค่า $\log K_{ow}$ ที่ทำนายจากค่า $\log k$	ค่า $\log K_{ow}$ จากการอ้างอิง
Mean	2.28857	2.32429
Variance	0.22255	0.26226
Observations	7	7
Pearson Correlation	0.97875	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	6	
t Stat	-0.86637	
P(T<=t) one-tail	0.20979	
t Critical one-tail	1.94318	
P(T<=t) two-tail	0.41958	
t Critical two-tail	2.44691	

สรุป *t* Stat (-0.86637) น้อยกว่า *t* Critical two-tail (2.44691)

ดังนั้นค่า $\log K_{ow}$ ของ homologous series ที่ได้จากการทำนายใน MEEKC โดยใช้กราฟสอบเทียบของ $\log K_{ow}$ กับ $\log k$ และการอ้างอิงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตาราง ผ23 เปรียบเทียบค่า $\log K_{ow}$ ของ homologous series ที่ได้จากการทำนายใน MEEKC โดยใช้กราฟสอบเทียบของ $\log K_{ow}$ กับ I และการอ้างอิง (ข้อมูลจากตาราง 4.6)

	ค่า $\log K_{ow}$	
	ที่ทำนายจากค่า I	จากการอ้างอิง
PN8	1.72	1.58
PN9	2.13	2.20
PN10	2.56	2.66
PN11	3.02	3.11
BA8	2.18	2.12
BA9	2.62	2.64
PB8	1.78	1.96

t-Test: Paired Two Sample for Means

	ค่า $\log K_{ow}$ ที่ทำนายจากค่า $\log k$	ค่า $\log K_{ow}$ จากการอ้างอิง
Mean	2.28714	2.32429
Variance	0.22289	0.26226
Observations	7	7
Pearson Correlation	0.97941	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	6	
t Stat	-0.91411	
P(T<=t) one-tail	0.19795	
t Critical one-tail	1.94318	
P(T<=t) two-tail	0.39591	
t Critical two-tail	2.44691	

สรุป t Stat (-0.91411) น้อยกว่า t Critical two-tail (2.44691)

ดังนั้นค่า $\log K_{ow}$ ของ homologous series ที่ได้จากการทำนายใน MEEKC โดยใช้กราฟสอบเทียบของ $\log K_{ow}$ กับ I และการอ้างอิงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตาราง ผ24 เปรียบเทียบค่า $\log k$ ของ homologous series ใน MEEKC ที่ได้จากการทดลองและทำนาย เมื่อใช้ความเข้มข้นของ SDS 130 mM (ข้อมูลจากรูป 4.12a)

	ค่า $\log k$		ค่า $\log k$		
	จากการทดลอง	จากการทำนาย	จากการทดลอง	จากการทำนาย	
BZ6	0.63	0.66	BA8	0.75	0.74
BZ7	1.06	1.07	BA9	1.09	1.09
BZ8	1.44	1.47	BA10	1.46	1.44
BZ9	1.87	1.88	BA11	1.79	1.79
PN8	0.4	0.36	PB8	0.41	0.46
PN9	0.75	0.71	PB9	0.78	0.84
PN10	1.09	1.05	PB10	1.19	1.21
PN11	1.45	1.40	PB11	1.57	1.59

t-Test: Paired Two Sample for Means

	ค่า $\log k$ จากการทดลอง	ค่า $\log k$ จากการทำนาย
Mean	1.10813	1.11000
Variance	0.21339	0.21208
Observations	16	16
Pearson Correlation	0.99740	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	15	
t Stat	-0.22515	
P(T<=t) one-tail	0.41245	
t Critical one-tail	1.75305	
P(T<=t) two-tail	0.82490	
t Critical two-tail	2.13145	

สรุป t Stat (-0.22515) น้อยกว่า t Critical two-tail (2.13145)

ดังนั้นค่า $\log k$ ของ homologous series ใน MEEKC ที่ได้จากการทดลองและทำนาย เมื่อใช้ความเข้มข้นของ SDS 130 mM ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตาราง ผ25 เปรียบเทียบค่า $\log k$ ของ homologous series ใน MEEKC ที่ได้จากการทดลองและทำนาย เมื่อใช้ความเข้มข้นของ SDS 190 mM (ข้อมูลจากรูป 4.12b)

	ค่า $\log k$			ค่า $\log k$	
	จากการทดลอง	จากการทำนาย		จากการทดลอง	จากการทำนาย
BZ6	0.79	0.81	BA8	0.92	0.89
BZ7	1.22	1.22	BA9	1.25	1.25
BZ8	1.60	1.62	BA10	1.62	1.60
BZ9	2.01	2.02	BA11	1.94	1.95
PN8	0.50	0.52	PB8	0.55	0.51
PN9	0.83	0.86	PB9	0.93	0.88
PN10	1.18	1.21	PB10	1.32	1.26
PN11	1.53	1.55	PB11	1.67	1.64

t-Test: Paired Two Sample for Means

	ค่า $\log k$ จากการทดลอง	ค่า $\log k$ จากการทำนาย
Mean	1.24125	1.23688
Variance	0.21528	0.21846
Observations	16	16
Pearson Correlation	0.99800	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	15	
t Stat	0.59006	
P(T<=t) one-tail	0.28197	
t Critical one-tail	1.75305	
P(T<=t) two-tail	0.56393	
t Critical two-tail	2.13145	

สรุป t Stat (0.59006) น้อยกว่า t Critical two-tail (2.13145)

ดังนั้นค่า $\log k$ ของ homologous series ใน MEEKC ที่ได้จากการทดลองและทำนาย เมื่อใช้ความเข้มข้นของ SDS 190 mM ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ภาคผนวก ข

การเผยแพร่ผลงานวิจัย

1. ตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ

- 1) K. Poouthree, N. Leepipatpiboon, A. Petsom, and T. Nhujak “Retention factor and retention index of homologous series compounds in microemulsion electrokinetic chromatography employing suppressed electroosmosis” *Electrophoresis*, 28 (2007), 767-778. (IF = 3.850)

2. นำเสนอในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

- 1) K. Poouthree, N. Leepipatpiboon, A. Petsom, T. Nhujak “Retention factor and retention index of homologous series compounds in microemulsion electrokinetic chromatography employing suppressed electroosmosis” *Poster Presentation*, The 27th International Symposium on Microscale Bioseparations, Vancouver, Canada, 14-18 January 2007.
- 2) K. Poouthree, N. Leepipatpiboon, A. Petsom, T. Nhujak “Retention factor and retention index of homologous series compounds in microemulsion electrokinetic chromatography employing suppressed electroosmosis” *Poster Presentation*, The First Mathematics and Physical Science Graduate Congress, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 6-7 December 2005.

3. นำเสนอในที่ประชุมวิชาการระดับชาติ

- 1) K. Poouthree, N. Leepipatpiboon, A. Petsom, T. Nhujak “Retention factor and retention index of homologous series compounds in microemulsion electrokinetic chromatography employing suppressed electroosmosis” นำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยครั้งที่ 31 ที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา วันที่ 18-20 ตุลาคม 2548
- 2) K. Poouthree, N. Leepipatpiboon, A. Petsom, T. Nhujak “Retention factor and retention index of homologous series compounds in microemulsion electrokinetic chromatography employing suppressed electroosmosis” นำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ ในการจัดประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่อง Interfaces of Analytical Sciences: Workshop of U.S. and Thai Analytical Sciences ณ โรงแรมอมารีริมน้ำ จังหวัดเชียงใหม่ วันที่ 4 - 8 มกราคม 2549



ภาคผนวก ค
ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Kieatsuda Poothree¹
Natchanun Leepipatpiboon¹
Amorn Petsom²
Thumnoon Nhujak¹

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

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

Received May 3, 2006

Revised September 20, 2006

Accepted September 22, 2006

Research Article

Retention factor and retention index of homologous series compounds in microemulsion electrokinetic chromatography employing suppressed electroosmosis

The retention factor (k) and retention index (I) of homologous series compounds such as alkylbenzenes (BZ), alkylaryl ketones, alkylbenzoates, and alkylparabens in microemulsion electrokinetic chromatography (MEEKC) with suppressed electroosmosis were investigated in a wide range of SDS concentrations ([SDS]), temperatures, and concentrations of organic cosolvents (ϕ). Using BZ as standards, the retention indices of other homologous series compounds were determined and they were found to be independent of [SDS] and temperature, while are dependent on the types and concentrations of organic cosolvents. The retention factor linearly increases with increasing [SDS], while linearly decreases with increasing temperature. The value of $\log k$ linearly decreases with increasing ϕ for methanol, ethanol, or ACN, while decreases by a second-degree polynomial with increasing ϕ for 2-propanol. Excellent agreement was found between the observed and predicted values of $\log k$ of analytes in MEEKC at given [SDS] and ϕ , where the predicted values were obtained from modified equations of the linear relationship of $\log k$ as functions of [SDS], the number of carbons, and ϕ . Therefore, both k and I can be used for peak identification of homologous series compounds.

Keywords:

Microemulsion electrokinetic chromatography / Octanol–water distribution constant / Organic cosolvent / Retention factor / Retention index

DOI 10.1002/elps.200600275

1 Introduction

Microemulsion electrokinetic chromatography (MEEKC), first introduced by Watarai [1], is one of the modes in CE in which the buffer used is a microemulsion containing oil droplets, such as octane, dispersed in an aqueous buffer in the presence of surfactant, such as SDS, as emulsifier. The interfacial tension is further lowered by the addition of a short chain alcohol, such as 1-butanol, resulting in the stability of the microemulsion system and optical transparency [2–4]. The oil droplets surrounding the surfactant and cosurfactant serve as a pseudostationary phase, similar to micellar

phase in MEKC. The separation of MEEKC is based on the difference in partitioning of analytes between the charged oil phase and the aqueous phase. Hydrophobic compounds favor partitioning into the oil droplet rather than into the buffer phase, and therefore, they have stronger retention in the oil droplet than do hydrophilic compounds. MEEKC can be used as a method for separation of charged and neutral analytes covering a wide range of water soluble and insoluble compounds [2–5].

Retention factor or capacity factor (k) is one of the characteristics that indicates retention behavior of analytes in chromatography and EKC such as MEEKC and MEKC. In MEEKC and MEKC, the retention factor is defined as the ratio of total moles of analyte in the pseudostationary phase versus those in the aqueous phase [2]. The higher the retention factor, the stronger the retention or the partitioning of analytes in the pseudostationary phase. An increase in the concentration of surfactant [4, 6–10] results in an increase in k in MEEKC, while a decrease in k is affected by an increase in temperature [6, 7, 10]. Joule heating caused by high voltage [6, 9], and the concentration of organic cosolvent [6, 7, 10, 11]. Types of surfactant [4], cosurfactant [4],

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

Abbreviations: BA, alkylbenzoates; BZ, alkylbenzenes; MEEKC, microemulsion electrokinetic chromatography; DDCV, dodecylcarboxylvaline; PB, alkylparabens; PN, alkylaryl ketones

and organic cosolvent [4, 6, 8] also influence a change in k . The relationship between $\log k$ of analytes in MEEKC and $\log K_{ow}$ was found to give a linear equation, where $\log K_{ow}$ is the octanol–water distribution constant of the analyte [11, 12]. Using standards with known $\log K_{ow}$, $\log k$ of the analyte may be determined using $\log k$ of the analyte obtained from MEEKC. Most of the previous MEEKC work mentioned above was carried out using high EOF [4, 5, 8–12], except for our previous work involving MEEKC with suppressed EOF [6–7].

Retention index (I) is another characteristic used for describing retention behavior, where I is the number, obtained by interpolation (usually logarithmic), relating the adjusted retention time or the retention factor of the analyte to the adjusted retention times of two standards eluted before and after the analyte [13]. In MEKC with EOF and using homologous series of alkylbenzenes (BZ) or alkyl-arylketones as retention index standards, the retention indices of analytes were obtained to be independent of the surfactant concentration, whereas slightly dependent on the temperature [13]. However, in MEKC with addition of organic solvents in the buffer, some variations (RSD < 3%) of retention index were found at different SDS concentrations [14]. The retention index can be used for identification of neutral analytes [13]. In addition, a good linear relationship between I and $\log K_{ow}$ was obtained [13]. Using the different surfactants as micellar phase in MEKC, the ΔI values, obtained from different micellar systems, can be used to elucidate the functional group selectivity of these specific micellar systems and to classify pseudostationary phases in MEKC [13]. Up-to-date, factors affecting the retention index of analytes in MEEKC have not been reported previously.

In MEEKC with high EOF and anionic surfactant, as shown in Fig. 1a, the neutral analyte, such as homologous series compounds of BZ, with higher hydrophobicity or greater number of carbons (z) has greater retention factor or favors partitioning into the pseudostationary phase, resulting in higher electrophoretic mobility along the direction toward the anode. Due to the electroosmotic mobility higher than the electrophoretic mobility of charged oil droplets and analytes, all the species migrate toward the cathode. Therefore, the migration times of species in Fig. 1a are in order: an EOF marker < the analyte with smaller k < the analyte with higher k < a microemulsion marker. In contrast to MEEKC without EOF and reversed polarity as shown in Fig. 1b, all species migrate only due to electrophoretic mobility, and therefore, a reversal of migration time order is observed. On the other hand, the greater the retention factor, the slower the migration time of analytes in MEEKC with high EOF, but the faster the migration time of analytes in MEEKC without EOF. In order to obtain short analysis time, MEEKC with high EOF is suitable for hydrophilic analytes with small k [2, 4], while MEEKC without EOF is suitable for hydrophobic analytes with high k [3, 6, 7, 15].

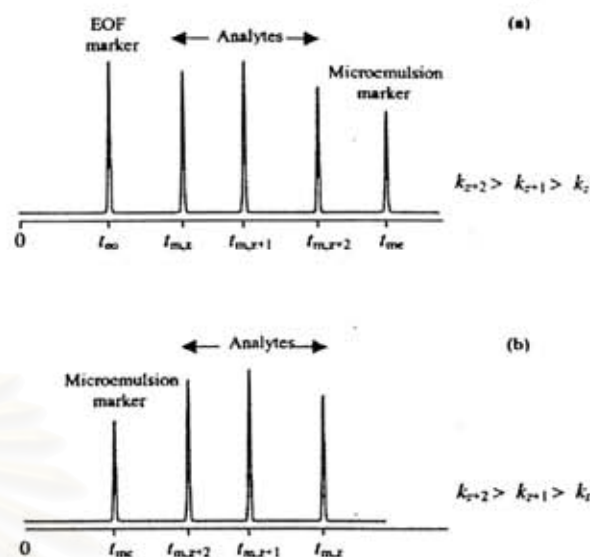


Figure 1. Electropherograms of neutral compounds in MEEKC using anionic surfactant and employing (a) with high EOF and normal polarity of applied voltage, and (b) without EOF and reversed polarity of applied voltage. t_{eof} , t_{me} and t_m are the migration times of an EOF marker, the charged oil droplet, and the analytes, respectively. z , $z + 1$ and $z + 2$ refer to the number of carbon atoms.

The aim of this work is to investigate the retention behaviors, such as retention factor and retention index, of homologous series of hydrophobic neutral compounds in MEEKC with suppressed EOF using an acidic buffer. The following parameters affecting these retention scales were determined: the SDS concentration, temperature, and types and concentrations of organic cosolvents. The equations were developed for prediction of retention factor of homologous series compounds in a wide range of the concentrations of SDS and organic cosolvents, and the observed values were compared with prediction.

Homologous series of BZ were chosen as standards because they are widely used as standards for studying retention factor and $\log K_{ow}$ in MEKC and MEEKC. In addition, BZ were found to be suitable retention index standards, in comparison with alkylaryl ketones (PN), in MEKC with anionic surfactant SDS [13]. Other homologous compounds, such as PN, alkylbenzoates (BA), and alkylparabens (PB), were used as test analytes in order to predict their retention factors using our modified equations with known z .

2 Materials and methods

2.1 Chemicals

Homologous series of BZ and BA were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland); benzene (BZ6), methylbenzene

(BZ7), ethylbenzene (BZ8), propylbenzene (BZ9), methylbenzoate (BA8), ethylbenzoate (BA9), propylbenzoate (BA10), and butylbenzoate (BA11). PN and PB were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany): acetophenone (PN8), propiophenone (PN9), butyrophenone (PN10), valerophenone (PN11), methylparaben (PB8), ethylparaben (PB9), propylparaben (PB10), butylparaben (PB11). *n*-Octane, 1-butanol, and sodium hydroxide were obtained from Fluka, SDS from Sigma (MO, USA), phosphoric acid and all organic solvents from Merck (Darmstadt, Germany), and dodecylbenzene/microemulsion marker (M) from Sigma-Aldrich.

2.2 Preparation of buffers and analytes

2.2.1 Preparation of microemulsion buffers

The microemulsion buffer was prepared by pipeting the appropriate amounts of stock aqueous solutions of 500 mM SDS and 500 mM phosphate buffer at pH 2.5 into a 10 mL volumetric flask, followed by adding appropriate volumes of 1-butanol and *n*-octane. The final solution was made up to 10 mL with Milli-Q water. In the case of preparation of the microemulsion buffer containing organic cosolvent, such as methanol, ethanol, ACN, or 2-propanol, the appropriate volume of organic cosolvent was added before addition of Milli-Q water. All the microemulsion buffers were sonicated for 30 min to obtain a clear and highly stable microemulsion. The microemulsion buffers were filtered through 0.45 μ m PTFE membrane filters prior to MEEKC analysis.

2.2.2 Preparation of analytes

Each homologous series of BZ, PN, BA, and PB as analytes, and dodecylbenzene as a microemulsion marker (M) were separately dissolved at a concentration of 10.0 mM in ethanol. The mixture of each homologous series at the concentration of 0.2 mM each was obtained by diluting 10.0 mM of each series of homologous and dodecylbenzene, and then diluting the mixture with microemulsion containing 180 mM SDS, 890 mM 1-butanol, and 1.0% v/v *n*-octane. It should be noted that the mixture of each homologous series was separately prepared to avoid overlapping or comigration of some analytes, leading to difficulty of identification of analytes and determination of migration times. All the sample solutions were filtered through 0.45 μ m PTFE membrane filters prior to MEEKC 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 used was 40.2 cm in length (30 cm to the detector) \times 50 μ m id, thermostated at 25°C.

Voltage was set at -15 kV. A sample solution was introduced by 0.5 psi pressure injection for 3 s. Each experiment was carried out in duplicate, unless otherwise stated. Prior to MEEKC analysis each day, the capillary was rinsed with ethanol, 0.1 M NaOH, water, and the microemulsion buffer for 15 min each. Between consecutive runs, the capillary was rinsed with water, ethanol, 0.1 M NaOH, and water for 1 min each and then with microemulsion buffer for 2 min. After analysis, each day, the capillary was rinsed with water and ethanol for 5 min each, and then 0.1 M NaOH and water for 10 min each.

3 Results and discussion

3.1 Principle of retention factor and retention index in MEEKC without EOF

As described in our previous work [7], the retention factor (k) of the neutral analyte in MEEKC without EOF can be calculated from electropherograms using the equation

$$k = \frac{t_{me}}{t_m - t_{me}} \quad (1)$$

where t_{me} and t_m are the migration times of the microemulsion marker and analyte, respectively. The retention index of the analyte can be calculated by the logarithmic interpolation between the two neighboring standards of homologous series, according to the equation [13]

$$I = 100z + 100 \frac{\log k_A - \log k_z}{\log k_{z+1} - \log k_z} \quad (2)$$

where k_z and k_{z+1} are the retention factors of the homologous with the number of carbon atoms z and $z + 1$, respectively, and k_A is the retention factor of the analyte. From Fig. 1b and Eqs. (1) and (2), the retention index can be expressed as a function of the migration time

$$I = 100z + 100 \frac{\log \left(\frac{t_{me}}{t_{m,A} - t_{me}} \right) - \log \left(\frac{t_{me}}{t_z - t_{me}} \right)}{\log \left(\frac{t_{me}}{t_{z+1} - t_{me}} \right) - \log \left(\frac{t_{me}}{t_z - t_{me}} \right)} \quad (3)$$

According to the Martin's equation [13], the retention indices of homologous series compounds increase with an increase in the number of methylene groups, giving a linear equation between $\log k$ and z [13]

$$\log k = az + b \quad (4)$$

where a and b are the slope and the intercept, respectively. It follows from Eqs. (2) and (4) that the retention index may be calculated by interpolation and, for the analyte with higher k than the first homologue, by extrapolation of the equation [13]

$$I = \frac{100(\log k - b)}{a} \quad (5)$$

3.2 Determination of retention factor and retention index of homologous series compounds

3.2.1 Precision in k and I

Intra- and interday precisions in k and I of homologous series were compared using one batch and batch-to-batch of the MEEKC buffer containing a 50 mM phosphate buffer at pH 2.5, 180 mM SDS, 1.0% v/v *n*-octane, and 890 mM 1-butanol. An example of electropherograms is shown in Fig. 2. Dodecylbenzene (M), a highly hydrophobic compound, spiked into a sample solution is used as a marker for t_{me} [6]. In comparison with the electrophoretic mobility of the analyte, negligible electroosmotic mobility was obtained in this work, measured by short-end injection using thiourea [6].

The values of k and I of standard (BZ series) and test analytes (PN, BA, and PB series) as shown in Table 1 were determined from electropherograms using Eqs. (1) for k and (5) for I . The quality of k and I for BZ standard is first considered. The slope (a) and the intercept (b) of the equation $\log k = az + b$ for a homologous series of BZ were also found to be fairly constant for one batch and batch-to-batch of intra- and interday runs, and a nonsignificant difference was obtained using paired t -test analysis at 95% confidence interval of the mean, indicating high precision in k of BZ standards used. Using the t -test comparing the calculated and nominal values of I for BZ, nonsignificant difference was obtained between one batch and batch-to-batch of intra- and interday runs, where the nominal values are 600, 700,

800, and 900 for BZ6, BZ7, BZ8, and BZ9, respectively. This indicates a high accuracy and precision in I of BZ standards used.

The quality of k and I for test analytes is now considered. In most of the cases, a slight difference in RSD was obtained between one batch and batch-to-batch intraday precisions in k and I of test analytes, while higher RSD values of k and I for interday than those for intraday were found. Slightly poorer precision for interday than intraday is probably due to variation in chemical properties of capillary wall surface each day, resulting in a change in suppressed EOF and the calculated retention factor [6]. However, using paired t -test analysis at 95% confidence interval of the mean, nonsignificant difference is found for \bar{k} and \bar{I} obtained from intra- and interday or one batch and batch-to-batch. Precision in k and I in this work was found to be in a similar range, while significantly worse precision in k than I of analytes in MEEKC with high EOF was found in previous work [16]. This is probably because, in comparison with octane used as oil in this work, heptane used as oil in the previous work can vaporize more easily [16] and give poorer stability of the microemulsion [17].

3.2.2 Effect of SDS concentration

To investigate the influence of SDS concentration ([SDS]) on k and I of analytes in MEEKC with suppressed EOF, experiments were carried out by varying [SDS] in a range of 100 to 200 mM. At SDS below 100 mM, broad peaks and poor precision in the migration time were obtained possibly due to low stability of the microemulsion [6].

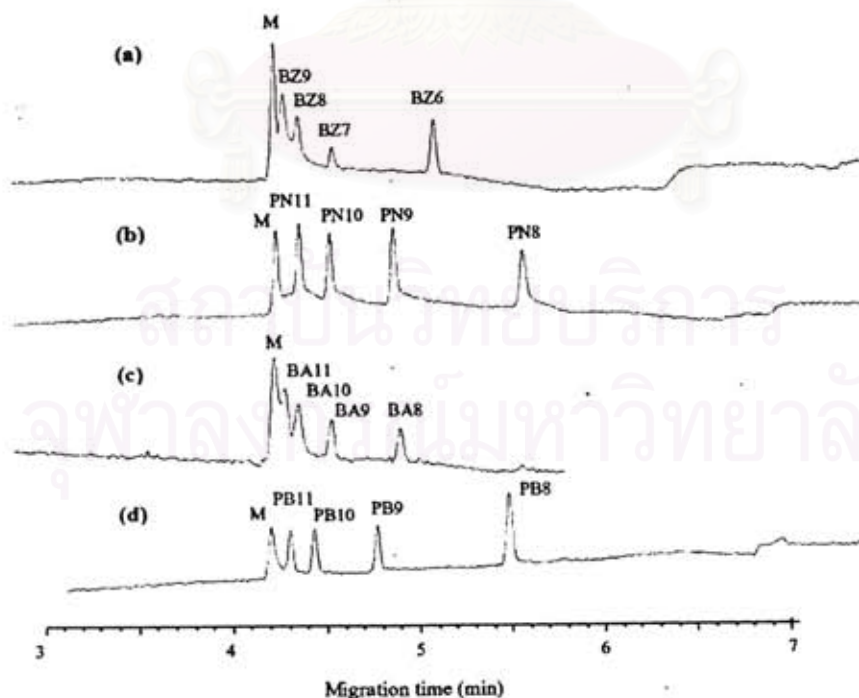


Figure 2. An example of electropherograms for homologous series; (a) BZ, (b) PN, (c) BA, and (d) PB in MEEKC using 180 mM SDS in a 50 mM phosphate buffer (pH 2.5) containing 1.0% v/v *n*-octane, and 890 mM 1-butanol. CE conditions: uncoated fused-silica capillary, 50 μ m id \times 40.2 cm (30 cm to the detector), temperature 25°C, voltage -15 kV, 0.5 psi pressure injection for 3 s, and UV detection at 214 nm.

Table 1. Intra- and interday precision of *k* and *l* of homologous series in MEEKC using 180 mM SDS and other conditions as shown in Fig. 2

	RSD (%) and mean of <i>k</i>				RSD (%) and mean of <i>l</i>			
	One batch		Batch-to-batch		One batch		Batch-to-batch	
	Intraday ^{a)}	Interday ^{b)}	Intraday ^{c)}	Interday ^{b)}	Intraday ^{a)}	Interday ^{b)}	Intraday ^{c)}	Interday ^{b)}
BZ6	0.5 (6.05)	2.0 (5.84)	0.8 (6.04)	1.6 (6.02)	0.1 (600)	0.1 (599)	0.1 (601)	0.3 (599)
BZ7	0.5 (15.66)	1.3 (15.59)	1.5 (15.32)	3.4 (15.91)	0.1 (702)	0.2 (703)	0.2 (701)	0.2 (703)
BZ8	0.9 (38.42)	1.6 (38.04)	1.7 (37.20)	3.8 (38.78)	0.1 (798)	0.2 (798)	0.1 (797)	0.2 (798)
BZ9	0.8 (100.08)	0.9 (99.05)	1.0 (99.07)	1.0 (99.90)	0.1 (901)	0.1 (900)	0.1 (902)	0.2 (900)
PN8	0.2 (3.35)	1.6 (3.30)	1.5 (3.36)	2.4 (3.37)	0.1 (536)	0.3 (538)	0.3 (537)	0.8 (536)
PN9	0.8 (7.18)	1.9 (7.19)	1.1 (7.18)	1.3 (7.14)	0.2 (618)	0.5 (621)	0.2 (619)	0.6 (617)
PN10	0.9 (15.31)	2.4 (15.58)	1.3 (15.42)	1.1 (15.29)	0.2 (699)	0.4 (703)	0.2 (702)	0.4 (699)
PN11	0.7 (34.79)	1.4 (34.84)	1.3 (34.87)	0.8 (34.54)	0.1 (787)	0.2 (789)	0.2 (790)	0.3 (786)
BA8	0.3 (7.97)	2.9 (7.82)	0.7 (7.93)	2.0 (7.83)	0.1 (629)	0.6 (630)	0.1 (630)	0.7 (627)
BA9	0.2 (17.93)	2.0 (17.61)	1.0 (17.31)	1.7 (17.48)	0.1 (716)	0.3 (716)	0.1 (714)	0.5 (713)
BA10	0.8 (40.58)	1.5 (40.68)	1.3 (39.99)	1.8 (40.26)	0.1 (804)	0.3 (805)	0.2 (804)	0.4 (803)
BA11	0.3 (88.55)	0.5 (88.61)	0.8 (88.93)	0.7 (89.06)	0.1 (888)	0.1 (888)	0.2 (890)	0.2 (888)
PB8	0.5 (3.97)	1.5 (3.90)	1.4 (3.94)	2.2 (3.93)	0.1 (554)	0.4 (556)	0.3 (555)	0.8 (553)
PB9	0.6 (8.85)	2.7 (8.67)	1.4 (8.86)	2.3 (8.75)	0.1 (640)	0.5 (641)	0.2 (642)	0.7 (639)
PB10	0.5 (21.46)	2.3 (21.70)	1.5 (21.69)	1.5 (21.53)	0.1 (736)	0.4 (736)	0.2 (736)	0.4 (735)
PB11	0.4 (51.42)	1.7 (52.08)	0.8 (51.31)	0.7 (51.45)	0.1 (829)	0.3 (832)	0.1 (831)	0.4 (829)

The values of mean are in parentheses. Homologous series of BZ (BZ6, BZ7, BZ8, and BZ9) were used as retention index standards.

a) $n = 5$ runs.

b) Five days and each day for two runs ($n = 10$ runs).

c) Five batches and each batch for two runs ($n = 10$ runs).

From Fig. 3a, the linear relationship between *k* and [SDS] was obtained, with high values of the coefficient of linear regression ($r^2 > 0.99$), except for BZ8, BZ9, BA11, and PB8 with $r^2 \sim 0.98$. In MEKC [13, 18], *k* linearly increases with [SDS] as the equation $k = K\phi = K\bar{v}([SDS] - CMC)$, where *K* is the distribution constant of the analyte between the micellar phase and aqueous phase, ϕ is the phase ratio of the volume of micellar phase to aqueous phase, and \bar{v} is the partial molar volume of the micelles. However, this equation has not proven to be valid for MEEKC since the values of \bar{v} and CMC are difficult to determine. The values \bar{v} and CMC of in MEEKC may be assumed to be equal to those in MEKC with the same concentration of [SDS] and 1-butanol [16]. However, the relationship between *k* and [SDS] also seemed to be linear in previous work on MEEKC [6, 8–9].

At the equal *z*, the retention factors were found to be in the order BZ > BA > PB > PN, indicating the hydrophobicity for BZ > BA > PB > PN. From Table 2, the excellent linear relationship between $\log k$ and *z* was obtained for each series at a given [SDS] in a range of 100–200 mM, with $r^2 > 0.999$, which is consistent with the Martin's equation in Eq. (4). Over a wide range of [SDS], the values of slope, *a*, for each homologous series were found to be insignificantly different, with RSD < 1.5%. This indicates that [SDS] does not affect a change in methylene selectivity, α_{CH_2} , of two adjacent compound of homologous series, where $\log \alpha_{CH_2} = a$ [19]. For analytes with equal *z*, the values of $\log \alpha_{CH_2}$ obtained are in order BZ > PB > BA > PN. A decrease in α_{CH_2} is possibly due to the hydrophilic functional group of analytes. Using the

average value of the slope (\bar{a}) obtained from a plot of $\log k$ versus *z*, the value of the adjusted intercept (b') is seen to increase linearly with an increase in [SDS] as given in Table 2. In previous work on MEKC with high EOF [13], the slope of the equation $\log k = az + b$ for homologous series of BZ was also found to be fairly constant, whereas the intercept increased with an increase in [SDS], which is consistent with this work.

Using BZ as standards and Eq. (5) with the values of *a* and *b* in Table 2, the calculated values (symbol) of *l* for analytes as a function of [SDS] in a range of 100–200 mM are shown in Fig. 3b. The calculated values of *l* for BZ were found to be in excellent agreement with the nominal values, with $|\Delta l| < 0.7\%$. Using *t*-test comparing the observed slope of the linear fit with zero for each analyte, nonsignificant difference was obtained, indicating that *l* for analytes in Fig. 3b are independent of [SDS]. Therefore, the average values *l* (solid line) for each analyte over a wide range of [SDS] from 100 to 200 mM are shown in Fig. 3b, with RSD < 0.5%. In previous work on MEKC with high EOF, the independence of [SDS] from *l* in neutral analytes was also reported [13].

3.2.3 Effect of temperature

The influence of temperatures, 15–40°C (298–313 K), on *k* and *l* in MEEKC was investigated using the microemulsion buffer as given in Fig. 2. At each temperature, the constant current of 95 μ A was used to exclude the difference in Joule

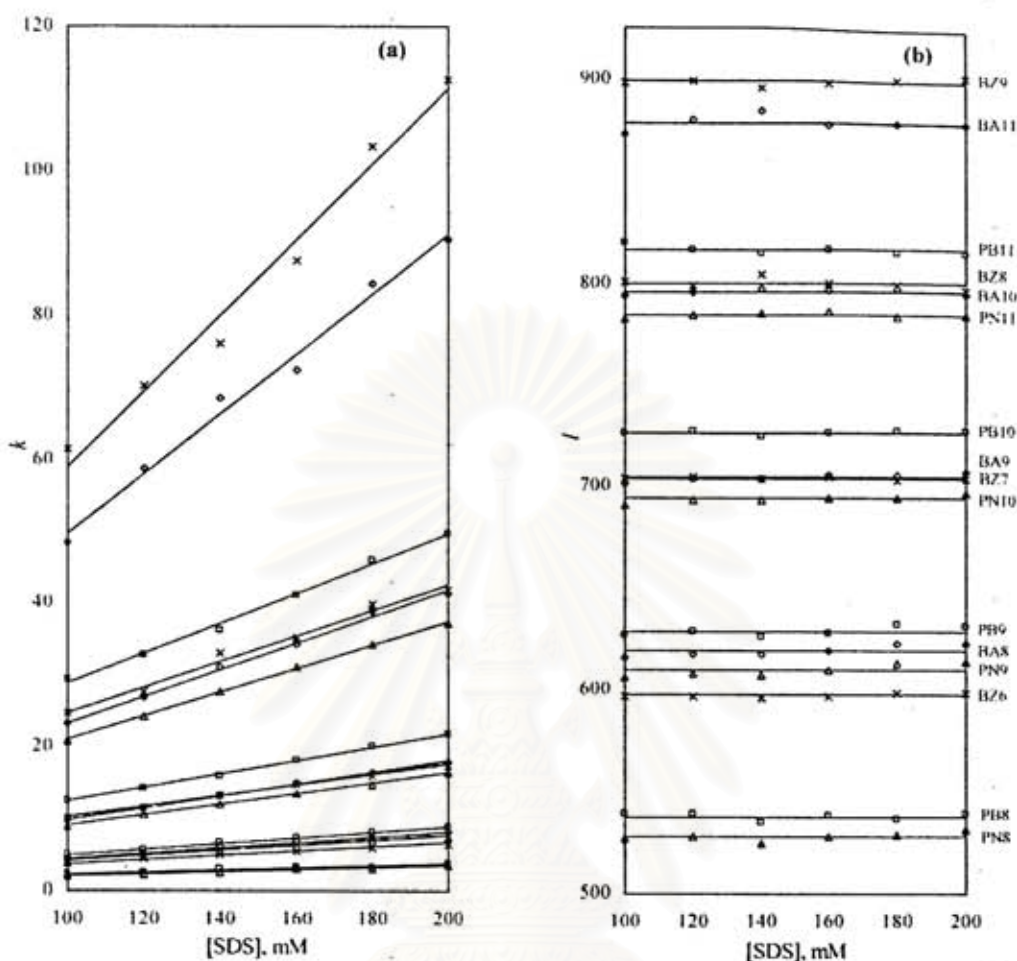


Figure 3. Retention factor (a) and retention index (b) of analytes as a function of SDS concentration. Conditions as shown in Fig. 2. Symbols \times , Δ , \diamond , and \square refer to the observed values for homologous series of BZ, PN, BA, and PB, respectively. Lines for k are linear fits, and lines for I are the average value obtained from 100 to 200 mM SDS.

heating [13], with a power < 1.5 W at the temperature above 25°C . As seen in Fig. 4a, k linearly decreases with increasing temperature, with $r^2 > 0.96$. An increase in separation temperature results in a decrease in k due to an increase in the solubility of insoluble compounds in the organic-water phase [4]. According to the van't Hoff equation [13], $\ln K$ and $\ln k$, where $k = K\phi$, are proportional to $1/T$

$$\ln K = \frac{-\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} \quad (6)$$

$$\ln k = \frac{-\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} + \ln \phi \quad (7)$$

where ΔH^0 and ΔS^0 are the standard enthalpy and standard entropy, respectively, and R is the gas constant. The phase ratio in MEEKC is difficult to determine as previously mentioned. In previous work on MEEKC with high EOF using

dodecoxycarbonylvaline (DDCV) as surfactant, ethyl acetate as oil and 1-butanol as cosurfactant, a linear increase in K was found with an increase in $1/T$ at 1% DDCV, while a nonlinear relationship was obtained at 4% DDCV [19]. Since 4% DDCV gave a higher concentration of surfactant to phase ratio, a temperature change had a much more dramatic effect with respect to either the phase ratio or the respective microemulsion conformation [19]. The linear relationship between the plot of $\ln k$ versus $1/T$ in Fig. 4b may be due to a slight or no change in the phase ratio in MEEKC used in this work. The similar result was found in our previous work also on curcuminoids [6] and avermectins [7].

The $\ln k$ values of BZ in MEEKC in the temperature range of 15 – 40°C were also determined using constant power of 1.5 W. Above 25°C , results showed that the constant power of 1.5 W gave $\ln k$ slightly higher than did the constant current of $95 \mu\text{A}$, with $|\Delta k| < 1.5\%$, while below 25°C , the slightly

Table 2. Linear relationship between log *k* and *z* of homologous series compounds in MEEKC

[SDS] (mM)	log <i>k</i> = <i>az</i> + <i>b</i>	BZ	PN	BA	PB
100	<i>a</i>	0.405	0.345	0.350	0.381
	<i>b</i>	-1.847	-2.491	-2.151	-2.728
	<i>r</i> ²	0.9994	0.9989	0.9995	0.9995
	<i>b'</i>	-1.843	-2.488	-2.164	-2.686
120	<i>a</i>	0.402	0.344	0.353	0.375
	<i>b</i>	-1.768	-2.406	-2.112	-2.604
	<i>r</i> ²	0.9993	0.9993	0.9997	0.9996
	<i>b'</i>	-1.784	-2.420	-2.092	-2.626
140	<i>a</i>	0.396	0.344	0.354	0.372
	<i>b</i>	-1.664	-2.352	-2.059	-2.527
	<i>r</i> ²	0.9987	0.9996	0.9998	0.9997
	<i>b'</i>	-1.726	-2.361	-2.028	-2.575
160	<i>a</i>	0.399	0.343	0.346	0.373
	<i>b</i>	-1.642	-2.292	-1.935	-2.482
	<i>r</i> ²	0.9994	0.9994	0.9996	0.9996
	<i>b'</i>	-1.681	-2.309	-1.987	-2.523
180	<i>a</i>	0.412	0.348	0.354	0.383
	<i>b</i>	-1.696	-2.304	-1.961	-2.542
	<i>r</i> ²	0.9998	0.9997	0.9995	0.9995
	<i>b'</i>	-1.633	-2.272	-1.934	-2.485
200	<i>a</i>	0.410	0.346	0.351	0.379
	<i>b</i>	-1.647	-2.241	-1.896	-2.464
	<i>r</i> ²	0.9993	0.9998	0.9999	0.9997
	<i>b'</i>	-1.599	-2.231	-1.901	-2.447
\bar{a}		0.404 ± 0.006	0.345 ± 0.002	0.351 ± 0.003	0.377 ± 0.004
\bar{b}'		0.00245 [SDS] -2.079 <i>r</i> ² = 0.9920	0.00254 [SDS] -2.728 <i>r</i> ² = 0.9866	0.00261 [SDS] -2.410 <i>r</i> ² = 0.9845	0.00239 [SDS] -2.915 <i>r</i> ² = 0.9920

\bar{a} is the average value of the slope obtained from a plot of log *k* and *z* over 100–200 mM SDS. \bar{b}' is the adjusted intercept obtained from a linear plot between log *k* and *z* with a constant slope of \bar{a} .

lower ln *k* was obtained using constant power of 1.5 W, with $|\Delta k| < 2\%$. At a given temperature, nonsignificant difference was found for ln *k* of BZ obtained from the constant current and the constant power, using paired *t*-test analysis at 95% confidence interval of the mean. This indicates insignificant deviation in ln *k* caused by Joule heating from the use of the constant current and the constant power. In addition, plots of ln *k* and 1/*T* using a constant power gave linear equations with *r*² > 0.97. However, a current lower than 95 μA or the power lower than 1.5 W may be used to keep Joule heating to the minimum, but a long analysis time will be obtained.

According to Eq. (5) and using BZ as retention index standards, the retention indices of analytes obtained are shown in Fig. 4c. Using the *t*-test comparing the observed slope of the linear fit with zero for each analyte over a temperature range of 15–40°C, a nonsignificant difference was obtained, indicating that *I* for analytes in Fig. 4c is independent of temperature. Therefore, the average values of *I* (solid line) for each analyte over a wide range of temperature from 15 to 40°C are shown in Fig. 4c, with RSD < 1.2%. In

previous work on MEKC [13], the rather small dependence of temperature on *I* was reported, using BZ as the retention index standards and constant current.

3.2.4 Effect of organic cosolvents

To investigate the influence of organic cosolvent on *k* and *I*, the organic cosolvent, such as ACN, methanol, ethanol, and 2-propanol, were separately added at the level of 0–30% v/v in the microemulsion buffer using 180 mM SDS and other components as given in Fig. 2. The retention factor was found to decrease with an increase in the concentration of organic cosolvent (ϕ) due to an increase in the solubility of analyte in organic-aqueous phase [2, 6]. From Fig. 5 when methanol, ethanol, or ACN was used as organic cosolvent, the relationship between log *k* and ϕ gave good linear equations with *r*² ranging from 0.93 to 0.99, while the second-degree polynomial equations were obtained for 2-propanol used as organic cosolvent with *r*² > 0.99. In RP-LC, a decrease

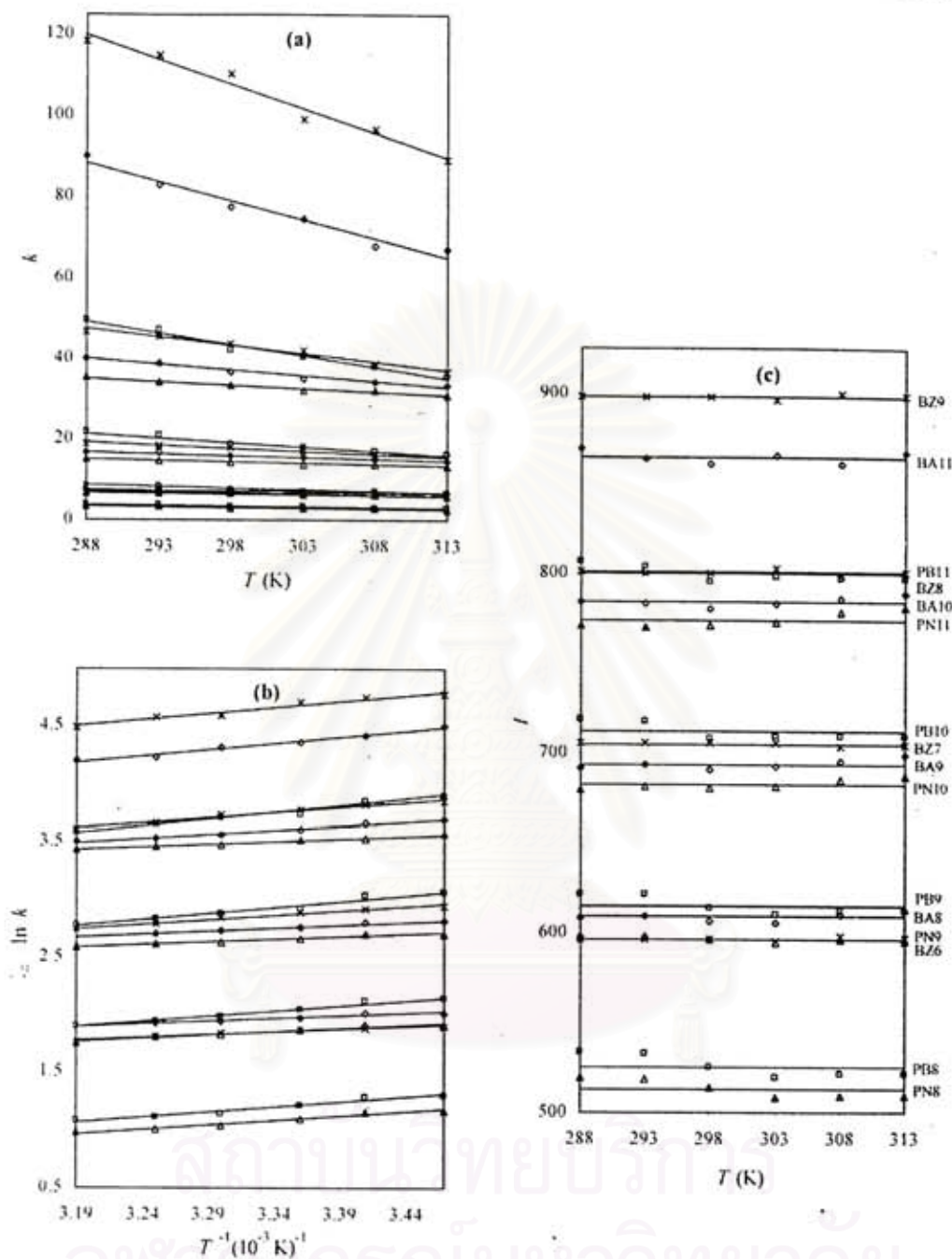


Figure 4. Retention factor (a), natural logarithm of retention factor (b), and retention index (c) of analytes as a function of temperature. Other MEEKC conditions as shown in Fig. 2. Symbols refer to the observed values for homologous series as given in Fig. 3. Lines for k and $\ln k$ are linear fit, and lines for I are the average values obtained from 15 to 40°C.

in $\log k$ as a function of an increase in φ is given by the simple linear equation [20–22]

$$\log k = \log k_w - m\varphi \quad (8)$$

where k_w is the retention factor extrapolated to pure water as the mobile phase, and m is the slope from the linearity of the plot of $\log k$ versus φ . However, the deviation from the linear plot of $\log k$ versus φ may be obtained, and a

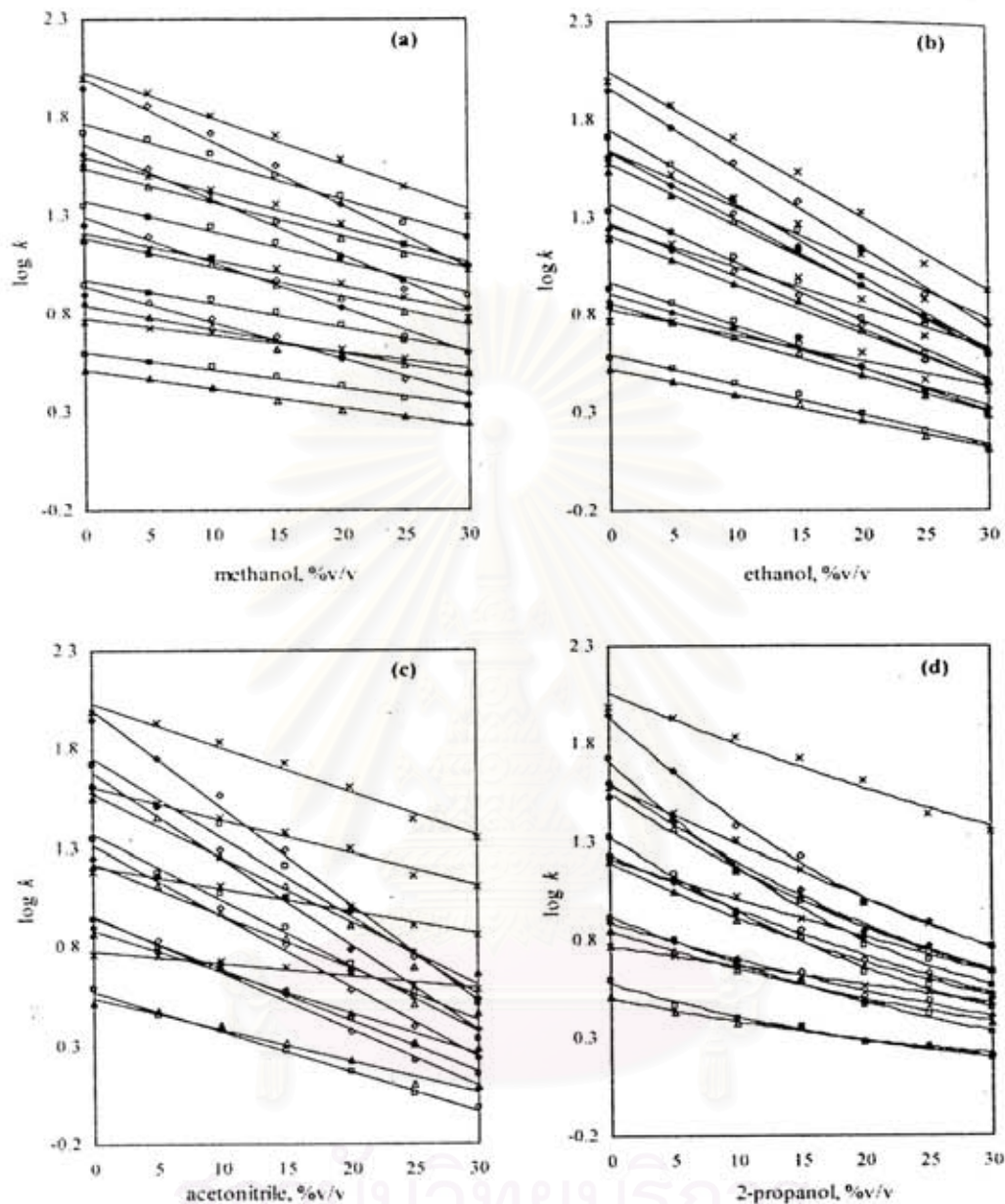


Figure 5. Retention factor of analytes as a function of the concentration of organic cosolvents used as (a) methanol, (b) ethanol, (c) ACN, and (d) 2-propanol, using 180 mM SDS and other MEEKC conditions as shown in Fig. 2. Symbols refer to the observed values for homologous series as given in Fig. 3. At 0% v/v organic cosolvent, observed log k values are in the order: BZ9>BA11>PB11>BZ8>BA10>PN11>PB10>BA9>BZ7>PN10>PB9>BA8>PN9>BZ6>PB8>PN8.

second-degree polynomial equation can be used to describe the curvature of the plot of log k versus ϕ as the equation [20, 21]

$$\log k = \log k_w - p\phi + q\phi^2 \quad (9)$$

where p and q are the constant values from the curvature of the plot of log k versus ϕ .

The different effects between 2-propanol and other solvents may be caused by the different chromatographic behavior with more hydrophobic organic cosolvents. Methanol, ethanol, and ACN are more polar organic cosolvents and have little or no interaction with the charged oil droplets, while 2-propanol is more hydrophobic than other organic cosolvents and can act as cosurfactant [4]. Therefore, the less amount of free 2-propanol in the aqueous phase than the

Table 3. Predicted and literature values of $\log K_{ow}$ of analytes in MEEKC using BZ as standards

Analyte	$\log K_{ow}$		Literature values
	Predicted values		
	$\log K_{ow} = c \log k + d$	$\log K_{ow} = eI + f$	
PN8	$1.72 \pm 0.05^a)$	1.72 ± 0.05	1.58 [16]
PN9	$2.13 \pm 0.06^a)$	2.13 ± 0.07	2.20 [16]
PN10	$2.56 \pm 0.05^a)$	2.56 ± 0.07	2.66 [16]
PN11	$3.02 \pm 0.05^a)$	3.02 ± 0.08	3.11 [24]
BA8	$2.19 \pm 0.07^a)$	2.18 ± 0.06	2.12 [24]
BA9	$2.62 \pm 0.04^a)$	2.63 ± 0.06	2.64 [24]
BA10	$3.11 \pm 0.06^a)$	3.11 ± 0.04	NA
BA11	$3.56 \pm 0.05^a)$	3.56 ± 0.01	NA
PB8	$1.78 \pm 0.04^a)$	1.78 ± 0.04	1.96 [8]
PB9	$2.24 \pm 0.05^a)$	2.24 ± 0.05	NA
PB10	$2.75 \pm 0.04^a)$	2.75 ± 0.04	NA
PB11	$3.22 \pm 0.03^a)$	3.23 ± 0.02	NA

c and d are the slope and intercept values, respectively, obtained from the linear calibration plot between $\log K_{ow}$ and $\log k$ for BZ at each SDS concentration; e and f are the slope and intercept values, respectively, obtained from the linear calibration plot between $\log K_{ow}$ and nominal I of BZ as standards. I is the average value of retention index from 100 to 200 mM SDS as shown Fig. 3b. $\log K_{ow} = 2.13, 2.65, 3.13,$ and 3.69 for BZ6, BZ7, BZ8, and BZ9, respectively, [13]. NA = not available.

a) The average value obtained from 100 to 200 mM SDS.

total 2-propanol added leads to higher k than expected (see Eq. (8) and Fig. 5), and the deviation of $\log k$ from linear relationship between $\log k$ and ϕ . In MEKC with high EOF and 0–20% v/v organic solvent, a linear relationship of $\ln k$ versus ϕ was obtained for methanol [21] and ACN [22], while the deviation of $\log k$ from linear relationship was observed at the high concentrations of ACN (20–30%) [21]. In MEEKC with high EOF, addition of organic cosolvents, such as ACN [10] and 2-propanol [11], affected a decrease in k , but the equation for relationship between $\log k$ and ϕ was not reported.

From Eqs. (8) and (9) and Fig. 5, good agreement was found for $\log k_w$ obtained from the experiments without any organic cosolvent and from the Y-intercept of plots in Fig. 5.

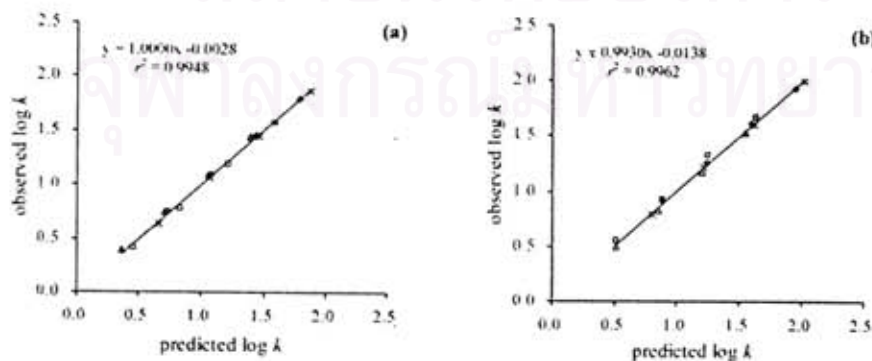


Figure 6. Relationship between observed and predicted $\log k$ of analytes in MEEKC using (a) 130 and (b) 190 mM SDS. Other MEEKC conditions as shown in Fig. 2. Symbols refer to homologous series as given in Fig. 3, and predicted values are obtained using Eq. (12) and Table 2.

The values of m for each homologous series were also found to linearly increase with z ($r^2 > 0.99$). In addition, at a given ϕ for each organic cosolvent, linear relationship between $\log k$ and z was observed, $\log k = az + b$ with $r^2 > 0.995$ for each homologous series. With an increase in ϕ , a linear decrease in a and a linear increase in b were obtained for each homologous series.

Using Eq. (5), the calculated values of I for all the analytes in MEEKC with organic cosolvents were found to decrease with an increase in ϕ . This indicates that the retention index is dependent on ϕ , possibly due to different solubilities of analytes and standards in organic cosolvents.

3.3 Octanol–water distribution constant ($\log K_{ow}$)

The value of $\log K_{ow}$ is one of the most commonly used as an indicator of solubility or hydrophobicity of compounds, and may be determined from the relationship between $\log K_{ow}$ and $\log k$ or $\log K_{ow}$ and I as the equations [11–13, 16, 23]

$$\log K_{ow} = c \log k + d \quad (10)$$

$$\log K_{ow} = eI + f \quad (11)$$

where c and d are the slope and intercept values, respectively, obtained from the linear plot between $\log K_{ow}$ and $\log k$ for BZ as standards at each SDS concentration; e and f are the slope and intercept values, respectively, obtained from the linear plot between $\log K_{ow}$ and nominal I of BZ as standards.

The average values of predicted $\log K_{ow}$ as shown in Table 3 were obtained from 100 to 200 mM SDS and BZ as standards. The predicted values of $\log K_{ow}$ using Eq. (11) were obtained from the linear relationship between $\log K_{ow}$ and I , where I is the average value of the retention index of the analyte over a wide range of SDS concentrations from 100 to 200 mM in Fig. 3b. From Table 3, using paired t -test analysis at 95% confidence interval of the mean, nonsignificant difference was obtained for the predicted $\log K_{ow}$ estimated from $\log k$ and I . Good agreement was also found for the predicted and literature values of $\log K_{ow}$ for each analyte, except for PN8 and PB8.

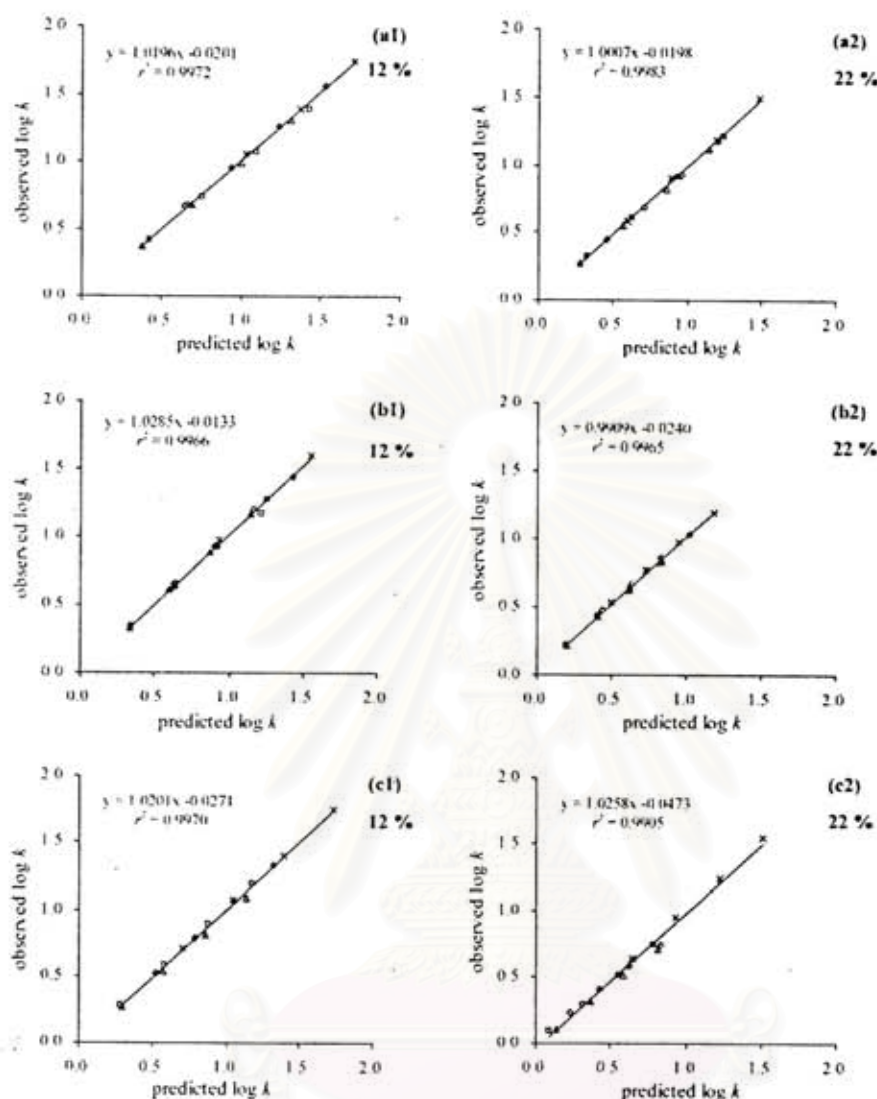


Figure 7. Relationship between observed and predicted log k of analytes in MEEKC using organic cosolvents as (a) methanol (b) ethanol, and (c) ACN at the concentrations of 12 and 22% v/v. Other MEEKC conditions as shown in Fig. 2. Symbols refer to homologous series as given in Fig. 3, and predicted values are obtained using Eq. (13) and Table 2.

The slight difference is probably because the predicted values of log K_{ow} for PN8 and PB8 are not in the range of a calibration plot using BZ as standards. However, using paired t -test analysis at 95% confidence interval of the mean, nonsignificant difference was obtained between the predicted and literature values for all the analytes.

3.4 Prediction of retention factor

In order to predict the retention factor of homologous series compounds in MEEKC in a wide range of [SDS], the linear relationship between log k and z in Eq. (4) may be modified into the equation

$$\log k = \bar{a}z + b' \quad (12)$$

where \bar{a} is dependent on homologous series, but independent of [SDS] for each homologous series as shown in Table 2. At a given [SDS], the value of b' may be predicted using the linear relationship between b' and [SDS] as given in Table 2. Using 130 and 190 mM SDS in MEEKC and predicted log k from Eq. (12) and Table 2, the linear plots in Fig. 6 indicate excellent agreement between observed and predicted log k of homologous series with the slope values of 1.000 ($r^2 = 0.995$) and 0.993 ($r^2 = 0.996$) for MEEKC at 130 and 190 mM SDS, respectively.

In the case of MEEKC with an organic cosolvent, such as methanol, ethanol, or ACN, it follows from Eqs. (4) and (8) that the relationship between log k as a function of φ may be given by the equation

$$\log k = (\bar{a}z + b') - (rz + s)\varphi \quad (13)$$

where r and s are the values of slope and intercept, respectively, for a plot of m (in Eq. 8) and z , for each homologous series. As seen in Fig. 7, in MEEKC with 12 or 22% v/v organic cosolvents and other CE conditions in Fig. 2, excellent agreement is obtained from the linear plots of observed $\log k$ versus predicted $\log k$ of analytes with the values of slope near 1.00 and $r^2 > 0.995$. Therefore, analytes with similar k or I , such as BA9 and BZ7, BZ8 and BA10, or PB8 and PN8, in MEEKC without any organic cosolvent may be identified using their k obtained from MEEKC with appropriate types and concentrations of organic cosolvents.

4 Concluding remarks

In MEEKC with suppressed EOF, both retention factor and retention index can be used for peak identification of homologous series compounds, such as BZ, PN, BA, and PB. However, the retention index shows better precision. The retention index is independent of [SDS] in the range of 100–200 mM and temperature in the range of 15–40°C, while is dependent on ϕ . The retention factor linearly increases with increasing [SDS], while linearly decreases with increasing temperature. The value of $\log k$ linearly decreases with increasing ϕ used as methanol, ethanol, or ACN, while a second-degree polynomial decrease with increasing concentration of 2-propanol was obtained. An excellent linear relationship is obtained between $\log k$ and z of homologous series compounds over a wide range of [SDS] and ϕ . At a given [SDS] and ϕ , the values of $\log k$ of analytes can be predicted using modified equations of the linear relationship of $\log k$ versus [SDS], z and ϕ . Excellent agreement is obtained for observed and predicted values of $\log k$. Using BZ as standards, excellent agreement is also found between predicted and literature values of $\log K_{ow}$ of the test analytes.

This work was financially supported by the Rachadaphiseksomphot Endowment and the Graduate School, Chulalongkorn University.

5 References

- [1] Watarai, H., *Chem. Lett.* 1991, 231, 391–394.
- [2] Altria, K. D., *J. Chromatogr. A* 2000, 892, 171–186.
- [3] Altria, K. D., Mahuzier, P.-E., Clark, B. J., *Electrophoresis* 2003, 24, 315–324.
- [4] Altria, K. D., Clark, B. J., Mahuzier, P.-E., *Chromatographia* 2000, 52, 758–768.
- [5] Hansen, S. H., *Electrophoresis* 2003, 24, 3900–3907.
- [6] Nhujak, T., Saisuwan, W., Srisa-art, M., Petsom, A., *J. Sep. Sci.* 2006, 29, 666–676.
- [7] Seelanan, P., Srisa-art, M., Petsom, A., Nhujak, T., *Anal. Chim. Acta* 2006, 570, 8–14.
- [8] Ishihama, Y., Oda, Y., Asakawa, N., *Anal. Chem.* 1996, 68, 1028–1032.
- [9] Song, L., Ou, Q., Yu, W., Li, G., *J. Chromatogr. A* 1995, 699, 371–382.
- [10] Harang, V., Eriksson, J., Sanger-van de Griend, C. E., Jacobsson, S. P., Westerlund, D., *Electrophoresis* 2004, 25, 80–93.
- [11] Gong, S., Bo, T., Huang, L., Li, K. A., Liu, H., *Electrophoresis* 2004, 25, 1058–1064.
- [12] Klotz, W. L., Schure, M. R., Foley, J. P., *J. Chromatogr. A* 2001, 930, 145–154.
- [13] Muijselaar, P. G. H. M., Claessens, H. A., Cramers, C. A., *Anal. Chem.* 1994, 66, 635–644.
- [14] Ahuja, E. S., Foley, J. P., *Analyst* 1994, 119, 353–360.
- [15] Pomponio, R., Gotti, R., Luppi, B., Cavrini, V., *Electrophoresis* 2003, 24, 1658–1667.
- [16] Ishihama, Y., Oda, Y., Uchikawa, K., Asakawa, N., *Anal. Chem.* 1995, 67, 1588–1595.
- [17] Fu, X., Lu, J., Zhu, A., *J. Chromatogr. A* 1996, 735, 353–356.
- [18] Quirino, J. P., Terabe, S., *J. Chromatogr. A* 1999, 856, 465–482.
- [19] Mertzman, M. D., Foley, J. P., *J. Chromatogr. A* 2005, 1073, 181–189.
- [20] Jandera, P., Pošvec, Z., Vrasplir, P., *J. Chromatogr. A* 1996, 734, 125–136.
- [21] Muijselaar, P. G. H. M., Claessens, H. A., Cramers, C. A., *J. Chromatogr. A* 1995, 696, 273–284.
- [22] Ahuja, E. S., Foley, J. P., *Anal. Chem.* 1995, 67, 2315–2324.
- [23] Muijselaar, P. G., Claessens, H. A., Cramers, C. A., *Anal. Chem.* 1997, 69, 1184–1191.
- [24] Poole, S. K., Durham, D., Kibbey, C., *J. Chromatogr. B* 2000, 745, 117–126.

