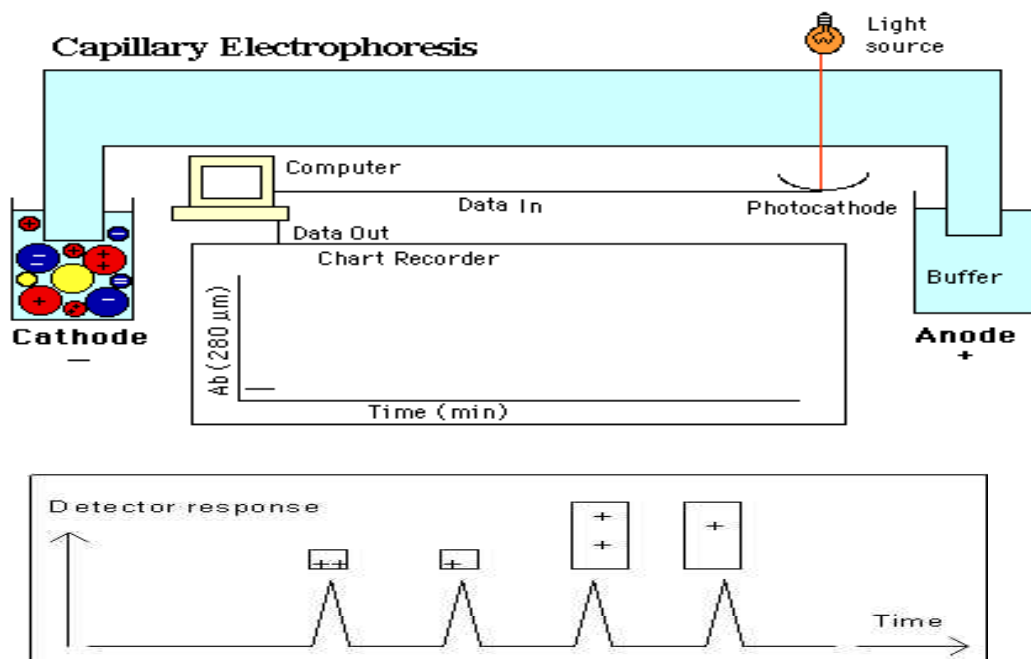


Capillary Electrophoresis Theory and Background

Electrophoresis หมายถึง การเคลื่อนที่ของอนุภาคที่มีประจุที่อยู่ในรูปของสารละลาย หรือแขวนลอยอยู่ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ โดยมีไฟฟ้าวิ่งผ่าน แคตไอออนในสารละลาย จะวิ่งไปที่ขั้วแคโทดซึ่งเป็นขั้วลบ แอนไอออนจะไปที่ขั้วแอโนดซึ่งเป็นขั้วบวก ส่วนอนุภาคที่เป็นกลางจะไม่วิ่งเข้าสู่ขั้วใดเลย

ตามที่คุณเคยกันมา electrophoresis มักจะทำบนแผ่นกระดาษ ซึ่งต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน เพราะจะต้องใช้ศักย์ไฟฟ้าต่ำเพื่อป้องกันความร้อนที่เกิดขึ้น ซึ่งถ้าใช้ศักย์ไฟฟ้าสูงจะรบกวนความคมชัดของแถบ (band) ที่ได้ นอกจากนั้นแล้วแถบที่แยกออกมาต้องนำมาทำให้เกิดสี แต่ในปัจจุบัน capillary electrophoresis (CE) จะสามารถระบายความร้อนที่เกิดขึ้นออกทางหลอดรูเล็กได้

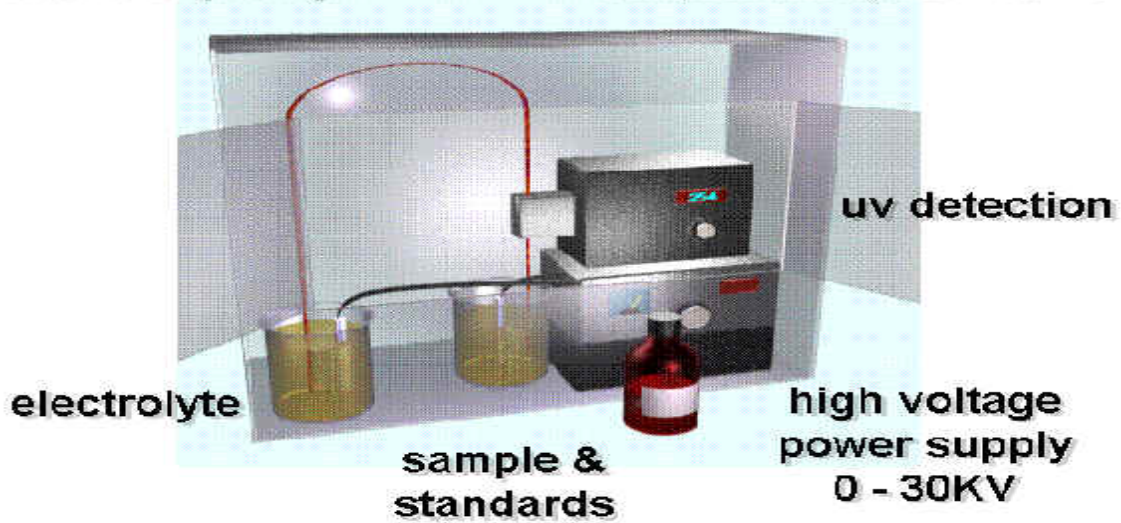
หลักการของ CE เกี่ยวข้องกับการให้ศักย์ไฟฟ้าสูงตั้งแต่ 10 ถึง 30 กิโลโวลต์ แก่หลอดรูเล็ก (capillary tube) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 25 ถึง 100 ไมโครเมตร บรรจุด้วยสารละลายอิเล็กโทรไลต์ โดยที่ปลายทั้ง 2 ข้าง ของหลอดรูเล็กจะจุ่มอยู่ในภาชนะบรรจุสารละลายอิเล็กโทรไลต์ เมื่อมีการให้ศักย์ไฟฟ้าจะทำให้ไอออนในตัวอย่างวิ่งไปที่ขั้วไฟฟ้าแต่ละขั้ว ตัววัดสัญญาณส่วนใหญ่เป็นแบบยูวี ซึ่งให้รูปแบบการตอบสนองเป็นสัญญาณต่อเวลา เรียกว่า electropherogram ส่วนการไหลของอิเล็กโทรไลต์ไปตามหลอดรูเล็กนี้ เป็นไปตามรูปแบบ electroosmotic flow หรือ EOF ซึ่งทำให้เวลาในการวิเคราะห์ลดลง



รูปที่ 1 แสดงการทำงานของ Capillary Electrophoresis

75 μ m x 60 cm
Silica Capillary

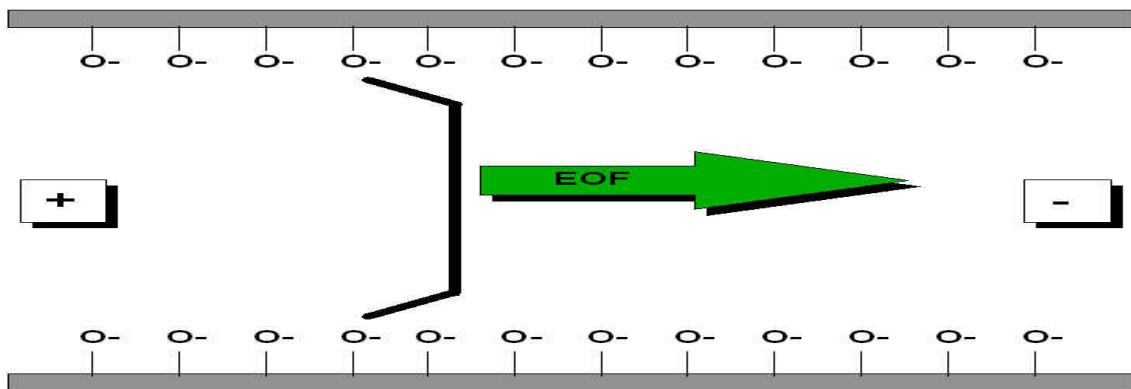
constant temperature
compartment, 20 - 30° C



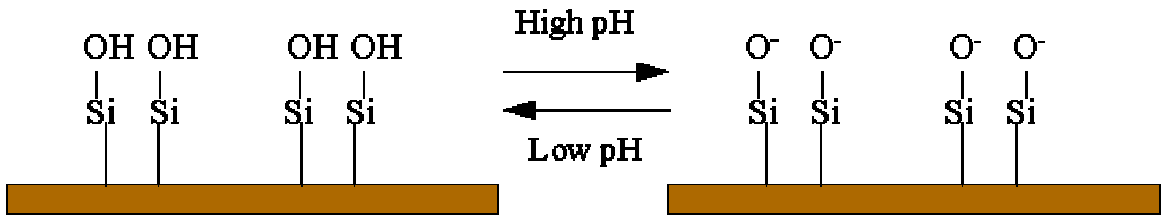
รูปที่ 2 แสดงองค์ประกอบของเครื่องมือ CE

Electroendosmotic flow (EOF)

ผนังของหลอดรูเล็กซึ่งทำด้วย fuse silica ประกอบด้วย silanols ซึ่งจะแตกตัวเป็นไอออนเมื่อบรรจุอิเล็กโทรไลต์ที่มี pH สูง โดยทำให้ผนังของหลอดรูเล็กมีประจุลบ ไอออนของโลหะซึ่งมีประจุเป็นบวกจึงเข้าไปเกาะติด เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าเข้าสู่หลอดรูเล็ก แคตไอออนและโมเลกุลของน้ำที่ล้อมรอบจึงเคลื่อนที่ไปสู่ขั้วแคโทด เป็นผลให้สารละลายเคลื่อนที่ไปยังตัววัดสัญญาณ นั่นคือเป็นการผลักดันไอออนไปตามหลอดรูเล็กผ่านตัววัดสัญญาณ ส่วนอิเล็กโทรไลต์ที่มี pH ต่ำ silanols จะไม่แตกตัว ดังนั้นอัตราการไหลจึงช้ามากหรือสารละลายอาจไม่เคลื่อนที่เลยก็ได้



รูปที่ 3 แสดงไดอะแกรม Electroendosmotic flow (EOF)

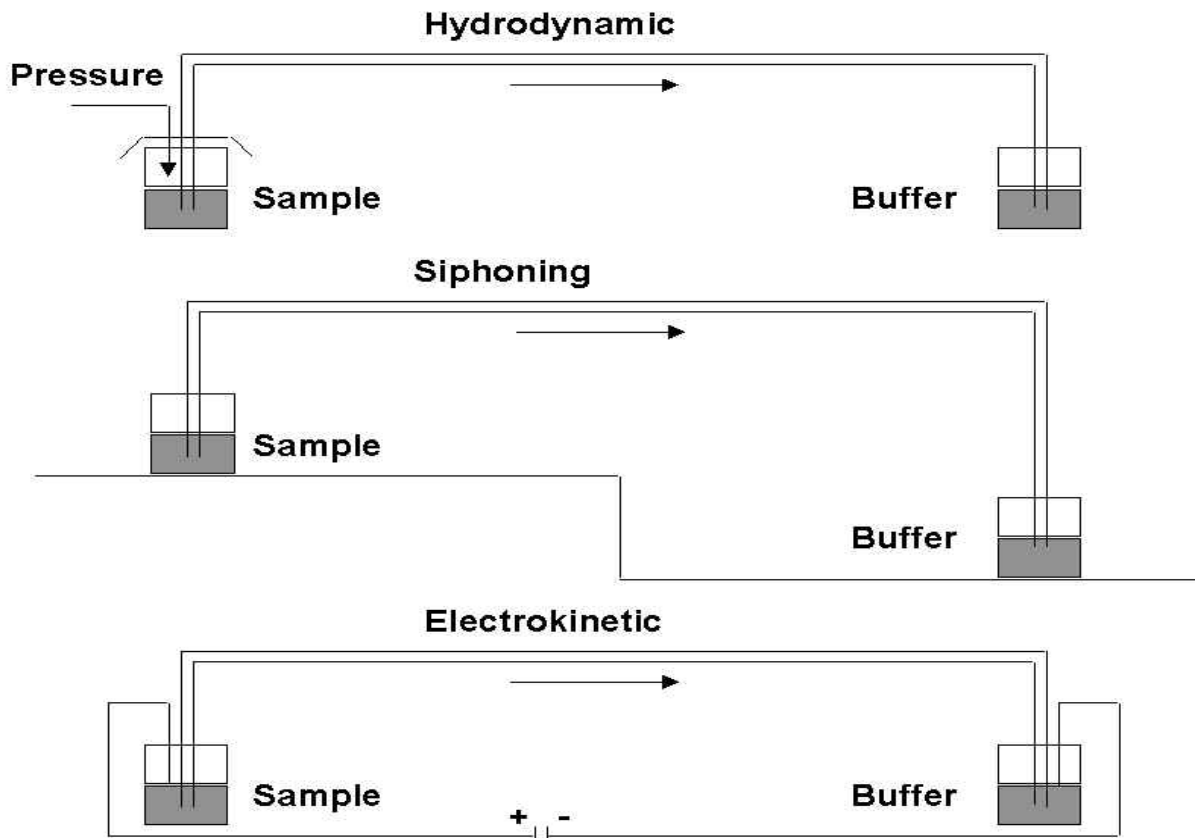


รูปที่ 4 แสดงกระบวนการแตกตัวของ Silanol

การไหลแบบ EOF นั้นเป็น plug-like ไม่ใช่เป็นแบบ laminar เหมือนการไหลในหลักการของ HPLC ข้อดีของ EOF ก็คือความเร็วในการไหลเท่ากันทั่วทั้งหลอด เป็นการลดการเกิด band broadening

การฉีดตัวอย่าง

การฉีดตัวอย่างเข้าไปในหลอดรูเล็กมี 3 แบบ ดังรูป

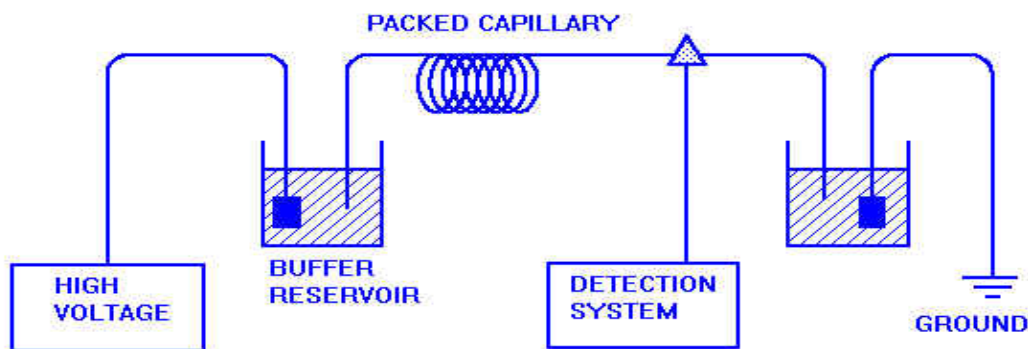


รูปที่ 4 แสดงวิธีการฉีดตัวอย่างเข้าสู่ CE

Capillary electrochromatography (CEC)

Capillary electrochromatography (CEC) เป็นเทคนิคที่รวมเอาเทคนิค HPLC และ CE เข้าด้วยกัน โดยที่หลอดรูเล็กจะบรรจุด้วยสารชนิดเดียวกับที่บรรจุในคอลัมน์ของ HPLC จากนั้น EOF จะดันตัวทำละลายเข้าไปในหลอดรูเล็ก แล้วเข้าสู่ตัววัดสัญญาณ

โดยระหว่างการเคลื่อนที่ของไอออนเข้าสู่ตัววัดสัญญาณ จะเกิด differential partitioning และ electrophoretic migration ขึ้น ทำให้เกิดการแยกที่ดี ลดการเกิด band broadening เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการแยก นอกจากนี้ยังไม่เกิดความดันย้อนกลับ (back pressure) อีกด้วย



รูปที่ 5. แสดง การทำงานของ Capillary electrochromatography(CEC)

การใช้เทคนิคหลอดรูเล็กแยกสารในเครื่องมือ electrophoresis และ electrochromatography ก่อให้เกิดอัตราการไหลของสารละลายอยู่ในรูปแบบของ electroosmotic flow ด้วยอัตราการไหลเท่ากันทั่วทั้งหลอด ซึ่งจะผลักดันไอออนไปตามหลอดรูเล็ก เพื่อผ่านตัววัดสัญญาณ ทำให้เกิดการแยกที่ดี ลดการเกิด band broadening ลดเวลาการวิเคราะห์ลง จึงเป็นแนวทางการเพิ่มประสิทธิภาพการวิเคราะห์อีกแนวทางหนึ่ง

เทคนิคนี้สามารถประยุกต์ใช้กับงานวิเคราะห์โปรตีน เปปไทด์ กรดอะมิโน กรดนิวคลีอิก งานทางด้านยา กรดอินทรีย์และกรดอนินทรีย์ รวมถึงแอนไอออนและแคตไอออนที่มีระดับความเข้มข้นต่ำ

เรียบเรียงโดยกลุ่มวิชาการ 1

กองการศึกษาเคมีปฏิบัติ

เอกสารอ้างอิง

CE Theory. 2002 [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก : <http://www.ceandcec.com/cetheory.htm>