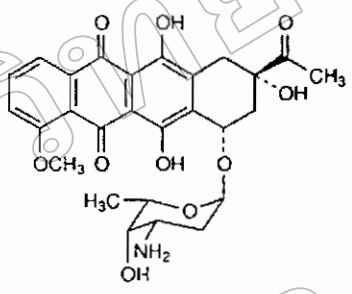
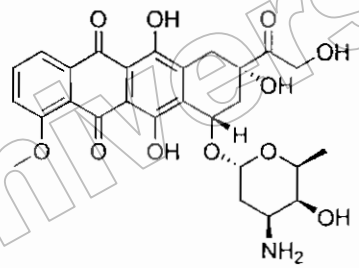
บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

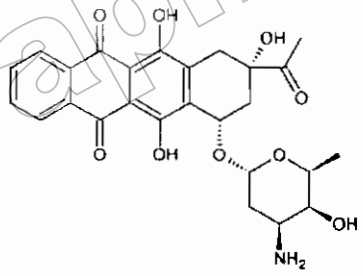
สารในกลุ่มยาแอนทราซัยคลิน (Anthracycline) ได้แก่ เดาโนรูบิซิน ไอดารูบิซิน และดีอกโซรูบิซิน และสารในกลุ่มยาแอนาล็อกโฟเลต ได้แก่ เมทโทเทรกเซท ฯลฯ โครงสร้างหลักของสารในกลุ่มแอนทราซัยคลิน ประกอบด้วยหมู่แอนทราควิโนน ซึ่งเป็นส่วนอะไกลโคนเชื่อมต่อกับน้ำตาลเดาโนซามีน ส่วนเมทโทเทรกเซทมีโครงสร้างคล้ายโฟเลต เป็นการแทนที่อะตอมออกซิเจนที่ตำแหน่งที่ 4 ของวงเทอริน (Pterin) ในโครงสร้างของโฟเลตด้วยอะมิโนได้สารอะมิโนเทอริน (Aminopterin) และการแทนที่อะตอมไฮโดรเจนที่ตำแหน่งที่ 10 ในโครงสร้างของอะมิโนเทอรินด้วยหมู่เมทิล แสดงดังภาพที่ 1



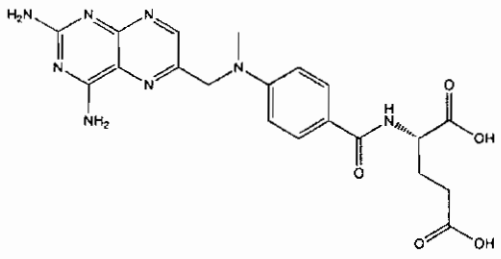
Daunorubicin, pK_a = 8.25



Doxorubicin, pK_a = 8.22



Idarubicin, pK_a = 8.50



Methotrexate, pK_a = 4.80, 5.50

ภาพที่ 1 โครงสร้างโมเลกุลของสาร เดาโนรูบิซิน ไอดารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท

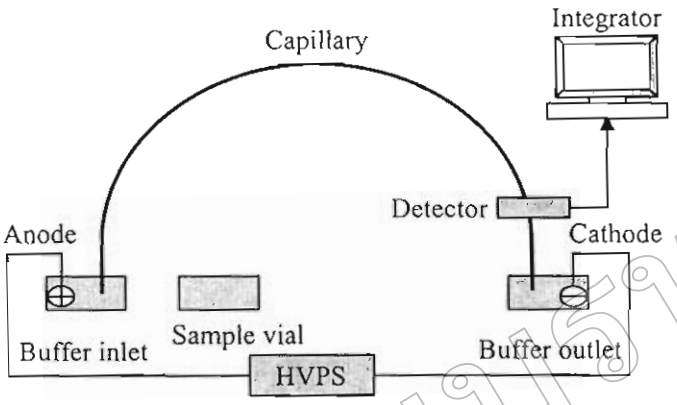
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.1 ทฤษฎีแคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Weinberger, 1993)

แคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Capillary electrophoresis, CE) เป็นเทคนิคของการแยกสารภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้า โดยให้สารเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางที่เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์หรือสารละลายบัฟเฟอร์ที่บรรจุในหลอดแคปปิลารีขนาดเล็ก หลักการแยกสารอาศัยความแตกต่างของความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารหรืออิเล็กโทรโฟรีติกโมบิลิตี้ (Electrophoretic mobility, μ_{ep}) ซึ่งขึ้นอยู่กับอัตราส่วนระหว่างประจุต่อขนาดของไอออน เทคนิคแคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส นำมาประยุกต์ใช้กับการแยกสารไอออนบวกและไอออนลบของสารประกอบอินทรีย์หรืออนินทรีย์ ตลอดจนสารโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น เปปไทด์ โปรตีน และพอลิเมอร์ เป็นต้น

เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสแสดงดังภาพที่ 2 ประกอบด้วยขั้วไฟฟ้า 2 ชนิด คือขั้วแอโนด (Anode) ซึ่งเป็นขั้วบวกและขั้วแคโทด (Cathode) ซึ่งเป็นขั้วลบ เครื่องให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าแรงดันสูง (High voltage power supply) แคปปิลารี (Capillary) ภาชนะบรรจุสารละลายบัฟเฟอร์ (Buffer reservoir) และตัวตรวจวัด (Detector) ซึ่งวางอยู่ทางด้านขั้วแคโทด หลอดแคปปิลารีโดยทั่วไปทำจากฟิวส์ซิลิกา (Fused silica) ปลายเปิดทั้งสองข้าง ภายในบรรจุสารละลายบัฟเฟอร์ และปลายทั้งสองข้างจุ่มอยู่ในภาชนะที่บรรจุสารละลายบัฟเฟอร์ เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าแก่ขั้วไฟฟ้าทั้งสองทำให้เกิดแรงอิเล็กโทรออสโมติกโฟล์ว (Electroosmotic flow, EOF) และแรงการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร (Electrophoretic mobility, μ_{ep}) ซึ่งสามารถทำให้สารเคลื่อนที่ภายในแคปปิลารี ไอออนที่มีประจุบวกเคลื่อนที่ไปยังขั้วแคโทดด้วยแรงดึงดูดระหว่างประจุและแรง EOF โมเลกุลที่เป็นกลางเคลื่อนที่ไปพร้อมกับแรง EOF และไอออนที่มีประจุลบเคลื่อนที่ไปยังแคโทดด้วยแรง EOF ด้วยเช่นกันแต่เป็นไอออนที่เคลื่อนที่ไปยังขั้วแคโทดและถูกตรวจวัดเป็นไอออนชนิดสุดท้าย เพราะไอออนลบมีแรงดึงดูดระหว่างประจุกับขั้วแอโนด เนื่องจากแรง EOF มีมากกว่าจึงสามารถพาสารเคลื่อนที่อย่างช้าๆ ไปยังขั้วแคโทดและถูกตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 2 ส่วนประกอบอย่างง่ายของเครื่องแคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Weinberger, 1993)

2.2 องค์ประกอบหลักของเครื่องแคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส

2.2.1 แคปปิลารี

แคปปิลารีที่ใช้กันทั่ว ๆ ไปในปัจจุบันเป็นฟิวส์ซิลิกา ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ภายใน 10 ถึง 200 μm ยาวประมาณ 20 ถึง 100 cm ภายนอกของแคปปิลารีเคลือบด้วยพอลิเอไมด์เพื่อป้องกันการแตกหัก และลอกพอลิเอไมด์ออกเฉพาะบริเวณตรวจวัด

2.2.2 สารละลายอิเล็กโทรไลต์หรือสารละลายบัฟเฟอร์

เป็นสารละลายที่รักษาระดับพีเอชของสารละลายให้คงที่ และบรรจุอยู่ในขวดขนาดเล็กซึ่งมีปลายทั้งสองข้างของแคปปิลารีจุ่มอยู่

2.2.3 เครื่องให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าแรงดันสูง

เครื่องกำเนิดไฟฟ้ากระแสตรงให้ความต่างศักย์ -30 ถึง 30 kV และกระแสสูงสุดไม่เกิน 300 μA ในการแยกสารส่วนใหญ่นิยมใช้ศักย์ไฟฟ้าที่เป็นบวก ด้านปลายออก (outlet) เชื่อมต่อกับขั้วลบ (แคโทด) ด้านฉีดสารเข้าหรือด้านเข้า (inlet) เชื่อมต่อกับขั้วบวก (แอโนด)

2.2.4 ขั้วไฟฟ้าบวก (แอโนด) และขั้วไฟฟ้าลบ (แคโทด)

2.2.5 เครื่องตรวจวัด

เครื่องตรวจวัดที่ใช้ในเทคนิคแคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส คัดแปลงมาจากเครื่องตรวจวัดที่ใช้ในเทคนิค HPLC เทคนิคการตรวจวัดที่ใช้กันคือ UV-Visible, Amperometry, Conductrometry และ Mass spectrometry (MS) เป็นต้น การตรวจวัด MS มีข้อดี คือความไวสูงและสามารถใช้เพื่อยืนยันสูตรโครงสร้างของสารได้แต่มีราคาแพง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.2.6 ระบบฉีดสารตัวอย่าง (Injection system)

โดยทั่วไปการฉีดสารตัวอย่างเข้าไปในแคปปิลารีมี 2 วิธี ได้แก่ การใช้ไฟฟ้า (Electrokinetic injection) และการใช้ความดัน (Pressure injection)

2.3 ประเภทของเทคนิคแคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส

เทคนิคแคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสแบ่งออกเป็น 6 ประเภทตามกลไกการแยกสาร

2.3.1 Capillary Zone Electrophoresis (CZE)

2.3.2 Micellar Electrokinetic Chromatography (MEKC)

2.3.3 Capillary Electrochromatography (CEC)

2.3.4 Capillary Gel Electrophoresis (CGE)

2.3.5 Capillary Isoelectric Focusing (CIEF)

2.3.6 Capillary Isotachophoresis (CITP)

งานวิจัยนี้เกี่ยวข้องกับเทคนิค CZE ซึ่งเป็นเทคนิคที่รู้จักและนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายของเทคนิคแคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส ซึ่งเป็นเทคนิคที่ง่ายไม่ซับซ้อน และสะดวกต่อการวิเคราะห์สาร การแยกสารใน CZE อาศัยความแตกต่างของความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร ซึ่งขึ้นอยู่กับความแตกต่างของอัตราส่วนของค่าประจุต่อขนาดของสารตัวอย่าง ตัวกลางที่ใช้ในแคปปิลารีคือ บัฟเฟอร์ทั่วไปหรือบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วยสารเติมแต่งบางชนิดที่ไม่ทำให้กลไกของการแยกเปลี่ยนแปลงไป สารเติมแต่งบัฟเฟอร์ เช่น ตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เมทานอล อะซิโตไนไตรล์ สารเติมแต่งลดอิเล็กโทรออสโมซิส (Electroosmosis) และสารเติมแต่งไครัลบางชนิด เป็นต้น

2.4 หลักการพื้นฐานของเทคนิคแคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส

เมื่อมีการให้ศักย์ไฟฟ้าแรงดันสูงกับแคปปิลารี ทำให้สารเกิดการเคลื่อนที่และเกิดการแยกของสาร การแยกของสารเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อสารเหล่านั้นมีความเร็วในการเคลื่อนที่ภายในหลอดแคปปิลารีไม่เท่ากัน โดยแรงในการเคลื่อนที่ซึ่งมีผลต่อการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของสารในสนามไฟฟ้ามีดังนี้

2.4.1 อิเล็กโทรโฟรีดิกโมบิลิตี้ (Electrophoretic mobility, μ_{ep}) คือความสามารถในการเคลื่อนที่ของสารที่มีประจุภายใต้อิทธิพลสนามไฟฟ้า ซึ่งมีหน่วยเป็น $m^2V^{-1}s^{-1}$ นิยามเป็นความเร็วในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร (Electrophoretic velocity, v_{ep}) ภายใต้ความแรงของสนามไฟฟ้า (Electric field strength, E) 1 V cm^{-1} เป็นการเคลื่อนที่ของสารอันเนื่องมาจากแรงดึงดูดระหว่าง

ไอออนกับขั้วไฟฟ้าที่มีประจุตรงกันข้าม โดยแรงนี้ขึ้นอยู่กับประจุและขนาดของโมเลกุล โมเลกุลที่มีประจุสูงมีการเคลื่อนที่เร็วกว่าโมเลกุลที่มีประจุต่ำและโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่เคลื่อนที่ด้วยความเร็วช้ากว่าโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก

อิเล็กโทรโฟรีดิกโมบิลิตี้ สามารถหาได้จากสมการที่ 1

$$\mu_{ep} = \frac{v_{ep}}{E} = \frac{ze}{6\pi\eta r_h} \qquad (1)$$

เมื่อ z คือ ค่าประจุของสาร

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

η คือ ความหนืดของสารละลายบัฟเฟอร์ (g cm^{-1} sec^{-1})

r_h คือ รัศมีไฮโดรไดนามิกของไอออน ซึ่งเป็นรัศมีของไอออนที่มีโมเลกุลของน้ำล้อมรอบขณะที่ไอออนเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า

ปัจจัยที่มีผลต่อค่า μ_{ep} ได้แก่

1) ความแรงไอออนนิก (Ionic strength) หรือความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ โดยเมื่อเพิ่มความแรงของไอออนิก ทำให้ Effective charge (z) ลดลง r_h มากขึ้น (r_h จะเป็นผลรวมของ r_h ของไอออนของสารตัวอย่างและเคาเตอร์ไอออน (counter ion) ดังนั้นค่า μ_{ep} จะลดลง

2) ความหนืดและอุณหภูมิ โดยสมการที่ 1 ค่า μ_{ep} จะแปรผกผันตามความหนืดของสารละลายบัฟเฟอร์ ดังนั้นเมื่อเพิ่มค่าความหนืด ค่า μ_{ep} จะลดลง การเพิ่มอุณหภูมิทำให้ความหนืดของสารละลายบัฟเฟอร์ลดลง ดังนั้นค่า μ_{ep} จะเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มของอุณหภูมิ โดยทั่วไปค่า μ_{ep} เพิ่มขึ้น 2 ถึง 3 % ต่อการเพิ่มอุณหภูมิ 1 องศาเซลเซียส

3) พีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีผลต่อค่า μ_{ep} ของสารตัวอย่างที่เป็นกรดอ่อนหรือกรดแก่ โดยการเพิ่มพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ จะมีผลต่อการเพิ่มดีกรีการแตกตัวของสาร (The degree of dissociation) ของกรดอ่อน ทำให้ค่า μ_{ep} ของกรดอ่อนเพิ่มขึ้น และลดดีกรีของโปรโตเนต (The degree of protonate) ของเบสอ่อน ทำให้ μ_{ep} ของเบสอ่อนลดลง

4) ตัวทำละลายอินทรีย์โดยทั่วไป เมื่อเติมตัวทำละลายอินทรีย์ มีผลทำให้ค่า μ_{ep} ลดลง เนื่องจากดีกรีการแตกตัวของสารที่เป็นกรดอ่อนหรือเบสอ่อนลดลง จึงทำให้ Effective charge ของสารลดลง ดังนั้นมีผลทำให้ลดค่า μ_{ep}

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5) ความแรงของสนามไฟฟ้า (E) การเพิ่ม E ส่งผลให้ความหนืดของสารละลายลดลง สารละลายสามารถเคลื่อนที่ได้เร็วขึ้น

2.4.2 อิเล็กโทรออสโมติกโฟล์ว (Electroosmotic flow; EOF) (Grossman, 1992) ที่บริเวณผิวด้านในของหลอดแคปปิลารีประกอบด้วยหมู่ซิลินอล (-Si-OH) และเมื่อสัมผัสกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชมากกว่า 3 จะเกิดการไอออนไนซ์ ทำให้ผิวด้านในของแคปปิลารีมีประจุลบ ดังสมการที่ 2 และ 3

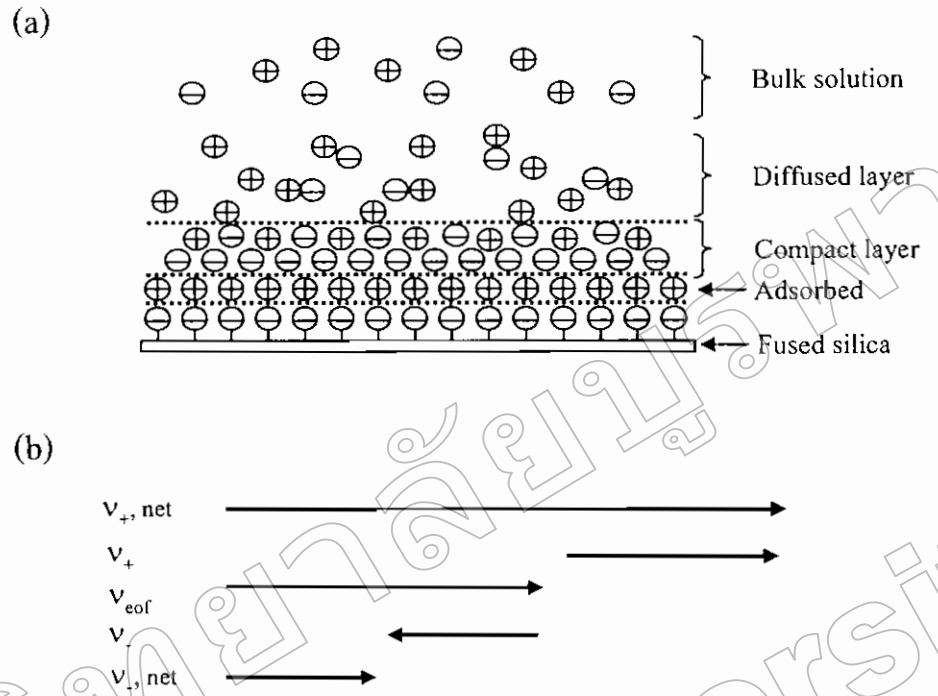
$$\text{-Si-OH(s)} + OH^-(aq) \rightleftharpoons \text{-Si-O}^-(s) + H_2O(l) \quad (2)$$

$$\text{-Si-OH(s)} + H_2O(l) \rightleftharpoons \text{-Si-O}^-(s) + H_3O^+(aq) \quad (3)$$

จากสมการที่ 2 และ 3 โดยทั่วไปในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส จะปรับสภาพผิวด้านในของหลอดแคปปิลารีด้วยเบสแก่ เช่น NaOH และตามด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ดังนั้น H^+ จึงน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับแคทไอออนจากสารละลายบัฟเฟอร์ ขั้นตอนแรกเมื่อหมู่ซิลินอลที่อยู่ผิวด้านในของหลอดแคปปิลารีแตกตัวมีประจุลบ(-Si-O$^-$) ไอออนบวกจากสารละลายบัฟเฟอร์เกิดเป็น Electric double layer ที่ผิวแคปปิลารี แสดงดังภาพที่ 3(a) ประจุลบที่ผิวของแคปปิลารีดึงดูดไอออนบวกของสารละลายบัฟเฟอร์เกิดเป็นชั้นแรก เรียกชั้นนี้ว่า Compact layer หรือ Immobile layer ซึ่งไอออนบวกที่ชั้นนี้จะไม่สามารถเคลื่อนที่ได้เนื่องจากอิทธิพลของแรงไฟฟ้าสถิต (Electrostatic force) และ แรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der waals force) ประจุลบที่เหลือจะดึงดูดไอออนบวกที่มากเกินพอเกิดเป็นชั้นที่สอง เรียกชั้นนี้ว่า Diffused layer หรือ Mobile layer และไอออนบวกที่เหลือจะอยู่ใน Bulk solution โดยแรงดึงดูดของประจุลบกับไอออนบวกที่ผิวของแคปปิลารีในชั้น Diffused layer มีค่าน้อยกว่าแรงดึงดูดของประจุลบกับไอออนบวกที่ผิวของแคปปิลารีในชั้น Compact layer

ผลของการเกิด Electric double layer ภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้าไอออนที่มีอยู่มากมายจากสารละลายบัฟเฟอร์ในชั้นของ Diffused layer และ Bulk solution ไอออนลบถูกดึงดูดเข้าหาขั้วแอโนด และไอออนบวกที่มากเกินพอในชั้นการแพร่ของ Double layer ถูกดึงดูดเข้าหาขั้วแคโทด เรียกการเคลื่อนที่ด้วยอิทธิพลนี้ว่าการไหลของอิเล็กโทรออสโมซิส (Electroosmosis) ซึ่งทำหน้าที่เหมือนปั๊มในเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ ลิควิด โครมาโทกราฟี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 3 (a) แสดง Electric double layer และ (b) แสดงพฤติกรรมการเคลื่อนที่ของสารภายใต้สภาวะที่มี EOF และกรณีที่ผิวของแคปปิลารีเป็นประจุลบและใช้ขั้วไฟฟ้าปกติ ν_{+}, net = ความเร็วสุทธิของสารประจุบวก, ν_{+} = ความเร็วอิเล็กโทรโฟรีดิกของสารประจุบวก, ν_{eof} = ความเร็วของการไหลอิเล็กโทรออสโมติก, ν_{-}, net = ความเร็วสุทธิของสารประจุลบ, ν_{-} = ความเร็วอิเล็กโทรโฟรีดิกของสารประจุลบ (Grossman, 1992)

จากภาพที่ 3(b) แสดงพฤติกรรมการเคลื่อนที่ของสารภายใต้สภาวะที่มี EOF เมื่อผิวแคปปิลารีเป็นประจุลบและด้านเครื่องตรวจวัดเป็นขั้วแคโทด (ขั้วลบ) แรง EOF จะมีทิศการไหลไปทางขั้วแคโทด สารตัวอย่างที่เป็นไอออนบวกมีทิศทางของ μ_{ep} ไปทางขั้วแคโทดเช่นกัน ดังนั้นไอออนบวกจะเคลื่อนที่ไปขั้วแคโทดด้วยแรง EOF และความเร็วของการเคลื่อนทางไฟฟ้าของสาร ($\nu_{+net} = \nu_{+} + \nu_{eof}$) โดยที่ไอออนบวกที่มีประจุมาก (ค่า μ_{ep} มาก) จะเคลื่อนที่ออกมาก่อน สารตัวอย่างที่มีไอออนลบซึ่งมีทิศทางของ μ_{ep} ไปทางขั้วแอโนด (ขั้วบวก) แต่ถ้า ν_{eof} มีขนาดมากกว่า ν_{+} ไอออนลบสามารถเคลื่อนที่ไปขั้วแคโทดผ่านเครื่องตรวจวัดได้ โดยลำดับการเคลื่อนที่จะตรงกันข้ามกับไอออนบวก กล่าวคือ ไอออนลบที่มีประจุมากและมีรัศมีไฮโดรไดนามิกน้อย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

(ค่า μ_{ep} มาก) จะเคลื่อนที่ออกมาทีหลัง ส่วนสารที่ไม่มีประจุจะเคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัดได้เนื่องจากแรง EOF

อิเล็กโทรออสโมติกโฟล์วโมบิลิตี้ของสารละลายตัวอย่างสามารถหาได้จากสมการที่ 4 (Rose & Jorgenson, 1998, pp. 642-648)

$$\mu_{eof} = \frac{\nu_{eof}}{V_i} L \qquad (4)$$

เมื่อ μ_{eof} คือ อิเล็กโทรออสโมติกโฟล์วโมบิลิตี้ของสารละลายตัวอย่าง ($cm^2V^{-1}sec^{-1}$)

ν_{eof} คือ ความเร็วของการไหลอิเล็กโทรออสโมติกของสารละลายตัวอย่าง ($cm\,sec^{-1}$)

V_i คือ ศักย์ไฟฟ้า (V)

L คือ ความยาวของแคปปิลารี (cm)

นอกจากนี้อิเล็กโทรออสโมติกโฟล์วโมบิลิตี้ยังขึ้นอยู่กับความหนืดและความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ดังสมการที่ 5 – 7

$$\mu_{eof} = \frac{\varepsilon\zeta}{\eta} \qquad (5)$$

ζ คือ ค่าศักย์ไฟฟ้าบริเวณดับเบิ้ลเลเยอร์ (Zeta potential) หาได้จากสมการที่ 6 (Weinberger, 1993, p. 24)

$$\zeta = \frac{4\pi\delta e}{\varepsilon} \qquad (6)$$

δ คือ ความหนาของชั้นดับเบิ้ลเลเยอร์สามารถหาได้จากสมการที่ 7

$$\delta = \left[3\times10^7 |Z| C^{1/2}\right]^{-1} \qquad (7)$$

เมื่อ μ_{eof} คือ อิเล็กโทรออสโมติกโฟล์วโมบิลิตี้ ($cm^2V^{-1}sec^{-1}$)

ζ คือ ค่าศักย์ไฟฟ้าบริเวณดับเบิ้ลเลเยอร์ (V)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ε คือ ค่าคงที่ไดอิเล็กทริคของสารละลายบัฟเฟอร์

η คือ ความหนืดของสารละลายบัฟเฟอร์ ($g\ cm^{-1}\ sec^{-1}$)

e คือ ประจุทั้งหมดในสารละลายต่อหน่วยพื้นที่

δ คือ ความหนาของดับเบิ้ลเลเยอร์

Z คือ จำนวนเวเลนต์อิเล็กตรอน

C คือ ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ ($mole\ cm^{-3}$)

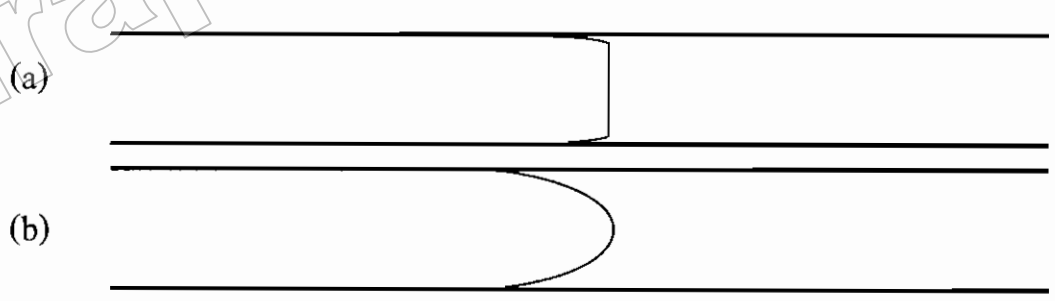
ปัจจัยที่มีผลต่อค่า EOF ได้แก่

1) พีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ โดยการลดพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ ทำให้การแตกตัวของหมู่ซิลินอลที่บริเวณผิวแคปปิลารีลดลง ดังนั้น EOF จะลดลง

2) ความแรงไอออนิกของสารละลายบัฟเฟอร์ ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ ทำให้ EOF ลดลง แต่ถ้าเพิ่มมาก ๆ ขึ้นอาจทำให้ EOF เพิ่มขึ้นเนื่องจากผลของ Joule heating

3) ปัจจัยอื่น ๆ เช่น ความหนืด อุณหภูมิ ความยาวของแคปปิลารีและความแรงของสนามไฟฟ้า มีผลต่อ EOF เช่นเดียวกับมีผลต่อค่า μ_{ep}

ลักษณะการเคลื่อนที่ภายในแคปปิลารีมีลักษณะเป็น Flat profile แสดงดังภาพที่ 4(a) การเคลื่อนที่ในลักษณะนี้ทำให้เกิดการกระจายตัวของสารน้อย ทำให้มีประสิทธิภาพในการแยกดีขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการเคลื่อนที่แบบ Laminar flow ที่พบในเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี แสดงดังภาพที่ 4(b)



ภาพที่ 4 (a) ลักษณะการเคลื่อนที่แบบ Flat profile ในเทคนิคแคปปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส และ (b) ลักษณะการเคลื่อนที่แบบ laminar ในเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (Weinberger, 1993)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.5 อิเล็กโทรฟีโรแกรมและไมเกรชั่นไทม์

เมื่อสารตัวอย่างเคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัดจะแสดงผลออกมาเรียกว่า อิเล็กโทรฟีโรแกรม (Electropherogram) และระยะเวลาที่สารเคลื่อนที่จากปลายแคปปิลารีด้านบรรจุสารถึงจุดตรวจวัด เรียกว่า ไมเกรชั่นไทม์ (Migration time, t_m) ในเทคนิคแคปปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส สารจะเคลื่อนที่ภายใต้อิทธิพลของ EOF ดังนั้นผลรวมสุทธิของความเร็ว (ν_{net}) เป็นดังสมการ

$$\nu_{net} = \nu_{ep} + \nu_{eof} \tag{8}$$

$$\nu_{net} = \mu_{ep} + \mu_{eof} \tag{9}$$

t_m มีความสัมพันธ์กับตัวแปรต่างๆ ดังสมการ

$$t_m = \frac{l}{\nu_{net}} = \frac{lL}{(\mu_{ep} + \mu_{eof})V} \tag{10}$$

เมื่อ L คือ ความยาวทั้งหมดของแคปปิลารี (cm)

l คือ ความยาวของแคปปิลารีจากจุดฉีดสารถึงจุดตรวจวัด (cm)

V คือ ศักย์ไฟฟ้า (V)

ค่าไมเกรชั่นไทม์ของสารขึ้นอยู่กับค่าศักย์ไฟฟ้าที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ เพราะอิเล็กโทรออสโมติกโฟล์วโมบิลิตี้และความเร็วอิเล็กโทรโฟรีติกโมบิลิตี้แปรผันตรงกับความแรงของสนามไฟฟ้า ด้วยเหตุนี้เมื่อศักย์ไฟฟ้าเพิ่มขึ้น ความเร็วในการเคลื่อนที่ของสารก็เพิ่มขึ้นด้วยส่งผลให้ค่าไมเกรชั่นไทม์ลดลง ดังสมการที่ 11

$$\nu = (\mu_{ep} + \mu_{eof})E \tag{11}$$

E คือ ความแรงของสนามไฟฟ้าหาได้จากสมการที่ 12

$$E = \frac{V}{L} \tag{12}$$

โดยที่ ν คือ ความเร็วของสารที่มีประจุ ($cm\ sec^{-1}$)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

μ_{ep} คือ อิเล็กโทรโฟรีติกโมบิลิตี้ ($cm^2\ sec^{-1}\ V^{-1}$)

μ_{eof} คือ อิเล็กโทรออสโมติกโฟล์วโมบิลิตี้ ($cm^2V^{-1}sec^{-1}$)

V คือ ศักย์ไฟฟ้า (V)

L คือ ความยาวของแคปปิลารี (cm)

ประสิทธิภาพการแยกของเทคนิคแคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสสามารถอธิบายได้จากสมการที่ 13

$$N = \frac{\mu V}{2D} \qquad (13)$$

เมื่อ N คือ จำนวนเพลตทางทฤษฎี (Number of theoretical plate)

μ คือ ผลรวมของแรงอิเล็กโทรโฟรีติกโมบิลิตี้และอิเล็กโทรออสโมติกโมบิลิตี้ ($cm^2\ V^{-1}\ s^{-1}$)

V คือ ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการแยก (V)

D คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของการแพร่ (Diffusion coefficient) ของสาร ($cm^2 s^{-1}$)

จากสมการที่ 13 ประสิทธิภาพการแยกของเทคนิคแคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสขึ้นอยู่กับศักย์ไฟฟ้าที่ให้แก่ระบบ แต่ไม่ขึ้นกับความยาวของแคปปิลารี การให้ศักย์ไฟฟ้าสูง ๆ มีผลทำให้ประสิทธิภาพการแยกดีขึ้น เนื่องจากสารสามารถเคลื่อนที่ด้วยความเร็วและผ่านแคปปิลารีโดยใช้เวลาน้อยและลดเวลาในการแพร่ของสาร เป็นผลทำให้จำนวนเพลตตามทฤษฎีมีค่ามาก ซึ่งแสดงว่าการแยกมีประสิทธิภาพสูง การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสสามารถให้ค่าการแยกสูงสุดได้ไม่ว่าสารจะมีโมเลกุลขนาดเท่าใดก็ตาม เนื่องจากสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ เช่น DNA และโปรตีน เป็นสารที่มีสัมประสิทธิ์การแพร่ต่ำและมีการกระจายตัวน้อยกว่าโมเลกุลขนาดเล็ก ส่วนสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กก็สามารถเคลื่อนผ่านแคปปิลารีด้วยความเร็วสูง ด้วยเหตุนี้สารจึงมีเวลาในการแพร่น้อยและมีผลทำให้จำนวนเพลตทางทฤษฎีมีค่ามากขึ้น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.6 การศึกษาวิธีวิเคราะห์สาร เดาโนรูบิซิน ไอดารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท

2.6.1 การศึกษาวิธีวิเคราะห์สารโดยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานลิควิดโครมาโทกราฟี

Eksborg and Nilsson (1989) ได้ศึกษาหาปริมาณของไอดารูบิซิน และเมแทบอไลต์หลักคือ ไอดารูบิซินอล ในพลาสมาของคนไข้โรคมะเร็ง ไอดารูบิซินและไอดารูบิซินอล ถูกสกัดจากตัวอย่างพลาสมา 2 มิลลิลิตร (พีเอช 8.1) โดยใช้คลอโรฟอร์ม-1-เอทานอล (9:1) หลังจากนั้นสกัด ในกรดฟอสฟอริก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ การแยกใช้คอลัมน์รีเวอร์สเฟส (LiChrosorb RP-2) ขนาดอนุภาค 5 ไมครอน เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย อะซิโตไนไตรล์-น้ำ-กรดฟอสฟอริก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (32:58:10, v/v/v) ค่าความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 5-100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 484 นาโนเมตร การเก็บตัวอย่างเลือดที่ประกอบด้วยไอดารูบิซิน และเมแทบอลิซึมที่เปลี่ยนไปเป็นไอดารูบิซินอล

Ricciarello et al. (1998) ได้ศึกษาวิเคราะห์หาปริมาณสารอีพิรูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และผลิตผลหลักจากการสันดาปของอีพิรูบิซินและด็อกโซรูบิซิน ได้แก่ 13-*S*-dihydroepirubicin และ 13-dihydrodoxorubicin พร้อมกันในพลาสมาของมนุษย์โดยใช้ไฮเพอร์ฟอร์มานลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) และตรวจวัดทางไฟฟ้า สารตัวอย่างถูกสกัดด้วยเทคนิค Solid phase (SPE) โดยใช้คอลัมน์ตัวดูดซับแบบพอลิเมอร์ (Oasis HLB) เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย น้ำ-อะซิโตไนไตรล์ (71:29,v/v) 0.05 โมลาร์ ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และ 0.05% ไตรเอทิลลามีน (v/v) พีเอช 4.6 คอลัมน์แยกสารชนิด C_{18} เส้นผ่านศูนย์กลางภายในของคอลัมน์มีขนาด 4.6 มิลลิเมตร ยาว 200 มิลลิเมตร อนุภาคที่บรรจุภายในคอลัมน์มีขนาด 10 ไมโครเมตร ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์สารตัวอย่างทั้งหมดอยู่ในช่วง 1-500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 89-93% วิธีนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดจากการรักษาผู้ป่วยด้วยอีพิรูบิซินโดยใช้ด็อกโซรูบิซินเป็นสาร internal standard

Fogli et al. (1999) ได้ศึกษาวิธี HPLC ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์เดาโนรูบิซิน ไอดารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน อีพิรูบิซิน และเมแทบอไลต์ทั้ง 13 ชนิด ในพลาสมาของมนุษย์ ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างพลาสมาของมนุษย์ทำได้โดยการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม/1- เฮบทานอล ผสมกันในอัตราส่วน 9:1 ทำการสกัดอีกครั้งด้วยกรดออร์โธฟอสฟอริกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ การวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีใช้รีเวอร์สเฟส ระบบการชะแบบ isocratic คอลัมน์ที่ใช้คือ supelcosil LC-CN ขนาดอนุภาค 5 ไมครอน ขนาดคอลัมน์ 25 เซนติเมตร × 4.6 มิลลิเมตร เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยสารละลาย 50 มิลลิโมลาร์ โมโนเบสิคฟอสเฟต-อะซิโตไนไตรล์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

(65:35 ร้อยละโดยปริมาตร) ที่ พีเอช 4.0 อัตราการไหล 1.0 มิลลิตรต่อนาที และตรวจวัดด้วยสเปกโทรฟลูออโรเมทรี ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 480 นาโนเมตร และความยาวคลื่นที่ปล่อยแสง 560 นาโนเมตร แอนทราซัยคลินทั้งหมดถูกชะออกมาในเวลา 15 นาที วิธีนี้มีความจำเพาะเจาะจงเพราะโครมาโทรแกรมที่ได้ไม่มีสิ่งรบกวน ความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.4-10,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มีค่ามากกว่า 0.999 ร้อยละการกลับคืนของด็อกโซรูบิซิน-ด็อกโซรูบิซินอล และอีพิรูบิซิน-อีพิรูบิซินอล เท่ากับ 67-109% และ 61-109% ตามลำดับ และสำหรับสารประกอบตัวอื่น ๆ มีค่าเท่ากับ 93-109% ขีดจำกัดของการตรวจวัดมีค่าเท่ากับ 0.4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ความเที่ยงของการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน และการวิเคราะห์ระหว่างวันมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่า 10 % และมีค่าความแม่นอยู่ในช่วง 91-107 %

Kuhlmann, Hofmann, and Weiss (1999) ได้ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณของไอดารูบิซิน และไอดารูบิซินอล พร้อมกันในพลาสมาหนู โดยใช้เทคนิครีเวอร์สเฟส HPLC ตัวอย่างเลือดที่นำมาวิเคราะห์นำมาจากหนู 16 ตัว ตัวอย่างเลือดได้มาจากท่อนำเลือดปริมาณ 2.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หลังจากสกัดโปรตีนออกจากตัวอย่างด้วยอะซิโตไนไตรล์แล้ว ทำการวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ LI chropher 100 RP-18 ขนาดอนุภาค 5 ไมครอน เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยน้ำ-อะซิโตไนไตรล์-THF-กรดฟอสฟอริก-TAE (312:165:20:1:2 ร้อยละโดยปริมาตร) ปรับพีเอช ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5 โมลาร์ อัตรการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วยฟลูออเรสเซนต์ ความยาวคลื่นกระตุ้น 485 นาโนเมตร ความยาวคลื่นปล่อยแสง 542 นาโนเมตร ร้อยละการกลับคืนของไอดารูบิซิน มีค่าเท่ากับ 95.6% และไอดารูบิซินอลมีค่าเท่ากับ 90.7% ขีดจำกัดของการตรวจวัดเท่ากับ 0.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรฉีดสาร 50 ไมโครลิตร ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ 32% (n=10) และ 4.4% (n=10) ของไอดารูบิซิน และไอดารูบิซินอล ตามลำดับ

Zhao and Dash (1999) ได้ศึกษาวิธี HPLC อย่างง่ายด้วยไมโครบอร์คอลัมน์ (microbore column) เพื่อวิเคราะห์สารด็อกโซรูบิซินซึ่งเป็นสารที่มีความสำคัญอย่างมากสำหรับการรักษาโรคมะเร็งกระดูก และมะเร็งเนื้องอก เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย น้ำ-อะซิโตไนไตรล์-กรดอะซิติก (80:90:1, v/v/v, พีเอช 3.0) อัตราการไหล 0.1มิลลิลิตรต่อนาที โดยมีสารเดาโนไมซินเป็น internal standard คอลัมน์แยกสารชนิด C_{18} Luna microbore (50×1 มิลลิเมตร) อนุภาคของเฟสคงที่มีขนาด 5 ไมครอน และตรวจวัดด้วยฟลูออเรสเซนต์ (ความยาวคลื่นกระตุ้น 505 นาโนเมตร ความยาวคลื่นปล่อยแสง 550 นาโนเมตร) ใช้ระบบการวิเคราะห์แบบ isocratic ขีดจำกัดของการตรวจวัดมีค่าเท่ากับ 0.02 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร กราฟมาตรฐานอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.01-0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของความเที่ยงสำหรับการวิเคราะห์สารตัวอย่างในวัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เดียวกันและการวิเคราะห์ระหว่างวันมีค่าน้อยกว่า 4.0% และ 3.2% ตามลำดับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของร้อยละการกลับคืนต่ำกว่า 4.1% (n=6)

Arnold, Slack, and Straubinger (2004) ได้ศึกษาการหาปริมาณของด็อกโซรูบิซินและเมแทบอลิซึมของสาร ด้วยวิธี LC-MS-MS คอลัมน์ที่ใช้คือ C_{18} (Zobax Extend Rapid Resolution) ขนาด 50 มิลลิเมตร × 4.6 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาคบรรจุ 3.5 ไมครอน ใช้ระบบการวิเคราะห์แบบ isocratic อัตราการไหล 250 ไมโครลิตรต่อนาที เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย 40% อะซิโตไนไตรล์ และ 60% แอมโมเนียมอะซิเตต ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ร้อยละโดยปริมาตร (v/v) พีเอช 3.5 ความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.125-10,000 นาโนโมลาร์ ขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณเท่ากับ 0.247 นาโนโมลาร์

Badea, Lazar, Moja, Nicolescu, and Tudose (2005) ได้ศึกษาวิเคราะห์ปริมาณสารแอนทราซัยคลินและอนุพันธ์ของสารได้แก่ ด็อกโซรูบิซินโนน เดาโนรูบิซินโนน ด็อกโซรูบิซิน อีพิรูบิซิน เดาโนรูบิซิน อีพิ-เดาโนรูบิซิน และไอดารูบิซิน ด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยตัวทำละลายชนิด A ผสมกับตัวทำละลายชนิด B ในอัตราส่วน 40:60 (ตัวทำละลายชนิด A คือ 0.4 % โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต พีเอช 2.0 ตัวทำละลายชนิด B คือ สารละลายผสมเมทานอล:อะซิโตไนไตรล์ อัตราส่วน 1:1, v/v) คอลัมน์แยกสารชนิด Zorbax Eclipse XDB-C_8 ความยาวของคอลัมน์ 25 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.6 มิลลิเมตร สารที่ใช้บรรจุในคอลัมน์มีขนาด 5 ไมโครเมตร อุณหภูมิของคอลัมน์ 35 องศาเซลเซียส ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ปริมาตรฉีดสาร 20 ไมโครลิตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 2 มิลลิลิตรต่อนาที ร้อยละการกลับคืนที่ได้จากการทดลองมีค่าอยู่ในช่วง 98.1-100.0% ขีดจำกัดของการตรวจวัดอยู่ในช่วง 29-162 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณสารอยู่ในช่วง 38-280 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

Yang (2007) ได้ศึกษาวิเคราะห์ปริมาณของเดาโนรูบิซิน ใน K_3EDTA ในพลาสมาหนูตัวอย่างพลาสมา 100 ไมโครลิตร ถูกสกัดด้วยเมทานอลกับอะซิโตน ขั้นตอนการตกตะกอนของโปรตีนทำได้โดยเติม 50 ไมโครลิตร ของ 70% โดยน้ำหนักของซิงค์ซัลเฟตและนำไปวิเคราะห์ ด้วย LC/MS/MS โดยระบบ positive turbo-ion spray ionization เครื่องมือ LC/MS/MS ในระบบนี้ใช้คอลัมน์ชนิด Thomo Finningan Beta Basic phenyl ขนาด 5 เซนติเมตร × 2.1 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาคบรรจุ 3 ไมครอน เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย 25% อะซิโตไนไตรล์ : 0.1% กรดฟอร์มิก ความแม่นของการทดลองอยู่ในช่วง 95-105% และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานน้อยกว่า 10%

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.6.2 การศึกษาวิธีวิเคราะห์สารโดยเทคนิคแคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส

Sczesny, Hempel, Boos, and Blaschke (1998) ได้ศึกษาวิธีแคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อตรวจวัดการให้ยาของเมทโทเทรกเซท ลูโคโวลิน และเมแทบอไลต์ของสาร ยาเมทโทเทรกเซทที่รับประทานเข้าไปในปริมาณมากมีความสำคัญสำหรับการรักษาผู้ป่วยเด็กที่เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว หรือ เนื้องอกร้ายแรงที่ประกอบด้วยเนื้อเยื่อกระดูก วิธีแคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสสามารถนำมาพัฒนาเพื่อตรวจวัดเมแทบอไลต์ของเมทโทเทรกเซทในพลาสมาของผู้ป่วยโรคมะเร็ง เมแทบอไลต์ที่วิเคราะห์ปริมาณได้แก่ 7-hydroxymethotrexate (7-OHMTX), 2,4-diamino-N^{10}-methylpteroic acid และ 5-methyltetrahydrofolic acid สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารที่มีความเข้มข้นสูง (>10 ไมโครโมลาร์) การตกตะกอนของโปรตีนด้วยอะซิโตไนไตรล์ก็เพียงพอแล้วสำหรับการเตรียมตัวอย่าง สารตัวอย่างทั้งหมดสกัดผ่านทางเทคนิค solid phase extraction และพัฒนาให้ดีขึ้นด้วย C_{18} คอลัมน์ โดยใช้อะมิโนเทอรินเป็น internal standard วิธีนี้ใช้ตัวตรวจวัดยูวีที่ความยาวคลื่น 300 นาโนเมตร ร้อยละการกลับคืนของสารสนใจทั้งหมดอยู่ในช่วง 84.4-92.7% ขีดจำกัดการตรวจวัดมีค่าเท่ากับ 0.005, 0.015, 0.02, 0.05 และ 0.02 ไมโครโมลาร์ สำหรับการวิเคราะห์สารเมทโทเทรกเซท 2,4-diamino-N^{10}-methylpteroic acid, 7-hydroxymethotrexate 5-methyltetrahydrofolic acid และ ลูโคโวลิน ตามลำดับ

Simeon, Chatelut, Canal, Nertz, and Coudere (1999) ได้ศึกษาวิเคราะห์สารกลุ่มแอนทราซัยคลินด้วยแคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสและนำมาประยุกต์ใช้เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณเดาโนรูบิซินในเนื้องอกชนิดร้ายแรงที่เกิดที่เนื้อเยื่อยึดต่อ โดยใช้การตรวจวัดด้วยวิธี เลเซอร์-อินดิวซ์ ฟลูออเรสเซนต์ (Laser-induced Fluorescence: LIF) สำหรับการวิเคราะห์ CE ด้วย LIF เป็นวิธีที่มีสภาพไวและมีความจำเพาะซึ่งมีสภาพไวมากกว่าการตรวจวัดด้วยยูวี 100-100,000 เท่า ในการทดลองนี้ได้ใช้ LIF เชื่อมต่อกับ HPLC เพื่อต้องการค่าการแยกและ สภาพไวที่สูง จากนั้นทำการเปรียบเทียบการตรวจวัดตัวอย่างระหว่างการใช้ HPLC-LIF และ CE-LIF พบว่า CE-LIF มีสภาพไวดีกว่า HPLC-LIF 50 เท่า เนื่องจากความเข้มข้นของการฉีดสารตัวอย่างมีค่าลดลง สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์เดาโนรูบิซินด้วย HPLC-LIF คือใช้ระบบการวิเคราะห์แบบ isocratic คอลัมน์ชนิด C_{18} (Enconosphere) อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์เดาโนรูบิซินด้วย CE-LIF คือ 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตบัฟเฟอร์:อะซิโตไนไตรล์ (8:2, v/v) พีเอช 4.0 ศักย์ไฟฟ้า 20 กิโลโวลต์ แคปปิลารีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 75 ไมโครเมตร ยาว 95 เซนติเมตร ความยาวคลื่นกระตุ้น 488 นาโนเมตร ความยาวคลื่นปล่อยแสง 580 นาโนเมตร

Hu, Zhang, Zhou, and Fang (2000) ได้ศึกษาวิเคราะห์ปริมาณสารเคาโนรูบิซินในตัวอย่างปัสสาวะโดยใช้เทคนิคแคปปิลารีโซนอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยตัวตรวจวัดด้วยเทคนิค Amperometry การทดลองนี้ใช้คาร์บอนดิสเป็นขั้วไฟฟ้าใช้งานและใช้ลวดแพลทินัมเป็นขั้วไฟฟ้าช่วย สภาวะที่เหมาะสมของการแยกสารคือ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ พีเอช 7.8 ศักย์ไฟฟ้า 8 กิโลโวลต์ และ 0.95 โวลต์ (ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง Ag/AgCl, KCl 3 โมลาร์) ใช้เป็นศักย์ไฟฟ้าของการตรวจวัด แคปปิลารีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 25 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางรอบนอก 360 ไมโครเมตร ความยาวของแคปปิลารี 35 เซนติเมตร ค่าของความเป็นเส้นตรงสำหรับวิเคราะห์สารอยู่ในช่วง 2×10^{-6} ถึง 2×10^{-4} โมลาร์ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มีค่าเท่ากับ 0.9995 ขีดจำกัดของการตรวจวัดมีค่าเท่ากับ 8×10^{-7} โมลาร์ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของไมเกรชั่นไทม์และพื้นที่พีกมีค่าเท่ากับ 1.22% และ 0.98% ตามลำดับ ร้อยละการกลับคืนอยู่ระหว่าง 93.2–109.0% การวิเคราะห์หาปริมาณสารเคาโนรูบิซินสามารถนำตัวอย่างปัสสาวะมากรองและวิเคราะห์ได้ทันที

Gavenda et al. (2001) ได้ศึกษาวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มแอนทราซัยคลินได้แก่ เคาโนรูบิซิน และ ด็อกโซรูบิซิน ในตัวอย่างพลาสมาโดยใช้แคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยตัวตรวจวัดยูวี ได้นำเทคนิค sweeping เข้าช่วยเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารตัวอย่าง การนำเทคนิค sweeping มาใช้ส่งผลให้การดูดซับของตัวอย่างที่ผนังแคปปิลารีลดลง สภาวะที่เหมาะสมของการแยกสารคือสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ พีเอช 2.5, 20% เมทานอลโดยปริมาตร (v/v) และโซเดียมโดเดคซิลซัลเฟตเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และศักย์ไฟฟ้า 30 กิโลโวลต์ การให้ศักย์ไฟฟ้าเพื่อแยกสารเป็นแบบ reverse polarity กระแสไฟฟ้าอยู่ในช่วง 80-85 ไมโครแอมแปร์ และฉีดสารด้วยเทคนิค electrokinetic injection แบบ normal polarity เป็นเวลา 3 วินาที แคปปิลารีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 50 ไมโครเมตร ความยาว 75 เซนติเมตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 234 นาโนเมตร ขีดจำกัดของการตรวจวัดมีค่าเท่ากับ 1×10^{-9} นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

Perez-Ruiz, Martinez-Lozano, Sanz, and Bravo (2001) ได้ศึกษาวิเคราะห์หาปริมาณสารด็อกโซรูบิซิน เคาโนรูบิซิน และไอดารูบิซินในตัวอย่างเซรั่มได้พร้อมกันโดยใช้แคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยตัวตรวจวัดเลเซอร์-อินดิวซ์ฟลูออเรสเซนต์ สภาวะที่เหมาะสมที่สุดของการแยกสารทั้งสามชนิดคือ สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ พีเอช 9.5, ประกอบด้วยอะซิโตไนไตรล์ 30% โดยปริมาตร (v/v) อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และศักย์ไฟฟ้า 15 กิโลโวลต์ แคปปิลารีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 75 ไมโครเมตร ความยาว 57 เซนติเมตร ความยาวคลื่น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

กระตุ้น 488 นาโนเมตร ความยาวคลื่นของการปล่อยแสง 560 นาโนเมตร ค่าของความเป็นเส้นตรงสำหรับวิเคราะห์สารอยู่ในช่วง 10-500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ขีดจำกัดของการตรวจวัดมีค่าเท่ากับ 0.9 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร การเติมอะซิโตไนไตรล์ในสารละลายบัฟเฟอร์สามารถปรับปรุงค่าการแยกระหว่างสารเดาโนรูบิซินกับไอดารูบิซิน แต่ส่งผลทำให้ไมเกรชั่นไทม์ของสารตัวอย่างเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม สารทั้ง 3 ชนิดใช้เวลาในการวิเคราะห์ 10 นาที

Griese, Blaschke, Boos, and Hempel (2002) ได้ศึกษาวิเคราะห์ปริมาณสารเดาโนรูบิซินอิสระที่รวมตัวกับไลโพโซม เดาโนรูบิซินอลในพลาสมาโดยใช้แคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส สภาวะที่เหมาะสมของการแยกสารคือ สารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ พีเอช 5.0, สเปอร์มีนเข้มข้น 19.8 ไมโครโมลาร์ และ 70% อะซิโตรไนไตรล์ โดยปริมาตร (v/v) ศักย์ไฟฟ้าแยกสาร 25 กิโลโวลต์ ฟิวส์ซิลิกาแคปปิลารีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 50 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางรอบนอก 375 ไมโครเมตร ความยาว 40 เซนติเมตร ความยาวคลื่นกระตุ้น 488 นาโนเมตร ความยาวคลื่นปล่อยแสง 520 นาโนเมตร ขีดจำกัดของการตรวจวัดของสารตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการสันดาปแล้วมีค่าเท่ากับ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของความเที่ยงของการวิเคราะห์สารเดาโนรูบิซินและเดาโนรูบิซินอลภายในวันเดียวกันมีค่าน้อยกว่า 8.6 และ 6.6% (n=7) และการวิเคราะห์ระหว่างวันมีค่าน้อยกว่า 11.4% และ 11.2% (n=6) ตามลำดับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของร้อยละการกลับคืนของเดาโรรูบิซินและเดาโนรูบิซินอลของการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันมีค่าต่ำกว่า 6.9% และ 9.1% (n=7) และการวิเคราะห์ระหว่างวันมีค่าต่ำกว่า 9.5% และ 5.9% (n=6) ตามลำดับ

Kuo et al. (2003) ได้ศึกษาวิเคราะห์ปริมาณของเมทโทเทรกเซท และเมแทบอไลต์ของสารอีก 8 ชนิดพร้อมกันในตัวอย่างเลือดด้วยแคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส เมแทบอไลต์ของเมทโทเทรกเซททั้ง 8 ชนิดได้แก่ 7-hydroxymethotrexate (7-OHMTX), 2,4-diamino-N^{10}-methylpteroic acid (DAMPA) และ อนุพันธ์โพลีกลูดาเมตอีก 6 ชนิด ($MTX\text{-}(Glu)_n$, n=2-7) ภายหลังจากการสกัด สารที่สนใจถูกแยกด้วยฟิวส์ซิลิกาแคปปิลารี ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ประกอบด้วยสารละลายไกลซีนบัฟเฟอร์เข้มข้น 1.2โมลาร์ พีเอช 9.3 อุณหภูมิของแคปปิลารี 25 องเซลเซียส และศักย์ไฟฟ้า 20 กิโลโวลต์ ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 300 นาโนเมตร ขีดจำกัดของการตรวจวัดของสารทั้งหมดอยู่ในช่วง 1.0-8.0 ไมโครโมลาร์ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวันน้อยกว่า 6% และ 11% ตามลำดับ ร้อยละการกลับคืนของสารสนใจทั้งหมดมีค่ามากกว่า 94% วิธีนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อตรวจวิเคราะห์เมทโทเทรกเซทในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Rodriguez Flores, Castaneda Penalvo, Espinosa Mansilla, and Rodriguez Gomez (2005) ได้ศึกษาวิธีแคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อวิเคราะห์ปริมาณของเมทโทเทรกเซท ลูโคโวริน และ กรดโฟลิค ในตัวอย่างปัสสาวะของมนุษย์ สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารเมทโทเทรกเซท กรดโฟลินิค และกรดโฟลิค คือ 15 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 12.0 อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และศักย์ไฟฟ้า 25 กิโลโวลต์ โดยใช้แคปปิลารีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 75 ไมโครเมตร ยาว 60 เซนติเมตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างในเวลาประมาณ 9.0 นาที ตัวอย่างปัสสาวะสามารถทำให้บริสุทธิ์โดยขั้นตอน solid phase extraction และชะสารประกอบด้วยสารละลายผสม เมทานอล:น้ำ ในอัตราส่วน 1:1(v/v) ความเป็นเส้นตรงของเมทโทเทรกเซทอยู่ในช่วง 1.0-6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.5-6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับกรดโฟลินิค และกรดโฟลิค ขีดจำกัดการตรวจวัดของสารทั้งสามชนิดในตัวอย่างปัสสาวะมีค่าเท่ากับ 0.35 มิลลิกรัมต่อลิตร

Whitaker et al. (2008) ได้ศึกษาการแยกสารกลุ่มแอนทราซัยคลินด้วยวิธีแคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสที่มีการตัวตรวจวัดแบบเลเซอร์-อินดิวซ์ฟลูออเรสเซนต์ ได้นำมาประยุกต์ใช้เพื่อวิเคราะห์หาสารตัวอย่างที่จับโปรตีนในเลือดด้วยเทคนิค Ultrafiltration สารกลุ่มแอนทราซัยคลินที่วิเคราะห์ปริมาณได้แก่ เดาโนรูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และ อีพิรูบิซิน สภาวะที่เหมาะสมที่สุดของการแยกสารคือ สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 105 มิลลิโมลาร์ พีเอช 9.0, 30 % เมทานอลโดยปริมาตร (v/v) อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และศักย์ไฟฟ้า 17.5 กิโลโวลต์ แคปปิลารีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 75 ไมโครเมตร ความยาว 62 เซนติเมตร ความยาวคลื่นกระตุ้น 488 นาโนเมตร ความยาวคลื่นของการปล่อยแสง 560 นาโนเมตร ขีดจำกัดการตรวจวัดมีค่าเท่ากับ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

2.6.3 การศึกษาวิธีวิเคราะห์สารโดยเทคนิคอื่นๆ

Cai, Chen, and Gong (2009) ได้ศึกษาอันตรกิริยาของยาเมทโทเทรกเซทด้วยการวิเคราะห์กรดนิวคลิอิก โดยวิธี multi-spectroscopic เมทโทเทรกเซทเป็นยาที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการรักษาทางเคมีบำบัด การรักษาด้วยการรับประทานเมทโทเทรกเซทในปริมาณมากทำให้มีความเป็นพิษโดยตรงกับเซลล์ที่ไม่เกี่ยวข้องกับโรค โดยเฉพาะเซลล์ตับ สำหรับการทดลองการให้ปริมาณยาเมทโทเทรกเซทที่เหมาะสมกับผู้ป่วยที่ทำให้ได้ความเข้มของ Resonance light scattering (RSL) มีค่าที่ความเข้มข้นสูงสุดคือ 4.54 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เมทโทเทรกเซทสามารถเกิดอันตรกิริยากับสารละลายกรดนิวคลิอิกที่มี cetyltrimethylammonium bromide (CTMAB) ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดบวกที่คล้ายกับเซลล์ของมนุษย์ทำให้อยู่ในรูปของ ternary complex (MTX-

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

CTMAB-DNA) ในสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ พีเอช 9.30 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารวัดได้จาก RSL ยูวี-วิสซิเบิ้ล ฟลูออเรสเซนต์ และ NMR spectra สัญญาณของ RSL มีความเข้มสูงสุดที่ความยาวคลื่น 339.5 นาโนเมตร

Lu, Yuan, He, and Chen (2009) ได้ศึกษาวิเคราะห์สารกลุ่มแอนทราซัยคลินคือดือกโซรูบิซินและเดาโนรูบิซินโดยแคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสไมโครชิพ ในตัวอย่างเซรั่มด้วยตัวตรวจวัดแบบเลเซอร์-อินดิวซ์ฟลูออเรสเซนต์ จากการทดลองพบว่าการเติมอะซิโตไนไตรล์สามารถปรับปรุงสภาพไวและประสิทธิภาพของการแยกสาร สภาวะที่เหมาะสมของการแยกสารคือโซเดียมเดตระบอเรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 9.5 ประกอบด้วยอะซิโตไนไตรล์ 40% (v/v) และศักย์ไฟฟ้า 2.1 กิโลโวลต์ ความสัมพันธ์เชิงเส้นของการวิเคราะห์ปริมาณสารอยู่ในช่วง 1-75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขีดจำกัดของการตรวจวัดของดือกโซรูบิซินมีค่าเท่ากับ 0.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเดาโนรูบิซินมีค่าเท่ากับ 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของไมเกรชั่นไทม์และพื้นที่พีกมีค่าน้อยกว่า 5% (n = 9) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสารทั้ง 2 ชนิดใช้เวลาในการวิเคราะห์ 60 วินาที

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University