ว 10925179

SEPARATION OF AMINO ACIDS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

CHOMPHUNUCH PHURISAT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF

THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE

(APPLIED ANALYTICAL AND INORGANIC CHEMISTRY)

อภิธันทนาลาร
จาก
.....
IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

1996

Copyright by Mahidol University

TH
ว548ส
1996

ชื่อวิทยานิพนธ์	การแยกกรดอะมิโนโดยเทคนิค Capillary Electrophoresis
ผู้วิจัย	ชมภูนุช ภูริสัตย์
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เคมีวิเคราะห์และเคมีอินทรีย์ประยุกต์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

ประพิณ	วิไลรัตน์	Ph.D.
ยุวดี	เชี่ยววัฒนา	Ph.D.
ชัชวลี	กะลัมพะเหติ	Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 22 มกราคม พ.ศ. 2540

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบพื้นฐานของโปรตีน ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาวิธีวิเคราะห์กรดอะมิโน 17 ชนิด ซึ่งพบมากในธรรมชาติโดยเตรียมให้อยู่ในสภาพสารอนุพันธ์ด้วยรีเอเจนต์ 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวัดสัญญาณ แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ พบว่ากรดอะมิโน 15 ชนิดจาก 17 ชนิดสามารถแยกได้ภายใน 70 นาทีโดยเทคนิค Capillary Electrophoresis (CE) แบบ Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography (MECC) ด้วยสารละลายอิเล็กโทรไลต์ผสมของโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์และโซเดียมบอเรต 40 มิลลิโมลาร์ pH 10.00 ในท่อแก้วขนาดเล็ก (capillary) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 75 ไมโครเมตร และความยาว 57 เซนติเมตร แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ได้ศึกษาตัวแปรที่มีผลต่อการแยกคือ ความต่างศักย์ และ pH ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ และพบว่าการ

Copyright© by Mahidol University

ใช้ internal standard ทำให้ผลการวิเคราะห์โดย MECC มีความเที่ยงมากขึ้น ส่วนเทคนิคไฮเปอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟฟีกระทำโดยการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่สองชนิดคือสารละลายบัฟเฟอร์อะซีเตท-ฟอสเฟท และสารละลายผสมอะซีโทรไนไตรล์และน้ำ (อัตราส่วน 60:40 โดยปริมาตร) โดยอาศัยเครื่องตรวจวัด 2 ชนิดคือ ยูวี-สเปกโทรโฟโตเมตรี และสเปกโทรฟลูออโรเมตรี พบว่าสามารถให้การแยกที่สมบูรณ์ของสารอนุพันธ์ของกรดอะมิโนทั้ง 17 ชนิด ภายใน 40 นาที ซึ่งเร็วกว่าวิธี CE แบบ MECC การวิเคราะห์ปริมาณโดยเทคนิคไฮเปอร์ฟอร์-มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟฟีโดยใช้วิธี external standard พบว่าให้ค่าความเที่ยงที่ยอมรับได้ ทั้งสองเทคนิคที่ศึกษาได้ประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์กรดอะมิโนในเชิงคุณภาพและปริมาณ ในตัวอย่างสารละลายกรดอะมิโนที่ฉีดให้คนไข้ทางหลอดเลือดดำ เพื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับความเข้มข้นของกรดอะมิโนที่แจ้งบนฉลากตัวอย่าง

Copyright by Mahidol University

Thesis Title	Separation of Amino Acids by Capillary Electrophoresis
Name	Chomphunuch Phurisat
Degree	Master of Science (Applied Analytical and Inorganic Chemistry)
Thesis Supervisory Committee	
	Prapin Wilairat, Ph.D.
	Juwadee Shiowatana, Ph.D.
	Chatvalee Kalambaheti, Ph.D.
Date of Graduation	22 January B.E. 2540 (1997)

ABSTRACT

Amino acids are the building blocks of proteins, and the determination of the amino acids composition of proteins is therefore of considerable interest. This work described the determination of seventeen essential amino acids using precolumn derivatization method. The derivatization reagent is 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC). Two separation techniques were employed, capillary electrophoresis (CE) and high-performance liquid chromatography (HPLC). CE permited AQC derivatives of amino acids to be detected at 254 nm with micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC) mode. Fifteen AQC-amino acids could be separated within 70 minutes using a buffer solution of 25 mM SDS in 40 mM borate (pH 10.00) and a 75 μm i.d.×57 cm fused silica capillary. The effect on the migration behaviour with voltage and pH were investigated. Aminoadipic acid

Copyright by Mahidol University

was used as an internal standard. With reversed-phase high-performance liquid chromatography, the complete separation of seventeen AQC-amino acids was achieved on a C-18 column using an acetate-phosphate buffer as mobile phase A and acetonitrile/water (60:40,v/v) as mobile phase B in combination with UV and fluorescence detection. The gradient elution gave a shorter separation time of 40 minutes, as compared with MECC. Reproducibility and precision obtained from the optimised HPLC, with external standard method, were acceptable. Two techniques were applied to the analysis of intravenous amino acid solution. The results of the analysis using MECC agreed with those obtained by HPLC and also with the label information.

Copyright by Mahidol University