

การวัดขนาดอนุภาคพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธี

Taylor Dispersion Analysis

ร่วมกับการตรวจวัดทางแสงยูวีอาศัยปฏิกิริยาโฟโตเคมีคัลออกซิเดชัน

Size-based Determination of Polysaccharides by

Taylor Dispersion Analysis

with UV-Photochemical Oxidation Detection

พูนทวี แซ่เตีย^{A*}

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ถนนพระรามที่ 6 แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400

Laurent Leclercq and Hervé Cottet

IBMM, Université de Montpellier, CNRS, ENSCM, Montpellier 34095

Phoonthawee Saetear^{A*}

Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University,

Rama VI Road, Toong Phayathai, Ratchathewi, Bangkok 10400

Laurent Leclercq and Hervé Cottet

IBMM, Université de Montpellier, CNRS, ENSCM, Montpellier 34095

บทคัดย่อ

Taylor dispersion analysis (TDA) เป็นวิธีวิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์การแพร่เชิงโมเลกุล (Molecular diffusion coefficient, D) หรือรัศมีไฮโดรไดนามิก (hydrodynamic radius, R_h) ของตัวถูกละลายจากการขยายตัวของสัญญาณ (peak broadening) อันเนื่องมาจากการสัทอนตัวถูกละลายในระบบการไหลแบบลามินาร์ปัวส์ซอง (laminar Poiseuille flow) การตรวจวัดที่มักใช้โดยทั่วไปกับวิธี TDA คือ การตรวจวัดทางแสงช่วงยูวี จึงกลายเป็นข้อจำกัดหลักของการประยุกต์วิธี TDA สำหรับการหาขนาดอนุภาคที่ไม่มีสมบัติในการดูดกลืนแสงยูวี งานวิจัยนี้นำเสนอวิธีตรวจวัดทางเลือกโดยใช้การตรวจวัดทางแสงยูวีร่วมกับปฏิกิริยาโฟโตเคมีคัลออกซิเดชัน (UV-

^AThe Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road, Toong Phayathai, Ratchathewi, Bangkok 10400

*ผู้รับผิดชอบบทความ : phoonthawee.sae@mahidol.edu

doi: 10.14456/tstj.2020.124

photochemical oxidation detection, UV-POD) เพื่อหาขนาดของพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งเป็นสารประกอบที่ไม่ดูดกลืนแสงยูวี วิธี TDA-UV-POD ที่เสนอนี้ใช้เครื่องมือแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (CE) และตรวจวัดสารผลิตภัณฑ์ที่ดูดกลืนแสงยูวีหลังจากการทำปฏิกิริยาโฟโตเคมีคัลออกซิเดชันในสภาวะที่มีค่าความเป็นด่างสูง (สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 130 มิลลิโมลาร์) โดยใช้ความยาวคลื่นที่ 266 นาโนเมตร นอกจากนี้แบบคสแกทเทอริงอินเตอร์เฟียโรเมตรี (Backscattering interferometry, BSI) ยังเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของวิธีตรวจวัดสำหรับเปรียบเทียบขนาดอนุภาคพอลิแซ็กคาไรด์ที่วัดได้ การตรวจวัดแบบ BSI เป็นวิธีที่วัดการเปลี่ยนแปลงของค่าดัชนีหักเห (refractive index, RI) ระหว่างตัวทำละลาย (ในที่นี้ คือ น้ำ) และตัวอย่างพอลิแซ็กคาไรด์ ภายใต้เงื่อนไขที่เหมาะสมของวิธี TDA ค่ารัศมีไฮโดรไดนามิกเฉลี่ยโดยมวลของอนุภาคพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากทั้งวิธี TDA-UV-POD และ TDA-BSI นั้นมีความสอดคล้องกัน การเลือกวิธีตรวจวัดสำหรับวิธี TDA นั้น ขึ้นกับสมบัติทางกายภาพของสารที่สนใจจะวัดขนาดและความไวในการวิเคราะห์ของวิธีตรวจวัด

คำสำคัญ : เทเลอร์ ดิสเพอร์ชัน อะนาไลซิส; พอลิแซ็กคาไรด์; ยูวี-โฟโตเคมีคัลออกซิเดชัน; แบบคสแกทเทอริงอินเตอร์เฟียโรเมตรี; รัศมีไฮโดรไดนามิก

Abstract

Taylor dispersion analysis (TDA) is an analytical method for the determination of the hydrodynamic radius (R_h) or the molecular diffusion coefficient (D) of a solute/compound by analysis from the peak broadening of a plug of the solute/compound under the condition of laminar Poiseuille flow. UV detection mode is commonly employed for TDA, however; the main limitation of TDA-UV method is the lack of a sensitive detection modality for non-UV absorbing solutes/compounds. In this work, we therefore present an alternative detection mode, UV-photochemical oxidation detection (UV-POD), suitable for TDA in order to determine the size of non UV-absorbing polysaccharides. TDA-UV-POD detects the UV-absorbing photooxidized products of polysaccharides in a strong alkaline media (130 mM NaOH) by using the capillary electrophoresis (CE) instrumentation equipped with a UV detector. The irradiation wavelength of 266 nm was selected. Backscattering interferometry (BSI), another kind of suitable detection mode, which measures the relative change of the refractive index (RI) between water eluent and sample, was employed to compare the hydrodynamic radius. Under the conditions of validity of TDA, the mass average R_h values obtained by TDA-UV-POD and TDA-BSI was found in good agreement. Selection of detection mode for TDA is based on the physical properties of the interest compounds and the desired sensitivity in detection.

Keywords: Taylor dispersion analysis; polysaccharide; UV-photochemical oxidation; backscattering interferometry; hydrodynamic radius

1. บทนำ

คาร์โบไฮเดรตเป็นสารประกอบพื้นฐานของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน ซึ่งจำเป็นสำหรับการเผาผลาญของพืชและสัตว์ [1] นอกจากนี้คาร์โบไฮเดรตยังใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่น ใช้เป็นวัตถุเติมแต่งในอาหาร [2,3] และใช้งานทางการแพทย์ [4,5] โครงสร้างของคาร์โบไฮเดรตประเภทพอลิแซ็กคาไรด์มีความซับซ้อนมาก โดยขึ้นกับการกระจายตัวที่หลายหลายของมวลโมเลกุล (M) องค์ประกอบทางเคมีและระดับการแตกแขนงของโครงสร้าง เทคนิคการแยกที่สามารถนำมาใช้สำหรับการศึกษาสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ ได้แก่ การแยกขนาดด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแยกตามขนาดอนุภาค (size exclusion chromatography, SEC) [6] เป็นหนึ่งในเทคนิคที่สำคัญที่สุดที่สามารถใช้ร่วมกับวิธีการตรวจวัดได้หลายประเภท wfhcdj การวัดการหักเหของแสง [6,7] การวัดความหนืด [6,8] และการกระเจิงของแสง [9] เป็นต้น มีรายงานว่าหลักการการกระเจิงของแสงร่วมกับการวัดการหักเหของแสงเหมาะกับการคำนวณหาค่ามวลโมลสัมบูรณ์ ขณะที่การวัดความหนืดจะเหมาะสมกับการหาค่ารีดิวซ์ไดโอดินมิกมากกว่า นอกจากนี้ยังมีเทคนิคการแยกขนาดอนุภาคแบบไหลภายใต้สนาม (field-flow fractionation, FFF) ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการแยกพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งมีโมเลกุลที่ขนาดใหญ่ [10-12]

เทคนิคแคปิลลารี (capillary electrophoresis, CE) เป็นเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุและไม่มีประจุ [13] อย่างไรก็ตาม เครื่องตรวจวัดที่ได้ใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับวิธีโครมาโทกราฟีแบบแยกตามขนาดอนุภาค (SEC) หรือวิธีการแยกขนาดอนุภาคแบบไหลภายใต้สนาม (FFF) นั้นไม่เหมาะสมกับเทคนิค CE เนื่องจากขนาดที่ใหญ่และไม่สามารถตรวจวัดแบบออนไลน์

(online detection) โดยทั่วไปแล้ว เครื่องตรวจวัดที่ใช้กับเทคนิค CE เช่น ยูวี (UV) ฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence) การวัดค่าการนำไฟฟ้าชนิดแผ่นอิเล็กโทรดไม่สัมผัสสารละลาย (contactless coupled conductivity confuctometry, C⁴D) และแมสสเปกโตรเมตรี (mass spectrometry, MS)

สำหรับตัวอย่างอนุภาคในงานวิจัยนี้ คือ อนุภาคพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นโมเลกุลที่ไม่ดูดกลืนแสงยูวีหรือตอบสนองต่อการเรืองแสง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการเปลี่ยนรูปให้เป็นสารอนุพันธ์ที่สามารถดูดกลืนแสงหรือเรืองแสงก่อนตรวจวัด ในปี ค.ศ. 2007 Rovio และคณะ อธิบายการใช้รังสียูวีในการตรวจวัดโดยตรงที่ความยาวคลื่น 270 นาโนเมตร สำหรับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและน้ำตาลโมเลกุลคู่ในตัวอย่างเครื่องดื่ม [14] และเส้นใยจากพืช [15] โดยใช้สารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่มีความเป็นด่างสูงที่ค่าพีเอช 12.6 เพื่อให้โมเลกุลดังกล่าวถูกไอออนไนซ์และเหมาะสมกับการตรวจวัดด้วยเทคนิค CE กลไกการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 270 นาโนเมตร เป็นการตรวจวัดสารประเภท enediolate ที่เกิดขึ้นในสภาวะการทดลองที่เป็นต่างนั่นเอง โดยมีขีดต่ำสุดของการตรวจวัด (limit of detection, LOD) เท่ากับ 0.02-0.05 มิลลิโมลาร์ [14] อย่างไรก็ตาม ในปี ค.ศ. 2011 Sarazin และคณะ ศึกษาและยืนยัน แล้วพบว่าน้ำตาลซูโครสไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวแล้วได้สาร enediolate [16] ตามที่เคยมีรายงานก่อนหน้านี้ ดังนั้น Sarazin และคณะ จึงเสนอปฏิกิริยาทางเคมีโดยใช้แสงซึ่งจะเกิดขึ้นที่หน้าต่างการตรวจวัดของเทคนิค CE (CE detection window) โดยมีแสงยูวีทำหน้าที่กระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาและได้สาร malonaldehyde enolate (อีกชื่อหนึ่ง คือ malondialdehyde, MDA) ซึ่งสามารถถูกตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 265-270 นาโนเมตร [16] ต่อมาในปี ค.ศ. 2013 Oliver และคณะ

[17] ได้เสนอการใช้สนามไฟฟ้าเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของปฏิกิริยาโฟโตเคมีคลอออกซิเดชันด้วยแสงยูวี และในปี ค.ศ. 2015 Schmid และคณะ ตรวจสอบรายละเอียดเพิ่มเติมเกี่ยวกับปฏิกิริยาโฟโตเคมีคลอออกซิเดชันด้วยแสงยูวีที่เกิดขึ้นโดยใช้เทคนิค CE-MS และ HPLC-MS/MS ผลการทดลองพบว่าปฏิกิริยาการเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตเป็น MDA นั้นไวต่อเวลาที่อยู่อาศัยภายใต้แสงยูวีที่ให้กับปฏิกิริยา เนื่องจาก MDA สามารถย่อยสลายเป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่ดูดกลืนรังสียูวี [18] นอกเหนือจากสาร MDA แล้ว ยังมีผลิตภัณฑ์รองอื่น ๆ (minor product) ที่เกิดจากปฏิกิริยาโฟโตเคมีคลอออกซิเดชันอีกด้วย เช่น สารประกอบ $C_4H_6O_2$ (ดูดกลืนแสงยูวีได้) และกรดกลูโคนิก (ดูดกลืนแสงยูวีไม่ได้) [19] นอกจากนี้การเติมตัวเริ่มปฏิกิริยาที่แตกตัวโดยใช้แสง (photo initiator) เช่น Irgacure® 2959 ในสารละลายเล็กโทรไลต์ สามารถเพิ่มความไวในการตรวจวัดได้ถึงร้อยละ 40 สำหรับการวิเคราะห์โมโนและไดแซ็กคาไรด์ [20]

การประยุกต์ปฏิกิริยาโฟโตเคมีคลอออกซิเดชันสำหรับคาร์โบไฮเดรตมีหลากหลาย เช่น การวิเคราะห์โมโนและไดแซ็กคาไรด์ในตัวอย่างเส้นใยพืชในของผสมซับซ้อน [17] ในตัวอย่างทางนิติเวช [21,22] ในตัวอย่างเวชภัณฑ์และเครื่องดื่ม [21] และในตัวอย่างชีเรียลอาหารเข้า [23] นอกจากนี้ยังประยุกต์ปฏิกิริยาโฟโตเคมีคลอออกซิเดชันสำหรับการวิเคราะห์แบบพร้อมกัน (simultaneous analysis) ของโอลิโกเมอร์ (oligomers) ที่มีระดับพอลิเมอร์เชน (DP) สูงสุดอยู่ที่ 7 [24] อย่างไรก็ตาม เมื่อพบทบทวนวรรณกรรมแล้ว ยังไม่พบรายงานการประยุกต์ปฏิกิริยาโฟโตเคมีคลอออกซิเดชันสำหรับการวิเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์สายยาว ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเสนอวิธีตรวจวัดทางเลือกโดยยังใช้การตรวจวัดทางแสงยูวีร่วมกับปฏิกิริยาโฟโตเคมีคลอออกซิเดชัน (UV-

photochemical oxidation detection, UV-POD) เพื่อหาขนาดของพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งเป็นสารประกอบที่ไม่ดูดกลืนแสงยูวี อาศัยวิธี Taylor dispersion analysis (TDA) โดยใช้เครื่องมือแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (CE) และตรวจวัดสารผลิตภัณฑ์ที่ดูดกลืนแสงยูวีหลังจากการทำปฏิกิริยาโฟโตเคมีคลอออกซิเดชันในสถานะที่มีค่าความเป็นด่างสูง (สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 130 มิลลิโมลาร์) โดยใช้ความยาวคลื่นที่ 266 นาโนเมตร และเปรียบเทียบกับขนาดอนุภาคที่ได้จากวิธีนำเสนอกับเทคนิค TDA ที่มีแบบผสมเทอริง อินเตอร์เฟียร์เมตรี (backscattering interferometry, BSI) เป็นตัวตรวจวัดด้วย วิธี TDA-UV-POD ที่เสนอในงานวิจัยนี้ เป็นหนึ่งในทางเลือกสำหรับการวัดหาขนาดของอนุภาคพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ดูดกลืนแสงยูวี

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 สารเคมี

น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ น้ำตาล D-กลูโคส มอนอไฮเดรต ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$, หมายเลขสินค้า A11090) ซื้อจากบริษัท Alfa Aesar GmbH & Co KG จำกัด ประเทศเยอรมนี น้ำตาล D-มอลโตส มอนอไฮเดรต ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$, หมายเลขสินค้า 63418) ซื้อจากบริษัท Sigma Aldrich จำกัด ประเทศญี่ปุ่น และ มอลโตเตตระโอส (Dp4, $C_{24}H_{42}O_{11}$, หมายเลขสินค้า 47877) ซื้อจากบริษัท Supelco จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา

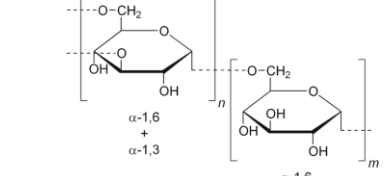
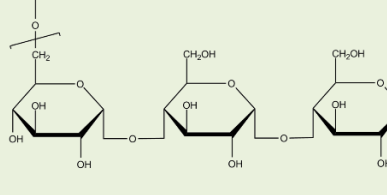
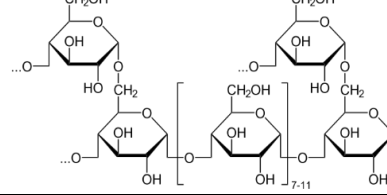
สำหรับพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในงานวิจัย แสดงในตารางที่ 1 โดยที่ Dextran T500 และ dextran T2000 ซื้อจากบริษัท Amersham Pharmacia Biotech จำกัด ประเทศสวีเดน Pullulan P400 และ pullulan P800 ซื้อจากบริษัท Showa Denko K.K. จำกัด ประเทศญี่ปุ่น Oyster glycogen-

Type II ซื้อมาจากบริษัท Sigma Chemical Company จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา และ Phytoglycogen ได้จากการสกัดจาก maize *Sugary-1*

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ซื้อมาจากบริษัท Merck จำกัด ประเทศเยอรมนี ใช้สำหรับการ

เตรียมเป็นอิลูเอนท์ในวิธี TDA-UV-POD และน้ำอัลตราเพียว (18 MΩ cm) จากเครื่อง Milli-Q system ยี่ห้อ Millipore ประเทศฝรั่งเศส ใช้สำหรับการเตรียมสารละลายทุกชนิด และเป็นอิลูเอนท์ในวิธี TDA-BSI

Table 1 Presentation of the polysaccharides studied in this work

Polysaccharides	General chemical structures	Polymer characteristics
Dextran		Branched polysaccharide (branching degree~5%) High dispersity (>>1)
Pullulan		Linear polysaccharide Low dispersity (~1)
Glycogen		Branched polysaccharide with densely packed branches (branching degree ~8-10%) High dispersity (>>1)

2.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่างและอิลูเอนท์

น้ำตาลและพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดต่าง ๆ ที่ซื้อมาจากบริษัทต่าง ๆ อยู่ในรูปผงแห้ง ตัวอย่างสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ถูกเตรียมโดยละลายปริมาณที่เหมาะสมในตัวอย่างที่ละลายที่เหมือนกันกับวิธีการตรวจวัดสำหรับวิธี TDA-UV-POD จะละลายผงแห้งของน้ำตาลหรือพอลิแซ็กคาไรด์ในสารละลาย NaOH เข้มข้น 130 มิลลิโมลาร์ ส่วนวิธี TDA-BSI ใช้น้ำอัลตราเพียวเป็นตัวทำละลายในการเตรียมสารละลายตัวอย่างของน้ำตาลและพอลิแซ็กคาไรด์

2.3 วิธี Taylor dispersion analysis ร่วมกับการตรวจวัดทางแสงยูวีอาศัยปฏิกิริยาโฟโตเคมีคัลออกซิเดชัน (TDA-UV-POD)

การทดลองด้วยวิธี TDA-UV-POD นี้ ใช้เครื่องมือแคปิลลารีเล็กโทรโฟรีซิส (CE) ร่วมกับการใช้ท่อแคปิลลารี (บริษัท Polymicro technologies จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา) ประกอบเข้ากับคาร์ทริดจ์ (cartridge) ของเครื่อง CE ดังแสดงในรูปที่ 1 เริ่มต้นการใช้งานท่อแคปิลลารี ได้ปรับพื้นผิวภายในท่อแคปิลลารีโดยการไหลผ่านสารละลายและน้ำต่อเนื่อง เป็นเวลาอย่างละ 60 นาที ตามขั้นตอนดังนี้

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลาร์ น้ำอัลตราเพียว และสารละลายอีลูเอนต์ (eluent) สภาวะการทดลองด้วยวิธี TDA-UV-POD แสดงในตารางที่ 2 และสำหรับการทดลอง TDA-BSI มีอธิบายใน [25]

2.4 การคำนวณขนาดอนุภาคพอลิแซ็กคาไรด์

สัญญาณที่วัดได้จากวิธี TDA เรียกว่า Taylorgram ซึ่งจะบันทึกโดยตรงจากเครื่องยวี่ที่ติดตั้งมาพร้อมในเครื่อง CE ด้วยโปรแกรม Beckman Coulter's 32 Karat™ Software 8.0 จากนั้นข้อมูล Taylorgram จะนำมาประมวลผลด้วยโปรแกรม Microsoft Excel และ Microcal Origin 6.0 การหาค่ารัศมีไฮโดรไดนามิกเฉลี่ยโดยมวลของอนุภาคพอลิแซ็กคาไรด์นั้น โดยคำนวณจากความแปรปรวนของ

สัญญาณ Taylorgram (peak variance) ด้วยวิธีอินทิเกรชัน (Integration) ซึ่งได้อธิบายไว้ในหัวข้อ 3.4 และใน [26]

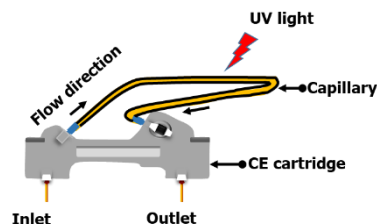


Figure 1 Schematic diagram showing the CE cartridge with fused-silica capillary for size-based determination of polysaccharides using TDA-UV-POD.

Table 2 TDA conditions for analysis of polysaccharides using UV-POD

Parameters	Conditions
CE apparatus and set detection wavelength (nm)	Beckman Coulter, 214 and 266 nm
Capillary length (cm)	40
Inner diameter (i.d., μm)	50
Outer diameter (o.d., μm)	360
Detection window from the inlet (cm)	30
Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	25
Eluent	130 mM NaOH ^a ($\eta = 0.998 \times 10^{-3}$ Pa·s)
Polysaccharide sample	Dextran T500, Dextran T2000, Pullulan P400, Pullulan P800, Oyster glycogen, Phytoglycogen
Hydrodynamic injection	0.2 psi for 8 s (4.07 nL) ($V_i/V_d = 0.7\%$)
Mobilization pressure (psi)	0.1
Linear velocity (mm s^{-1})	0.19
Dilution Factor (for $R_h = 10$ and 100 nm, respectively)	3.5-11

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 สัญญาณ Taylorgram ที่ได้จากวิธี TDA-UV และ TDA-UV-POD ที่ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร

อนุภาคพอลิแซ็กคาไรด์ รวมถึงน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ไม่สามารถดูดกลืนแสงยูวี งานวิจัยนี้จึงยืนยันด้วยการฉีดสารละลายกลูโคสเข้าสู่เครื่อง CE โดยตรงแบบต่อเนื่อง (frontal mode) และตรวจวัดในช่วงยูวีที่ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร (การทดลองแสดงดังรูปที่ 1) ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 2a เป็นไปดังที่คาดไว้ คือ ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส 1-5 กรัมต่อลิตร ไม่สามารถถูกตรวจวัดและให้สัญญาณ Taylorgram ได้ด้วยวิธี TDA-UV เนื่องจากโครงสร้างของกลูโคสมีอะตอมคาร์บอนจำนวน 6 อะตอม และไม่มีหมู่ฟังก์ชันที่เป็นโครโมฟอร์ที่จะสามารถดูดกลืนแสงยูวีนั่นเอง ทั้งนี้สำหรับน้ำตาลชนิดอื่น ๆ และพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ให้ผลการทดลองในทำนองเดียวกัน เนื่องจากสารดังกล่าวมีโครงสร้างเป็นสายสั้นและสายยาวที่มีมอนอเมอร์เป็นโมเลกุลกลูโคสด้วยกันทั้งสิ้น

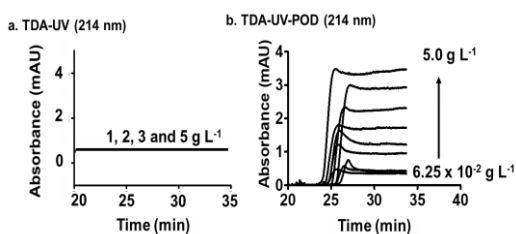


Figure 2 Taylorgram of glucose solutions using the frontal mode with (a) TDA-UV and (b) TDA-UV-POD at 214 nm

งานวิจัยนี้ได้ทดสอบความเป็นไปได้ของปฏิกิริยาโฟโตเคมีคัลออกซิเดชันโดยมีแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร เป็นตัวกระตุ้น โดยทดสอบ

ด้วยระบบการทดลองที่แสดงในรูปที่ 1 เพียงแต่เปลี่ยนตัวทำละลายและอีลูเอนต์เป็นสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 130 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองในรูปที่ 2b แสดงสัญญาณ Taylorgram ที่สามารถถูกตรวจวัดในช่วงยูวีได้ เนื่องจากคลื่นแสงยูวีที่ 214 นาโนเมตร ไปกระตุ้นให้โมเลกุลกลูโคส เกิดปฏิกิริยาโฟโตเคมีคัลออกซิเดชันในสารละลายต่างและได้สารตัวกลาง (intermediate) ที่สามารถดูดกลืนแสงทั้งนี้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร ทำหน้าที่ทั้งเป็นคลื่นแสงยูวีกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาโฟโตเคมีคัลออกซิเดชันของโมเลกุลกลูโคสและเป็นความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัดสารตัวกลาง ผลการทดลองที่แสดงในรูปที่ 2b พบว่าค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่แสดงในแกน y นั้น มีค่าเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสดังแต่ 6.25×10^{-2} ถึง 5 กรัมต่อลิตร ดังนั้นปฏิกิริยาโฟโตเคมีคัลออกซิเดชันด้วยแสงยูวีของโมเลกุลคาร์โบไฮเดรตที่มีกลูโคสเป็นมอนอเมอร์จึงมีความเป็นไปได้ในการวัดหาขนาดอนุภาคพอลิแซ็กคาไรด์

3.2 การเลือกความยาวคลื่นแสงยูวีที่เหมาะสมสำหรับการวัดขนาดพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธี TDA-UV-POD

ความยาวคลื่นแสงยูวีที่ใช้ในการกระตุ้นปฏิกิริยาโฟโตเคมีคัลออกซิเดชันและใช้เป็นความยาวคลื่นในการตรวจวัดสารตัวกลางเป็นปัจจัยแรกที่ได้ศึกษา เนื่องจากจะส่งผลต่อความไวในการตรวจวัด (sensitivity) โดยได้ศึกษาความยาวคลื่นแสงยูวีที่ 214 และ 266 นาโนเมตร ระดับความเข้มข้นของสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ใช้ศึกษาทั่วไปมีค่า 0-5 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 266 นาโนเมตร เริ่มคงที่ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่น้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น

214 นาโนเมตร เช่น กราฟในรูปที่ 3a แสดงค่าการดูดกลืนแสงของ dextran T500 ที่ความยาวคลื่น 266 นาโนเมตร เริ่มคงที่เมื่อความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร ขณะที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร ยังเพิ่มขึ้นและสัมพันธ์เป็นเชิงเส้นตรง อย่างไรก็ตาม การใช้ความยาวคลื่น 266 นาโนเมตรนั้น จะให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ค่อนข้างสูงกว่าการใช้ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร กล่าวคือ มีความไวในการตรวจวัดที่สูงกว่านั่นเอง ดังนั้นจึงเลือกความยาวคลื่น 266 นาโนเมตร เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

สำหรับความเข้มข้นของสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่จะฉีดแบบท่อน (plug injection mode) เข้าสู่ระบบ TDA-UV-POD เพื่อหาขนาดอนุภาคนั้น ควรอยู่ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำและอยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรง การประมาณสัดส่วนการเจือจาง (dilution factor) [27] พบว่าสัดส่วนการเจือจางที่เหมาะสม คือ 3.5-11 สำหรับคาร์โบไฮเดรโตนาไมก (R_n) คือ 10-100 นาโนเมตร ตามลำดับ ดังนั้นระดับความเข้มข้นของสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่เหมาะสมในการฉีดสารละลายแบบท่อนเข้าสู่ระบบ TDA-UV-POD ประมาณ 0.25-0.5 กรัมต่อลิตร สำหรับตัวอย่าง dextran และ pullulan และประมาณ 5 กรัมต่อลิตร สำหรับตัวอย่างไกลโคเจน

3.3 ความไวในการวิเคราะห์ของการตรวจวัดด้วยวิธี TDA-UV-POD

ผลการศึกษาความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) ของการตรวจวัดด้วยวิธี TDA-UV-POD ที่ความยาวคลื่น 266 นาโนเมตร แสดงในรูปที่ 4 ซึ่งเป็นกราฟที่พลอตระหว่างความไวในการวิเคราะห์ (แกน y) และมวลโมเลกุลของตัวอย่างพอลิแซ็กคาไรด์ (แกน x) ค่าความไวในการวิเคราะห์ถูกคำนวณมาจากสัดส่วนความสูงของสัญญาณต่อความเข้มข้นของสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้ฉีดแบบต่อเนื่อง (frontal mode) ผล

การทดลองพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีมวลโมเลกุลสูงกว่าหรือจำนวนหน่วยซ้ำ (repeating unit) ในพอลิเมอร์สูงกว่า (degree of polymerization, D.P. สูงกว่า) จะมีความไวในการวิเคราะห์ที่ต่ำกว่า ซึ่งเป็นผลมาจากร้อยละผลได้ของสารตัวกลางที่เกิดขึ้นและจลนศาสตร์ของปฏิกิริยาโฟโตเคมีคัลออกซิเดชันด้วยแสงยูวีนั่นเอง ถึงแม้ว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีมวลโมเลกุลสูงจะมีความไวในการวิเคราะห์ที่ต่ำ อย่างไรก็ตาม การวัดขนาดอนุภาคด้วยวิธี TDA-UV-POD ที่ความยาวคลื่นแสงยูวี 266 นาโนเมตร ยังคงทำได้ ดังแสดงในผลการทดลองหัวข้อ 3.4 และตารางที่ 3

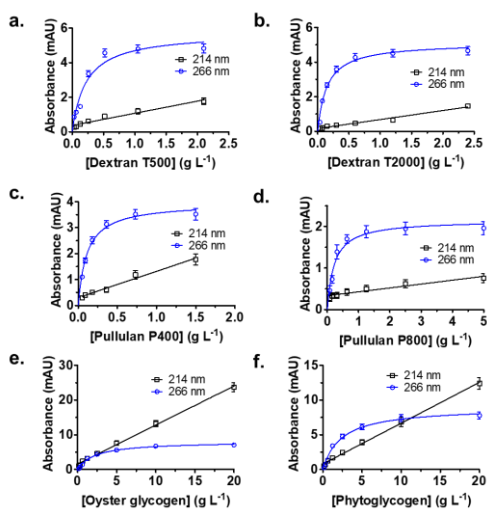


Figure 3 Signal response by for polysaccharides obtained at 214 and 266 nm

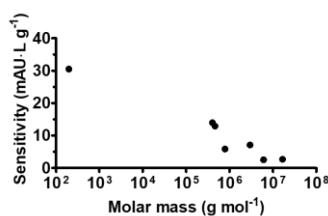


Figure 4 Detection sensitivity obtained by TDA-UV-POD at 266 nm (b) vs the molar mass of (poly)saccharides

Table 3 Comparison of quantitative data on hydrodynamic radius (R_h) of oligo α -D-glucans and α -D-glucan polysaccharides obtained from TDA-BSI and TDA-UV-POD

Samples	Molar mass (g mol ⁻¹)	Dispersity (M_w/M_n)	Hydrodynamic radius (R_h , nm) (mean $\pm$ SD)	
			TDA UV-POD 266 nm (n=3)	TDA-BSI (n=3)
Glucose	180 ^a	1	0.49 $\pm$ 0.04 ^d	0.33 ^e
Maltose	342.31 ^a	1	Not tested	0.46 ^e
Maltotetraose	666.58 ^a	1	Not tested	0.61 ^e
Dextran T500	4.64-4.866 $\times 10^5$ ^{b,c}	1.27-1.69 ^{b,c}	12.3 $\pm$ 0.5 ^d	12.5 $\pm$ 0.5 ^d
Dextran T2000	2.96- 3.27 $\times 10^6$ ^{b,c}	2.41-3.49 ^c	18.9 $\pm$ 0.5 ^d	18.8 $\pm$ 0.5 ^d
Pullulan P400	4.04 $\times 10^5$ ^a	1.06 ^a	16.0 $\pm$ 0.4 ^d	16.1 $\pm$ 0.8 ^d
Pullulan P800	7.88 $\times 10^5$ ^a	1.06 ^a	20.3 $\pm$ 0.6 ^d	21.7 $\pm$ 0.3 ^d
Oyster glycogen	7.41-6.09 $\times 10^6$ ^{b,c}	1.16-1.35 ^{b,c}	12.5 $\pm$ 0.3 ^d	12.4 $\pm$ 0.3 ^d

^a Indicated by manufacturer; ^b Reference [30]; ^c Reference [31]; ^d By left-part integration of the Taylorgram using eqs 1 and 2; ^e From Gaussian fitting

3.4 การหาขนาดอนุภาคพอลิแซ็กคาไรด์

การหาขนาดอนุภาคพอลิแซ็กคาไรด์ทำได้โดยฉีดสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์แบบท่อน (plug injection mode) เข้าในระบบที่แสดงในรูปที่ 1 โดยสัญญาณ Taylorgram ที่บันทึกได้แสดงในรูปที่ 5 มีลักษณะคล้ายการกระจายตัวแบบปกติหรือคล้ายกราฟทรงระฆังคว่ำ ซึ่งมีทั้งแบบสมมาตรและอสมมาตร อย่างไรก็ตาม การฉีดสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์เข้าในท่อแคปิลลารีขนาดเล็กนั้น สารตัวอย่างอาจยึดเกาะหรือเคลือบที่บริเวณผิวด้านในท่อแคปิลลารี ส่งผลให้สัญญาณที่ได้เป็นแบบอสมมาตร ดังนั้นในการคำนวณหาขนาดอนุภาคจะพิจารณาเฉพาะด้านซ้ายของสัญญาณเท่านั้น

$$\sigma_t^2 = \frac{\int h(t)(t-t_0)^2 dt}{\int h(t) dt} = \frac{\sum_{i=n}^m h_i(t_i-t_0)^2(t_{i+1}-t_i)}{\sum_{i=n}^m h_i(t_{i+1}-t_i)} \quad (2)$$

โดยที่ $h(t)$ คือ การตอบสนองของตัวตรวจวัด; t_i คือ เวลา ณ ตำแหน่งเฉพาะเจาะจง i ของสัญญาณ

สมการที่ 1 เป็นสมการที่ใช้ในการคำนวณหาขนาดอนุภาค แสดงในรูปของคาร์ลล์ไฮโดรไดนามิก (R_h)

$$R_h = \frac{4\sigma_t^2 k_B T}{\pi \eta R_c^2 t_0} \quad (1)$$

โดยที่ k_B เป็นค่าคงที่ บ็อลทซ์มัน (Boltzmann constant); T คือ อุณหภูมิในหน่วยเคลวิน; R_c คือ รัศมีของท่อแคปิลลารี; η คือ ค่าความหนืดของอีลูเอนท์ และ t_0 คือ เวลาเฉลี่ยของสัญญาณหรือเวลาที่จุดสูงสุดของสัญญาณ สำหรับ σ^2 คือ ความแปรปรวนของสัญญาณแสดงในหน่วยของเวลา ซึ่งสามารถคำนวณได้จากความสัมพันธ์ที่แสดงในสมการที่ 2 [26,28]

Taylorgram และสำหรับการอินทิเกรตสัญญาณ Taylorgram นั้น จะมี n และ m คือ จุดเริ่มต้นและจุด

สุดท้ายตามลำดับ โดยจะอินทิเกรตเฉพาะด้านซ้ายของสัญญาณเท่านั้น ($t - t_0 \leq 0$) กล่าวคือ ตั้งแต่เวลาเริ่มต้นจนเวลาที่จุดสูงสุดของสัญญาณ Taylorgram การอินทิเกรตเฉพาะด้านซ้ายเช่นนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาสารตัวอย่างยิดเกาะหรือเคลือบที่บริเวณผิวด้านในท่อแคปิลลารีนนั่นเอง

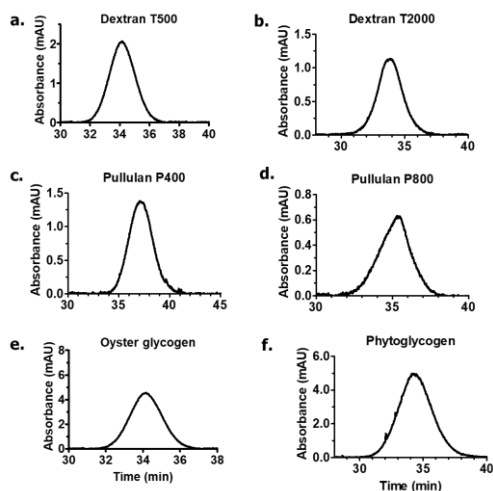


Figure 5 Taylorgrams obtained from polysaccharides. All sample solutions were prepared in the eluent: Dextran T500 = 0.25 g L⁻¹; Dextran T2000 = 0.35 g L⁻¹; Pullulan P400 = 0.35 g L⁻¹; Pullulan P800 = 0.5 g L⁻¹; Oyster glycogen = 5 g L⁻¹ and Phytoglycogen = 6 g L⁻¹.

ตารางที่ 3 แสดงผลการทดลองของค่าขนาดอนุภาคโมเลกุลคาร์โบไฮเดรตประเภทต่าง ๆ (น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว น้ำตาลโมเลกุลคู่ และพอลิแซ็กคาไรด์) ที่ได้จากการวัดด้วยวิธี TDA-UV-POD และ TDA-BSI ขนาดอนุภาคโมเลกุลคาร์โบไฮเดรตที่วัดได้แสดงอยู่ในรูปของค่ารัศมีไฮโดรไดนามิกเฉลี่ยโดยมวล โดยคำนวณจากการอินทิเกรตเฉพาะด้านซ้ายของ

สัญญาณ Taylorgram โดยใช้สมการที่ 1 และ 2 (หัวข้อ 3.4) โดยการวัดขนาดอนุภาคนั้น จะอยู่ภายใต้เงื่อนไขที่เหมาะสมของวิธี TDA คือ มีค่า residence time (τ) ≥ 1.25 โดยที่ $\tau = Dt_0/R_c^2$ และค่า Péclet number (P_e) ≥ 40 โดยที่ $P_e = R_c u/D$ [29]

ค่าขนาดอนุภาคคาร์โบไฮเดรตประเภทต่าง ๆ ที่วัดได้ประมาณ 10-20 นาโนเมตร โดยผลการทดลองจากการวัดขนาดอนุภาคด้วยวิธี TDA-UV-POD โดยใช้ความยาวคลื่น 266 นาโนเมตร ให้ค่าเฉลี่ยรัศมีไฮโดรไดนามิกเฉลี่ยโดยมวลที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับผลการทดลองที่ได้จากวิธี TDA-BSI ดังนั้นจึงได้เปรียบเทียบทางสถิติของค่าขนาดของพอลิแซ็กคาไรด์ที่แสดงในตารางที่ 3 โดยใช้สถิติ paired *t*-test พบว่าวิธี TDA-UV-POD (266 นาโนเมตร) ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ให้ค่าขนาดอนุภาคพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่แตกต่างอย่างมีสำคัญกับค่าขนาดที่ได้จากวิธี TDA-BSI ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($t_{cal} = 0.89$, $t_{crit} = 3.18$) นอกจากนี้วิธีวิเคราะห์ทั้งสองยังมีค่าความเที่ยงที่ดี โดยมีร้อยละเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่า 5

4. สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้นำเสนอวิธีทางเลือกเป็นครั้งแรกสำหรับการหาขนาดอนุภาคพอลิแซ็กคาไรด์บางชนิดที่ไม่มีสมบัติในการดูดกลืนแสงยูวี วิธีที่ใช้วิเคราะห์ คือ Taylor dispersion analysis (TDA) ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์การแพร่เชิงโมเลกุล (molecular diffusion coefficient, D) หรือรัศมีไฮโดรไดนามิก (hydrodynamic radius, R_h) ของตัวถูกละลายจากการขยายตัวของสัญญาณ (peak broadening) อันเนื่องมาจากการฉีดท่อนตัวถูกละลายในระบบการไหลแบบลามินาร์ปัวส์ซอง (laminar Poiseuille flow) วิธี TDA ที่เสนอนี้ได้ประยุกต์ร่วมกับ

ปฏิกิริยาโฟโตเคมีคัดลอกซีเด็นด้วยแสงยูวี (UV-POD) ที่ความยาวคลื่น 266 นาโนเมตร โดยตรวจวัดสารผลิตภัณฑ์ที่ดูดกลืนแสงยูวีหลังจากการทำปฏิกิริยาโฟโตเคมีคัดลอกซีเด็นในสภาวะที่มีค่าความเป็นด่างสูง (สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 130 มิลลิโมลาร์) ค่าขนาดอนุภาคที่วัดได้แสดงในรูปของคาร์ซีไฮโดรไดนามิกเฉลี่ยโดยมวลของอนุภาคพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากวิธี TDA-UV-POD เปรียบเทียบกับเทคนิค TDA-BSI นั้นมีความสอดคล้องกัน ผลการวิจัยแสดงให้เห็นชัดว่าปฏิกิริยาโฟโตเคมีคัดลอกซีเด็นด้วยแสงยูวีของโมเลกุลคาร์โบไฮเดรตที่มีกลูโคสเป็นมอนอเมอร์ มีความเป็นไปได้ในการวัดหาขนาดอนุภาคพอลิแซ็กคาไรด์ โดยต้องคำนึงถึงสัดส่วนการเจือจางและระดับความเข้มข้นของสารละลายซึ่งควรอยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงและความเข้มข้นที่ไม่สูงเกินไป วิธี TDA-UV-POD ที่เสนอในงานนี้เป็นหนึ่งในทางเลือกสำหรับการวัดหาขนาดของอนุภาคพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ดูดกลืนแสงยูวี โดยไม่ต้องอาศัยกราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ดังกล่าว

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ทูส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่จากเงินรายได้มหาวิทยาลัยมหิดล ประจำปี 2561 (สัญญาเลขที่ A9/2561) และศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี (PERCH-CIC) กระทรวงอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

6. References

- [1] Ju, H., Zhang, X. and Wang, J., 2011, Carbohydrate Detection Using Nano structured Biosensing, pp. 393-424, In NanoBiosensing: Principles, Development and Application, Springer, New York.
- [2] Gortatowsky, C., 1955, Sugar and other carbohydrates in carbonated beverages: In use of sugars and other carbohydrates in the food industry, J. Amer. Chem Soc. 12: 70-74.
- [3] Schoch, T.J. and Elder, A.L., 1955, Starches in the food industry: In use of sugars and other carbohydrates in the food industry, J. Amer. Chem Soc. 12: 21-34.
- [4] Burd, A. and Huang, L., 2008, Chapter 11: Carbohydrates and Cutaneous Wound Healing A2 – Garg, Hari G., pp 253-274 In Cowman, M.K. and Hales, C.A. (Eds.), Carbohydrate Chemistry, Biology and Medical Applications, Elsevier, Oxford.
- [5] Avila, L.Z., Gianolio, D.A., Konowicz, P.A., Philbrook, M., Santos, M.R. and Miller, R.J., 2008, Chapter 15 : Drug Delivery and Medical Applications of Chemically Modified Hyaluronan A2 – Garg, Hari G., pp 333-357, In Cowman, M.K. and Hales, C.A. (Eds.), Carbohydrate Chemistry, Biology and Medical Applications, Elsevier, Oxford.
- [6] Striegel, A.M., Isenberg, S.L., Côté and G.L., 2009, An SEC/ MALS study of alternan degradation during size- exclusion chromatographic analysis, Anal. Bioanal. Chem. 394: 1887-1893.
- [7] Gaborieau, M., Gilbert, R. G., Gray-Weale, A., Hernandez, J.M. and Castignolles, P., 2007, Theory of multiple-detection size-exclusion chromatography of complex

- branched polymers, *Macromol. Theory Simul.* 16: 13-28.
- [8] Gaborieau, M. , Nicolas, J. , Save, M. , Charleux, B., Vairon, J.P., Gilbert, R.G. and Castignolles, P. , 2008, Separation of complex branched polymers by size-exclusion chromatography probed with multiple detection, *J. Chromatogr. A* 1190: 215-223.
- [9] Rolland- Sabaté, A. , 2017, High- Performance Size- Exclusion Chromatography coupled with on-line Multi- angle Laser Light Scattering (HPSEC-MALLS), Bentham Science Publishers, Sharjah.
- [10] Rolland- Sabaté, A. , Battu, S., Bonfils, F., Chelbi, K. and Martin, M., 2017, Field-Flow Fractionation (FFF) : In *Advances in Physicochemical Properties of Bio polymers (Part 1)* , Bentham Science Publishers, Sharjah.
- [11] Giddings, J. C. , 1966, A new separation concept based on a coupling of concentration and flow nonuniformities, *Separat. Sci.* 1: 123-125.
- [12] Messaud, F. A. , Sanderson, R. D. , Runyon, J.R., Otte, T., Pasch, H. and Williams, S.K.R., 2009, An overview on field- flow fractionation techniques and their applications in the separation and characterization of polymers, *Prog. Polym. Sci.* 34: 351-368.
- [13] Volpi, N., Maccari, F. and Linhardt, R.J., 2008, Capillary electrophoresis of complex natural polysaccharides, *Electrophoresis* 29: 3095-3106.
- [14] Rovio, S., Yli-Kauhaluoma, J. and Siren, H., 2007, Determination of neutral carbohydrates by CZE with direct UV detection, *Electrophoresis* 28: 3129-3135.
- [15] Rovio, S., Simolin, H., Koljonen, K. and Siren, H. , 2008, Determination of mono saccharide composition in plant fiber materials by capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 1185: 139-144.
- [16] Sarazin, C. , Delaunay, N. , Costanza, C. , Eudes, V., Mallet, J.M. and Gareil, P., 2011, New avenue for mid- UV- range detection of underivatized carbohydrates and amino acids in capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 83: 7381-7387.
- [17] Oliver, J.D., Gaborieau, M., Hilder, E.F. and Castignolles, P. , 2013, Simple and robust determination of monosaccharides in plant fibers in complex mixtures by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1291: 179-186.
- [18] Schmid, T., Himmelsbach, M., Oliver, J.D., Gaborieau, M. , Castignolles, P. and Buchberger, W. , 2015, Investigation of photochemical reactions of saccharides during direct ultraviolet absorbance detection in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 1388: 259-266.
- [19] Schmid, T. , Himmelsbach, M. and Buchberger, W.W. , 2016, Investigation of

- photochemical reaction products of glucose formed during direct UV detection in CE, *Electrophoresis* 37: 947-953.
- [20] Oliver, J.D., Rosser, A.A., Fellows, C.M., Guillaneuf, Y., Clement, J.L., Gaborieau, M. and Castignolles, P., 2014, Understanding and improving direct UV detection of monosaccharides and disaccharides in free solution capillary electrophoresis, *Anal. Chim. Acta* 809: 183-193.
- [21] Sarazin, C., Delaunay, N., Costanza, C., Eudes, V. and Gareil, P., 2012, Application of a new capillary electrophoretic method for the determination of carbohydrates in forensic, pharmaceutical, and beverage samples, *Talanta* 99: 202-206.
- [22] Sarazin, C., Delaunay, N., Costanza, C., Eudes, V. and Gareil, P., 2013, On the use of capillary electrophoresis for the determination of inorganic anions and cations, and carbohydrates in residues collected after a simulated suicide bombing attack, *Talanta* 103: 301-305.
- [23] Toutounji, M. R., van Leeuwen, M. P., Oliver, J.D., Shrestha, A.K., Castignolles, P. and Gaborieau, M., 2015, Quantification of sugars in breakfast cereals using capillary electrophoresis, *Carbohydr. Res.* 408: 34-141.
- [24] Alinat, E., Jemmali, S., Delaunay, N., Archer, X. and Gareil, P., 2015, Analysis of underivatized cellodextrin oligosaccharides by capillary electrophoresis with direct photochemically induced UV-detection, *Electrophoresis* 36: 1555-1563.
- [25] Saetear, P., Chamieh, J., Kammer, M.N., Manuel, T.J., Biron, J.P., Bornhop, D.J. and Cotte, H., 2017, Taylor Dispersion Analysis of polysaccharides using backscattering interferometry, *Anal. Chem.* 89: 6710-6718.
- [26] Chamieh, J. and Cottet, H., 2012, Comparison of single and double detection points Taylor dispersion analysis for monodisperse and polydisperse samples, *J. Chromatogr. A* 1241: 123-127.
- [27] Provencher, S. W., 1982, A constrained regularization method for inverting data represented by linear algebraic or integral equations, *Comput. Phys. Commun.* 27: 213-227.
- [28] Cottet, H., Biron, J.P. and Martin, M., 2007, Taylor dispersion analysis of mixtures, *Anal. Chem.* 79: 9066-9073.
- [29] Cottet, H., Biron, J.P. and Martin, M., 2014, On the optimization of operating conditions for Taylor dispersion analysis of mixtures, *Analyst* 139: 3552-3562.
- [30] Rolland-Sabaté, A., Guilois, S., Jaillais, B. and Colonna, P., 2011, Molecular size and mass distributions of native starches using complementary separation methods: Asymmetrical flow field flow fractionation (AF4) and hydrodynamic and size

- exclusion chromatography (HDC- SEC) ,
Anal. Bioanal. Chem. 399: 1493-1505.
- [31] Rolland- Sabaté, A. , Mendez- Montealvo,
M.G., Colonna, P. and Planchot, V., 2008,
Online determination of structural
properties and observation of deviations
from power law behavior, Biomacro
molecules 9: 1719-1730.