

**PENENTUAN PEMALAR PENGIONAN,  $pK_a$ , BAGI ASID ASKORBIK, ASID BENZOIK DAN  
VANILIN DENGAN MENGGUNAKAN ELEKTROFORESIS KAPILARI**

**CLAUDYA JELESON**

**DISERTASI INI DIKEMUKAKAN UNTUK MEMENUHI  
SEBAHAGIAN DARIIPADA SYARAT MEMPEROLEHI  
IJAZAH SARJANA MUDA SAINS DENGAN  
KEPUJIAN**

**PROGRAM KIMIA INDUSTRI  
SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH**

**2010**



**UMS**  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH



UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS@

JUDUL: PENENTUAN PEMALAR PENGIONAN, PK<sub>2</sub>, BAGI ASID ASKORIK, ASID BENZOIK DAN VANILIN DENGAN MENGGUNAKAN ELEKTROFORESIS KAPILARI

Ijazah: SARJANA MUDA SAINS Dengan KEPUNIAN (KIMIA INDUSTRI)

SESI PENGAJIAN: 2007 - 2010

Saya CLAUDYA JELESON (HURUF BESAR)

mengaku membenarkan tesis (LPS/Sarjana/Doktor Falsafah)\* ini disimpan di Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dengan syarat-syarat kegunaan seperti berikut:

1. Tesis adalah hakmilik Universiti Malaysia Sabah.
2. Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dibenarkan membuat salinan untuk tujuan pengajian sabaja.
3. Perpustakaan dibenarkan membuat salinan tesis ini sebagai bahan pertukaran antara institusi pengajian tinggi.
4. \*\*Sila tandakan ( / )

SULIT

(Mengandungi maklumat yang berdarjah keselamatan atau kepentingan Malaysia seperti yang termaktub di dalam AKTA RAHSIA RASMI 1972)

TERHAD

(Mengandungi maklumat TERHAD yang telah ditentukan oleh organisasi/badan di mana penyelidikan dijalankan)

TDK TERHAD

Disahkan oleh NURULAIN BINTI

PERPUSTAKAAN UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

Nurain  
(TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

Claudia  
(TANDATANGAN PENULIS)

Alamat Tetap: K9. MORION, JLN TANDOK, P/S 127, 89108, KOTA

Dr. Nourie Surugau  
Nama Penyelia

MARUDU, SABAH

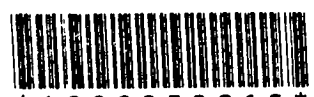
Tarikh: 21 MEI 2010

Tarikh: 21 MEI 2010

CATATAN: \* Potong yang tidak berkenaan.  
\*\* Jika tesis ini SULIT atau TERHAD, sila lampirkan surat daripada pihak berkuasa/organisasi berkenaan dengan menyatakan sekali sebab dan tempoh tesis ini perlu dikelaskan sebagai SULIT

PERPUSTAKAAN UMS

sebagai tesis bagi Ijazah Doktor Falsafah dan Sarjana secara penyelidikan, atau an secara kerja kursus dan penyelidikan, atau Laporan Projek Sarjana Muda



UMS  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

## **PENGAKUAN**

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang setiap satunya telah dijelaskan sumbernya.



---

**CLAUDYA JELESON**  
**(BS07110305)**

**11 MEI 2010**

## PENGESAHAN

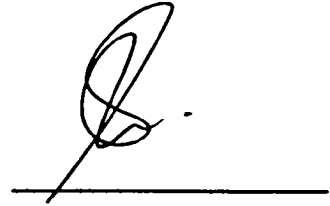
**1. PENYELIA**

(DR. LOUMI @ NOUMIE SURUGAU)



**2. PEMERIKSA 1**

(MISS SHARAIN LIEW)



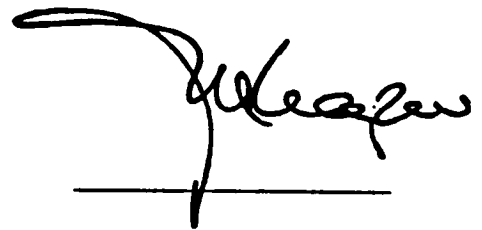
**3. PEMERIKSA 2**

(MISS RUBIA BTE IDRIS)



**4. DEKAN**

(PROF. DR. MOHD. HARUN ABDULLAH)



## **PENGHARGAAN**

Saya ingin mengucapkan setinggi-tinggi terima kasih kepada penyelia saya, Dr. Loumie @ Noumie Surugau, di atas kesabaran, bimbingan dan tunjuk ajar yang telah dicurahkan sehingga saya dapat menyiapkan disertasi ini dengan baik, dan juga kepada semua pensyarah Kimia Industri yang sentiasa memberikan ilmu dan nasihat sepanjang tempoh penyiapan disertasi ini. Terima kasih juga saya ucapkan kepada keluarga saya yang telah memberikan sokongan sepenuhnya kepada saya. Tidak dilupakan juga kepada rakan-rakan yang telah banyak membantu saya dalam menyiapkan disertasi ini.

## ABSTRAK

Elektroforesis kapilari memberikan masa migrasi bagi sampel mengion dalam larutan penimbal. Masa migrasi ini digunakan untuk menentukan mobiliti efektif bagi setiap sampel. Kemudian, nilai mobiliti efektif ini digunakan dalam pemplotan graf. Terdapat dua kaedah dalam penentuan  $pK_a$ , iaitu melalui graf mobiliti efektif melawan pH dan graf pH melawan  $\log 1/\mu - 1$ . Tujuan menggunakan dua kaedah ini adalah untuk mengetahui kaedah yang lebih sesuai dalam penentuan  $pK_a$ . Kecerunan lengkungan atau kecerunan garis lurus merupakan nilai  $pK_a$  bagi sampel tersebut. Sampel yang digunakan dalam kajian ini adalah asid askorbik, asid benzoik dan vanilin. Ketiga-tiga sampel ini mempunyai kadar pengionan yang berbeza dalam empat jenis larutan penimbal, yang masing-masing mempunyai pH 2.85, 5.40, 7.10 dan 9.65.

## ABSTRACT

Capillary electrophoresis provides the information of migration time for ionization of sample in the buffer solution. Migration time is used to determine the effective mobility for each sample. Then, the effective mobility is used in plotting the graph. There are two methods in the determination of  $pK_a$ , which from the graph of effective mobility versus pH and graph of pH versus  $\log 1/\mu - 1$ . The purpose in using these two methods is to know the suitable method in determination of  $pK_a$ . The gradient of the curve or straight line is the  $pK_a$  of the sample. The samples used in this study are ascorbic acid, benzoic acid and vanillin. All these three samples have different ionization rates in the four types of buffer solution, respectively with pH 2.85, 5.40, 7.10 and 9.65.

# SENARAI KANDUNGAN

	Muka surat
PENGAKUAN	ii
PENGESAHAN	iii
PENGHARGAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
SENARAI KANDUNGAN	vii
SENARAI JADUAL	ix
SENARAI RAJAH	x
SENARAI SIMBOL	xii
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b>	<b>1</b>
1.1 Pemalar Pengionan, $pK_a$	1
1.2 Objektif	4
1.3 Skop Kajian	4
<b>BAB 2 ULASAN LITERATUR</b>	<b>5</b>
2.1 Pemalar Pengionan, $pK_a$	5
2.2 Asas Pemalar Pengionan, $pK_a$	6
2.3 Kepentingan $pK_a$	7
2.4 Sejarah Elektrofesis Kapilari (CE)	8
2.5 Elektrofesis Kapilari (CE)	9
2.6 Prinsip Asas CE	10
2.7 Aliran Elektroosmotik (EOF)	12
2.7.1 Kesan-kesan Elektroosmosis	14
2.7.2 Kesan-kesan Elektroforetik	15
2.8 Instrumen Asas dalam CE	16
2.8.1 Bekalan Voltan Kuasa Tinggi	18
2.8.2 Kapilari Pemisahan	18
2.8.3 Julat Penimbal Elektrolit	19
2.9 Teori Pemalar Pengionan, $pK_a$ , dan Mobiliti Efektif, $\mu_{eff}$	20



<b>BAB 3 METODOLOGI</b>	<b>24</b>
3.1 Bahan-bahan Kimia	24
3.2 Senarai Sebatian Lemah	25
3.3 Instrumen	26
3.4 Penyediaan Sampel	27
3.5 Penyediaan Larutan Stok	29
3.6 Penyediaan Larutan Penimbang	30
3.7 Analisis Elektroforesis Kapilari	30
3.8 Penentuan Pemalar Pengionan, $pK_a$	31
<b>BAB 4 KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN</b>	<b>33</b>
4.1 Elektroferogram Bagi Asid Askorbik, Asid Benzoik dan Vanilin	33
4.2 Masa Migrasi, $t_m$	37
4.3 Mobiliti Efektif, $\mu$	38
4.4 Aliran Elektroosmotik, EOF	42
4.5 Mobiliti Efektif bagi EOF, $\mu_{eof}$	43
4.6 Penentuan Nilai $pK_a$ Melalui Graf $\mu_{ef}$ Melawan pH	50
4.7 Penentuan Nilai $pK_a$ Melalui Graf pH Melawan $(\log 1/\mu - 1)$	53
<b>BAB 5 KESIMPULAN</b>	<b>59</b>
RUJUKAN	61

## SENARAI JADUAL

Nombor Jadual	Muka surat
3.1 Senarai bahan-bahan kimia.	24
3.2 Senarai sebatian lemah.	25
3.3 Ciri-ciri elektroforesis kapilari yang digunakan dalam penentuan $pK_a$ .	27
3.4 Penyediaan larutan penimbal untuk penentuan $pK_a$ Oleh elektroforesis kapilari.	30
4.1 Masa migrasi bagi asid askorbik, asid benzoik dan vanilin dengan pH yang berbeza.	37
4.2 Nilai mobiliti efektif bagi asid askorbik dengan pH yang berbeza.	38
4.3 Nilai mobiliti efektif bagi asid benzoik dengan pH yang berbeza.	39
4.4 Nilai mobiliti efektif bagi vanilin dengan pH yang berbeza.	39
4.5 Masa migrasi EOF bagi setiap sampel dengan pH yang berbeza.	40
4.6 Mobiliti efektif bagi EOF, $\mu_{eof}$ bagi asid askorbik dengan pH yang berbeza.	41
4.7 Nilai mobiliti efektif EOF, $\mu_{eof}$ bagi asid benzoik dengan pH yang berbeza.	42
4.8 Nilai mobiliti efektif EOF, $\mu_{eof}$ bagi vanilin dengan pH yang berbeza.	42
4.9 Mobiliti efektif, $\mu_{ef}$ bagi asid askorbik dengan pH yang berbeza.	43
4.10 Mobiliti efektif, $\mu_{ef}$ bagi asid benzoik dengan pH yang berbeza.	43
4.11 Mobiliti efektif, $\mu_{ef}$ bagi vanilin dengan pH yang berbeza.	44
4.12 Nilai $\log 1/\mu - 1$ bagi (a) asid askorbik, (b) asid benzoik dan (c) vanilin.	49

## SENARAI RAJAH

Nombor rajah	Muka surat	
2.1	Kadar pengionan ubat-ubatan lemah.	5
2.2	Kepekatan spesis ionik dan neutral bagi asid dan bes pada pH di atas dan di bawah daripada nilai $pK_a$ mereka.	7
2.3	Laluan bagi ubat-ubatan ke sistem saraf pusat.	8
2.4	Pengionan pada dinding kapilari.	12
2.5	Profil aliran dalam kapilari.	13
2.6	Susunan instrumental asas bagi sistem CE.	16
3.1	Gambarajah elektroforesis kapilari.	26
4.1	Elektroferogram bagi asid askorbik dengan pH 2.85 (a), 5.40 (b), 7.10 (c) dan 9.65 (d).	34
4.2	Elektroferogram bagi asid benzoik dengan pH 2.85 (a), 5.40 (b), 7.10 (c) dan 9.65 (d).	35
4.3	Elektroferogram bagi vanilin dengan pH 2.85 (a), 5.40 (b), 7.10 (c) dan 9.65 (d).	36
4.4	Graf masa migrasi melawan pH bagi asid askorbik, asid benzoik dan vanilin.	38
4.5	Graf $\mu_{ef}$ melawan pH bagi asid askorbik.	39
4.6	Graf $\mu_{ef}$ melawan pH bagi asid benzoik.	40
4.7	Graf $\mu_{ef}$ melawan pH bagi vanilin.	41
4.8	Graf masa migrasi, $t_{eof}$ melawan pH bagi asid askorbik, asid benzoik dan vanilin.	43
4.9	Graf mobiliti efektif EOF, $\mu_{eof}$ , melawan pH bagi asid askorbik.	44
4.10	Graf mobiliti efektif EOF, $\mu_{eof}$ , melawan pH bagi asid benzoik.	45
4.11	Graf mobiliti efektif EOF, $\mu_{eof}$ , melawan pH bagi vanilin.	46
4.12	Graf mobiliti efektif, $\mu_{ef}$ , melawan pH bagi asid askorbik.	47
4.13	Graf mobiliti efektif, $\mu_{ef}$ , melawan pH bagi asid benzoik.	48
4.14	Graf mobiliti efektif, $\mu_{ef}$ , melawan pH bagi vanilin.	49
4.15	Graf $\mu_{ef}$ melawan pH bagi asid askorbik dengan $pK_a$ 4.20 dan 8.60.	50

4.16	Graf $\mu_{ef}$ melawan pH bagi asid benzoik dengan $pK_a$ 4.20.	50
4.17	Graf $\mu_{ef}$ melawan pH bagi vanilin dengan $pK_a$ 4.20.	51
4.18	Graf $\mu_{ef}$ melawan pH bagi asid askorbik, asid benzoik dan vanilin.	52
4.19	Graf pH melawan $\log 1/\mu - 1$ bagi asid askorbik.	55
4.20	Graf pH melawan $\log 1/\mu - 1$ bagi asid benzoik.	55
4.21	Graf pH melawan $\log 1/\mu - 1$ bagi vanilin.	56

## SENARAI SIMBOL

$a$	Saiz ion
CE	Elektroforesis Kapilari
cm	Sentimeter
CZE	Elektroforesis Zon Kapilari
$D$	Pekali difusi
DNA	Deoxyribonucleic acid
$E$	Medan elektrik
EOF	Aliran elektroosmotik
GC	Kromatografi Gas
HPLC	Kromatografi Cecair Berprestasi Tinggi
$I$	Kekuatan ionik elektrolit
$K_a$	Pemalar Perceraian
$K_a'$	Pemalar keasidan
$K_a^{th}$	Termodinamik pemalar perceraian
kV	Kilovolt
$L$	Panjang tiub/kapilari
$l$	Jarak dari saluran masuk ke pengesan
m	meter
$N$	Plat teori
$pK_a$	Pemalar Pengionan
$q$	Cas bagi ion
$r$	Jejari Stoke
$t$	Masa migrasi
UV	Ultralembayung
$V$	Voltan
$z$	Valensi ion
$\mu$	Mobiliti elektroforetik
$\mu_{eff}$	Mobiliti efektif
$\mu_{eo}$	Mobiliti elektroosmosis
$\mu_{ep}$	Mobiliti elektroforesis
$\mu A$	Mikroampere
$\mu m$	Mikrometer

$\epsilon_0$	Permitiviti vakum
$\epsilon_r$	Pemalar dielektrik
$u_{\infty}$	Halaju aliran elektroosmotik
$\gamma$	Pekali aktiviti
$\zeta$	Potensi Zeta
$\eta$	Kelikatan larutan
$^{\circ}\text{C}$	Celcius
%	Peratus

# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Pemalar Pengionan, $pK_a$

Kebanyakan ubat-ubatan mempunyai ciri-ciri berkutub dan tidak berkutub. Sebahagian besar ubat-ubatan yang digunakan dalam perubatan berperilaku dalam larutan sebagai asid lemah, bes lemah atau kadang-kadang sebagai asid lemah dan bes lemah. Setiap jenis ubat mempunyai nilai pemalar pengionan,  $pK_a$ , yang tersendiri. Nilai  $pK_a$  asid-bes sesuatu ubat merupakan kunci bagi parameter fisiokimia yang mempengaruhi ciri-ciri biofarmasi (Harvey, 2008). Nilai  $pK_a$  memberikan maklumat tentang kekuatan sesuatu asid dan bes; ia memberitahu tentang pH di mana 50 % daripada ubat itu mengion (Cairns, 2003). Namun, nilai-nilai  $pK_a$  tidak menentukan sama ada ubat itu berperilaku sebagai asid atau bes di dalam larutan. Satu-satunya cara yang pasti untuk mengetahui sesuatu ubat itu bersifat asid atau bes adalah dengan mempelajari kumpulan berfungsi yang member sifat asid atau bes kepada molekul (Cairns, 2003).

Terdapat beberapa kaedah untuk menentukan  $pK_a$ , seperti titrasi potensiometrik, titrasi spektrofotometrik, ultralembayung (UV), kelarutan dan kertas elektroforesis (Mrestani *et al.*, 1998). Pada mulanya, titrasi potensiometrik merupakan kaedah piawai untuk pengukuran  $pK_a$  (Poole *et al.*, 2004). Semua kaedah ini mempunyai kebaikan dan keburukannya sendiri. Sebagai contoh, titrasi potensiometrik dapat memberikan keputusan yang sangat tepat, tetapi sampel haruslah mempunyai ketulenan yang tinggi dan larut dalam semua nilai pH, ia



memerlukan jumlah sampel yang sangat banyak, dan ia bukan teknik yang cepat (Fuguet *et al.*, 2009). Titrasi spektrofotometrik UV boleh menangani sebatian dengan kelarutan rendah dan kepekatan sampel yang rendah, tetapi sebatian itu haruslah mempunyai kromofor UV yang aktif yang berdekatan dengan tapak asid-bes dalam molekul, dan penentuan  $pK_a$  sering diganggu oleh kotoran-kotoran dalam sampel (Andrasi *et al.*, 2007).

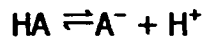
Namun, terdapat kaedah lain untuk menentukan nilai  $pK_a$ . Elektroforesis kapilari (CE) telah digunakan sebagai kaedah yang terbaru untuk lebih mudah dan tepat dalam penentuan  $pK_a$ . Teknik CE mempunyai beberapa kelebihan berbanding kaedah-kaedah yang disebutkan di atas. CE hanya memerlukan jumlah sampel yang sedikit pada kepekatan terlarut rendah. Prosedur pengukuran tidak memerlukan kepekatan zat terlarut, hanya masa migrasi. Tambahan pula, pengiraan  $pK_a$  tidak bergantung kepada ketulenan zat terlarut (Hu *et al.*, 2003). Penggunaan CE semakin meluas disebabkan kelebihan-kelebihan ini dan merupakan teknik yang berjaya dalam arena analisis, termasuklah farmasi, agrokimia, persekitaran, klinikal, dan kajian metabolisme ubat-ubatan (Petersen dan Mohammad, 2001). Istilah elektroforesis berkaitan dengan semua teknik pemisahan berdasarkan kepada peredaran analit bercas dalam gel atau larutan penimbal mengikut mobiliti elektroforesis mereka. Peredaran dalam CE ini tercapai dengan mengalirkan arus elektrik yang bertindak sebagai motor penggerak sehingga ke hujung kapilari (Chankvetadze, 1997).

$pK_a$  bagi ubat-ubatan lemah merupakan kunci bagi parameter fisiokimia yang mempengaruhi banyak sifat biofarmasi. Pengaruh  $pK_a$  terhadap sifat biofarmasi dan bahan kimia telah menyebabkan industri farmasi dan bahan kimia telah lama ditubuhkan (Williams *et al.*, 2002). Disebabkan kebanyakan daripada ubat-ubatan merupakan asid dan/atau bes lemah, pengetahuan tentang  $pK_a$  bagi setiap kes membantu dalam memahami bentuk molekul ionik bagi nilai pH yang tertentu. Hal ini penting dalam sistem fisiologi kerana kadar pengionan akan mempengaruhi kadar di mana sebatian boleh meresap melalui membran dan rintangan-rintangan seperti penghalang darah-otak (Williams *et al.*, 2002). Kebanyakan ubat-ubatan adalah



organik asid atau bes lemah dan wujud di dalam larutan dalam bentuk terion dan tidak terion. Ubat-ubatan lemah yang tidak terion biasanya lebih lipid-larut dan lebih mudah meresap melalui membran sel untuk mencapai keseimbangan kepekatan yang sama di kedua-dua bahagian (Adams, 2001). Peredaran elektrolit yang lemah biasanya ditentukan oleh nilai  $pK_a$  dan kecerunan pH merentasi membran (Adams, 2001).

Ubat-ubatan asid, HA, membebaskan  $H^+$  dan menyebabkan anion bercas,  $A^-$  terbentuk:



Bes lemah juga boleh membebaskan  $H^+$ . Namun, bentuk protonasi bagi ubat-ubatan bes biasanya bercas dan kehilangan proton lalu menghasilkan bes tidak bercas, B:



Sesuatu ubat dapat meresap melalui membran dengan lebih mudah jika tidak bercas. Oleh itu, bagi asid lemah, HA yang tidak bercas dapat menembusi membran, dan  $A^-$  tidak dapat menembusi membran. Bagi bes lemah, bentuk yang tidak bercas, B, menembusi membran sel, tetapi  $BH^+$  tidak boleh menembusi membran sel. Oleh itu, sifat boleh meresap bagi setiap ubat-ubatan pada tapak penyerapan ditentukan oleh kepekatan relatif bagi bentuk bercas dan tidak bercas (Harvey *et al.*, 2008).

Nisbah antara dua bentuk ditentukan oleh pH pada tapak penyerapan dan kekuatan asid atau bes lemah, yang diwakili oleh  $pK_a$ . Semakin rendah nilai  $pK_a$ , semakin berasid ubat tersebut. Sebaliknya, semakin besar nilai  $pK_a$ , semakin tinggi bes ubat tersebut. Keseimbangan dicapai apabila bentuk mudah meresap bagi ubat itu mencapai kepekatan yang sama di semua bahagian (Harvey *et al.*, 2008). Oleh itu, pengetahuan tentang  $pK_a$  adalah penting dalam pemahaman tentang fenomena kimia tertentu seperti pengertian, aktiviti dan pengangkutan biologi, dan dalam ramalan bagi migrasi zat terlarut dalam kaedah elektromigrasi (Matoga *et al.*, 2003).

## 1.2 Objektif

Objektif bagi kajian ini adalah:

1. Untuk menentukan pemalar pengionan,  $pK_a$ , bagi asid askorbik, asid benzoik dan vanilin dengan menggunakan elektroforesis kapilari.
2. Untuk menentukan  $pK_a$  bagi asid askorbik, asid benzoik dan vanilin melalui dua kaedah, iaitu dengan menggunakan graf mobiliti efektif melawan pH dan graf pH melawan  $\log 1/\mu - 1$ .
3. Untuk mengetahui kaedah yang lebih sesuai dalam penentuan  $pK_a$  antara kedua-dua kaedah.
4. Untuk mengkaji kesan pH larutan penimbal yang berbeza terhadap nilai pemalar pengionan,  $pK_a$ .

## 1.3 Skop Kajian

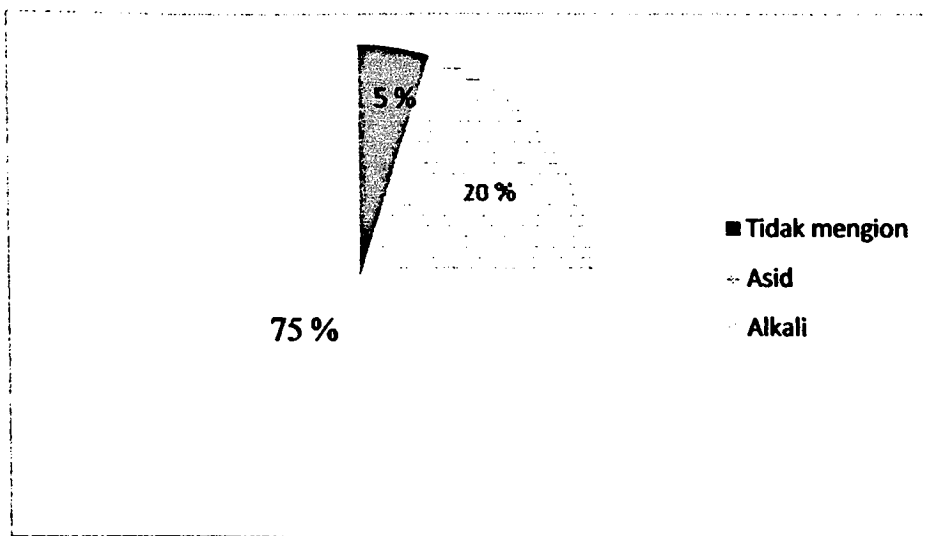
Matlamat utama kajian projek ini adalah untuk menentukan pemalar pengionan,  $pK_a$ , bagi asid askorbik, asid benzoik dan vanilin melalui dua kaedah, iaitu dengan menggunakan graf mobiliti efektif melawan pH dan graf pH melawan  $\log 1/\mu - 1$ . Nilai-nilai  $pK_a$  yang didapati melalui kedua-dua kaedah ini dibandingkan untuk mengetahui kaedah mana yang lebih sesuai dalam penentuan  $pK_a$ , dan dibandingkan dengan nilai-nilai  $pK_a$  secara teori. Sebanyak empat jenis larutan penimbal yang akan disediakan dengan nilai pH yang berbeza, iaitu pH 2.85, 5.40, 7.10 dan 9.65. Penentuan nilai  $pK_a$  dijalankan dengan menggunakan instrumen elektroforesis kapilari (CE).

## BAB 2

### ULASAN LITERATUR

#### 2.1 Pemalar Pengionan, $pK_a$

Majoriti ubat-ubatan terdiri daripada kumpulan mengion (Rajah 2.1). Kebanyakan daripadanya adalah bes, dan beberapa daripadanya adalah asid dan hanya 5% yang tidak mengion. Kebolehan sebatian untuk mengion ditunjukkan oleh nilai  $pK_a$ . Ia merupakan fungsi bagi kumpulan molekul dalam keasidan atau kebesan (Kerns dan Di, 2008). Ahli kimia perubatan boleh mengubah sub-struktur asid atau bes untuk mendapatkan nilai  $pK_a$  yang diinginkan, yang mana mempengaruhi kelarutan dan ketelapan ubat-ubatan tersebut (Kerns dan Di, 2008).



**Rajah 2.1:** Kadar pengionan ubat-ubatan lemah (Sumber: Kerns dan Di, 2008).

Nilai  $pK_a$  yang kecil menunjukkan bahawa kepekatan bagi molekul yang tidak mengion lebih besar berbanding dengan kepekatan ion-ion, dan nilai  $pK_a$  yang besar menunjukkan bahawa kepekatan bagi ion-ion adalah tinggi. Oleh itu, semakin kecil nilai  $pK_a$  bagi asid, semakin lemah asid itu.

## 2.2 Asas Pemalar Pengionan, $pK_a$

$pK_a$  adalah log negatif bagi pemalar perceraian  $K_a$ . Bagi kedua-dua asid dan bes, kebiasaannya menggunakan  $pK_a$ .

Bagi asid:



$$pK_a = -\log \left( \frac{[H^+] \cdot [A^-]}{[HA]} \right) \quad [2]$$

Bagi bes:



$$pK_a = -\log \left( \frac{[H^+] \cdot [B]}{[BH^+]} \right) \quad [4]$$

Aspek yang berguna bagi sifat asid dan bes boleh ditunjukkan daripada persamaan di atas. Bagi asid, (1) apabila pH menurun, kepekatan molekul asid neutral, HA, adalah tinggi, dan kepekatan molekul asid anionik,  $A^-$ , adalah rendah dalam larutan, dan (2) asid dengan nilai  $pK_a$  yang rendah adalah asid kuat, dan lebih cenderung untuk membentuk  $A^-$ . Bagi bes pula, (1) apabila pH menurun, kepekatan bes neutral,  $BH^+$ , juga turut menurun dalam larutan, dan (2) bes dengan nilai  $pK_a$  yang rendah adalah bes lemah, dan kurang cenderung untuk membentuk  $BH^+$ .

Persamaan Handerson-Hasselbach merupakan hubungan yang bermanfaat bagi penemuan  $pK_a$ . Bagi asid:

$$pK_a = -\log \left( \frac{[H^+] \cdot [A^-]}{[HA]} \right) \quad [5]$$

atau

$$[HA] / [A^-] = 10^{(pK_a - pH)} \quad [6]$$

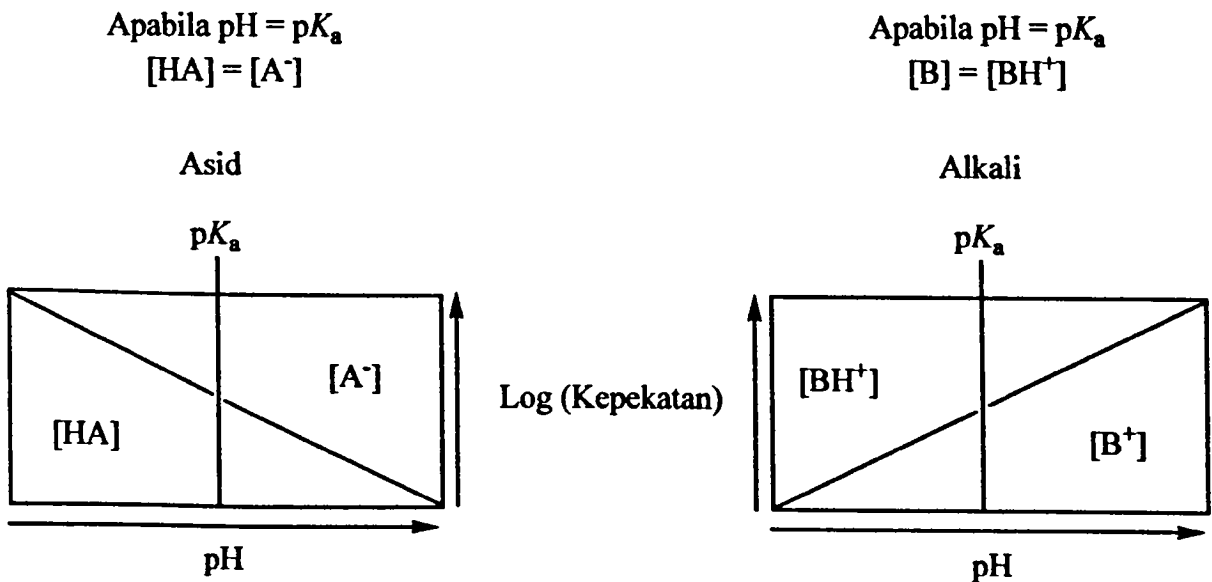
Bagi bes:

$$pK_a = -\log ([H^+] \cdot [B] / [BH^+]) \quad [7]$$

atau

$$[BH^+] / [B] = 10^{(pK_a - pH)} \quad [8]$$

Hubungan ini mengira kepekatan spesis ionik dan neutral pada setiap pH, jika nilai  $pK_a$  diketahui. Tambahan pula, terdapat kepekatan yang sama bagi spesis ionik dan neutral dalam larutan apabila pH sama dengan  $pK_a$  (Rajah 2.2).

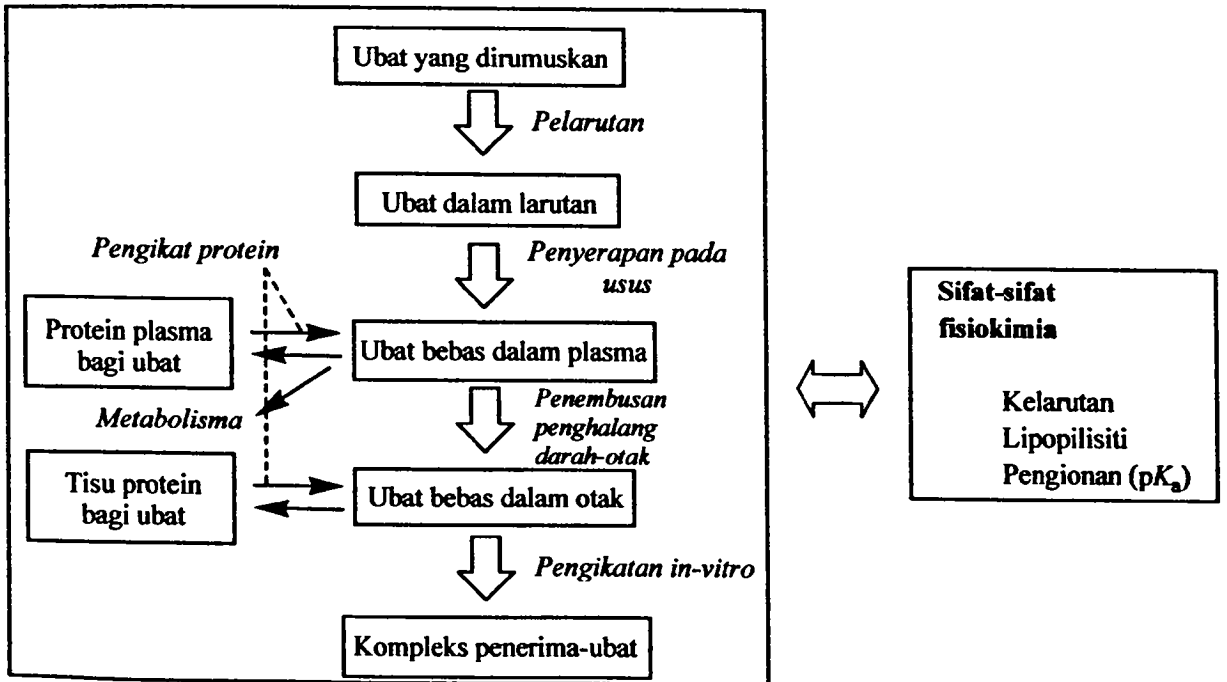


**Rajah 2.2:** Kepekatan spesis ionik dan neutral bagi asid dan bes pada pH di atas dan di bawah daripada nilai  $pK_a$  mereka (Sumber: Kerns dan Di, 2008).

### 2.3 Kepentingan $pK_a$

Pengionan bagi ubat-ubatan adalah penting kerana ia bukan sahaja mempengaruhi sifat-sifat fisiokimia ubat-ubatan, seperti lipofilisiti dan kelarutan,

tetapi juga mempengaruhi beberapa parameter yang berkaitan dengan sel, seperti ketelapan membran, pengikatan protein plasma, metabolisme, penembusan tisu, dan sasaran pengikatan protein (Kimko dan Duffull, 2003).  $pK_a$  merupakan parameter penting yang mencerminkan struktur dan tahap pengionan sesuatu ubat pada nilai pH yang berbeza (Rajah 2.3).



**Rajah 2.3:** Laluan bagi ubat-ubatan ke sistem saraf pusat (Sumber: Kimko dan Duffull, 2003).

## 2.4 Sejarah Elektrofesis Kapilari (CE)

Pada tahun 1967, Hjerten menyatakan bahawa dengan menjalankan elektrofesis di dalam tiub berdiameter sempit dapat mengurangkan kesan termal (Camilleri, 1998). Hjerten juga menunjukkan bahawa adalah mungkin untuk menjalankan pemisahan elektrofesis menggunakan kapilari yang mempunyai diameter dalaman 300  $\mu\text{m}$  dan mengesan pemisahan puncak oleh penyerapan UV (Camilleri, 1998). Instrumen automatik CE yang pertama diperkenalkan secara komersil di bawah nama Microphoretic 1000 oleh Microphoretic Systems (Sunnyvale,

CA, USA) pada tahun 1987 (Chankvetadze, 1997). Istilah 'elektroforesis' dicipta oleh Michaelis (Landers, 1997) pada tahun 1909, yang menemui pemisahan protein berdasarkan titik isoelektrik mereka. Disebabkan sejarah latar belakang (peningkatan permintaan untuk resolusi tinggi, ketelitian kuantitatif untuk biofarmasi, kawalan pengurusan bahan buangan), CE diperkenalkan di dunia analisis (Landers, 1997).

## 2.5 Elektroforesis Kapilari, CE

Sejak 10 tahun yang lalu, CE telah berkembang menjadi kaedah analisis yang terkenal untuk pelbagai aplikasi. CE adalah kes khusus yang menggunakan medan elektrik untuk memisahkan komponen campuran (Petersen dan Mohammad, 2001). Ia berupaya menggantikan elektroforesis gel tradisional untuk pemisahan sampel biologi kompleks, seperti DNA (*Deoxyribonucleic acid*), protein dan karbohidrat (Mitchelson dan Cheng, 2000). Elektroforesis dalam kapilari dibezakan daripada bentuk-bentuk lain elektroforesis yang dijalankan melalui sempadan-sempadan tiub yang sempit. Kapilari diperkenalkan ke dalam elektroforesis sebagai anti-konvektif dan pengawalan haba secara inovatif (Petersen dan Mohammad, 2001).

Kebolehan untuk menganalisis lebih jauh komponen-komponen berasingan menggunakan tindak balas sekunder yang spesifik adalah penting bagi kaedah yang semakin berkembang dengan pesat ini (Mitchelson dan Cheng, 2000). CE merupakan satu teknik pemisahan yang mendapat populariti selama bertahun-tahun. Hal ini telah membawa kepada mod elektrokinetik kromatografi yang lain, termasuklah elektroforesis, kapilari elektrokinetik kromatografi, kromatografi elektrokinetik micellar, elektroforesis zon kapilari (CZE), dan penumpuan isoelektrik (Yan, 2004). Penggunaan CE sangat berjaya dalam mengasingkan beberapa jenis biomolekul, memisahkan molekul terutamanya mengikut saiz dan cas. Dari semua teknik yang dikembangkan, penggunaan yang dominan adalah gel elektroforesis, yang boleh digunakan untuk memisahkan peptide dan protein (Yan, 2004).

## 2.6 Prinsip Asas CE

Elektroforesis adalah pergerakan ion-ion bagi sampel dibawah pengaruh voltan yang dikenakan (Altria, 1996). Ion-ion akan bergerak menuju ke arah elektrod yang sesuai dan ke arah pengesan. Memang telah lama diketahui bahawa molekul-molekul boleh bercas positif atau negatif. Apabila jumlah cas positif dan negatif adalah sama, molekul neutral (tidak bercas) akan terbentuk (Petersen dan Mohammad, 2001). Jika diberi kebebasan untuk bergerak, zarah-zarah bercas akan mencari kawasan, seperti elektrod, yang mempunyai cas yang berbeza; dengan kata lain, berlawanan tarikan. Kadar migrasi (atau mobiliti) bagi ion zat terlarut adalah dipengaruhi oleh saiznya dan jumlah cas ionik (Altria, 1996).

Masa migrasi bagi analit (masa yang diambil dari hujung masuk kapilari hingga ke pengesan) adalah dipengaruhi oleh dua faktor. Faktor pertama, daripada migrasi disebabkan oleh cas molekul (mobiliti elektroforetik) dan berlaku kerana analit yang bercas negatif bergerak ke arah anod dan cas positif bergerak ke arah katod (Venn, 2000). Faktor yang ke-dua adalah disebabkan pergerakan larutan penimbal di sepanjang kapilari, dipengaruhi oleh keupayaan yang tinggi yang dikenakan di sepanjang kapilari silika. Pergerakan ini dikenali sebagai aliran elektroosmotik (Venn, 2000). Aliran ini membawa analit-analit bersamanya di dalam campuran dan menambahkan atau mengurangkan kadar perkembangan mereka di sepanjang kapilari menuju ke arah pengesan.

Pertimbangan teori CE menghasilkan dua persamaan yang penting (Wilson dan Walker, 2000):

$$t = \frac{L^2}{\mu V} \quad [9]$$

di mana  $t$  adalah masa migrasi bagi zat terlarut,  $L$  adalah panjang tiub,  $\mu$  adalah mobiliti elektroforetik bagi zat terlarut, dan  $V$  adalah voltan yang dikenakan. Keberkesanan pemisahan, dalam istilah jumlah plat teori,  $N$ , adalah:



## RUJUKAN

- Adams, H. R. 2001. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Ed. ke-8. Wiley-Blackwell, Singapore.
- Ajuha, S. & Jimidar, M. L. 2008. *Capillary Electrophoresis for Pharmaceutical Analysis*. Elsevier, Boston.
- Altria, K. D. 1996. *Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, Operation, and Applications*. Humana Press, United States.
- Andrasi, M., Buglyo, P., Zekany, L. & Gaspar, A. 2007. A Comparative Study of Capillary Zone Electrophoresis and pH-potentiometry for Determination of Dissociation Constants. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **44**: 1040.
- Barbosa, J., Barron, D. & Lozano, E. J. 1999. Electrophoretic Behavior of Quinolones in Capillary Electrophoresis, Effect of pH and Evaluation of Ionization Constants. *Journal of Chromatography A* **839**: 183-192.
- Bartak, P., Bednar, P., Stransky, Z., Bocek, P. & Vespalec, R. 2000. Determination of Dissociation Constants of Cytokinins by Capillary Zone Electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **878**: 249-251.
- Brown, P. R. & Grushka, E. 1998. *Advances in Chromatography*. CRC Press, US.
- Cairns, D. 2003. *Essential of Pharmaceutical Chemistry*. Ed. ke-2. Pharmaceutical Press, London.
- Camilleri, P. 1998. *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*. Ed. ke-2. CRC Press, United States.

- Cazes, J. 2005. *Encyclopedia of Chromatography*. Ed. ke-2. Marcel Dekker, New York.
- Chankvetadze, B. 1997. *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Frazier, R. A., Ames, J. M. & Nursten, H. E. 2000. *Capillary Electrophoresis for Food Analysis: Method Development*. Royal Society of Chemistry, United Kingdom.
- Fuguet, E., Ràfols, C., Bosch, E. & Rosés, M. 2009. Fast High-throughput Method for the Determination of Acidity Constants by Capillary Electrophoresis: Monoprotic Weak Acid and Bases. *Journal of Chromatography A* **1216**: 3646.
- Green, J. S. & Jorgenson, J. W. 1986. Variable Wavelength On-column Fluorescence Detector for Open Tubular Zone Electrophoresis. *Journal of Chromatography* **352**: 337-343.
- Grushka, E. & Grinberg, N. 2005. *Advances in Chromatography*. CRC Press, US.
- Harvey, R. A., Champe, P. C., Clark, M. A. & Cubeddu, L. 2008. *Pharmacology*. Ed. ke-4. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.
- Herron, J. N. & Crommelin, D. J. A. 1995. *Physical Methods to Characterize Pharmaceutical Proteins*. Springer, United States.
- Hu, Q., Hu, G., Zhou, T. & Fang, Y. 2003. Determination of Dissociation Constants of Anthrocycline by Capillary Zone Electrophoresis with Amperometric Detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **31**: 679.
- Jiskoot, W. & Crommelin, D. J. A. 2005. *Principles and Techniques of Practical Biochemistry*. Springer, United States.
- Katz, E. 1998. *Handbook of HPLC*. CRC Press, United States.

- Kerns, E. H. & Di, L. 2008. *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods: from ADME to Toxicity Optimization*. Academic Press, San Diego.
- Kimko, H. C. & Dufful, S. B. 2003. *Simulation for Designing Clinical Trials: A Pharmacokinetic – Pharmacodynamic Modeling Perspective*. Informa Health Care, United Kingdom.
- Kuhr, W. G. & Yeung, E. S. 1988. Optimization of Sensitivity and Separation in Capillary Zone Electrophoresis with Indirect Fluorescence Detection. *Analytical Chemistry* **60**: 2642-2646.
- Landers, J. P. 1997. *Handbook of Capillary Electrophoresis*. Ed. ke-2. CRC Press, US.
- Mascetta, J. A. 2003. *Chemistry the Easy Way*. Ed. ke-4. Barron's Educational Series, Hauppauge, New York.
- Matoga, M., Kummer E. L., Langlois, M. H., Dallet, P., Bosc, J. J., Jarry, C. & Dubost, J. P. 2003. Determination of pK<sub>a</sub> Values of 2-amino-2-oxazolines by Capillary Electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **984**: 253.
- Mitchelson, K. R. & Cheng, J. 2000. *Capillary Electrophoresis in Nucleic Acids: Introduction of Nucleic Acids*. Humana Press, New York.
- Mrestani, Y., Neubert, R., Munk, A. & Wiese, M. 1998. Determination of Dissociation Constants of Cephalosporins by Capillary Zone Electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **803**: 273.
- Nollet, L. M. L. 2000. *Handbook of Water Analysis*. CRC Press, United States.
- Palfrey, S. M. 1999. *Clinical Applications of Capillary Electrophoresis*. Humana Press, New York.
- Petersen, J. R. & Mohammad, A. A. 2001. *Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis*. Humana Press, New York.

- Poole, C. F. 2003. *The Essence of Chromatography*. Elsevier, Boston.
- Poole, S. K., Patel, S., Dehring, K., Workman, H. & Poole, C. F. 2004. Determination of Acid Dissociation Constants by Capillary Electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **1037**: 445.
- Righetti, P. G. 1996. *Capillary Electrophoresis in Analytical Biotechnology*. CRC Press, United States.
- Rose, D. J. & Jorgenson, J. W. 1988. Postcapillary Fluorescence Detection in Capillary Zone Electrophoresis Using o-phthalaldehyde. *Journal of Chromatography* **447**: 117-131.
- Swaile, D. F. & Sepaniak, M. J. 1991. Laser Based Fluorometric Detection Schemes for the Analysis of Proteins by Capillary Zone Electrophoresis. *Journal of Liquid Chromatography* **14**: 869-893.
- Vaidyanathan, S., Harrigan, G. G. & Goodacre, R. 2005. *Metabolome Analyses: Strategies for Systems Biology*. Springer, US.
- Venn, R. F. 2000. *Principles and Practice of Bioanalysis*. Taylor & Francis, UK.
- Waterbeemd, H. V. D. & Testa, B. 2008. *Drug Bioavailability: Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability*. Ed. ke-2. Wiley-VCH, Australia.
- Wehr, T., Rodriguez-Diaz, R. & Mingde, Z. 1999. *Capillary of Proteins*. CRC Press, US.
- Williams, D. A., Foye, W. O. & Lemke, T. L. 2002. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. Ed. ke-5. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.
- Wilson, K. & Walker, J. M. 2000. *Principles and Techniques of Practical Biochemistry*. Ed. ke-5. Cambridge University Press, University of Cambridge.

Yan, B. 2004. *Analysis and Purification Methods in Combinatorial Chemistry*.  
Wiley-IEEE, Canada.