

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 การสกัดในสถานะของแข็งโดยใช้พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล (Molecular Imprinted Solid Phase Extraction; MISPE)

มนุษย์รู้จักนำวัตถุพอลิเมอร์มาใช้เป็นประโยชน์ตั้งแต่สมัยโบราณ คนโบราณรู้จักใช้ขนสัตว์เป็นเครื่องนุ่งห่ม และใช้ปูพื้นในที่อยู่อาศัย จากหลักฐานที่เชื่อถือได้เชื่อได้ว่าได้มีการนำเส้นใยของขนสัตว์ เส้นใยไหม และเส้นใยจากพืช เช่น ฝ้าย มาทำเป็นเสื้อผ้าสวมใส่เป็นเวลานานไม่ต่ำกว่า 5000 ปี เพราะได้มีการค้นพบผ้าโบราณที่ทำด้วยฝ้ายในประเทศเม็กซิโก ผ้าไหมในประเทศจีน และผ้าลินิน (ทำจากปอ) ใช้หุ้มห่อมัมมี่ (Mummy) ของกษัตริย์อียิปต์โบราณ

การนำวัตถุพอลิเมอร์อื่น ๆ มาใช้เป็นประโยชน์อย่างจริงจังเริ่มขึ้นหลังจากที่ ชาร์ล กูดเยียร์ (Charles Goodyear, 1839) นักประดิษฐ์ชาวอเมริกัน ได้ปรับปรุงสมบัติของยางธรรมชาติโดยผสมผงกำมะถันกับยางธรรมชาติ และให้ความร้อน โดยกระบวนการวัลคาไนเซชัน (Vulcanization) ทำให้มีสมบัติดี และใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางจนทุกวันนี้ ต่อมา มีการค้นพบ และพัฒนาพลาสติก และฟิล์มอื่น ๆ จากเซลลูโลส (Cellulose) เช่น เซลลูลอยด์ (Celluloid) เซลลูโลสอะซิเตต (Cellulose acetate) และวิสโคสเรยอน (Viscose rayon) เป็นต้น อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์พลาสติก เส้นใยสังเคราะห์ และฟิล์มที่ผลิตขึ้นในเชิงการค้า ตั้งแต่หลังกูดเยียร์ถึงต้นศตวรรษที่ 20 ล้วนแล้วแต่เป็นพอลิเมอร์ที่มีในธรรมชาติ หรือปรับปรุงจากวัตถุพอลิเมอร์ที่มีในธรรมชาติ จนกระทั่งแบกแลนด์ (Bakeland) ได้รับผลสำเร็จในการเตรียมพอลิเมอร์จากปฏิกิริยาการควบแน่นของฟีนอล () [7]

การสกัดในสถานะของแข็งโดยใช้พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการเตรียมตัวอย่างนอกเหนือจากวิธีเดิม มีข้อดีในเรื่องความจำเพาะ และราคาไม่แพง เป็นผลิตภัณฑ์ถูกออกแบบมาเฉพาะสำหรับสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ และสามารถนำไปใช้ได้หลากหลาย นอกจากนี้ยังมีความเสถียรสูงทั้งทางกายภาพ และเคมี จึงสามารถนำไปใช้ได้กับสารตัวอย่างหลากหลายชนิด ได้เกือบตลอดช่วงพีเอช (pH) มีความเสถียรที่อุณหภูมิ และความดันสูง อีกทั้งยังทนต่อการกรด และเบส

การลอกแบบโมเลกุล (Molecular imprinting) หรือ การสร้างต้นแบบโมเลกุล (Molecular templating) เป็นเทคนิคหนึ่งในการสร้างตัวรับเฉพาะสังเคราะห์ (Synthetic receptor site) ภายในเมทริกซ์พอลิเมอร์ที่มีโครงร่างซับซ้อน (High cross-linked) พอลิเมอร์ลอกแบบ (Imprinted

polymers) จะมีสมบัติจำเพาะกับสารหลากหลาย จึงเหมาะจะนำไปใช้ในขั้นตอนการแยกสำหรับการวิเคราะห์อาหาร และเครื่องมือที่ต้องการความจำเพาะสูง

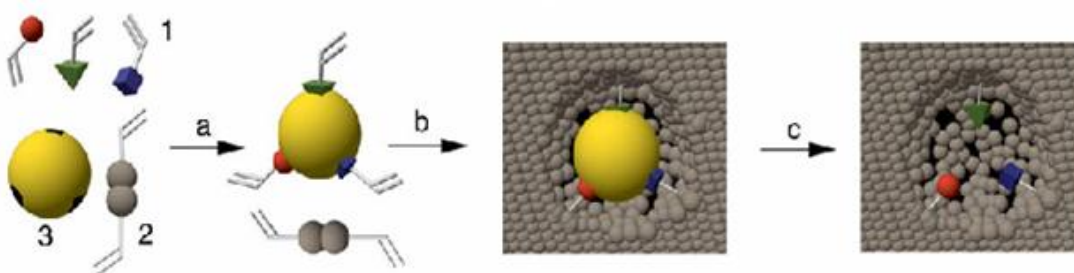
เนื่องจากมีข้อกำหนดมาตรฐานความปลอดภัยของอาหาร และการให้ความสำคัญต่อผู้บริโภคเกี่ยวกับความปลอดภัย และการควบคุมคุณภาพอาหารจากสิ่งเจือปน ทำให้ต้องมีการพัฒนาวิธีวัดขั้นสูงมากขึ้น ในขณะที่การวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการ และสารประกอบของอาหารยังคงเป็นงานหลักเหมือนเดิม การวิเคราะห์ยาฆ่าแมลง สารพิษในเชื้อรา (Mycotoxin) และสารตกค้างในอาหาร มีแนวโน้มมากขึ้น

ปัญหาในการวิเคราะห์อาหาร และเครื่องมือตัวอย่างส่วนใหญ่จะมีเมทริกซ์ที่ซับซ้อน และสารที่จะวิเคราะห์มักจะมีปริมาณความเข้มข้นต่ำมาก ดังนั้นวิธีการต่าง ๆ ที่จะนำมาวิเคราะห์ ทั้ง Molecular Spectroscopy หรือ เทคนิคทางโครมาโทกราฟี (HPLC, GC และ TLC) รวมถึงเทคนิคต่อพ่วงเช่น GC-MS จึงจำเป็นต้องมีการเตรียมตัวอย่างหลาย ๆ ขั้นตอน พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล (Molecular Imprinted Polymers; MIPs) เป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการเตรียมตัวอย่าง นอกเหนือจากวิธีดั้งเดิม มีข้อดีในเรื่องความจำเพาะ และราคาไม่แพง MIPs เป็นผลิตภัณฑ์ ที่ถูกออกแบบมาเฉพาะสำหรับสารเป้าหมาย และสามารถนำไปใช้ได้หลากหลาย

### 2.1.1 เทคนิคการลอกแบบโมเลกุล (Molecular Imprinting)

พอลิเมอร์ลอกแบบถูกสังเคราะห์ขึ้นจากปฏิกิริยาเรดิคัล โคพอลิเมอร์ไรเซชัน (Radical copolymerization) ระหว่างหมู่ฟังก์ชันมอนอเมอร์ (Functional monomers) และสารพอลิเมอร์เชื่อมโยง (Cross-linkers) ในโมเลกุลต้นแบบ

ที่ผ่านมา มีการพัฒนางานวิจัยเกี่ยวกับ MIPs ที่สำคัญ 2 อย่าง คือ วิธีการทำให้โมเลกุลต้นแบบ (Template molecule) เกิดปฏิกิริยาแบบ Non-covalent (วิธี Self-assembly พัฒนาขึ้นครั้งแรกโดย K. Mosbach และทีมงาน) และวิธีทำให้โมเลกุลต้นแบบเกิดปฏิกิริยาแบบโควาเลนต์ (Covalent) (โดย G. Wulff และทีมงาน) [8] กับหมู่ฟังก์ชันของมอนอเมอร์ที่เหมาะสม



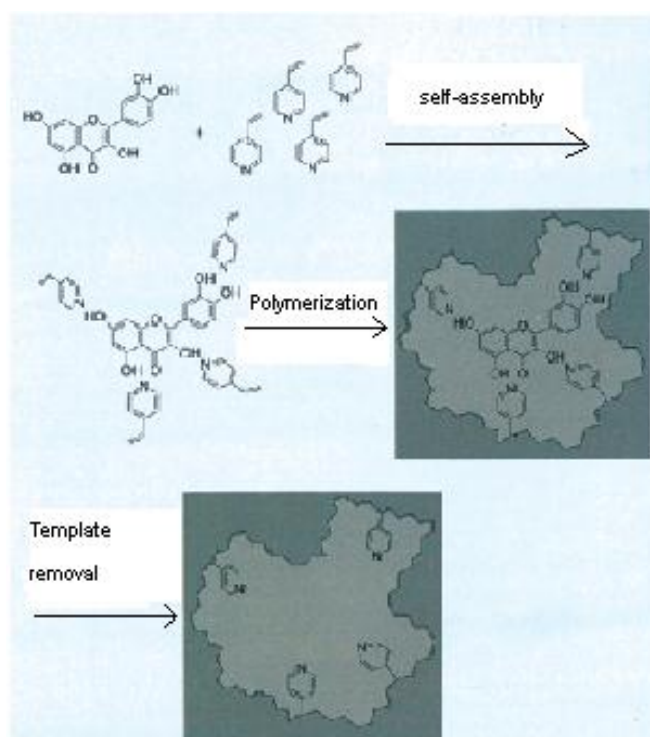
รูปที่ 2.1 ไดอะแกรมแสดงกระบวนการลอกแบบโมเลกุล [9]

1: ฟังก์ชันนัลมอนอเมอร์, 2: พอลิเมอร์เชื่อมโยง, 3: โมเลกุลต้นแบบ (Template molecule);

a: กลุ่มของสารประกอบต่าง ๆ ก่อนกระบวนการพอลิเมอไรเซชัน,

b: กระบวนการพอลิเมอไรเซชัน, c: การสกัดเอาตัวต้นแบบออกไป

วิธีการเกิดปฏิกิริยาแบบ non-covalent (Self-assembly) ซึ่งเป็นที่นิยมมากกว่ามีขั้นตอนการเตรียมดังนี้ ก่อนการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันทำการเติมตัวริเริ่ม (Initiator) เช่น Azobis-isobutyronitrile แล้วให้ความร้อน (ที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส) หรือฉายด้วยแสงยูวีก็จะเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน นำพอลิเมอร์ที่ได้มาคัดกรองขนาดตามที่ต้องการ หลังจากนั้นทำการแยกโมเลกุลต้นแบบออกมาให้เหลือแต่ Binding sites 3 มิติ ที่มีสัมพรรคภาพ (Affinity) สูง มีรูปร่างและหมู่ฟังก์ชันพร้อมจับกับสารเป้าหมายที่ต้องการวิเคราะห์ ดังไดอะแกรมแสดงตามรูปที่ 2.1 และ 2.2



**รูปที่ 2.2** ไดอะแกรมแสดงการเกิด MIPs โดยวิธี Self-assembly โดยใช้ Quecerin เป็นโมเลกุลต้นแบบ [10]

นอกจากการสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบ แล้วยังต้องสังเคราะห์พอลิเมอร์ควบคุม (Control polymer) ขึ้นมาด้วยวิธีการเดียวกัน แต่ไม่ต้องเติมโมเลกุลต้นแบบลงไป ซึ่งจะวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของทั้งพอลิเมอร์ลอกแบบ และพอลิเมอร์ควบคุมด้วยเทคนิคคลิควิดโครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูง (HPLC)

การเลือกตัวต้นแบบโดยวิธี Self - assembly จะมีความยืดหยุ่นสูง  
คุณสมบัติของพอลิเมอร์ลอกแบบ และพอลิเมอร์ควบคุม

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (2.1)$$

$$\alpha = \frac{k'_{print}}{k'_{test}} \quad (2.2)$$

$$RI = \frac{\alpha_{CTL}}{\alpha_{IMP}} \quad (2.3)$$

$k'$  : capacity factor

$t_R$  : total retention time

$t_M$  : hold-up time

$\alpha$  : separation factor

RI: retention index (RI = 1 for the template)

ตัวต้นแบบต้องมีหมู่ฟังก์ชันที่สามารถทำปฏิกิริยากับมอนอเมอร์ที่รูปร่างมีช่องว่าง (Cavity-shaping monomer) และสารเป้าหมายจะต้องมีปริมาณเพียงพอกับความต้องการคัดลอกแบบ ความแรงของปฏิกิริยาก่อนพอลิเมอร์ไรเซชัน (Polymerization) จะเป็นตัวบ่งบอกถึงความแรงของคุณสมบัติสัมพรรคภาพของ binding sites นอกจากตัวต้นแบบแล้ว ชนิดของหมู่ฟังก์ชันของมอนอเมอร์ ชนิดของตัวเชื่อมโยง ก็มีผลต่อคุณสมบัติ และรูปร่างลักษณะของพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล (MIPs) ตัวอย่างของมอนอเมอร์ที่เหมาะสม ได้แก่ Methacrylic acid และอนุพันธ์ของมัน 2-หรือ4-vinylpyridine และ Acrylamide ส่วนตัวเชื่อมโยงที่นิยมนำมาใช้คือ Ethyleneglycol dimethacrylate (EDMA) Divinylbenzene และ Trimethylolpropane trimethacrylate ซึ่งถ้าตัวเชื่อมโยงมีความแข็งแรงสูงจะทำให้ MIPs มีโครงสร้างที่แข็งแรงสูงด้วย

### 2.1.2 วิธีการสกัด

ตามปกติสารตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์จะเป็นสารที่ไม่บริสุทธิ์มีสิ่งเจือปนต่างๆรวมอยู่ด้วยเสมอ ดังนั้นก่อนทำการวิเคราะห์จำเป็นต้องแยกสารที่สนใจออกจากสิ่งเจือปนก่อน เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการวิเคราะห์ กระบวนการแยกเกิดขึ้นได้เมื่อเกิดการแพร่กระจายของสารที่สนใจระหว่างเฟสสองเฟส ถ้ามีสาร 2 ชนิดที่มีอัตราส่วนของการแพร่กระจายระหว่างเฟสสองเฟสต่างกัน จะทำให้สามารถแยกสารทั้งสองชนิดออกจากกันได้ง่าย ถ้าอัตราส่วนของการแพร่กระจายของสารทั้งสองต่างกันมาก ๆ จะสามารถแยกสารทั้งสองออกจากกันได้โดยทำการแยกเพียงครั้งเดียว เช่น

การตกตะกอนคลอไรด์ด้วยเงินไอออนสามารถแยกคลอไรด์ไอออน ( $\text{Cl}^-$ ) ออกจากสารละลายที่มีไอออนอื่น ๆ ปนอยู่ เช่น ไนเตรตไอออน ( $\text{NO}_3^-$ ) เปอร์คลอเรตไอออน ( $\text{ClO}_4^-$ ) ทั้งนี้เพราะอัตราส่วนที่เกิดจากการแพร่กระจายของคลอไรด์ในเฟสที่เป็นของแข็ง ( $\text{AgCl}$ ) ต่อเฟสที่เป็นของเหลว (สารละลายคลอไรด์) มีค่ามาก ในขณะที่ไอออนอื่นมีค่าน้อยมากเข้าใกล้ศูนย์การแยกที่ทำได้อย่างสมบูรณ์โดยใช้การแยกเพียงครั้งเดียว เรียกว่า Single-stage process ถ้าสารผสมแต่ละตัวมีค่าอัตราส่วนของการแพร่กระจายแตกต่างกันไม่มาก การแยกให้สมบูรณ์สามารถทำได้โดยใช้กระบวนการแยกหลาย ๆ ครั้ง เรียกว่า Multi-stage process เทคนิคที่เกิดขึ้นในกระบวนการแยก คือ เกิดการแบ่งส่วนของสารที่สนใจระหว่างเฟสสองเฟส ดังนั้นเทคนิคการแยกนี้จึงมีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า Fractionation technique ซึ่งสามารถแบ่งได้อีกหลายแบบแล้วแต่ชนิดของเฟสว่าเป็นของแข็ง ของเหลว หรือก๊าซ

การแยกมีหลายวิธีเช่น การแยกโดยการตกตะกอน (Precipitation) การแยกโดยวิธีอิเล็กโทรไลซิสให้เกาะที่ขั้วไฟฟ้า (Electrodeposition) การแยกโดยการทำให้กลายเป็นไอ (Volatilization) การกลั่น (Distillation) การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Extraction) และการแยกโดยวิธีโครมาโทกราฟี (Chromatography)

### 2.1.2.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย

การสกัดด้วยตัวทำละลายสามารถทำได้โดยใช้ตัวทำละลายของเหลวชนิดหนึ่งสกัดตัวถูกละลายออกจากของเหลวอีกชนิดหนึ่ง มีชื่อเรียกวิธีการสกัดนี้ว่า Liquid - liquid extraction ซึ่งมีเทคนิคสำหรับการวิเคราะห์อยู่ 3 วิธี คือ วิธีการสกัดแบบไม่ต่อเนื่องหรือแบทช์ (Batch extraction) วิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง (Continuous extraction) และวิธีการสกัดแบบเคาน์เตอร์เคอร์เรนต์ (Counter current extraction) ถ้าการสกัดใช้ตัวทำละลายของเหลวชนิดเดียวสกัดตัวถูกละลายออกจากสารตัวอย่างของแข็ง จะเรียกการสกัดนี้ว่า Solid - liquid extraction การสกัดจะเกิดขึ้นหรือไม่ขึ้นอยู่กับความสามารถของตัวถูกละลายในตัวทำละลาย ถ้าตัวถูกละลายสามารถละลายได้น้อย จำเป็นต้องใช้เทคนิคของการสกัดที่ทำอย่างต่อเนื่อง และใช้ตัวทำละลายเพียงเล็กน้อย เทคนิคในการสกัดมีหลายวิธีจะเลือกใช้เทคนิค และวิธีการใดขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของการสกัด หรือชนิดของตัวถูกละลาย และตัวทำละลาย

### 2.1.2.2 การสกัดของแข็ง (Extraction of solids)

ถ้าตัวถูกละลายที่ต้องการสกัดอยู่ในสารตัวอย่างที่เป็นของแข็งก็สามารถทำการสกัดด้วยตัวทำละลายของเหลวได้ เรียกวิธีการสกัดนี้ว่า Solid - liquid extraction การสกัดจะทำได้ดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับความสามารถของตัวถูกละลายในตัวทำละลายของเหลว และเวลาที่ใช้ในการสกัด เวลาที่ใช้จะสั้นหรือนานขึ้นอยู่กับลักษณะของตัวถูกละลายที่อยู่ในสารตัวอย่างของแข็ง ถ้าตัวถูกละลายเพียง

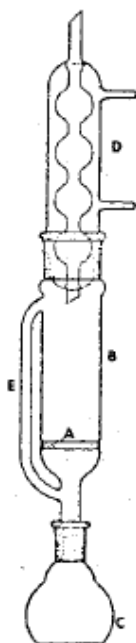
ดูดซับที่ผิวของของแข็ง การสกัดก็จะใช้เวลาน้อย แต่ถ้าตัวถูกละลายอยู่ในรูปของของแข็ง ก็ต้องใช้เวลามากกว่า และถ้าปรากฏว่าการกระจายของตัวทำละลายสู่ภายในรูปของของแข็งเกิดขึ้นได้ช้ามาก ต้องบดของแข็งให้ละเอียดก่อนทำการสกัด การสกัดของแข็ง หรือการทำ Solid – liquid extraction สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการสกัดสารทางชีววิทยา สารอินทรีย์ ตลอดจนเกลือของสารอนินทรีย์

วิธีการสกัดของแข็งสามารถทำได้ 2 วิธี คือ

1. ถ้าตัวถูกละลายอยู่ในสารตัวอย่างของแข็งเพียงแค่ดูดซับที่ผิว และการละลายของตัวถูกละลายในตัวทำละลายมีค่าสูง การสกัดทำได้โดยนำสารตัวอย่างใส่ลงในบีกเกอร์ แล้วเติมตัวทำละลายลงไป จากนั้นคนเป็นเวลานานจนเรคาดว่าตัวถูกละลายละลายในตัวทำละลายหมด จากนั้นกรองเอาของแข็งออกจากสารละลาย เทคนิคนี้ก็สามารถแยกตัวถูกละลายออกจากสารตัวอย่างของแข็งได้ เทคนิคนี้เหมาะสำหรับใช้ในการแยกสารประกอบประเภทเกลือของสารอนินทรีย์

2. ถ้าตัวถูกละลายเป็นสารประกอบอินทรีย์ หรือสารทางชีววิทยา ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีการละลายในตัวทำละลายต่ำ หรือการสกัดจะเกิดขึ้นสมบูรณ์ได้ต้องใช้เวลาาน จำเป็นต้องใช้เทคนิคการสกัดอย่างต่อเนื่อง เครื่องมือที่ใช้สำหรับการสกัดอย่างต่อเนื่องมีอยู่ 2 แบบ คือ การสกัดอย่างต่อเนื่องแบบธรรมดา (Continuous – infusion extractor) และ Discontinuous – infusion extractor หรือเครื่องสกัดซอกเลต (Soxhlet extractor)

เครื่องมือสำหรับการสกัดต่อเนื่องแบบธรรมดาเรียกว่า Continuous – infusion extractor



รูปที่ 2.3 เครื่องมือสำหรับการสกัดต่อเนื่องแบบธรรมดา (Continuous – infusion extractor)

A คือ Sintered - glass plate

B คือ หลอดบรรจุสารที่จะสกัด ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดการสกัดเรียกว่า extractor

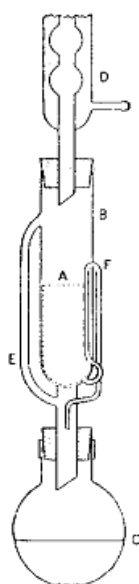
C คือ ขวดสำหรับใส่ตัวทำละลาย

D คือ ตัวควบแน่น (Condenser)

E คือ หลอดสำหรับให้อิทธิพลของตัวทำละลายผ่านไปยังตัวควบแน่น

เครื่องสกัดแบบ Continuous – infusion extractor สามารถทำการสกัดได้โดยตัวทำละลายที่บรรจุอยู่ใน ขวด C จะถูกกลั่นผ่านหลอด E แล้วควบแน่นเป็นของเหลวที่หลอดควบแน่น D จากนั้นจะหยดลงสู่ตัวถูกละลายที่อยู่ในสารตัวอย่างของแข็งที่อยู่ในหลอด B แล้วพาตัวถูกละลายไหลลงสู่ขวด C ตัวทำละลายที่ไหลกลับมายังขวด C ก็จะถูกลั่นแล้วควบแน่นกลับมาสกัดตัวถูกละลายอีกเป็นเช่นนี้ต่อไปอย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งตัวถูกละลายถูกสกัดลงมาอยู่ในขวด C ได้อย่างสมบูรณ์ สำหรับสารตัวอย่างของแข็งที่บรรจุอยู่ในหลอด B ก็จะอยู่ภายในหลอดโดยไม่ไหลลงสู่ขวด C เพราะมีแผ่น Sintered – glass plate (รูป A) เป็นตัวรองรับ วิธีการสกัดแบบนี้มีข้อเสีย คือตัวทำละลายที่ไหลผ่านมาสกัดตัวถูกละลายมีเวลาสัมผัสกับตัวถูกละลายเพียงเล็กน้อย เครื่องสกัดที่ออกแบบให้ทำงานได้ดีขึ้น คือเครื่องสกัดซอกเลต (Soxhlet extractor) ซึ่งสามารถทำให้ตัวทำละลายมีเวลาสัมผัสกับตัวถูกละลายที่เป็นของแข็งได้นานขึ้น

เครื่องมือสำหรับการสกัดแบบ Discontinuous – infusion extractor หรือเครื่องสกัดซอกเลต (Soxhlet extractor)



รูปที่ 2.4 เครื่องมือสำหรับการสกัดแบบ Discontinuous – infusion extractor หรือเครื่องสกัดซอกเลต

- A คือ ถุงผ้าสำหรับใส่สารที่ต้องการสกัดซึ่งเป็นของแข็ง  
 B คือ หลอดบรรจุสารที่ถูกสกัด ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดการสกัดเรียกว่า extractor  
 C คือ ขวดสำหรับใส่ตัวทำละลาย  
 D คือ ตัวควบแน่น (Condenser)  
 E คือ หลอดสำหรับให้อิทธิพลของตัวทำละลายผ่านไปยังตัวควบแน่น  
 F คือ กาลักน้ำ (Siphon)

การสกัดทำได้ดังนี้ บรรจุของแข็งที่ต้องการสกัดลงในหลอด A แล้วใส่ในหลอดแก้ว B ตัวสกัด คือตัวทำละลายอินทรีย์ที่ระเหยกลายเป็นไอได้ บรรจุในขวดก้นกลม C โดยให้ความร้อนแก่ตัวทำละลายในขวดก้นกลม ตัวทำละลายจะระเหยกลายเป็นไอผ่านหลอดแก้ว E ไปยังตัวควบแน่น D (Condenser) เมื่อตัวทำละลายถูกควบแน่นกลายเป็นของเหลวจะไหลลงมาบนของแข็งที่ต้องการสกัดในหลอด A เมื่อตัวทำละลายสะสมในหลอดแก้ว B มากเพียงพอ ตัวทำละลายก็จะไหลกลับมายังขวด C สารที่ถูกสกัดจะออกมาพร้อมกับตัวทำละลาย และสะสมในขวด C ด้วย และตัวทำละลายก็จะกลายเป็นไอแล้วควบแน่นมาสะสมที่หลอดแก้ว B เกิดแบบนี้ต่อเนื่องไปเรื่อย ๆ การสกัดแบบนี้บางครั้งต้องใช้เวลาหลายชั่วโมง หรือหลายวันก็ได้ และสามารถติดตั้งให้ทำงานได้ตลอดเวลาเป็นเวลานาน ๆ โดยไม่ต้องเฝ้าดู ทำให้ประหยัดเวลาสำหรับผู้วิเคราะห์ [11]

### 2.1.3 การประยุกต์ใช้พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล (MIPs) ในการวิเคราะห์อาหารและเครื่องดื่ม

พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลสามารถสังเคราะห์ได้ง่าย และมีคุณสมบัติเลือกจับกับสารหรือกลุ่มสารที่มีลักษณะเหมือนตัวต้นแบบ จึงมีการประยุกต์พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลไปใช้เป็นวัสดุสำหรับแยกสารในเทคนิคต่าง ๆ เช่น การสกัดในสถานะของแข็ง (Solid Phase Extraction; SPE) โครมาโทกราฟีของเหลว (Liquid Chromatography; LC), Capillary Electrochromatography (CEC), Chemical sensor technology และ Binding assays

การเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ทางเคมีเป็นขั้นตอนที่สำคัญ การทำตัวอย่างให้บริสุทธิ์ (Clean-up sample) ได้อย่างรวดเร็ว และได้ผล จึงเป็นสิ่งจำเป็น ดังนั้นจึงมีการประยุกต์ พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลมาใช้เป็นวัสดุสำหรับ SPE ทั้งแบบ Off-line และ On-line เมื่อเปรียบเทียบกับ Reverse-phase SPE แบบเดิมแล้ว Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction (MISPE) จะมีข้อได้เปรียบกว่า เพราะมีความเลือกเฉพาะ (Selectivity) และสามารถปรับเปลี่ยนได้ (Tunability) MISPE ที่เป็นลักษณะ Catridge สามารถนำไปใช้จับสารที่มีปริมาณน้อย ๆ เพื่อทำให้มีความเข้มข้นมากขึ้น (Enrichment) และเนื่องจากมีคุณสมบัติจำเพาะจึงทำให้สิ่งรบกวนต่าง ๆ ที่มีในตัวอย่าง มีผลน้อยมาก ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องทำสารตัวอย่างให้บริสุทธิ์ (Clean-up) อีก เพราะสิ่งรบกวน

ต่าง ๆ ไม่ถูกจับไว้จึงผ่าน MISPE ออกไป ทำให้เหลือเฉพาะสารที่สนใจซึ่งจะถูกชะออกมาภายหลัง จึงช่วยลดขั้นตอนให้น้อยลง

ระหว่างกระบวนการพอลิเมอไรเซชัน MIPs สามารถนำมาใช้กับตัวอย่างที่ละลายน้ำได้ เช่น ตัวอย่างอาหาร และเครื่องคั่ว ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับธรรมชาติของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างการเกิดพันธะ (เช่น พันธะไฮโดรเจน และพันธะไอออนิก ฯลฯ) ส่วนพันธะที่ไม่จำเพาะจะทำให้สารเกิดการแยกที่แตกต่างกันบนพอลิเมอร์ เนื่องจากถูกดูดซับที่พื้นผิวของพอลิเมอร์ไม่เท่ากัน ด้วยเหตุนี้เมื่อผ่านตัวอย่างที่ละลายน้ำเข้าไปใน MISPE แล้วล้างด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (เช่น อะซิโตน ไทรล์ ไดคลอโรมีเทน หรือเตตระไฮโดรฟูแรน) ก็จะทำให้ MISPE จำหุ้มฟังก์ชันได้ และเลือกจับเฉพาะสารที่คล้ายตัวต้นแบบเดิม (Imprinted analyte) ส่วนที่ไม่ใช่ จะถูกตัวทำละลายอินทรีย์พาออกไป ขั้นตอนสุดท้ายคือการชะสารที่ต้องการออกจาก MIPs ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม [12]

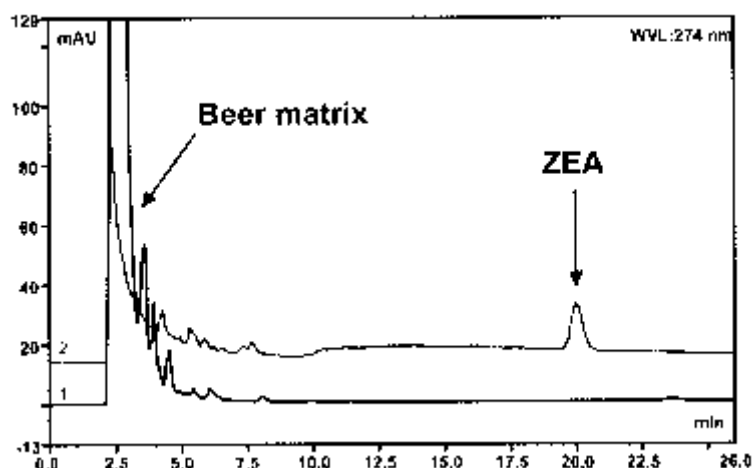
ส่วนเทคนิคอื่น ๆ เช่นการใช้เอนไซม์จับจำเพาะ (Specific enzymatic methods) และการทำ Immunoassays ที่ถึงแม้ว่าไม่ต้องทำตัวอย่างให้บริสุทธิ์ แต่ก็มีความอ่อนไหวในแง่ราคาสูง และไม่ค่อยเสถียร เมื่อเปรียบเทียบกับ MISPE แล้ว Immunoaffinity SPE จะมีคุณสมบัติความจำเพาะดีกว่า แต่การพัฒนาแอนติบอดี (Antibody) เฉพาะ มักใช้เวลานาน และมีกระบวนการหลายขั้นตอน

### 2.1.3.1 การวิเคราะห์สารชนิดต่าง ๆ โดยใช้เทคนิคการลอกแบบโมเลกุลของพอลิเมอร์ (Molecular Imprinted Polymers, MIPs)

Mycotoxins deoxynivalenol (DON) และ Zearalenone (ZEA) เป็นสาร secondary metabolites ซึ่งถูกผลิตมาจากเชื้อรา *Fusarium* สารทั้งสองตัวนี้มีความเป็นพิษสูง ก่อให้เกิดมะเร็ง ก่อการกลายพันธุ์ มีผลกระทบต่อการพัฒนาของตัวอ่อน (teratogenic) ซึ่งการปนเปื้อนของสารทั้งสองตัวในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรทั้งที่ผ่าน และไม่ผ่านกระบวนการแปรรูป จะเป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภคอาหาร และเครื่องคั่ว สาร DON และ ZEA เป็นสารที่สลายตัวยาก ยกตัวอย่างเช่น ในกระบวนการต้มเบียร์เมล็ดที่มีการปนเปื้อนจะสามารถถ่ายสารดังกล่าวไปสู่ น้ำเบียร์ได้ [13]

การวิเคราะห์โดยวิธีการมาตรฐาน ในการหาปริมาณของสารพิษที่มาจากการปนเปื้อน (Mycotoxins) จะต้องผ่านกระบวนการสกัดตัวอย่างที่ไม่ต่อเนื่อง และการทำตัวอย่างให้บริสุทธิ์ใช้เวลานาน ดังนั้น MIPs จึงถูกพัฒนาเป็น MISPE สำหรับ DON และ ZEA โดยใช้ Methyl methacrylic acid หรือ 4-vinylpyridine เป็นมอนอเมอร์หลัก และ Ethyleneglycol dimethacrylate เป็นพอลิเมอร์เชื่อมโยง

MISPE cartridges ที่มีขนาดบรรจุ 100 มิลลิกรัม สามารถใช้สกัด Mycotoxins จากตัวอย่างเบียร์สดที่ยังไม่ได้ทำการเจือจางได้ Recovery สูงถึง 85% (รูปที่ 2.5) ผลที่ได้ชี้ให้เห็นถึงศักยภาพของ MISPE สำหรับใช้ในการแยก หรือปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของสาร DON และ ZEA ที่มีอยู่ในธรรมชาติ และกระบวนการผลิตเครื่องดื่ม เช่น เบียร์ ไวน์ เป็นต้น



รูปที่ 2.5 ตัวอย่างเบียร์ที่ spike กับ ZEA (1 ppm) ก่อน (1) และ หลัง (2) ผ่าน MISPE โครมาโทแกรม (2) แสดงให้เห็น ZEA ที่ถูกจับไว้ใน MISPE [14]

Condition;

Column : Kromasil 100 - 5 C18 250 mm 4.6 mmID

Mobile phase : H<sub>2</sub>O/ACN (1:1, v/v) 0.1% acetic acid

flow rate 0.8 ml/min

Detector: UV detector

ในอีกกรณีหนึ่ง เป็นการศึกษาสารประกอบ Flavonoid compound quercetin ซึ่งถูกเลือกให้เป็นต้นแบบสำหรับการทำ Molecular imprinting โดยธรรมชาติแล้ว Flavonoids จะพบอยู่ในรูปของสารประกอบ Phenolics มักพบในพืช ผัก ผลไม้ และผลิตภัณฑ์แปรรูปเช่น ไวน์แดง สารตัวนี้เป็นหนึ่งในสารประกอบ Phenolics ที่พบมากในไวน์แดงซึ่งมีส่วนสำคัญต่อลักษณะเฉพาะ และคุณภาพของไวน์แดง นอกจากนี้สมบัติการเป็นตัวแอนติออกซิแดนท์ที่แรงของ Flavonoid บางตัว โดยเฉพาะ Quercetin มีผลดีต่อสุขภาพ

มีการทดลองนำ MISPE มาใช้สกัด และปรับเพิ่มความเข้มข้นของ Quercetin จากสารมาตรฐาน และในตัวอย่างไวน์แดง [15] โดยนำไวน์แดงจาก French Merlot ที่ Spiked กับ Quercetin ปริมาณ 8.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ฉีดเข้าไปใน MISPE cartridge 50 มิลลิกรัม พบว่า MISPE สามารถสกัด Quercetin จากไวน์แดงที่มีเมทริกซ์ซับซ้อนได้ ดังนั้นจึงชี้ให้เห็นว่า MISPE มีศักยภาพในด้านความจำเพาะ รวดเร็ว และเป็นวิธีที่ใช้เตรียมตัวอย่างที่ราคาไม่แพง

นอกจากนี้ MISPE ยังประสบความสำเร็จในการใช้กับสารปนเปื้อนในอาหาร และเครื่องดื่ม เช่น ยาฆ่าแมลง ยาปราบวัชพืช ฮอร์โมน และยาปฏิชีวนะ ดังตารางที่ 2.1

MISPE นี้ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณของสารหลายชนิด เช่น ยาปราบวัชพืชประเภท Triazine, Sulfonylurea และ Phenoxy acid ที่อยู่ในตัวอย่างน้ำ [16] Clenbuterol ในตัวอย่างปัสสาวะ [17] สารประกอบ และสารปรุงแต่งที่อยู่ในอาหาร และเครื่องดื่ม เช่น คาเฟอีน คลอเรสเตอรอล และนิโคติน [18] สารประกอบอื่น ๆ เช่น ฮอร์โมน 17-b-estradiol และ Hexestrol หรือสารพิษ 4-nitrophenol [19] ก็ได้มีการนำมาออกแบบ เพื่อพัฒนาเป็น MIPs สำหรับงานทางโครมาโทกราฟีของเหลว และ Binding assays สำหรับศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของพอลิเมอร์

ปัจจุบันมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางเพื่อพัฒนาการใช้ MIPs เช่น การนำไปใช้เป็นชั้นบาง ๆ ชนิด Chemical recognition ในหัววัดไวแสง (Optical sensor) [20] สำหรับตรวจหาขาม่าแมลง เป็นต้น ดังตารางที่ 2.1 แสดงตัวอย่างการใช้ MISPE สำหรับอาหาร และเครื่องดื่ม เพื่อวิเคราะห์ส่วนประกอบ หรือสารปรุงแต่ง และสิ่งเจือปน

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างการใช้ MISPE สำหรับอาหาร และเครื่องดื่ม เพื่อวิเคราะห์ส่วนประกอบ หรือสารปรุงแต่ง และสิ่งเจือปน [21]

| Template               | Sample                     | Amount of references |
|------------------------|----------------------------|----------------------|
| Herbicides pesticides  |                            |                      |
| Atrazine herbicides    | Vegetable extracts         | 8                    |
| Sulfonyurea herbicides | Water                      | 10                   |
| Phenylurea herbicides  | Plant extracts             | 11                   |
| Phenoxyacid herbicides | Water                      | 12                   |
| Food components        |                            |                      |
| Quercetin              | Red wine                   | 4                    |
| Caffeine               | Caffeinated beverages      | 13                   |
| Nicotine               | Chewing gum                | 14                   |
| Pharmacueticals        |                            |                      |
| Clenbuterol            | Animal feeds, urine, liver | 15, 16, 17 ตามลำดับ  |
| Theophylline           | Serum                      | 18                   |

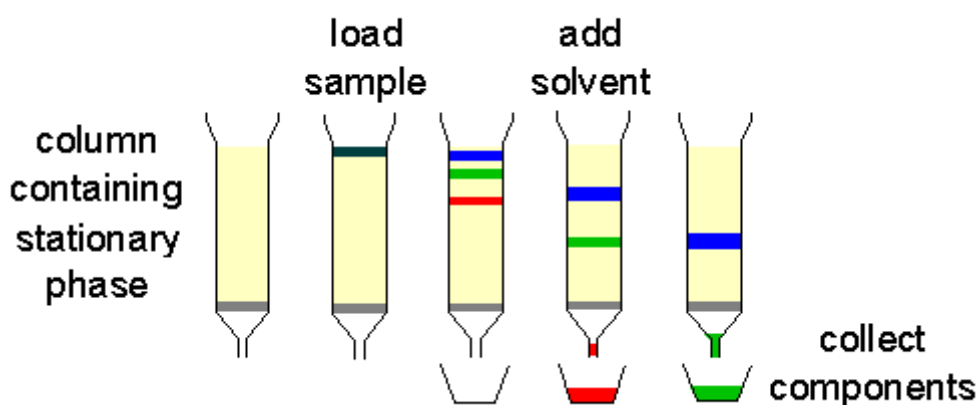
การผลิตที่ง่าย มีความจำเพาะสูงของ MISPE และความสำเร็จในการนำไปใช้งานที่หลากหลาย ยืนยันถึงศักยภาพของ MIPs สำหรับใช้ในการเตรียมตัวอย่าง นอกจากนี้ยังมีข้อดีอื่น ๆ เช่น ใช้กับตัวอย่าง และสารละลายเพียงเล็กน้อยสามารถนำไปใช้กับเครื่องระบบอัตโนมัติได้ อย่างไรก็ตามศักยภาพในการใช้งานที่หลากหลาย ยังเป็นสิ่งที่ท้าทายสำหรับ MIPs ในขณะที่

MISPE ประสบความสำเร็จสำหรับตัวอย่างที่เป็นของเหลว แต่สำหรับตัวอย่างที่เป็นของแข็งก็ยังเป็นเรื่องที่ยากอยู่ นอกจากนี้ยังมีปัญหาอื่น ๆ ที่รอการแก้ไข เช่น ความต้องการต้นแบบที่มีปริมาณเพียงพอสำหรับกระบวนการผลิต คุณสมบัติ affinity ของ MIPs ที่ได้ และความสมบูรณ์ของการแยกตัวต้นแบบออกจากสารผสม

## 2.2 เทคนิคโครมาโทกราฟี (Liquid Chromatography; LC)

### 2.2.1 หลักการพื้นฐาน

พิจารณาการแยกสารละลายผสมที่ประกอบด้วยสารสามชนิดในคอลัมน์ (Column) ซึ่งบรรจุด้วยอนุภาคของแข็งขนาดเล็ก ๆ ที่มีรูพรุนเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 150 ไมครอน ในหลอดขนาดเล็ก และยาว เรียกว่า คอลัมน์



รูปที่ 2.6 แสดงการแยกของผสมของสาร 3 ชนิด โดยให้สาร A เป็นสีแดง, สาร B เป็นสีเขียว, สาร C เป็นสีน้ำเงิน พื้นที่ที่เป็นสีครีม แสดงถึงตัวทำละลายที่ใช้เป็นตัวชะล้าง [22]

จากรูปที่ 2.6 แสดงให้เห็นถึงกระบวนการทางโครมาโทกราฟี สารละลายตัวอย่างจะถูกฉีดเข้าไปในส่วนบนของคอลัมน์ (Load sample) เฟสเคลื่อนที่จะทำหน้าที่พาสารผ่านไปยังคอลัมน์ สารประกอบ แต่ละตัวจะถูกดูดซับ และถูกทำให้หลุดออกไปจากการดูดซับ (Desorption) บนอนุภาคที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ ผลคือสารประกอบจะเคลื่อนที่ไปตามคอลัมน์ได้ช้าลง และอัตราเร็วของการเคลื่อนที่จะขึ้นอยู่กับสัมพรรคภาพ ของสารกับอนุภาคที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ สารประกอบ X มีการกระจายอยู่ระหว่างเฟสอยู่กับที่ (Stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) เมื่อผ่านไปตามคอลัมน์ดังสมการที่ 2.4



$X_m$  คือ สารประกอบ X ที่อยู่ในเฟสเคลื่อนที่

$X_s$  คือ สารประกอบ X ที่อยู่ในเฟสอยู่กับที่

ค่าสัมประสิทธิ์การกระจาย (Distribution coefficient) สำหรับสารประกอบที่สอดคล้องกับสมการที่ (2.4) คือ

$$K_x = [X]_s / [X]_m = \text{ค่าคงที่} \quad (2.5)$$

$K_x$  = ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายของสาร X

$[X]_s$  = ความเข้มข้นของสาร X ในเฟสอยู่กับที่

$[X]_m$  = ความเข้มข้นของสาร X ในเฟสเคลื่อนที่

ถ้า  $K_x$  มีค่ามาก แสดงว่าสารประกอบละลายได้ดีในเฟสอยู่กับที่มากกว่าเฟสเคลื่อนที่ ดังนั้นสารประกอบนี้จะเคลื่อนที่ไปตามคอลัมน์ได้ช้า แต่ถ้า  $K_x$  มีค่าน้อย แสดงว่าสารประกอบละลายในเฟสเคลื่อนที่ได้ดีกว่าเฟสอยู่กับที่ และจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้อย่างรวดเร็ว

## 2.2.2 ตัวตรวจวัด สำหรับเครื่อง HPLC

### 1. ยูวี-วิสิเบิล ดีเทคเตอร์ (UV-VIS Detectors)

หลักการทำงานของเครื่องตรวจวัดชนิดนี้อาศัยการดูดกลืนแสงยูวีของสารตัวอย่างเครื่องชนิดนี้เป็นที่นิยมใช้กันมากใน HPLC เพราะเครื่องตรวจวัดนี้มีลักษณะพิเศษ คือ ไม่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของการไหลและอุณหภูมิ แต่ก่อนข้างจะมีความไวสูงกับสารประกอบอินทรีย์เป็นส่วนใหญ่ สารที่ดูดกลืนคลื่นแสงอัลตราไวโอเลตส่วนมากจะเป็นพวกที่มี  $\pi$ -bonding electrons และพวกที่มี unshaired electron เช่น โอลิฟิน (Olefin) สารประกอบอโรมาติก สารประกอบที่มี C=O, C=S, -N=O-, N=N- อยู่ในโมเลกุล การดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่นหนึ่ง จะเป็นไปตามกฎของแลมเบิร์ตและเบียร์ (Lambert-Beer law) ในปัจจุบัน ยูวี-วิสิเบิล ดีเทคเตอร์ ที่นิยมใช้ใน HPLC แบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด คือ

1.1 Fixed-wavelength UV detector ดีเทคเตอร์ชนิดนี้ประกอบด้วย flow-through cell และแหล่งกำเนิดแสง(Light source) ที่ใช้เป็นแบบหลอดที่ทำด้วยปรอทที่มีความดันต่ำ ซึ่งจะให้แสงที่เปล่งออกมาที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยทำให้เป็นลำแสงด้วยเลนส์ที่ทำด้วยควอทซ์ แล้วให้แสงนี้ผ่านเซลล์ของสารละลายมาตรฐาน และสารตัวอย่าง แสงที่ผ่านออกมาจะผ่านการกรองด้วยฟิลเตอร์ แล้วจึงจะผ่านไปยังโฟโตเซลล์(Photo cell) หรือโฟโตไดโอด 2 ตัว โดยทั่วไป Flow-

through cell จะมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร และยาว 10 มิลลิเมตร และมีปริมาตร 8 ไมโครลิตร นอกจาก Mercury lamp แล้วอาจใช้แหล่งกำเนิดแสงอย่างอื่นที่ใช้ได้กับ Fixed-wavelength detector ได้แก่ Zn lamp(206 นาโนเมตร) และ Cd lamp(214 นาโนเมตร) สำหรับ D2 lamp จะเปล่งแสงออกมาอย่างต่อเนื่องในช่วงยูวี(200-400 นาโนเมตร) และบางช่วงของวิสิเบิล ดีเทคเตอร์ที่ใช้ฟิเตอร์กรองแสง หรือใช้โมโนโครมาเตอร์แยกแสงให้ได้ความยาวคลื่นที่ต้องการ จะใช้แหล่งกำเนิดแสงเป็น D<sub>2</sub> lamp

1.2 Variable UV-VIS detector สามารถตรวจวัดค่าการดูดกลืนได้มากกว่าหนึ่งความยาวคลื่นในขณะการวิเคราะห์ ประกอบด้วย D<sub>2</sub> lamps หลอดทั้งสองนี้สามารถใช้วัดแสงได้ในช่วง 190-800 นาโนเมตร นอกจากนี้ยังมีโมโนโครมาเตอร์ เพื่อใช้สำหรับเลือกความยาวคลื่นตามที่ต้องการได้ ดังนั้นเครื่องดีเทคเตอร์นี้จึงมีประโยชน์มาก สามารถใช้ตรวจหาสารตัวอย่างได้ทั่วไป เพราะสามารถเลือกความยาวคลื่นที่สารตัวอย่างดูดกลืนแสงได้ดีที่สุด และเหมาะสมมากในการนำมาใช้กับ Gradient elution และตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ที่นำมาใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่จะไม่ดูดกลืนแสงยูวี เช่น Acetonitrile สามารถดูดกลืนแสงยูวีได้ที่มีความยาวคลื่นต่ำกว่า 190 นาโนเมตร ดังนั้นจึงไม่มีข้อจำกัดที่จะเลือกตัวทำละลายมาใช้กับเครื่องยูวีดีเทคเตอร์ เครื่องยูวีดีเทคเตอร์นี้มีประโยชน์มากในการวิเคราะห์สารที่มีปริมาณน้อย ๆ ได้ โดยที่ตัวทำละลายหรือสารประกอบที่ปนอยู่ไม่ดูดกลืนแสงยูวี จึงไม่รบกวนการวิเคราะห์นี้

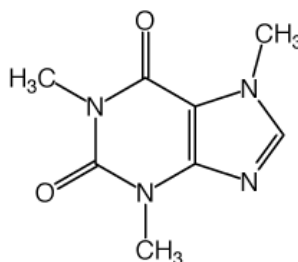
1.3. Photodiode array detector (PDA) ดีเทคเตอร์ชนิดนี้จัดว่าเป็น Solid state detector ซึ่งประกอบด้วยโฟโตไดโอดจำนวนมาก สามารถวัดแสงได้หลาย ๆ ความยาวคลื่นในขณะเดียวกัน ระบบทางเดินของแสงจะแตกต่างจากยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์โดยทั่วไป คือ ระบบทางเดินของแสงจะเป็นแบบย้อนแสง “Reverse Optics” คือแสงจากแหล่งกำเนิดหรือจากหลอดยูวีจะผ่านไปยัง Flow-through cell ก่อนที่จะไปยังโมโนโครมาเตอร์หรือเกรตติง เมื่อแสงที่ตกกระทบบนเกรตติงจะกระจายออกไปเป็นความยาวคลื่นต่าง ๆ แล้วจะไปตกกระทบกับแผงของโฟโตไดโอด เนื่องจากเครื่องดีเทคเตอร์นี้สามารถสแกน UV-VIS spectrum ได้รวดเร็วมาก ดังนั้น การนำเอาเครื่องดีเทคเตอร์นี้มาใช้กับ HPLC จะทำให้ทราบข้อมูลของพีคต่าง ๆ ในยูวีสเปกตรัมที่อยู่ในโครมาโทแกรมได้อย่างดี และข้อมูลต่าง ๆ เหล่านี้ยังสามารถเก็บเข้าไว้ในเครื่องคอมพิวเตอร์ ซึ่งสามารถนำออกมาใช้เมื่อไรก็ได้ ในการตรวจหาสารประกอบที่อยู่ในสารตัวอย่างว่าเป็นอะไรนั้น อาจนำไปเปรียบเทียบกับสารประกอบที่คิดว่าจะเป็นไปได้ แล้วยังสามารถเปรียบเทียบสเปกตรัมที่เป็น 3 มิติ ซึ่งเป็นสเปกตรัมที่แสดงค่าการดูดกลืนคลื่นแสง ความยาวคลื่น และเวลา นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้จากสเปกตรัมยังใช้ตรวจหาสารเจือปนได้อีกด้วย [23]

## 2.3. สมบัติของสารประกอบ Xanthines

### 2.3.1. คาเฟอีน (Caffeine)

สูตรเคมีของคาเฟอีน:  $C_8H_{10}O_2N_4$

ชื่อเคมี IUPAC: 3,7-Dihydro-1,3,7-trimethyl-1H-Purine-2,6-dione



รูปที่ 2.7 แสดงสูตร โครงสร้างของคาเฟอีน [24]

คาเฟอีนเป็นสารที่พบได้ใน ใบ เมล็ด หรือผลของพืชมากกว่า 60 ชนิด แต่ที่รู้จักกันดีก็คือ ในเมล็ดกาแฟ ใบชา Cocoa-bean guarana นอกจากนี้ในเครื่องดื่มหลายๆชนิด เช่น น้ำอัดลม ก็ใส่คาเฟอีนลงไปด้วย ในกาแฟ 150 มิลลิกรัม จะมีคาเฟอีนประมาณ 60-130 มิลลิกรัม ขึ้นกับชนิดของกาแฟส่วนใหญ่ประกอบด้วย คาเฟอีนประมาณร้อยละ 1.5 - 2.5 นอกนั้นเป็นไขมันและสารอินทรีย์ กาแฟ 1 ถ้วย มีคาเฟอีน ประมาณ 0.10 - 0.15 กรัม มีไนอะซิน 1 มิลลิกรัม ไทอามิน และโรโบเฟลวินเล็กน้อย ใบชา 150 มิลลิกรัม มีคาเฟอีนประมาณ 20-90 มิลลิกรัม ส่วนในเครื่องดื่มน้ำอัดลม 180 มิลลิลิตร จะมีคาเฟอีนประมาณ 15-30 มิลลิกรัม ชาประกอบด้วย คาเฟอีนประมาณร้อยละ 1.4 - 3.5 และแทนนินร้อยละ 1-30 ที่เหลือเป็นสารอินทรีย์ ชา 1 ถ้วย ที่ชง จากใบชาแห้ง 1 ช้อนชา จะมีคาเฟอีนประมาณ 0.1 กรัม มีโรโบเฟลวิน และไนอะซินจำนวนน้อยมาก [25] คาเฟอีนเป็นสารที่มีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง หลังจากการกินหรือดื่ม คาเฟอีนจะถูกดูดซึมเข้าสู่เลือดและเนื้อเยื่อของร่างกาย ซึ่งคาเฟอีนจะไม่สะสมในร่างกาย ร่างกายจะขับคาเฟอีนออกไป โดยทั่วไปปริมาณคาเฟอีนในร่างกายจะลดลงครึ่งหนึ่ง ภายในเวลาประมาณ 4 ชั่วโมง ส่วนในสตรีมีครรภ์จะขจัดคาเฟอีนได้ช้ากว่า

คาเฟอีนมีฤทธิ์กระตุ้นการเต้นของหัวใจ การหายใจ และเพิ่มความดันของเลือด เพิ่มการตื่นตัวและทำให้มีสมาธิในการทำงานดีขึ้น โดยฤทธิ์ของคาเฟอีนจะขึ้นกับแต่ละบุคคลโดยจะอยู่ในช่วงประมาณ 2 ถึง 10 ชั่วโมง สารคาเฟอีนนั้นนอกจากจะมีในกาแฟแล้ว ยังพบในชา โกโก้ และเมล็ดโคลา คาเฟอีนเป็นสารที่มีฤทธิ์ ต่อร่างกายหลายประการ เช่น กระตุ้นการไหลเวียนของโลหิต ทำให้โลหิตไปเลี้ยงสมองมากขึ้น ผู้ที่ดื่มเครื่องดื่มที่มีคาเฟอีนจะรู้สึกสดชื่น กระปรี้กระเปร่ากระตุ้น

ประสาทส่วนกลางทำให้รู้สึกตัวไม่ถ่วงนอน กระตุ้นการหลั่งของกรดเกลือในกระเพาะอาหาร มีฤทธิ์เป็นยาขับปัสสาวะอย่างอ่อนเป็นผลให้มีการขับถ่ายแคลเซียมออกจากร่างกายเพิ่มขึ้นด้วย ในทางตรงกันข้าม ในคนที่ไวต่อฤทธิ์ของคาเฟอีนหรือได้รับคาเฟอีนมากเกินไป อาจทำให้มีอาการใจสั่น มือสั่น ปวดศีรษะ นอนไม่หลับกระสับกระส่าย และปวดท้อง

ผลเสียของกาแฟคืออาจทำให้อนอนหลับยากขึ้น ซึ่งขึ้นกับแต่ละบุคคลเช่นกันเพราะบางคนดื่มกาแฟก่อนนอนก็ยังหลับได้สบาย แต่โดยทั่วไปจะทำให้อนอนหลับยาก การบริโภคคาเฟอีนจะช่วยเพิ่มอัตราการเผาผลาญอาหารในร่างกาย (Metabolism) และการเผาผลาญไขมัน บางครั้งการลดน้ำหนักจะใช้คาเฟอีนด้วย คาเฟอีนช่วยการคลายตัวของกล้ามเนื้อของปอดและหลอดเลือด

สำหรับฤทธิ์ของคาเฟอีนที่มีผลต่อร่างกาย พบว่าค่าความปลอดภัยอยู่ที่ 100-300 มิลลิกรัม แต่ถ้าดื่ม กาแฟเป็นประจำและ ได้รับคาเฟอีนมากกว่า 300 มิลลิกรัมต่อวัน ก็มีโอกาสเพิ่มอัตราเสี่ยงต่อโรคหัวใจ โดยผลวิจัยบอกว่าเสี่ยงในอัตรา 2-8 เท่าของคนที่ไม่ดื่มกาแฟ แต่หาวันหนึ่งๆ ดื่มกาแฟชงแก้วๆ 5-6 ถ้วยต่อวัน ก็อาจมีอาการติดคาแฟ (Caffeinism) ขึ้น โดยจะกระวนกระวาย ปวดศีรษะ และหัวใจเต้นแรงเร็วเพราะปริมาณคาเฟอีนจะเพิ่มสูง ขึ้นมากกว่า 600 มิลลิกรัม ส่วนคาเฟอีน ขนาดที่ทำให้เสียชีวิตมีรายงาน จาก องค์การอาหาร และยา (อย.) กระทรวงสาธารณสุขของไทย์ว่า คาเฟอีนประมาณ 10 กรัม หรือเท่ากับกาแฟเข้มข้น 80-100 ถ้วย หรือโคล่า 200 กระป๋องที่ต้องดื่มให้หมดภายในครึ่งชั่วโมง [26]

ผลของคาเฟอีนที่มีต่อหัวใจเป็นที่ถกเถียงกันอย่างมากเนื่องจากผลการวิจัยหลายชิ้นแสดงผลที่ไม่ตรงกัน บางชิ้นรายงานว่า คาเฟอีนไม่มีผลกระทบต่อระดับความดันโลหิต จากผลการวิจัยของ Duke University Medical Center พบว่าปริมาณคาเฟอีน 500 มิลลิกรัม หรือประมาณ 3-4 แก้วกาแฟ (แก้วละ 8 ออนซ์) มีผลทำให้ ระดับความดันเลือดสูงขึ้น 4 มิลลิเมตรปรอท (mmHg) และผลกระทบนั้นต่อเนื่องยาวนาน

### ปริมาณคาเฟอีนในเครื่องดื่ม

ตารางที่ 2.2 แสดงปริมาณในเครื่องดื่มชนิดต่าง ๆ [27]

| ปริมาณ คาเฟอีนที่มีผลต่อระดับความดัน (500 มก.) |                         |                            |
|------------------------------------------------|-------------------------|----------------------------|
| กาแฟ (4 ถ้วย)                                  | กาแฟ แก้วละ 8 ออนซ์     | ปริมาณ คาเฟอีน 100-125 มก. |
| ชา (10 ถ้วย)                                   | ชา แก้วละ 8 ออนซ์       | ปริมาณ คาเฟอีน 50 มก.      |
| โค้กกระป๋อง 325 cc (9 กระป๋อง)                 | โค้ก กระป๋องละ 11 ออนซ์ | ปริมาณ คาเฟอีน 55 มก.      |

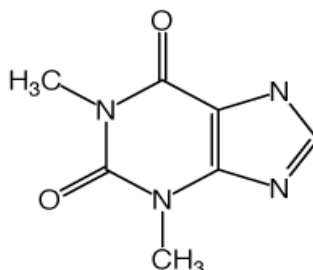
หมายเหตุ: 1 ออนซ์ = 437.5 grains หรือ 1/16 ปอนด์ (pound) หรือ 28.35 กรัม

1 grain = 0.0648 กรัม

### 2.3.2 ซีโอฟีลลีน (Theophylline)

สูตรเคมีของซีโอฟีลลีน:  $C_7H_8N_4O_2$

ชื่อเคมี IUPAC: 1,3-dimethyl-7H-purine-2,6-dione



รูปที่ 2.8 แสดงสูตร โครงสร้างของซีโอฟีลลีน [28]

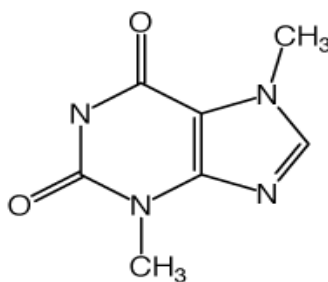
ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Pharmacology) พบว่า Theophylline มีฤทธิ์คล้ายกล้ามเนื้อเรียบของหลอดลมและหลอดเลือดที่ปอด จึงมีฤทธิ์ในการขยายหลอดลมและขยายหลอดเลือดที่ปอด ทั้งนี้ยังมีฤทธิ์ในการเป็นยาขับปัสสาวะ ขยายหลอดเลือดหัวใจ กระตุ้นหัวใจและสมองส่วน cerebrum ซึ่งส่งผลให้มีการหดตัวของกล้ามเนื้อกะบังลมดีขึ้น ใช้แก้โรคหอบหืด (Bronchial asthma) และโรคภูมิแพ้อุดกั้น

Theophylline ที่พบในใบชามีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง โดย Caffeine จะมีฤทธิ์ที่แรงกว่า จึงใช้เป็นยาถอนพิษยาบางชนิด เช่น ใช้ถอนพิษ Morphine (พวกสูบฝิ่นสมัยก่อนจำเป็นต้องดื่มน้ำชาตลอดเพื่อล้างพิษ) ช่วยเพิ่มการบีบตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ เพิ่มอัตราการเต้นของหัวใจ, ขับปัสสาวะจากฤทธิ์ของ Theophylline, ลดไขมันในเส้นเลือดที่เป็นตัวการสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคเส้นเลือดที่ไปหล่อเลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจตีบ, แก้หืดหอบ, กระตุ้นสมองเนื่องจากได้รับยานอนหลับและยาสงบประสาท และนอกจากนี้ยังช่วยลดความเสี่ยงต่อการกำเนิดของเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น ที่ผิวหนัง, ปอด, หลอดอาหาร, ลำไส้เล็ก, ตับ, ทรวงอก และลำไส้ใหญ่

### 2.3.3 ซีโอโบรมีน (Theobromine)

สูตรเคมีของซีโอโบรมีน:  $C_7H_8N_4O_2$

ชื่อเคมี IUPAC: 3,7-dimethylpurine-2,6-dione



รูปที่ 2.9 แสดงสูตรโครงสร้างของธีโอฟีลลีน [29]

## 2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Nishitani และคณะ [30] ได้ทำการตรวจวัดคาเทชิน (Catechin) 8 ชนิด (Epigallocatechin gallate, Epigallocatechin, Epicatechin gallate, Epicatechin, Gallocatechin gallate, Gallocatechin, Catechin gallate, Catechin) คาเฟอีน และสารประกอบฟีนอล 8 ชนิด (Epigallocatechin 3-O-(3N-o-methyl) gallate, Epigallocatechin 3,5-di-o-gallate, Chlorogenic acid, 3-o-caffeoylquinic acid, 4-o-p-coumaroylquinic acid, 5-o-p-coumaroylquinic acid, Coniferin, 1,4,6-tri-o-galloyl- $\beta$ -D-glucose) โดยเทคนิคคลิควิดโครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูง (HPLC) ที่มีตัวตรวจวัดยูวี คอลัมน์ที่ใช้คือ Octadecylsilyl (ODS) และใช้ระบบ Gradient elution (น้ำ-เมทานอล-ethyl acetate-phosphoric acid) สารประกอบทั้งหมดถูกแยกหมดภายใน 40 นาที ปีกจำกัดของการตรวจวัดในช่วง 1.4 - 3.5 นาโนกรัม สารตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์มีช่วงความเป็นเส้นตรงที่ดีจนถึง 1,500 นาโนกรัม และมีค่าความถูกต้องในการตรวจวัด 96-103% ก่อนหน้านี้นี้ได้มีการตรวจวัดคาเฟอีน และคาเทชินชนิดต่าง ๆ ในใบชา [29] โดยใช้คอลัมน์ Octadecylsilyl และใช้ระบบ Isocratic elution (น้ำ-เมทานอล-phosphoric acid) แต่ใช้เวลาในการแยกสารทั้งหมดนาน

Grand และคณะ [31] ได้ทำการตรวจวัดคาเฟอีนในเครื่องดื่มอัดก๊าซยี่ห้อต่าง ๆ ในอเมริกา โดยเทคนิคคลิควิดโครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูง (HPLC) คอลัมน์ที่ใช้คือ คาร์บอน-18 เป็น reverse phase ขนาด 250 x 4.6 มิลลิเมตร (Phenomenex, Torrance, Calif) เฟสเคลื่อนที่ใช่อะซิโตน ไนไทรล์ และน้ำปราศจากไอออน อัตราส่วน 20: 80 (v/v) ปรับค่าพีเอช (pH) ให้มีค่าเท่ากับ 3 อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1 มิลลิตร/ นาที และตรวจพบคาเฟอีนที่ 254 นาโนเมตร ส่วนเครื่องดื่มอัดก๊าซชนิดที่ไม่มีคาเฟอีน ทำการ spike ด้วยคาเฟอีนที่รู้ปริมาณแน่นอน พบว่ามีค่า Recovery เฉลี่ย 102.5% และสัมประสิทธิ์ความเปลี่ยนแปลง (Coefficient of variation) 2.6% ซึ่งแสดงถึงการยอมรับได้ของวิธีการนี้ US Department of Agriculture (USDA) กำหนดไว้ว่าค่าของคาเฟอีนมีได้ 10 มิลลิกรัม/เครื่องดื่ม 100 กรัม สำหรับผลิตภัณฑ์ที่เป็นเครื่องดื่มประเภทน้ำอัดลมที่มีโคเลาผสม จากค่าที่ตรวจวัดได้เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ US Department of Agriculture สำหรับเครื่องดื่มแต่ละยี่ห้อพบว่า มีค่าที่คลาดเคลื่อนไป

Mena และคณะ [32] ได้ทำการตรวจวัด Perimicarb ในตัวอย่างน้ำโดยใช้พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลสำหรับการเตรียมตัวอย่างโดยการสกัดในสถานะของแข็ง มีการสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลเพื่อใช้เป็นตัวดูดซับที่จำเพาะในการสกัดในสถานะของแข็ง สำหรับการเตรียม Carbamate pirimicarb จากตัวอย่างน้ำ พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลเตรียมขึ้นโดยใช้ pirimicarb เป็นตัวต้นแบบ Methacrylic acid เป็นหมู่ฟังก์ชันมอนอเมอร์ และ Ethylene glycol dimethacrylate เป็นมอนอเมอร์เชื่อมโยง ตัวทำละลายที่ใช้คือ คลอโรฟอร์ม (Chloroform) การตรวจวัด Perimicarb ใช้ดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์โวลแทมเมทรี (Differential pulse voltammetry; DPV) ขั้วไฟฟ้าทำงานใช้ขั้วไฟฟ้าปรอทหยด (Hanging mercury drop electrode; HMDE) 0.1 โมล/ลิตร HCl พบว่ามีขีดจำกัดของการตรวจวัด 4.1 ไมโครกรัม/ลิตร มีค่าการทำซ้ำดี

Matsui และคณะ [33] ได้ทำการสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบที่มีความจำเพาะกับไทรเอซีน (Triazine) ซึ่งเป็นยาปราบศัตรูพืช โดยปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบแขวนลอย (Suspension polymerization) และนำมาใช้กับการสกัดในสถานะของแข็งที่มีความจำเพาะต่อไซมาซีน (Simazine) ซึ่งเป็นหนึ่งในยาปราบศัตรูพืชในกลุ่มของไทรเอซีน ที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำ กรรมวิธีดังกล่าวนี้มีการใช้สถานะย้อนกลับ (Reversed-phase) ในการสังเคราะห์ตัวรับ (Receptor) ตามกระบวนการแยกแบบสัมพรรคภาพ (Affinity separation) โดยมีพื้นฐานอยู่บนพันธะไฮโดรเจน ซึ่งแสดงความจำเพาะกับไซมาซีน และชะสารประกอบอื่น ๆ ที่ไม่ต้องการออกมา การสกัดในสถานะของแข็งมีผล (Yield) เท่ากับ 56 เท่าของความเข้มข้นของสารละลายไซมาซีน และมีค่า Recovery 91%

Pap และคณะ [34] ได้ทำการศึกษา และพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการสกัดในสถานะของแข็งโดยใช้พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล (MIP) ที่มีความจำเพาะต่อ Terbutylazine ซึ่งเป็นยาฆ่าแมลงในกลุ่มไทรเอซีน (Triazine) วิธีการนี้เกี่ยวข้องกับการเตรียมความเข้มข้นจากตัวอย่างน้ำที่มีปริมาตรมากบนแผ่น C-18 แบบกลม (C-18 disk) เชื่อมต่อการ Clean-up ที่จำเพาะบนพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล ซึ่งวิธีการนี้ถูกปรับให้มีความเหมาะสมโดยทำการศึกษา Recovery และ Retention ของ Terbutylazine และสารประกอบอื่น ๆ ที่มีโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับอนุพันธ์ของไทรเอซีน ตามหมู่ฟังก์ชันของสารละลายที่เลือกใช้ในการล้าง ศึกษาผลขององค์ประกอบที่เป็นน้ำของสารละลายที่เลือกใช้ในการล้างโดยศึกษาค่า Recovery ของพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล ตัวอย่างน้ำในแม่น้ำนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคที่เชื่อมต่อกันดังที่กล่าวไว้ข้างต้น และจะได้การ Clean-up สารตัวอย่างที่มีประสิทธิภาพ