

บทที่ 3

การดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 สารเคมี

1. Caffeine 99% ($C_8H_{10}O_2N_4 \cdot H_2O$) Analytical grade จากบริษัท ALDRICH
2. Theophylline ($C_7H_8N_4O_2$) 99+% Analytical grade จากบริษัท ACROS ORGANICS
3. Theobromine ($C_7H_8N_4O_2$) 99% Analytical grade จากบริษัท ACROS ORGANICS
4. Ethylene glycol dimethacrylate (EDMA) 98% Analytical grade จากบริษัท ALDRICH
5. Methacrylic acid (MAA) 99% Analytical grade จากบริษัท ALDRICH
6. Benzoyl peroxide (BPO) 98% Analytical grade จากบริษัท ALDRICH
7. Acetonitrile (CH_3CN) 99.99% HPLC grade จากบริษัท Fisher Scientific
8. Methanol (CH_3OH) 99.99% HPLC grade จากบริษัท Fisher Scientific
9. น้ำปราศจากไอออน
10. Acetic acid (CH_3COOH) 99.9% Analytical grade จากบริษัท Carlo erba
11. Ammonium acetate (CH_3COONH_4) 99.9% Analytical grade จากบริษัท Carlo erba
12. ก๊าซไนโตรเจน (N_2) 99.99%

3.1.2 เครื่องมือ และอุปกรณ์

1. เครื่องโครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูง (HPLC) รุ่น C-R74 Chromapac ของ Water จากบริษัท WINSOR & CO., LTD.
2. เครื่อง Magnetic Stirrer รุ่น TYP M 21/1 จากบริษัท Franz Morat KG (GmbH & Co.) ความเร็วรอบ 0-1,200 รอบ/นาที
3. เครื่อง FT-IR รุ่น Spectrum GX ของบริษัท Perkin Elmer
4. เครื่อง Mastersizer X ของบริษัท Malvern
5. เครื่อง Thermogravimetric analyser (TGA) รุ่น Pyris 1 TGA HT ยี่ห้อ Perkin-Elmer Pyris 1 ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล (Molecular Imprint Polymer)

การเตรียมพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลชนิด P_1 , P_2 และ P_3 (ใช้คาเฟอีน 0.25, 0.50 และ 0.75 มิลลิโมล ตามลำดับ) และ P คือ พอลิเมอร์ควบคุมไม่ต้องใส่คาเฟอีน การเตรียม P_1 (P_1 ใช้คาเฟอีน 0.25 มิลลิโมล) โดยชั่งเบนโซอิลเปอร์ออกไซด์ (Benzoyl peroxide) 0.02215 กรัม และคาเฟอีน 0.04855 กรัม ใส่ลงในขวดรูปกรวยขนาด 125 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Acetonitrile ลงไป 2 มิลลิลิตร เติม Methyl methacrylic acid (MMA) 170 ไมโครลิตร (2 มิลลิโมล) และ Ethylene glycol dimethacrylate 1.13 มิลลิลิตร (6 มิลลิโมล) นำไปใส่ภาชนะออกโดยผ่านก๊าซไนโตรเจนเป็นเวลา 2 นาที ปิดฝาขวดรูปกรวย และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสในอ่างน้ำ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง พบว่าเกิดพอลิเมอร์ที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวเต็มขวดรูปกรวย จากนั้นนำพอลิเมอร์ออกมาบดให้มีขนาดเล็กลงด้วยโกร่งบดสาร ทำการสกัดเอามอนอเมอร์ ตัวต้นแบบ และสารที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันออกไปโดยการสกัดแบบซอกเลต (Soxhlet extraction) ใช้ตัวทำละลายผสมคือ เมทานอล-กรดแอซิดิก อัตราส่วน 9: 1 โดยปริมาตร ทำการสกัดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำพอลิเมอร์ที่ผ่านการสกัดมาบดเพื่อลดขนาดอนุภาคอีกครั้ง แล้วคัดแยกขนาดโดยใช้น้ำกรองผ่านที่คัดแยกขนาดอนุภาค 90 ไมโครเมตร อนุภาคที่ไม่ผ่านที่คัดแยกให้นำมาบดใหม่ จนกระทั่งอนุภาคทั้งหมดสามารถผ่านที่คัดแยกได้ อนุภาคที่คัดแยกขนาดแล้ว นำมาล้างด้วยสารละลายผสมเมทานอล-น้ำในอัตราส่วน 1: 1 โดยปริมาตร นำอนุภาคทั้งหมดมาทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะนำไปใช้

การเตรียม P_2 (P_2 คือใช้คาเฟอีน 0.50 มิลลิโมล) ชั่งคาเฟอีนมาจำนวน 0.09915 กรัม และเบนโซอิลเปอร์ออกไซด์ 0.02225 กรัม P_3 (P_3 คือใช้คาเฟอีน 0.75 มิลลิโมล) ชั่งคาเฟอีนมาจำนวน 0.14572 กรัม และ เบนโซอิลเปอร์ออกไซด์ 0.02264 กรัมวิธีการเตรียมทำเหมือนกับวิธีที่กล่าวไว้ข้างต้น และพอลิเมอร์ควบคุม (P) ชั่งเบนโซอิลเปอร์ออกไซด์ 0.02246 กรัมแต่ไม่ต้องใส่คาเฟอีนซึ่งเป็นตัวต้นแบบในปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันนี้

3.2.2 การศึกษาคุณลักษณะของพอลิเมอร์ลอกแบบ

3.2.2.1 การวิเคราะห์โดยใช้ FT-IR

นำพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลมาบดผสมกับ KBr แล้วนำไปอัดเป็นแผ่นบางด้วยเครื่องมือสำหรับอัดของเครื่อง FT-IR แล้วนำไปวัดที่ความยาวคลื่น $4,000-370\text{ cm}^{-1}$

3.2.2.2 การหาความคงทนต่อความร้อน และการสลายตัวของพอลิเมอร์ลอกแบบ

โมเลกุล

นำพอลิเมอร์มาทดสอบความคงทนต่อความร้อน และการสลายตัวด้วย TGA โดยนำพอลิเมอร์ประมาณ 5-10 มิลลิกรัม ใส่ลงในจานแพลทินัม น้ำหนักสารจะปรากฏที่จอ ซึ่ง 1 มิลลิกรัม = 20 มิลลิโวลต์ แล้วนำไปแขวนไว้ที่ปลายด้านหนึ่งของคานชั่งซึ่งติดอยู่กับ Taut-band meter ที่เคลื่อนที่ได้ เสาที่อุณหภูมิ 50 -900 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 20 องศาเซลเซียส/นาที ภายใต้อากาศในโตรเจน

3.2.2.3 การหาขนาดอนุภาคของพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล

นำพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้มาหาขนาดอนุภาคโดยเฉลี่ยโดยทำการตรวจวัดด้วยเครื่อง Mastersizer X โดยใช้น้ำเป็นสารช่วยกระจายตัว วัดขนาดอนุภาคของพอลิเมอร์ลอกแบบ

3.2.2.4 การตรวจดูพื้นผิวด้วย SEM

1. นำพอลิเมอร์ที่ได้ทั้งหมดมา Cross section ภายใต้อากาศในโตรเจนเหลว แล้วนำมาวางลงบนฐาน (Stub) จากนั้นทำการเคลือบผิวด้วยทอง โดยใช้ความดันช่วงแรก 2×10^{-2} มิลลิบาร์ เป็นเวลา 50 นาที ช่วงที่สองใช้ความดัน 10^{-1} มิลลิบาร์ เพื่อเคลือบทองเป็นเวลา 30 วินาที กระแสไฟที่ใช้ 18 มิลลิแอมป์ โดยใช้ก๊าซอาร์กอน 99% จากนั้นนำพอลิเมอร์ที่ได้ไปวางลงบนฐาน (State) ของเครื่อง SEM เพื่อดูลักษณะพื้นผิว และลักษณะอนุภาคที่บดเป็นผงละเอียดของพอลิเมอร์ลอกแบบ โมเลกุล

2. ทำการ Spark vacuum เครื่อง SEM เป็นเวลา 15 นาที รอจนส่วนที่เรียกว่า Chamber มีความดัน 10^{-1} มิลลิบาร์ และส่วนของคอลัมน์มีความดัน 1.2×10^{-4} มิลลิบาร์

3. เปิดเครื่องเพื่อดูภาพพอลิเมอร์ที่ทำการตรวจวัด

3.2.3 การเตรียมการสกัดในสถานะของแข็งโดยใช้พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล (MIP-SPE)

นำ SPE cartridge ที่ใช้แล้วมาล้าง และทำให้แห้ง นำพอลิเมอร์ลอกแบบที่สังเคราะห์ได้จำนวน 200 มิลลิกรัม มาทำการบรรจุลงไปใน Cartridge โดยบรรจุแบบแห้ง (Dry pack) และนำ Frit บรรจุลงไปที่ด้านบน และล่าง

3.2.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐานต่าง ๆ

3.2.4.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานคาเฟอีน (Caffeine) เข้มข้น 0.25, 0.5, 1, 5, 20, 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

1. ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานคาเฟอีนเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรก่อนโดยชั่งคาเฟอีน 2.50 กรัม ละลายด้วยเมทานอล และปรับปริมาตรจนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานคาเฟอีนเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร โดยนำสารละลายมาตรฐานในข้อ 1 มา 10 มิลลิลิตร เจือจางด้วยเมทานอล จนมีปริมาตร 250 มิลลิลิตรจะได้สารละลายมาตรฐานคาเฟอีนเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำสารละลายมาตรฐานคาเฟอีนที่ได้นี้ไปเจือจางต่อด้วยเมทานอลจนมีความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1, 10, 20, 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

3.2.4.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน ทีโอฟิลลีน (Theophylline) เข้มข้น 0.25, 0.5, 1, 5, 20, 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

1. ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานทีโอฟิลลีนเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรก่อนโดยชั่งทีโอฟิลลีน 2.50 กรัม ละลายด้วยเมทานอล และปรับปริมาตรจนมีปริมาตร 25 มิลลิลิตร
2. เตรียมสารละลายมาตรฐานทีโอฟิลลีนเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยนำสารละลายมาตรฐานในข้อ 1 มา 1 มิลลิลิตร เจือจางด้วยเมทานอล จนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานทีโอฟิลลีนเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำสารละลายมาตรฐานทีโอฟิลลีนที่ได้นี้ไปเจือจางต่อด้วยเมทานอลจนมีความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1, 10, 20, 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

3.2.4.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน ทีโอโบรมีน (Theobromine) เข้มข้น 0.25, 0.5, 1, 5, 20, 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

1. ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานทีโอโบรมีนเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรก่อนโดยชั่งทีโอโบรมีน 2.5 กรัม ละลายด้วยเมทานอล และปรับปริมาตรจนมีปริมาตร 25 มิลลิลิตร
2. เตรียมสารละลายมาตรฐานทีโอโบรมีนเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยนำสารละลายมาตรฐานในข้อ 1 มา 1 มิลลิลิตร เจือจางด้วยเมทานอล จนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานทีโอโบรมีนเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำสารละลายมาตรฐานทีโอโบรมีนที่ได้นี้ไปเจือจางต่อด้วยเมทานอลจนมีความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1, 10, 20, 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรทำการตรวจวัดสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิดคือ คาเฟอีน (Caffeine) ทีโอฟิลลีน (Theophylline) และทีโอโบรมีน (Theobromine) ที่ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1, 10, 20, 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยเครื่อง HPLC ที่สภาวะการทดลองดังนี้

คอลัมน์: คาร์บอน-18 คอลัมน์ ขนาด 15 เซนติเมตร x 4.6 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาคที่บรรจุในคอลัมน์ 0.5 ไมครอน เฟสเคลื่อนที่: สารละลายเมทานอล- 0.05 โมลาร์ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ อัตราส่วน 20:80 โดยปริมาตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ : 0.8 มิลลิลิตร/ นาที ตัวตรวจวัด: UV detector ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร

ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และสร้างกราฟมาตรฐานโดยทำการพล็อตกราฟระหว่าง Peak area และความเข้มข้น

3.2.5 การศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการสกัดสารมาตรฐานด้วยพอลิเมอร์ลอกแบบ

ทดสอบสถานะของสารละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารละลายมาตรฐานคาเฟอีนด้วยพอลิเมอร์ลอกแบบที่เตรียมไว้ คือ P_1 , P_2 , P_3 และ พอลิเมอร์ควบคุม (P) เพื่อทดสอบว่าพอลิเมอร์ใดมีความสามารถในการสกัดคาเฟอีนได้ดีที่สุด โดยนำสารละลายมาตรฐานคาเฟอีนเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 1 มิลลิลิตร มาทำการสกัดด้วยพอลิเมอร์ลอกแบบที่เตรียมไว้ทั้ง 4 ชนิด แล้วผ่านสารละลายบัฟเฟอร์ (0.05 โมลาร์ $\text{CH}_3\text{COONH}_4\text{-NH}_3(\text{aq})$ pH 9) จำนวน 1 มิลลิลิตร เข้าไปก่อน เก็บสารละลายที่ได้มาทำการตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC เพื่อทำการตรวจวัดคาเฟอีน จากนั้นทำการล้างครั้งแรกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (0.05 โมลาร์ $\text{CH}_3\text{COONH}_4\text{-NH}_3(\text{aq})$ pH 9) จำนวน 1 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ได้มาทำการตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC เพื่อทำการตรวจวัดคาเฟอีน ทำการล้างครั้งที่สองด้วยสารละลายผสม ACN-TEA 1% (ACN คือ Acetonitrile, TEA คือ Triethylamine) จำนวน 1 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ได้มาทำการตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC เพื่อทำการตรวจวัดคาเฟอีน และทำการชะด้วยสารละลายผสม ACN- CH_3COOH 1% จำนวน 1 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ได้มาทำการตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC เพื่อทำการตรวจวัดคาเฟอีนที่ถูกชะออกมาทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำข้อมูลที่ได้ไปทำการเปรียบเทียบกัน และหา %Recovery

3.2.6 การศึกษาปริมาตรที่เหมาะสมในการ loading (ปริมาตร Breakthrough) ในพอลิเมอร์ลอกแบบชนิด P_2 และ P_3

โดยนำสารละลายมาตรฐานคาเฟอีนเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาทำการสกัดด้วยพอลิเมอร์ลอกแบบชนิด P_2 และ P_3 ซึ่งปริมาตรในการ loading ที่ทำการเปลี่ยนแปลงดังนี้ 100, 250, 500, 750, 1000 และ 1500 ไมโครลิตร ทำการทดลองเหมือนในข้อ 3.2.5 นำข้อมูลที่ได้มาทำการพล็อตกราฟระหว่าง q (มิลลิกรัม/ กรัม) ซึ่งค่า q คืออัตราส่วนระหว่างน้ำหนักของสารที่ถูกดูดซับ (มิลลิกรัม) และน้ำหนักของพอลิเมอร์ลอกแบบที่บรรจุใน cartridge (กรัม)

3.2.7 การศึกษาความเลือกจำเพาะในการสกัดสารละลายผสม (คาเฟอีน ซีโอโบรมีน และซีโอฟิลลีน) ด้วยพอลิเมอร์ลอกแบบชนิด P_2 และ P_3

นำพอลิเมอร์ลอกแบบชนิด P_2 และ P_3 มาศึกษาความเลือกจำเพาะต่อคาเฟอีน โดยนำสารละลายมาตรฐานคาเฟอีน ซีโอโบรมีน และซีโอฟิลลีน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร มาผสมกัน และปริมาตรในการ loading สำหรับ P_2 คือ 1,000 ไมโครลิตร จากนั้นทำการทดลองตามที่กล่าวไว้ข้างต้น