การสกัดในสภาวะของแข็งโดยใช้พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลเพื่อตรวจวัดคาเฟอีน ด้วยวิธีลิควิดโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง

MOLECULAR IMPRINTED SOLID PHASE EXTRACTION FOR DETERMINATION OF CAFFEINE BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

พิมพัตรา แพงบุดดี
PIMPATRA PANGBUDDEE

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2549

ISBN 974-15-2744-6

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การสกัดในสภาวะของแข็งโดยใช้พอลิเมอร์ฉลอกแบบโมเลกุลเพื่อตรวจวัดคาเฟอีนด้วยวิธีลิควิดโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง

MOLECULAR IMPRINTED SOLID PHASE EXTRACTION FOR DETERMINATION OF CAFFEINE BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

T 065466

พิมพัตรา แพงบุดดี

PIMPATRA PANGBUDDEE

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....65466
วัน,เดือน,ปี.....11 ต.ค. 2549

b.....
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2549

ISBN 974-15-2744-6

MOLECULAR IMPRINTED SOLID PHASE EXTRACTION FOR DETERMINATION OF CAFFEINE BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

PIMPATRA PANGBUDDEE

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN CHEMISTRY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2006

ISBN 974-15-2744-6

COPYRIGHT 2006

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การสกัดในสภาวะของแข็งโดยใช้พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลเพื่อตรวจวัดคาเฟอีนด้วยวิธีลิควิดโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง
นักศึกษา	นางสาวพิมพัตรา แพงบุดดี
รหัสประจำตัว	44065510
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เคมี (เคมีวิเคราะห์)
พ. ศ.	2549
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	รศ. อรุณี คงศักดิ์ไพศาล

บทคัดย่อ

การสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบเตรียมได้จากปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยใช้คาเฟอีนเป็นตัวต้นแบบ (template) กรดเมทิลเมทาไครลิค (methyl methacrylic acid; MAA) เป็นฟังก์ชันนัล มอนอเมอร์ เอทิลีน ไกลคอล ไดเมทาไครเลต (EDMA) เป็นพอลิเมอร์แบบเชื่อมโยง และใช้เบนโซอิล เพอร์ออกไซด์ (BPO) เป็นตัวริเริ่มปฏิกิริยา พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลที่สังเคราะห์ได้นั้นนำมาใช้เป็น solid-phase extraction (SPE) sorbent สำหรับการเตรียมตัวอย่างคาเฟอีน ศึกษาคุณลักษณะของพอลิเมอร์ลอกแบบ โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FT-IR ทดสอบความคงทนต่อความร้อน และการสลายตัวด้วย TGA พบว่า อุณหภูมิที่พอลิเมอร์ควบคุม (P) เริ่มสลายตัว คือ 295.466 °C พอลิเมอร์ที่ใช้คาเฟอีนเป็นตัวต้นแบบจำนวน 0.25 มิลลิโมล (P_1) 223.743 °C พอลิเมอร์ที่ใช้คาเฟอีนเป็นตัวต้นแบบจำนวน 0.50 มิลลิโมล (P_2) 221.981 °C และพอลิเมอร์ที่ใช้คาเฟอีนเป็นตัวต้นแบบจำนวน 0.75 มิลลิโมล (P_3) 274.904 °C การหาขนาดของอนุภาคของพอลิเมอร์ลอกแบบด้วยเครื่อง Mastersizer X พบว่าพอลิเมอร์ควบคุม (P) มีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 47.48 μm. P_1 มีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 47.25 μm. P_2 มีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 48.93 μm. และ P_3 มีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 52.58 μm. นำพอลิเมอร์ลอกแบบทั้ง 4 ชนิดบรรจุใน catridge เพื่อนำไปสกัดตัวอย่างคาเฟอีน ก่อนนำไปตรวจวัดด้วยเครื่องลิควิดโครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูง (HPLC) ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารมาตรฐานด้วยพอลิเมอร์ลอกแบบพบว่าสภาวะที่ดีที่สุดคือ ในขั้นตอนการ loading ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ (0.05 M CH_3COONH_4(aq) pH 9) แล้วทำการล้างครั้งแรกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (0.05 M CH_3COONH_4(aq) pH 9) จากนั้นทำการล้างครั้งที่สองด้วยสารละลายผสม acetonitrile (CH_3CN)-triethyllamine (TEA) 1% จำนวน 1 mL. แล้วทำการชะด้วยสารละลายผสม acetonitrile

(CH_3CN)-acetic acid (CH_3COOH) 1 % จำนวน 1 mL. ในแต่ละขั้นตอนเก็บสารละลายออกมาทำการตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC และในการศึกษาประสิทธิภาพของพอลิเมอร์ลอกแบบในการสกัดสารประกอบ Xanthines พบว่าพอลิเมอร์ลอกแบบชนิด P_1, P_2 และ P_3 มีค่าเท่ากับ 99.43, 99.96 และ 113.55 ส่วน P มี %Recovery เท่ากับ 87.64 พบว่าพอลิเมอร์ลอกแบบทั้งหมดมีความจำเพาะต่อคาเฟอีน โดยเฉพาะพอลิเมอร์ลอกแบบ ชนิด P_2 พบว่ามีความจำเพาะต่อคาเฟอีนมากที่สุด ส่วน P_3 ยังสกัดเอาคาเฟอีน (ตัวต้นแบบ) ออกไม่หมด จึงมีคาเฟอีนเหลือค้างอยู่ในโพรงดูได้จากผลของ TGA เทอร์โมแกรมของ P_3 E S (พอลิเมอร์ลอกแบบชนิด P_3 ที่สกัดเอาคาเฟอีนออก และทำการคัดแยกขนาดแล้ว) พบคาเฟอีนอยู่ในเทอร์โมแกรม

Thesis Title	Molecular Imprinted Solid Phase Extraction for Determination of Caffeine by High Performance Liquid Chromatography.
Student	Miss Pimpatra Pangbuddee
Student ID	44065510
Degree	Master of Science
Program	Chemistry (Analytical Chemistry)
Year	2006
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Arunee Kongsakphaisal

ABSTRACT

The synthetic molecular imprinted polymers (MIPs) was prepared by thermal polymerization at 60 °C, using caffeine as the template, methyl methacrylic acid (MAA) as the functional monomer, ethylene glycol dimethacrylate (EDMA) as the cross-linked monomer and benzoyl peroxide (BPO) as the initiator. This polymer was packed in a cartridge and used as a solid-phase extraction (SPE) sorbent for pre-concentration of caffeine. Studied properties of molecular imprinted polymer by FT-IR. TGA analysis, melting temperature of control polymer (P) was 295.466 °C, molecular imprinted polymer which used template caffeine 0.25 mmol (P_1) is 223.743 °C, molecular imprinted polymer which used template caffeine 0.50 mmol (P_2) is 221.981 °C and molecular imprinted polymer which used template caffeine 0.75 mmol (P_3) is 274.904 °C. The particle size of molecular imprinted polymer was determined by Mastersizer X for control polymer (P) found the average particle size were 47.48 μm., P_1 47.25 μm., P_2 48.93 μm. and P_3 52.58 μm. This 4 types of polymer were packed into cartridge for extraction of caffeine before determined with HPLC. The condition for pre-concentration of caffeine standard solution by solid phase extraction (SPE) technique we found that the loading step used buffer solution (0.05 M CH_3COONH_4(aq) pH 9) as loading solution then buffer solution (0.05 M CH_3COONH_4(aq) pH 9) as first washing step and 1 mL. of CH_3CN-CH_3COOH 1% solution for the second washing. For elution step used 1 mL. of CH_3CN-triethylamine (TEA) 1% solution. In each step we collected the solutions and determination of caffeine by HPLC technique. We found %recovery of P_1, P_2, P_3 and P were 99.43, 99.96 113.55 and 87.64. The extraction

efficiency of molecular imprinted polymer for xanthine compounds found P_1, P_2 and P_3 specific with caffeine especially for P_2.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดีได้นั้น ต้องขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ อรุณี คงศักดิ์ไพศาล อาจารย์ที่ปรึกษาที่ให้คำปรึกษาและเสนอแนะการทำวิทยานิพนธ์ กราบพระคุณ รศ.ดร.มาลินี ชัยศุภกิจสินธ์ ดร.วิบูลย์ ประดิษฐ์เวียงคำ รศ.ดร.นิพนธ์ วงศ์วิเศษสิริกุล และ ผศ. ดร.วินัย นุตมากุล สำหรับคำแนะนำต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย รวมถึงความหวังดีและความห่วงใยตลอดการทำวิทยานิพนธ์

ขอบคุณพี่ ๆ นักวิทยาศาสตร์ (พี่สุรินทร์ พี่สุพจน์ พี่ปัท พี่น้ำ พี่ยา พี่หยี) ที่กรุณาอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือต่าง ๆ ตลอดมา รวมถึงน้ำใจและกำลังใจที่มอบให้

ขอบคุณเพื่อน ๆ และพี่ ๆ ภาคเคมี (แจน กิ๊ฟ อ้อ แคท ออ ปลา แมว ตุ้ย เอี๊ยม พี่โรจน์ พี่หลิง พี่กุ๊ก ฯลฯ) สำหรับน้ำใจ และคำแนะนำที่ได้ช่วยเหลือกันตลอดมา

ขอบคุณพี่เจมส์สำหรับความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ เป็นอย่างดีตลอดมา

ขอบคุณบริษัท Axis Associates International และเพื่อนร่วมงานทุกคน ที่ให้ความห่วงใยและสนับสนุนค่าใช้จ่ายบางส่วนในการศึกษา

สุดท้ายขอกราบขอบคุณบิดามารดาที่ให้ความสนับสนุนในด้านต่าง ๆ ตลอดมา รวมทั้งกำลังใจในการต่อสู้อุปสรรคต่าง ๆ ให้ผ่านพ้นไปได้ด้วยดี

พิมพัตรา แพงบุดดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....III

กิตติกรรมประกาศ.....V

สารบัญ.....VI

สารบัญตาราง.....IX

สารบัญรูป.....X

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความสำคัญของวิทยานิพนธ์.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....3

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....4

2.1 การสกัดในสภาวะของแข็งโดยใช้พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล (Molecular Imprinted Solid Phase Extraction; MISPE).....4

2.1.1 เทคนิคการลอกแบบโมเลกุล (Molecular imprinting).....5

2.1.2 วิธีการสกัด.....7

2.1.2.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย.....8

2.1.2.2 การสกัดของแข็ง.....8

2.1.3 การประยุกต์ใช้พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล (MIPs) ในการวิเคราะห์อาหารและเครื่องดื่ม.....11

2.1.3.1 การวิเคราะห์สารชนิดต่าง ๆ โดยการใช้เทคนิคการลอกแบบโมเลกุลของพอลิเมอร์ (Molecular Imprinted Polymers, MIPs). 12

2.2 เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี (Liquid Chromatography; LC).....15

2.2.1 หลักการพื้นฐาน.....15

2.2.2 ตัวตรวจวัด สำหรับเครื่อง HPLC.....16

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.3 สมบัติของสารประกอบ Xanthines....13

2.3.1 คาเฟอีน (Caffeine)....18

2.3.2 ธีโอฟิลลิน (Theophylline)....20

2.3.3 ธีโอโบรมีน (Theobromine)....20

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง....21

บทที่ 3 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย....23

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี....23

3.1.1 สารเคมี....23

3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์....23

3.2 วิธีการทดลอง....24

3.2.1 การเตรียมพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล (Molecular Imprint Polymer)....24

3.2.2 การศึกษาคุณลักษณะของพอลิเมอร์ลอกแบบ....24

3.2.3 การเตรียมการสกัดในสภาวะของแข็งโดยใช้พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล (MIP-SPE....25

3.2.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐานต่างๆ....25

3.2.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารมาตรฐานด้วยพอลิเมอร์ลอกแบบ....27

บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง....28

4.1 ผลการศึกษาคุณลักษณะของพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล....28

4.2 ผลการหาค่า reproducibility, %Recovery, ช่วงความสัมพันธ์ที่เป็นเชิงเส้น (Linear range), ปริมาตร breakthrough และสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r2) 45

บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ....52

5.1 สรุปผลการวิจัย....52

5.2 แนวทางในการศึกษาและพัฒนา....52

สารบัญ (ต่อ)

เอกสารอ้างอิง.....53
ภาคผนวก ก เอกสารข้อมูลความปลอดภัยเคมีภัณฑ์ 55
ภาคผนวก ข วิธีการใช้เครื่อง FT-IR, Pyris I TGA HT, MASTERSIZER X.....63
ภาคผนวก ค การคำนวณพารามิเตอร์ต่างๆ.....67
ภาคผนวก ง Solid Phase Extraction (SPE)และ เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง.....74
ประวัติผู้เขียน.....95

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ตัวอย่างการใช้ MISPE สำหรับอาหาร และเครื่องดื่ม เพื่อวิเคราะห์ส่วนประกอบหรือสารปรุงแต่ง และสิ่งเจือปน....14

2.2 แสดงปริมาณในเครื่องดื่มชนิดต่าง ๆ....19

4.1 เปรียบเทียบ FT-IR สเปกตรัมที่สำคัญ ๆ ของพอลิเมอร์ลอกแบบ 4 ชนิด คือ P, P_1, P_2 และ P_3 คาเฟอีน (Caffeine) ทีโอฟิลลิน (Theophylline) และทีโอโบรมีน (Theobromine)....28

4.2 แสดงขนาดอนุภาคของพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล....32

4.3 แสดงผลการทดสอบความคงทนต่อความร้อน และการสลายตัวด้วย TGA....32

4.4 แสดงข้อมูลความเข้มข้นของคาเฟอีนกับพื้นที่ใต้พีก....45

4.5 แสดงข้อมูลทั้งหมดจากการสร้าง Single standard calibration....46

4.6 แสดงข้อมูลที่ได้จากการทดลอง และนำมาคำนวณหาความเข้มข้นของคาเฟอีนที่ถูกชะออกมาจาก SPE cartridge และนำมาพล็อตกราฟหาปริมาตรที่เหมาะสมในการ loading....48

4.7 แสดงค่า % Recovery ของคาเฟอีน (50 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร) ของพอลิเมอร์ลอกแบบทั้ง 4 ชนิด ซึ่งผลการทดลองได้มาจากการทำซ้ำ 3 ครั้ง....50

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 ไดอะแกรมแสดงกระบวนการลอกแบบโมเลกุล.....5

2.2 ไดอะแกรมแสดงการเกิด MIPs โดยวิธี Self-assembly โดยใช้ Quecerin เป็นโมเลกุลต้นแบบ...6

2.3 เครื่องมือสำหรับทำการสกัดต่อเนื่องแบบธรรมดา (Continuous – infusion extractor).....9

2.4 เครื่องมือสำหรับทำการสกัดแบบ Discontinuous infusion extractor หรือเครื่องสกัดซอกเลต..10

2.5 ตัวอย่างเบียร์ที่ spike กับ ZEA (1 ppm) ก่อน (1) และ หลัง (2) ผ่าน MISPEโครมาโทแกรม (2) แสดงให้ เห็น ZEA ที่ถูกจับไว้ใน MISPE.....13

2.6 แสดงการแยกของผสมของสาร 3 ชนิด โดยให้สาร A เป็นสีแดง, สารB เป็นสีเขียว, สารC เป็นสีน้ำเงิน พื้นที่ที่เป็นสีครีม แสดงถึงตัวทำละลายที่ใช้เป็นตัวชะล้าง.....15

2.7 แสดงสูตรโครงสร้างของคาเฟอีน.....18

2.8 แสดงสูตรโครงสร้างของธีโอฟิลลิน.....20

2.9 แสดงสูตรโครงสร้างของธีโอฟิลลิน.....21

4.1ก FT-IR สเปกตรัม ของพอลิเมอร์ลอกแบบที่สกัดเอาคาเฟอีนซึ่งใช้เป็นตัวต้นแบบออกแล้ว....29

4.1ข FT-IR สเปกตรัม ของพอลิเมอร์ลอกแบบที่ยังไม่สกัดเอาคาเฟอีนซึ่งใช้เป็นตัวต้นแบบออก..30

4.1ค FT-IR สเปกตรัม ของคาเฟอีน.....30

4.1ง FT-IR สเปกตรัม ของธีโอฟิลลิน.....31

4.1จ FT-IR สเปกตรัม ของธีโอโบรมีน.....31

4.2ก แสดงเทอร์โมแกรมของ P S 34

4.2ข แสดงเทอร์โมแกรมของ P E, S.....35

4.2ค แสดงเทอร์โมแกรมของ P_1 S.....36

4.2ง แสดงเทอร์โมแกรมของ P_1 E, S.....38

4.2จ แสดงเทอร์โมแกรมของ P_2 S.....39

4.2ฉ แสดงเทอร์โมแกรมของ P_2 E, S.....40

4.2ช แสดงเทอร์โมแกรมของ P_3 S.....41

4.2ซ แสดงเทอร์โมแกรมของ P_3 E, S.....42

4.3ก แสดงภาพพื้นผิวของพอลิเมอร์ลอกแบบที่ทำการสกัดเอาตัวต้นแบบ (คาเฟอีน) ออกไป.....43

4.3ข แสดงภาพพื้นผิวของพอลิเมอร์ลอกแบบที่ยังไม่ได้สกัดเอาตัวต้นแบบ (คาเฟอีน) ออก.....44

4.3ค แสดงลักษณะรูปร่าง และขนาดโดยทั่วไปของพอลิเมอร์ลอกแบบที่ผ่านการบดและคัดแยกขนาดโดยผ่านที่คัดแยกขนาดอนุภาค 90 ไมโครเมตร.....44

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.4 แสดงกราฟมาตรฐานของคาเฟอีนโดยทำการพล็อตกราฟระหว่างความเข้มข้นของคาเฟอีน (ไมโครกรัม / มิลลิลิตร) และพื้นที่พีก (a.u.).....45

4.5 แสดง Single standard calibration ของ P_2 และ P_3 ซึ่งทำการพล็อตระหว่าง Mass loaded (ไมโครกรัม) และพื้นที่พีก (a.u.) 46

4.6 แสดงเส้นโค้งการถ่ายเทมวลในระหว่างการดูดซับ (Breakthrough curve).....48

4.7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง q (อัตราส่วนของปริมาณสารที่ต้องการวิเคราะห์ (มิลลิกรัม) ต่อปริมาณของพอลิเมอร์ลอกแบบชนิด P_2 จำนวน 0.20324 กรัม) ที่บรรจุใน SPE cartridge กับความเข้มข้น (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร).....49

4.8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง q (อัตราส่วนของปริมาณสารที่ต้องการวิเคราะห์ (มิลลิกรัม) ต่อปริมาณของพอลิเมอร์ลอกแบบชนิด P_3 จำนวน 0.201754 กรัม) ที่บรรจุใน SPE cartridge กับความเข้มข้น (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร).....49

4.9 แสดงการสกัดของพอลิเมอร์ชนิด P_2 ที่สกัดสารผสมของคาเฟอีน ธีโอโบรมีน และธีโอฟิลลีน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร.....51

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญของวิทยานิพนธ์

ในปัจจุบันมีการนำคาเฟอีนมาใช้เป็นส่วนประกอบในอุตสาหกรรมจำนวนมาก ทั้งในอุตสาหกรรมยา เครื่องดื่ม อาหาร หรือแม้กระทั่งเครื่องสำอาง ซึ่งจะต้องมีการทำคุณภาพวิเคราะห์ของผลิตภัณฑ์นั้น ๆ ให้ประกอบด้วยปริมาณคาเฟอีนที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ตรงตามค่าที่กำหนดไว้ การตรวจวัดสารตัวอย่างคาเฟอีนนั้นมีด้วยกันหลายวิธีเช่น เทคนิคการไทเทรต(Titrimetry) [1] เทคนิคการวิเคราะห์ทางสเปกโทรโฟโตเมทรี(Spectrophotometry) [2] โพลาโรกราฟี (Polarography) [3] ก๊าซโครมาโทกราฟี(Gas Chromatography, GC) [4] และ การใช้สเปกโทรโฟโตเมทรีแบบใช้อนุพันธ์ของสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์(Derivative spectrophotometry) [5] แต่ที่นิยมใช้กันส่วนมากนั้น คือ วิธีลิควิดโครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูง (High Performance-Liquid Chromatography, HPLC) โดยใช้ ตัวตรวจวัด UV ซึ่งมักจะใช้คอลัมน์คาร์บอน-18(C-18) แต่วิธีการเตรียมตัวอย่างนั้นค่อนข้างจะยุ่งยากซึ่งมีด้วยกันหลายวิธี บางวิธีมีหลายขั้นตอนและต้องใช้เวลามาก ส่วนในกรณีที่สารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์เป็นสารตกค้างในสิ่งแวดล้อมซึ่งมีความเข้มข้นที่น้อยมาก ทำให้การตรวจวิเคราะห์มักจะไม่พบ เนื่องจากขั้นตอนการสกัดมีหลายขั้นตอนทำให้เกิดการสูญเสียสารที่ต้องการวิเคราะห์ในขณะทำการสกัดสาร ตัวทำละลายที่ใช้ต้องมีความบริสุทธิ์สูงมิเช่นนั้นจะทำให้เกิดการปนเปื้อนของสารอื่น หรือผลของแมทริกซ์มีค่าสูงเป็นเหตุให้มีการรบกวนของสารเจือปน และตัวทำละลายเหล่านี้มีราคาสูง และถูกใช้หมดไปตลอดเวลา เป็นอันตราย และมีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงมีการพัฒนาการเตรียมสกัดสารตัวอย่างขึ้นมาหลากหลายชนิดด้วยกัน สารตัวอย่างที่เป็นสารที่ระเหยได้จะใช้การสกัดสารโดยเทคนิค Headspace, Purge and Trap, Super Critical Fluid Extraction (SFE) หรือ Solid Phase Microextraction (SPME) สำหรับสารที่ไม่ระเหยจะทำการสกัดสารด้วยเทคนิค Liquid-Liquid Extraction Solid Phase Extraction (SPE) หรือ Molecular Imprinted Solid Phase Extraction (MISPE) เป็นต้น

มักมีการนำหลักการของกระบวนการสกัดด้วยของแข็งมาใช้ในการสกัดสารตัวอย่างหรือที่เรียกว่า Pre-treatment technique ซึ่งมีการใช้งานกันอย่างแพร่หลาย และมีข้อดี เช่น ง่ายในการดำเนินการ มีค่า Recovery สูง การเลือกใช้เฟสอยู่กับที่สามารถเลือกได้หลากหลาย สามารถทำให้เป็นระบบอัตโนมัติได้ง่าย มีค่าการทำซ้ำ (Reproducibility) ที่ดี ถึงแม้ว่าจะมีข้อดีหลายอย่างแต่ SPE ก็ยังมีข้อเสียที่สำคัญคือ ความเลือกจำเพาะ (Selectivity) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการแยกสารไม่เฉพาะเจาะจง มักจะควบคุมโดยใช้กระบวนการหน่วง (Retention mechanism) และ

อาจจะทำให้ความบริสุทธิ์ลดลงได้ ดังนั้นจึงมีการนำเอาเทคนิคการลอกแบบโมเลกุลมาใช้เพื่อเพิ่มความจำเพาะในการแยกสาร และการวิเคราะห์ทางเคมี

ปัจจุบันมีการนำเทคนิคการลอกแบบโมเลกุล (Molecular imprinted polymer) ไปใช้ในการสกัดสารตัวอย่างทางด้านชีววิทยา ผลิตภัณฑ์ยา และตัวอย่างทางสิ่งแวดล้อม [6] การนำเอาพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล (Molecular imprinted polymers, MIPs) และ การสกัดในสภาวะของแข็ง (Solid-phase extraction, SPE) มารวมกันเป็นวิธีการสกัดในสภาวะของแข็งโดยใช้พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล (Moleculary imprinted solid phase extraction, MISPE) ได้มีการพัฒนากันอย่างแพร่หลาย

งานวิจัยนี้ได้ทำการสกัดคาเฟอีนในสภาวะของแข็งโดยใช้พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล และตรวจวัดคาเฟอีนด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูง โดยทำการสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลของคาเฟอีนจึงใช้คาเฟอีนเป็นตัวต้นแบบ (Template) และทำปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน ใช้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส โดยใช้คาเฟอีนเป็นตัวต้นแบบ กรดเมทิลเมทาไครลิค (Methyl methacrylic acid; MAA) เป็นหมู่ฟังก์ชันมอนอเมอร์ (Functional monomer) เอทิลีน ไกลคอล ไดเมทาไครเลต (Ethylene glycol dimethacrylate; EDMA) เป็นมอนอเมอร์เชื่อมโยง (Cross-linked monomer) และใช้เบนโซอิล เพอร์ออกไซด์ (Benzoyl peroxide; BPO) เป็นตัวริเริ่มปฏิกิริยา (Initiator) นำพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลที่สังเคราะห์ได้มาใช้เป็นตัวดูดซับสภาวะของแข็งในการสกัด (Solid-phase extraction sorbent) การเตรียมตัวอย่างคาเฟอีน แล้วนำไปตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.เตรียมพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลของคาเฟอีน

2.ศึกษาสมบัติทางกายภาพของพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลที่เตรียมได้

3.ศึกษาประสิทธิภาพในการสกัดคาเฟอีนโดยใช้พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล เปรียบเทียบกับเมื่อไม่ใช้พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลในการเตรียมตัวอย่าง และตรวจวัดโดยวิธีลิควิดโครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูง (HPLC)

4.เปรียบเทียบการใช้พอลิเมอร์ลอกแบบในการสกัดสารตัวอย่าง กับเมื่อไม่ใช้พอลิเมอร์ลอกแบบในการเตรียมตัวอย่าง ก่อนทำการตรวจวัดโดยวิธีลิควิดโครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูง

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. สังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลของคาเฟอีน
2. ศึกษาคุณลักษณะของพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลด้วยเครื่อง FT-IR, Scanning Electron

Microscope (SEM), Thermalgravimetric Analyzer (TGA) และ Particle Analyzer Mastersizer X

3. ศึกษาคุณสมบัติของพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลในการตรวจวัดสารมาตรฐานคาเฟอีน (Caffeine) ธีโอฟิลลิน (Theophylline) และธีโอโบรมีน (Theobromine) เพื่อหาค่า %Recovery ค่าการทำซ้ำ (reproducibility) ช่วงความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรง (Linear range) ขีดจำกัดในการตรวจวัด (Limits of detection, LODS) ขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ (Limits of quantitation, LOQs) และสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r^2)

4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสม และทำการสกัดคาเฟอีนในสารตัวอย่างด้วย MISPE ที่ผลิตได้ และนำไปตรวจวัดด้วยวิธีลิควิดโครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูง

5. เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจวัดคาเฟอีนในสารตัวอย่างโดยวิธีลิควิดโครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูง ที่มีการสกัดสารตัวอย่างจากพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล และที่ไม่มีการสกัดก่อนการตรวจวัด

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบขั้นตอน และ สภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล Molecular imprinted polymer (MIP) เพื่อใช้ในการตรวจวัดคาเฟอีน

2. สามารถใช้วิธีการนี้ในการเตรียมตัวอย่างการวิเคราะห์คาเฟอีนในผลิตภัณฑ์อื่น ๆ เช่น ผลิตภัณฑ์ยา เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ อุตสาหกรรมเกี่ยวกับอาหาร เครื่องดื่ม และงานทางด้านสิ่งแวดล้อม

3. สามารถนำอุปกรณ์ในการเตรียมตัวอย่างที่ใช้แล้วกลับมาใช้ใหม่ได้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การสกัดในสภาวะของแข็งโดยใช้พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล (Molecular Imprinted Solid Phase Extraction; MISPE)

มนุษย์รู้จักนำวัตถุพอลิเมอร์มาใช้เป็นประโยชน์ตั้งแต่สมัยโบราณ คนโบราณรู้จักใช้ขนสัตว์เป็นเครื่องนุ่งห่ม และใช้ปูพื้นในที่อยู่อาศัย จากหลักฐานที่เชื่อถือได้เชื่อว่าได้มีการนำเส้นใยของขนสัตว์ เส้นใยไหม และเส้นใยจากพืช เช่นฝ้าย มาทำเป็นเสื้อผ้าสวมใส่เป็นเวลาไม่ต่ำกว่า 5000 ปี เพราะได้มีการค้นพบผ้าโบราณที่ทำด้วยฝ้ายในประเทศเม็กซิโก ผ้าไหมในประเทศจีน และผ้าลินิน (ทำจากปอ) ใช้หุ้มห่อมัมมี่ (Mummy) ของกษัตริย์อียิปต์โบราณ

การนำวัตถุพอลิเมอร์อื่น ๆ มาใช้เป็นประโยชน์อย่างจริงจังเริ่มขึ้นหลังจากที่ ชาร์ล กูดเยียร์ (Charles Goodyear, 1839) นักประดิษฐ์ชาวอเมริกัน ได้ปรับปรุงสมบัติของยางธรรมชาติโดยผสมผงกำมะถันกับยางธรรมชาติ และให้ความร้อน โดยกระบวนการวัลคาไนเซชัน (Vulcanization) ทำให้มีสมบัติดี และใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางจนทุกวันนี้ ต่อมามีการค้นพบ และพัฒนาพลาสติกและฟิล์มอื่น ๆ จากเซลลูโลส (Cellulose) เช่นเซลลูลอยด์ (Celluloid) เซลลูโลสอะซิเตต (Cellulose acetate) และวิสโคสเรยอน (Viscose rayon) เป็นต้น อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์พลาสติก เส้นใยสังเคราะห์ และฟิล์มที่ผลิตขึ้นในเชิงการค้า ตั้งแต่หลังกูดเยียร์ถึงต้นศตวรรษที่ 20 ล้วนแล้วแต่เป็นพอลิเมอร์ที่มีในธรรมชาติ หรือปรับปรุงจากวัตถุพอลิเมอร์ที่มีในธรรมชาติ จนกระทั่งแบกแลนด์ (Backeland) ได้รับผลสำเร็จในการเตรียมพอลิเมอร์จากปฏิกิริยาการควบแน่นของฟีนอล ( ) [7]

การสกัดในสภาวะของแข็งโดยใช้พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการเตรียมตัวอย่างนอกเหนือจากวิธีเดิม มีข้อดีในเรื่องความจำเพาะ และราคาไม่แพง เป็นผลิตภัณฑ์ถูกออกแบบมาเฉพาะสำหรับสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ และสามารถนำไปใช้ได้อย่างหลากหลาย นอกจากนั้นยังมีความเสถียรสูงทั้งทางกายภาพ และเคมี จึงสามารถนำไปใช้ได้กับสารตัวอย่างหลากหลายชนิด ได้เกือบตลอดช่วงพีเอช (pH) มีความเสถียรที่อุณภูมิ และความดันสูง อีกทั้งยังทนต่อกรด และเบส

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

polymers) จะมีสมบัติจำเพาะกับสารหลากหลาย จึงเหมาะจะนำไปใช้ในขั้นตอนการแยกสำหรับการวิเคราะห์อาหาร และเครื่องดื่มที่ต้องการความจำเพาะสูง

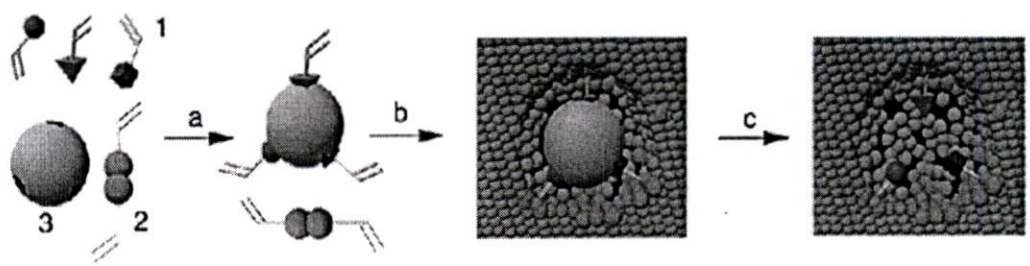
เนื่องจากมีข้อกำหนดมาตรฐานความปลอดภัยของอาหาร และการให้ความสำคัญต่อผู้บริโภคเกี่ยวกับความปลอดภัย และการควบคุมคุณภาพอาหารจากสิ่งเจือปน ทำให้ต้องมีการพัฒนาวิธีวัดขั้นสูงมากขึ้น ในขณะที่การวิเคราะห์องค์ประกอบ และสารประกอบของอาหารยังคงเป็นงานหลักเหมือนเดิม การวิเคราะห์ยาฆ่าแมลง สารพิษในเชื้อรา (Mycotoxin)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

ปัญหาในการวิเคราะห์อาหาร และเครื่องดื่มตัวอย่างส่วนใหญ่จะมีแมทริกซ์ที่ซับซ้อน 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)

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

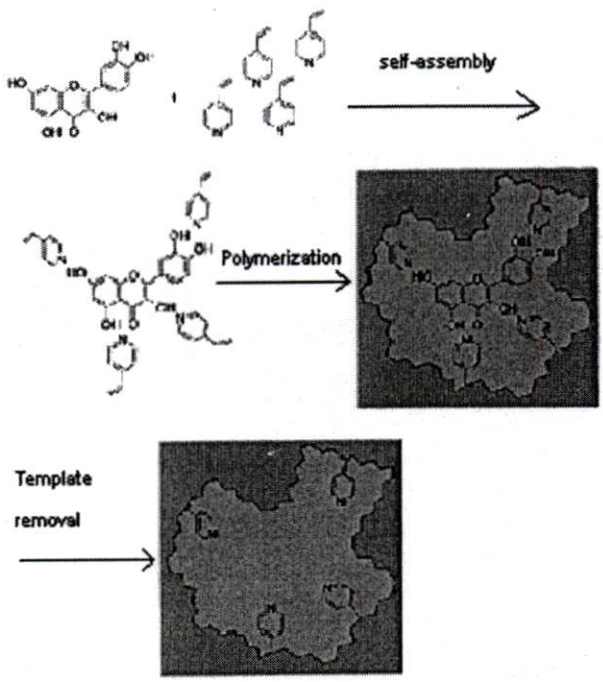
ที่ผ่านมา มีการพัฒนางานวิจัยเกี่ยวกับ MIPs ที่สำคัญ 2 อย่าง คือ วิธีการทำให้โมเลกุลต้นแบบ (Template molecule) เกิดปฏิกิริยาแบบ Non-covalent (วิธี Self-assembly พัฒนาขึ้นครั้งแรกโดย K. Mosbach และทีมงาน) และวิธีทำให้โมเลกุลต้นแบบเกิดปฏิกิริยาแบบโควาเลนท์ (Covalent) (โดย G. Wulff และทีมงาน) [8] กับหมู่ฟังก์ชันของมอนอเมอร์ที่เหมาะสม



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) หรือฉายด้วยแสงยูวีก็จะเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน 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 และพอลิเมอร์ควบคุมด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูง (HPLC)

การเลือกตัวต้นแบบโดยวิธี Self - assembly จะมีความยืดหยุ่นสูง
คุณสมบัติของพอลิเมอร์ลอกแบบ และพอลิเมอร์ควบคุม

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} \tag{2.1}$$

$$\alpha = \frac{k'_{pr\ int}}{k'_{test}} \tag{2.2}$$

$$RI = \frac{\alpha_{CTL}}{\alpha_{IMP}} \tag{2.3}$$

k' : capacity factor

tR : total retention time

tM : hold-up time

α : 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 Trimethyolpropane trimethacrylate ซึ่งถ้าตัวเชื่อมโยงมีความแข็งแรงสูงจะทำให้ MIPs มีโครงสร้างที่แข็งแรงสูงด้วย

2.1.2 วิธีการสกัด

ตามปกติสารตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์จะเป็นสารที่ไม่บริสุทธิ์มีสิ่งเจือปนต่างๆรวมอยู่ด้วยเสมอ ดังนั้นก่อนทำการวิเคราะห์จำเป็นต้องแยกสารที่สนใจออกจากสิ่งเจือปนก่อน เพื่อป้องกันไม่ให้รบกวนการวิเคราะห์ กระบวนการแยกเกิดขึ้นได้เมื่อเกิดการแพร่กระจายของสารที่สนใจระหว่างเฟสสองเฟส ถ้ามีสาร 2 ชนิดที่มีอัตราส่วนของการแพร่กระจายระหว่างเฟสสองเฟสต่างกันจะทำให้สามารถแยกสารทั้งสองชนิดออกจากกันโดยง่าย ถ้าอัตราส่วนของการแพร่กระจายของสารทั้งสองต่างกันมาก ๆ จะสามารถแยกสารทั้งสองออกจากกันได้โดยทำการแยกเพียงครั้งเดียว เช่น

การตกตะกอนคลอไรด์ด้วยเงินไอออนสามารถแยกคลอไรด์ไอออน (Cl-) ออกจากสารละลายที่มีไอออนอื่น ๆ ปนอยู่ เช่นไนเตรตไอออน (NO_3-) เปอร์คลอเรตไอออน (ClO_4-) ทั้งนี้เพราะอัตราส่วนที่เกิดจากการแพร่กระจายของคลอไรด์ในเฟสที่เป็นของแข็ง(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) การแยกโดยวิธีอิเล็กโตรไลซีสให้เกาะที่ขั้วไฟฟ้า (Electrodeposition) การแยกโดยการที่ทำให้กลายเป็นไอ (Volatization) การกลั่น (Distillation) การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Extraction) และการแยกโดยวิธีโครมาโทกราฟี (Chromatography)

2.1.2.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย

การสกัดด้วยตัวทำละลายสามารถทำได้โดยใช้ตัวทำละลายของเหลวชนิดหนึ่งสกัดตัวถูกละลายออกจากของเหลวอีกชนิดหนึ่ง มีชื่อเรียกวิธีการสกัดนี้ว่า Liquid - liquid extraction ซึ่งมีเทคนิคสำหรับการวิเคราะห์อยู่ 3 วิธี คือ วิธีการสกัดแบบไม่ต่อเนื่องหรือแบทช (Batch extraction) วิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง (Continuous extraction) และวิธีการสกัดแบบเคาน์เตอร์เคอร์เรนท์ (Counter current extraction) ถ้าการสกัดใช้ตัวทำละลายของเหลวชนิดเดียวสกัดตัวถูกละลายออกจากสารตัวอย่างของแข็ง จะเรียกการสกัดนี้ว่า Solid – liquid extraction การสกัดจะเกิดขึ้นดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับการละลายของตัวถูกละลายในตัวทำละลาย ถ้าตัวถูกละลายสามารถละลายได้น้อยจำเป็นต้องใช้เทคนิคของการสกัดที่ทำอย่างต่อเนื่อง และใช้ตัวทำละลายเพียงเล็กน้อย เทคนิคในการสกัดมีหลายวิธีจะเลือกใช้เทคนิค และวิธีการใดขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของการสกัด หรือชนิดของตัวถูกละลาย และตัวทำละลาย

2.1.2.2 การสกัดของแข็ง (Extraction of solids)

ถ้าตัวถูกละลายที่ต้องการสกัดอยู่ในสารตัวอย่างที่เป็นของแข็งก็สามารถทำการสกัดด้วยตัวทำละลายของเหลวได้ เรียกวิธีการสกัดนี้ว่า Solid – liquid extraction การสกัดจะทำได้ดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับการละลายของตัวถูกละลายในตัวทำละลายของเหลว 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 จากนั้นคนเป็นเวลานานจนเราคาดว่าตัวถูกละลายละลายในตัวทำละลายหมด จากนั้นกรองเอาของแข็งออกจากสารละลาย เทคนิคนี้ก็สามารถแยกตัวถูกละลายออกจากสารตัวอย่างของแข็งได้ เทคนิคนี้เหมาะสำหรับใช้ในการแยกสารประกอบประเภทเกลือของสารอนินทรีย์

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

เครื่องมือสำหรับทำการสกัดต่อเนื่องแบบธรรมดาเรียกว่า Continuous – infusion extractor

รูปที่ 2.3 เครื่องมือสำหรับทำการสกัดต่อเนื่องแบบธรรมดา (Continuous – infusion extractor)

A คือ Sintered - glass plate

B คือ หลอดบรรจุสารที่จะสกัด ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดการสกัดเรียกว่า extractor

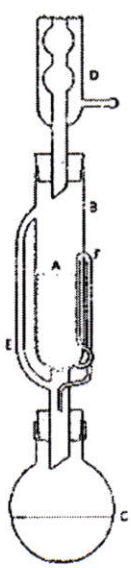
C คือ ขวดสำหรับใส่ตัวทำละลาย

D คือ ตัวควบแน่น (Condenser)

E คือ หลอดสำหรับให้ไอของตัวทำละลายผ่านไปควบแน่น

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

เครื่องมือสำหรับทำการสกัดแบบ Discontinuous – infusion extractor หรือเครื่องสกัดซอกเลต (Soxhlet extractor)



รูปที่ 2.4 เครื่องมือสำหรับทำการสกัดแบบ Discontinuous – infusion extractor หรือเครื่องสกัดซอกเลต

A คือ ถุงผ้าสำหรับใส่สารที่ต้องการสกัดซึ่งเป็นของแข็ง

B คือ หลอดบรรจุสารที่ถูกสกัด ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดการสกัดเรียกว่า extractor

C คือ ขวดสำหรับใส่ตัวทำละลาย

D คือ ตัวควบแน่น (Condenser)

E คือ หลอดสำหรับให้ไอของตัวทำละลายผ่านไปควบแน่น

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 สารที่ถูกสกัดจะออกมากับตัวทำละลาย 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 การสกัดในสภาวะของแข็ง (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 และเครื่องดื่ม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับธรรมชาติของปฏิกิริยาที่เกิดในระหว่างการเกิดพันธะ (เช่น พันธะไฮโดรเจน และพันธะไอออนิก ฯลฯ) ส่วนพันธะที่ไม่จำเพาะจะทำให้สารเกิดการแยกที่แตกต่างกันบนพอลิเมอร์ เนื่องจากถูกดูดซับที่พื้นผิวของพอลิเมอร์ไม่เท่ากัน ด้วยเหตุนี้เมื่อผ่านตัวอย่างที่ละลายน้ำเข้าไปใน MISPE แล้วล้างด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (เช่น อะซีโทไนไทรล์ ไดคลอโรมีเทน หรือเตตระไนโทรฟูแรน) ก็จะทำให้ MISPE จำหมู่ฟังก์ชันได้ และเลือกจับเฉพาะสารที่คล้ายตัวต้นแบบเดิม (Imprinted analyte) ส่วนที่ไม่ใช่ จะถูกตัวทำละลายอินทรีย์พาออกไป ขั้นตอนสุดท้ายคือการชะสารที่ต้องการออกจาก MIPs ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม [12]

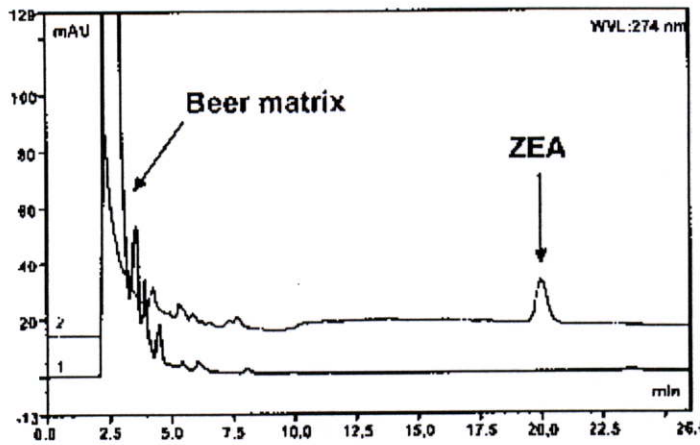
ส่วนเทคนิคอื่น ๆ เช่นการใช้เอนไซม์จับจำเพาะ (Specific enzymatic methods) และการทำ Immunoassays ที่ถึงแม้ว่าไม่ต้องทำตัวอย่างให้บริสุทธิ์ แต่ก็มีจุดอ่อนในเรื่องราคาสูง และไม่ค่อยเสถียร เมื่อเปรียบเทียบกับ MISPE แล้ว Immunoaffinity SPE จะมีคุณสมบัติความจำเพาะดีกว่า แต่การพัฒนาแอนติบอดี้ (Antibody) เฉพาะ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

2.1.3.1 การวิเคราะห์สารชนิดต่าง ๆ โดยการใช้เทคนิคการลอกแบบโมเลกุลของพอลิเมอร์ (Molecular Imprinted Polymers, MIPs)

Mycotoxins deoxynivalenol (DON) และ Zearalenone (ZEA) เป็นสาร secondary metabolites ซึ่งถูกผลิตมาจากเชื้อรา Fusarium สารทั้งสองตัวนี้มีความเป็นพิษสูง ก่อให้เกิดมะเร็ง ก่อการกลายพันธุ์ มีผลกระทบต่อการพัฒนาของตัวอ่อน (teratogenic) ซึ่งการปนเปื้อนของสารทั้งสองตัวในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรทั้งที่ผ่าน และไม่ผ่านกระบวนการแปรรูป จะเป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภคอาหาร และเครื่องดื่ม สาร DON และ ZEA เป็นสารที่สลายตัวยาก ยกตัวอย่าง เช่น ในกระบวนการต้มเบียร์เมล็ดที่มีการปนเปื้อนจะสามารถถ่ายสารดังกล่าวไปสู่น้ำเบียร์ได้ [13]

การวิเคราะห์โดยวิธีการมาตรฐาน ในการหาปริมาณของสารพิษที่มาจากเชื้อรา (Mycotoxins) จะต้องผ่านกระบวนการสกัดตัวอย่างที่ไม่ต่อเนื่อง และการทำตัวอย่างให้บริสุทธิ์ใช้เวลานานดังนั้น MIPs จึงถูกพัฒนาเป็น MISPE สำหรับ DON และ ZEA โดยใช้ Methyl methacrylic acid หรือ 4-vinylpyridine เป็นมอนอเมอร์หมู่ฟังก์ชัน และ Ethyleneglycol dimethacrylate เป็นพอลิเมอร์เชื่อมโยง

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



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

Condition;

Column : Kromasil 100 - 5 C18 250 mm 4.6 mmID

Mobile phase : H2O/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 นอกจากนี้สมบัติการเป็นตัวแอนติออกซิแดนซ์ที่แรงของ 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 จากไวน์แดงที่มีแมทริกซ์ซับซ้อนได้ ดังนั้นจึงชี้ให้เห็นว่า MISPE มีศักยภาพในด้านความจำเพาะ รวดเร็ว และเป็นวิธีที่ใช้เตรียมตัวอย่างที่ราคาไม่แพง

นอกจากนี้ MISPE ยังประสบความสำเร็จในการใช้กับสารปนเปื้อนในอาหาร และเครื่องดื่ม เช่น ยาฆ่าแมลง ยาปราบวัชพืช ฮอร์โมน และยาปฏิชีวนะ ดังตารางที่ 2.1

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

ปัจจุบันมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางเพื่อพัฒนาการใช้ MIPs เช่น การนำไปใช้เป็นชั้นบาง ๆ ชนิด Chemical recognition ในหัววัดไวแสง (Optical sensor) [20] สำหรับตรวจหายาฆ่าแมลง 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

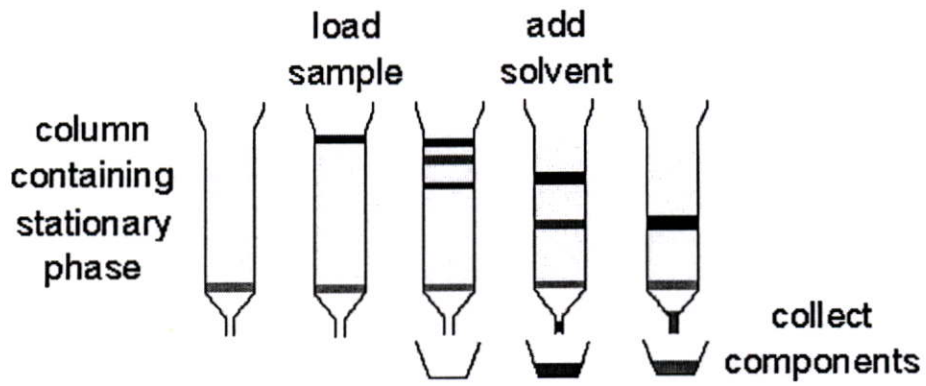
การผลิตที่ง่าย มีความจำเพาะสูงของ MISPE และความสำเร็จในการนำไปใช้งานที่หลากหลาย ยืนยันถึงศักยภาพของ MIPs สำหรับใช้ในการเตรียมตัวอย่าง นอกจากนี้ยังมีข้อดีอื่น ๆ เช่น ใช้กับตัวอย่าง และสารละลายเพียงเล็กน้อยสามารถนำไปใช้กับเครื่องระบบอัตโนมัติได้ อย่างไรก็ตามศักยภาพในการใช้งานที่หลากหลาย ยังเป็นสิ่งที่ท้าทายสำหรับ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

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

2.2 เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี (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, สารB เป็นสีเขียว, สารC เป็นสีน้ำเงิน พื้นที่ที่เป็นสีครีม แสดงถึงตัวทำละลายที่ใช้เป็นตัวชะล้าง [22]

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

$$X_m \rightleftharpoons X_s \qquad (2.4)$$

X_m คือ สารประกอบ X ที่อยู่ในเฟสเคลื่อนที่

X_s คือ สารประกอบ X ที่อยู่ในเฟสอยู่กับที่

ค่าสัมประสิทธิ์การกระจาย (Distribution coefficient) สำหรับสารประกอบที่สอดคล้องกับสมการที่ (2.4) คือ

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

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 แต่ค่อนข้างจะมีความไวสูงกับสารประกอบอินทรีย์เป็นส่วนใหญ่ สารที่ดูดกลืนคลื่นแสงอัลตราไวโอเลตส่วนมากจะเป็นพวกที่มี π-bonding electrons และพวกที่มี unshaired electron เช่น โอเลฟิน (Olefin) สารประกอบอโรมาติก สารประกอบที่มี C=O, C=S, -N=O-, N=N- อยู่ในโมเลกุล การดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่นหนึ่ง จะเป็นไปตามกฎของแลมเบิร์ดและเบียร์ (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) ที่ใช้เป็นแบบหลอดที่ทำด้วยปรอทที่ความดันต่ำ ซึ่งจะให้แสงที่เปล่งออกมาที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยทำให้เป็นลำแสงด้วยเลนส์ที่ทำด้วยควอทซ์ แล้วให้แสงนี้ผ่านเซลล์ของสารละลายมาตรฐาน และสารตัวอย่าง แสงที่ผ่านออกมาจะผ่านการกรองด้วยฟิลเตอร์ แล้วจึงจะผ่านไปยังโฟโตเซลล์(Photo cell) หรือโฟโตไดโอด 2 ตัว โดยทั่วไป Flow-

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

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 ดีเทคเตอร์ที่ใช้ฟิลเตอร์กรองแสง หรือใช้โมโนโครมาเตอร์แยกแสงให้ได้ความยาวคลื่นที่ต้องการ จะใช้แหล่งกำเนิดแสงเป็น D_2 lamp

1.2 Variable UV-VIS detector สามารถตรวจวัดค่าการดูดกลืนได้มากกว่าหนึ่งความยาวคลื่นในขณะการวิเคราะห์ ประกอบด้วย D_2 lamps หลอดทั้งสองนี้สามารถใช้วัดแสงได้ในช่วง 190-800 นาโนเมตร นอกจากนี้ยังมีโมโนโครมาเตอร์ เพื่อใช้สำหรับเลือกความยาวคลื่นตามที่ต้องการได้ ดังนั้นเครื่องดีเทคเตอร์นี้จึงมีประโยชน์มาก สามารถใช้ตรวจหาสารตัวอย่างได้ทั่วไป เพราะสามารถเลือกความยาวคลื่นที่สารตัวอย่างดูดกลืนแสงได้ดีที่สุด และเหมาะสมมากในการนำมาใช้กับ Gradient elution และตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ที่นำมาใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่จะไม่ดูดกลืนแสงยูวี เช่น Acetronitrile สามารถดูดกลืนแสงยูวีได้ที่ความยาวคลื่นต่ำกว่า 190 นาโนเมตร ดังนั้นจึงไม่มีข้อจำกัดที่จะเลือกตัวทำละลายมาใช้กับเครื่องยูวีดีเทคเตอร์ เครื่องยูวีดีเทคเตอร์นี้มีประโยชน์มากในการวิเคราะห์สารที่มีปริมาณน้อย ๆ ได้ โดยที่ตัวทำละลายหรือสารประกอบที่ปนอยู่ไม่ดูดกลืนแสงยูวี จึงไม่รบกวนการวิเคราะห์นี้

1.3. Photodiode array detector (PDA) ดีเทคเตอร์ชนิดนี้จัดว่าเป็น Solid state detector ซึ่งประกอบด้วยโฟโตไดโอดจำนวนมาก สามารถวัดแสงได้หลาย ๆ ความยาวคลื่นในขณะเดียวกัน ระบบทางเดินของแสงจะแตกต่างจากยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์โดยทั่วไป 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 ในการตรวจหาสารประกอบที่อยู่ในสารตัวอย่างว่าเป็นอะไรนั้นอาจนำไปเปรียบเทียบกับสารประกอบที่คิดว่าน่าจะเป็นไปได้ แล้วยังสามารถเปรียบเทียบสเปกตรัมที่เป็น 3 มิติ ซึ่งเป็นสเปกตรัมที่แสดงค่าการดูดกลืนคลื่นแสง ความยาวคลื่น และเวลา นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้จากสเปกตรัมยังใช้ตรวจหาสารเจือปนได้อีกด้วย [23]

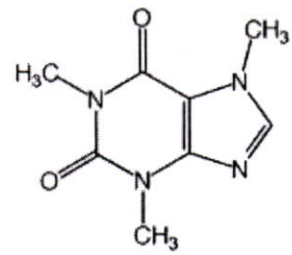
65466

2.3. สมบัติของสารประกอบ Xanthines

2.3.1. คาเฟอีน (Caffeine)

สูตรเคมีของคาเฟอีน: $C_8H_{10}O_2N_4$

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



รูปที่ 2.7 แสดงสูตรโครงสร้างของคาเฟอีน [24]

คาเฟอีนเป็นสารที่พบได้ใน ใบ เมล็ด หรือผลของพืชมากกว่า 60 ชนิด แต่ที่รู้จักกันดีก็คือในเมล็ดกาแฟ 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 และไรโบเฟลวินเล็กน้อย ใบชา 150 มิลลิกรัม มีคาเฟอีนประมาณ 20-90 มิลลิกรัมส่วนในเครื่องดื่มน้ำอัดลม 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 มีไรโบเฟลวิน และไนอะซินจำนวนน้อยมาก [25] คาเฟอีนเป็นสารที่มีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง หลังจากการกินหรือดื่ม คาเฟอีนจะถูกดูดซึมเข้าสู่เลือดและเนื้อเยื่อของร่างกาย ซึ่งคาเฟอีนจะไม่สะสมในร่างกาย ร่างกายจะขับคาเฟอีนออกไป โดยทั่วไปปริมาณคาเฟอีนในร่างกายจะลดลงครึ่งหนึ่ง ภายในเวลาประมาณ 4 ชั่งโมง ส่วนในสตรีมีครรภ์จะขจัดคาเฟอีนได้ช้ากว่า

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

ประสาทส่วนกลางทำให้รู้สึกตื่นตัวไม่ง่วงนอน กระตุ้นการหลั่งของกรดเกลือในกระเพาะอาหาร มีฤทธิ์เป็นยาขับปัสสาวะอย่างอ่อนเป็นผลให้มีการขับถ่ายแคลเซียมออกจากร่างกายเพิ่มขึ้นด้วย ในทางตรงกันข้าม ในคนที่ไวต่อฤทธิ์ของคาเฟอีนหรือได้รับคาเฟอีนมากเกินไป อาจทำให้มีอาการใจสั่น มือสั่น ปวดศีรษะ นอนไม่หลับกระสับกระส่าย และปวดท้อง

ผลเสียของกาแฟคืออาจทำให้นอนหลับยากขึ้น ซึ่งขึ้นกับแต่ละบุคคลเช่นกันเพราะบางคนดื่มกาแฟก่อนนอนก็ยังหลับได้สบาย แต่โดยทั่วไปจะทำให้นอนหลับยาก การบริโภคคาเฟอีนจะช่วยเพิ่มอัตราการเผาผลาญอาหารในร่างกาย (Metabolism) และการเผาผลาญไขมัน บางครั้งการลดน้ำหนักจะใช้คาเฟอีนด้วย คาเฟอีนช่วยการคลายตัวของกล้ามเนื้อของปอดและหลอดเลือด

สำหรับฤทธิ์ของคาเฟอีนที่มีผลต่อร่างกาย พบว่าค่าความปลอดภัยอยู่ที่ 100-300 มิลลิกรัม แต่ถ้าดื่ม กาแฟเป็นประจำและ ได้รับคาเฟอีนมากกว่า 300 มิลลิกรัมต่อวัน ก็มีโอกาสเพิ่มอัตราเสี่ยงต่อโรคหัวใจ โดยผลวิจัยบอกว่าเสี่ยงในอัตรา 2-8 เท่าของคนที่ ไม่ดื่มกาแฟ แต่หากวันหนึ่งๆ ดื่มกาแฟชงแก่ๆ 5-6 ถ้วยต่อวัน ก็อาจมีอาการติดกาแฟ (Caffeinism) ขึ้น โดยจะกระวนกระวาย ปวดศีรษะ และหัวใจเต้นแรงเร็วเพราะปริมาณคาเฟอีนจะเพิ่มสูง ขึ้นมากกว่า 600 มิลลิกรัม ส่วนคาเฟอีน ขนาดที่ทำให้เสียชีวิตมีรายงาน จาก องค์การอาหาร และยา (อย.) กระทรวงสาธารณะสุขของไทยว่า 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.

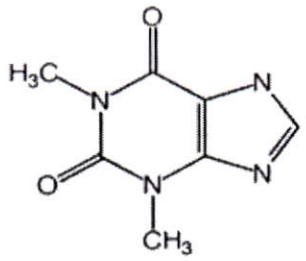
หมายเหตุ: 1 ออนซ์ = 437.5 grains หรือ 1/16 ปอนด์ (pound) หรือ 28.35 กรัม

1 grain = 0.0648 กรัม

2.3.2 ธีโอฟิลลิน (Theophylline)

สูตรเคมีของธีโอฟิลลิน: $C_7H_8N_4O_2$

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



รูปที่ 2.8 แสดงสูตรโครงสร้างของธีโอฟิลลิน [28]

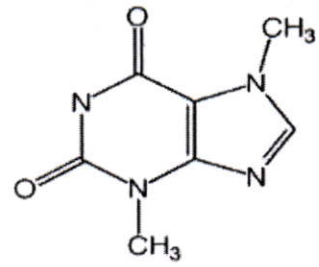
ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Pharmacology) พบว่า Theophylline มีฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อเรียบของหลอดลมและหลอดเลือดที่ปอด จึงมีฤทธิ์ในการขยายหลอดลมและขยายหลอดเลือดที่ปอด ทั้งนี้ยังมีฤทธิ์ในการเป็นยาขับปัสสาวะ ขยายหลอดเลือดหัวใจ กระตุ้นหัวใจและสมองส่วน cerebrum ซึ่งส่งผลให้มีการหดตัวของกล้ามเนื้อกะบังลมดีขึ้น ใช้แก้โรคหอบหืด (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 ธีโอโบรมีน (Theobromine)

สูตรเคมีของธีโอโบรมีน: $C_7H_8N_4O_2$

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



รูปที่ 2.9 แสดงสูตรโครงสร้างของธีโอฟิลลิน [29]

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Nishitani และคณะ [30] ได้ทำการตรวจวัดคาเทชิน (Cathechin) 8 ชนิด (Epigallocatechin gallate, Epigallocatechin, Epicatechin gallate, Epicatechin, Gallocatechin gallate, Gallocatechin, Catechin gallate, Catechin) คาเฟอีน และสารประกอบพวกฟีนอล 8 ชนิด (Epigallocatechin 3-0-(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-β-D-glucose) โดยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูง (HPLC) ที่มีตัวตรวจวัดยูวี คอลัมน์ที่ใช้คือ Octadecylsilyl (ODS) และใช้ระบบ Gradient elution (น้ำ-เมทานอล-ethyl acetate-phosphoric acid) สารประกอบทั้งหมดถูกแยกหมดภายใน 40 นาที ขีดจำกัดของการตรวจวัดในช่วง 1.4 - 3.5 นาโนกรัม สารตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์มีช่วงความเป็นเส้นตรงที่ดีจนถึง 1,500 นาโนกรัม และมีค่าความถูกต้องในการตรวจวัด 96-103% ก่อนหน้านี้ได้มีการตรวจวัดคาเฟอีน และคาเทชินชนิดต่าง ๆ ในใบชา [29] โดยใช้คอลัมน์ Octadecylsilyl และใช้ระบบ Isocratic elution (น้ำ-เมทานอล-phosphoric acid) แต่ใช้เวลาในการแยกสารทั้งหมดนาน

Grand และคณะ [31] ได้ทำการตรวจวัดคาเฟอีนในเครื่องดื่มอัดก๊าซยี่ห้อต่าง ๆ ในอเมริกา โดยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูง (HPLC) คอลัมน์ที่ใช้คือ คาร์บอน-18 เป็น reverse phase ขนาด 250 x 4.6 มิลลิเมตร (Phenomenex, Torrance, Calif) เฟสเคลื่อนที่ใช้อะซีโทรไนไทรล์ และน้ำปราศจากไอออน อัตราส่วน 20: 80 (v/v) ปรับค่าพีเอช (pH) ให้มีค่าเท่ากับ 3 อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1 มิลลิลิตร/ 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 สำหรับผลิตภัณฑ์ที่เป็นเครื่องดื่มประเภทน้ำอัดลมที่มีโคล่าผสม จากค่าที่ตรวจวัดได้เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ US Department of Agriculture สำหรับเครื่องดื่มแต่ละยี่ห้อพบว่า มีค่าที่คลาดเคลื่อนไป

Mena และคณะ [32] ได้ทำการตรวจวัด Perimicarb ในตัวอย่างน้ำโดยใช้พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลสำหรับการเตรียมตัวอย่างโดยการสกัดในสภาวะของแข็ง มีการสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลเพื่อใช้เป็นตัวดูดซับที่จำเพาะในการสกัดในสภาวะของแข็ง สำหรับการเตรียม Carbamate pirimicarb จากตัวอย่างน้ำ พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลเตรียมขึ้นโดยใช้ pirimicarb เป็นตัวต้นแบบ Methacrylic acid เป็นหมู่ฟังก์ชันมอนอเมอร์ และ Ethylene glycol dimethacrylate เป็นมอนอเมอร์เชื่อมโยง ตัวทำละลายที่ใช้คือ คลอโรฟอร์ม (Chloroform) การตรวจวัด Perimicarb ใช้ดิฟเฟอร์เรนเชียลพัลส์โวลแทมเมทรี (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) และนำมาใช้กับการสกัดในสภาวะของแข็งที่มีความจำเพาะต่อไซมาซีน (Simazine)ซึ่งเป็นหนึ่งในยาปราบศัตรูพืชในกลุ่มของไทรเอซีน ที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำ กรรมวิธีดังกล่าวนี้มีการใช้สภาวะย้อนกลับ (Reversed-phase) ในการสังเคราะห์ตัวรับ (Receptor) ตามกระบวนการแยกแบบสัมภรรคภาพ (Affinity separation) โดยมีพื้นฐานอยู่บนพันธะไฮโดรเจน ซึ่งแสดงความจำเพาะกับไซมาซีน และชะสารประกอบอื่น ๆ ที่ไม่ต้องการออกมา การสกัดในสภาวะของแข็งมีผล (Yield) เท่ากับ 56 เท่าของความเข้มข้นของสารละลายไซมาซีน และมีค่า Recovery 91%

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

บทที่ 3
การดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 สารเคมี

1. Caffeine 99% ($C_8H_{10}O_2N_4.H_2O$) 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 I TGA HT ยี่ห้อ Perkin-Elmer Pyris 1 ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล (Molecular Imprint Polymer)

การเตรียมพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลชนิด P_1, P_2และ 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 Acetronitrile ลงไป 2 มิลลิลิตร เติม Methyl methacrylic acid (MMA) 170 ไมโครลิตร (2 มิลลิโมล) และ Ethylene glycol dimethacrylate 1.13 มิลลิลิตร (6 มิลลิโมล) นำไปไล่อากาศออกโดยผ่านก๊าซไนโตรเจนเป็นเวลา 2 นาที ปิดฝาขวดรูปกรวย และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสในอ่างน้ำ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง พบว่าเกิดพอลิเมอร์ที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวเต็มขวดรูปกรวย จากนั้นนำพอลิเมอร์ออกมาบดให้มีขนาดเล็กลงด้วยโกร่งบดสาร ทำการสกัดเอามอนอเมอร์ ตัวต้นแบบ และสารที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันออกไปโดยการสกัดแบบซอคเลต (Soxhlet extraction) ใช้ตัวทำละลายผสมคือ เมทานอล-กรดแอซิติก อัตราส่วน 9: 1 โดยปริมาตร ทำการสกัดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำพอลิเมอร์ที่ผ่านการสกัดมาบดเพื่อลดขนาดอนุภาคอีกครั้ง แล้วคัดแยกขนาดโดยใช้น้ำกรองผ่านที่คัดแยกขนาดอนุภาค 90 ไมโครเมตร อนุภาคที่ไม่ผ่านที่คัดแยกให้นำมาบดใหม่จนกระทั่งอนุภาคทั้งหมดสามารถผ่านที่คัดแยกได้ 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 cm^{-1}

3.2.2.2 การหาความคงทนต่อความร้อน และการสลายตัวของพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล

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

3.2.2.3 การหาขนาดอนุภาคของพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล

นำพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้มาหาขนาดอนุภาคโดยเฉลี่ยโดยทำการตรวจวัดด้วยเครื่อง Mastersizer X โดยใช้น้ำเป็นสารช่วยกระจายตัว วัดขนาดอนุภาคของพอลิเมอร์ลอกแบบ

3.2.2.4 การตรวจดูพื้นผิวด้วย SEM

1. นำพอลิเมอร์ที่ได้ทั้งหมดมา Cross section ภายใต้ไนโตรเจนเหลว แล้วนำมาวางลงบนฐาน (Stub) จากนั้นทำการเคลือบผิวด้วยทอง โดยใช้ความดันช่วงแรก $2x10^{-2}$ มิลลิบาร์ เป็นเวลา 50 นาที ช่วงที่สองใช้ความดัน 10^{-1} มิลลิบาร์ เพื่อเคลือบทองเป็นเวลา 30 วินาที กระแสไฟที่ใช้ 18 มิลลิแอมป์ โดยใช้ก๊าซอาร์กอน 99% จากนั้นนำพอลิเมอร์ที่ได้ไปวางลงบนฐาน (State) ของเครื่อง SEM เพื่อดูลักษณะพื้นผิว และลักษณะอนุภาคที่บดเป็นผงละเอียดของพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล

2. ทำการ Spark vacuum เครื่อง SEM เป็นเวลา 15 นาที รอจนส่วนที่เรียกว่า Chamber มีความดัน 10^{-1} มิลลิบาร์ และส่วนของคอลัมน์มีความดัน $1.2x10^{-4}$ มิลลิบาร์

3. เปิดเครื่องเพื่อดูภาพพอลิเมอร์ที่ทำการตรวจวัด

3.2.3 การเตรียมการสกัดในสภาวะของแข็งโดยใช้พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล (MIP-SPE)

นำ SPE catridge ที่ใช้แล้วมาล้าง และทำให้แห้ง นำพอลิเมอร์ลอกแบบที่สังเคราะห์ได้จำนวน 200 มิลลิกรัม มาทำการบรรจุลงไปใน Catridge โดยบรรจุแบบแห้ง (Dry pack) และนำ Frit บรรจุลงไปทั้งด้านบน 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 ธีโอฟิลลิน (Theophylline) เข้มข้น 0.25, 0.5, 1, 5, 20, 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

1. ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานธีโอฟิลลินเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรก่อนโดยชั่งธีโอฟิลลิน 2.50 กรัม ละลายด้วยเมทานอล และปรับปริมาตรจนมีปริมาตร 25 มิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานธีโอฟิลลินเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยนำสารละลายมาตรฐานในข้อ 1 มา 1 มิลลิลิตร เจือจางด้วยเมทานอล จนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานธีโอฟิลลินเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำสารละลายมาตรฐานธีโอฟิลลินที่ได้นี้ไปเจือจางต่อด้วยเมทานอลจนมีความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1, 10, 20, 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

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

1. ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานธีโอโบรมีนเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรก่อนโดยชั่งธีโอโบรมีน 2.5 กรัม ละลายด้วยเมทานอล และปรับปริมาตรจนมีปริมาตร 25 มิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานธีโอโบรมีนเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยนำสารละลายมาตรฐานในข้อ 1 มา 1 มิลลิลิตร เจือจางด้วยเมทานอล จนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานธีโอโบรมีนเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำสารละลายมาตรฐานธีโอโบรมีนที่ได้นี้ไปเจือจางต่อด้วยเมทานอลจนมีความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1, 10, 20, 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรทำการตรวจวัดสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิดคือ คาเฟอีน (Caffeine) ธีโอฟิลลิน (Theophylline) และธีโอโบรมีน (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 CH_3COONH_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 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารมาตรฐานด้วยพอลิเมอร์ลอกแบบ

ทดสอบสภาวะของสารละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารละลายมาตรฐานคาเฟอีนด้วยพอลิเมอร์ลอกแบบที่เตรียมไว้ 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 CH_3COONH_4-NH_3(aq) pH 9) จำนวน 1 มิลลิลิตร เข้าไปก่อน เก็บสารละลายที่ได้มาทำการตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC เพื่อทำการตรวจวัดคาเฟอีน จากนั้นทำการล้างครั้งแรกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (0.05 โมลาร์ CH_3COONH_4-NH_3(aq) pH 9) จำนวน 1 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ได้มาทำการตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC เพื่อทำการตรวจวัดคาเฟอีน ทำการล้างครั้งที่สองด้วยสารละลายผสม ACN-TEA 1% (ACN คือAcetonitrile, TEA คือ Triethylamine)จำนวน 1 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ได้มาทำการตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC เพื่อทำการตรวจวัดคาเฟอีน และทำการชะด้วยสารละลายผสม ACN- CH_3COOH 1% จำนวน 1 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ได้มาทำการตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC เพื่อทำการตรวจวัดคาเฟอีนที่ถูกชะออกมา ทำการทดลองซ้ำ 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 ธีโอโบรมีน และธีโอฟิลลีน) ด้วยพอลิเมอร์ลอกแบบชนิด P_2 และ P_3

นำพอลิเมอร์ลอกแบบชนิด P2 และ P3 มาศึกษาความเลือกจำเพาะต่อคาเฟอีน โดยนำสารละลายมาตรฐานคาเฟอีน ธีโอโบรมีน และธีโอฟิลลีน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร มาผสมกัน และปริมาตรในการ loading สำหรับ P2 คือ 1,000 ไมโครลิตร จากนั้นทำการทดลองตามที่กล่าวไว้ข้างต้น

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาคุณลักษณะของพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล

ศึกษาคุณลักษณะของพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลที่ได้จากการสังเคราะห์จากปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยใช้คาเฟอีนเป็นตัวต้นแบบ, กรดเมทิลเมทาไครลิค (Methyl methacrylic acid, MAA) เป็นฟังก์ชันนัล มอโนเมอร์ ส่วนพอลิเมอร์แบบเชื่อมโยงใช้เอทิลีน ไกลคอล ไดเมทาไครเลต (EDMA) และเบนโซอิล เพอร์ออกไซด์ (BPO) เป็นตัวริเริ่มปฏิกิริยา พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลที่สังเคราะห์ได้นั้นนำมาใช้เป็น Solid-phase extraction (SPE) sorbent สำหรับการเตรียมตัวอย่างคาเฟอีน เมื่อนำไปทำการวิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชันโดยใช้ FT-IR ผลที่ได้ดังรูป 4.1 และ 4.2 การดูดกลืนแสงอินฟาเรดที่สำคัญใน FT-IR สเปกตรัมของพอลิเมอร์ลอกแบบ 4 ชนิด คือ P, P_1, P_2 และ P_3 คาเฟอีน (Caffeine) ทีโอฟิลลิน (Theophylline) และทีโอโบรมีน (Theo bromine) แสดงในรูปในภาคผนวก จ และตาราง 4.1

ตารางที่ 4.1 เปรียบเทียบ FT-IR สเปกตรัมที่สำคัญ ๆ ของพอลิเมอร์ลอกแบบ 4 ชนิด คือ P, P_1, P_2 และ P_3 คาเฟอีน (Caffeine) ทีโอฟิลลิน (Theophylline) และทีโอโบรมีน (Theobromine)

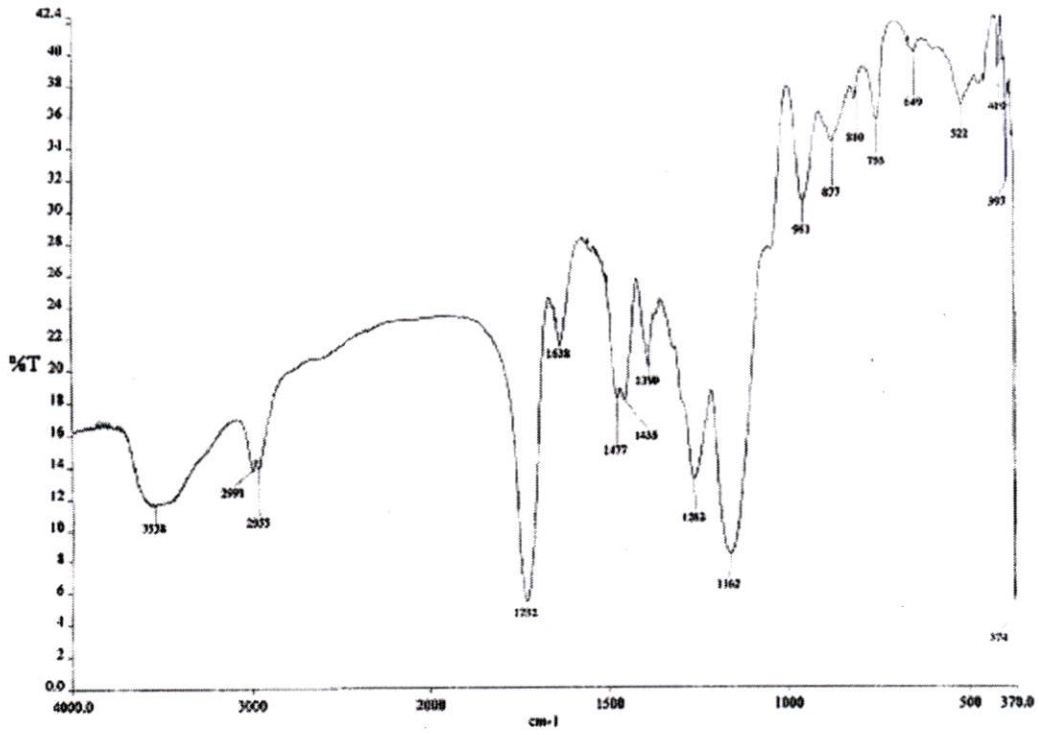
P (cm^{-1})	P_1 (cm^{-1})	P_2 (cm^{-1})	P_3 (cm^{-1})	คาเฟอีน (Caffeine) (cm^{-1})	ธีโอฟิลลิน (Theophylline) (cm^{-1})	ธีโอโบรมีน (Theobromine) (cm^{-1})
1731 (-C=O)	1732 (C=O)	1731 (C=O)	1731 (C=O)	1550-1666 (C=C, C=N) ใน purine ring	1550-1666 (C=C, C=N) ใน purine ring	1550-1666 (C=C, C=N) ใน purine ring
2955 ($-CH_3$)	2955 ($-CH_3$)	2947 ($-CH_3$)	2955 ($-CH_3$)	1698, 1655 (double C=O)	1718, 1668 (double C=O)	1684 (double C=O)
2991 ($-CH_2$)	2991 ($-CH_2$)	2992 ($-CH_2$)	2991 ($-CH_2$)	2954($-CH_3$)	2611-3121 (-CH)	2827-3194 (-CH)
3526 (-OH) carboxylic	3538 (-OH) carboxylic	3546 (-OH) carboxylic	3526 (-OH) carboxylic	3112(-CH)	3343 ($-R_2$-NH-)	3527 ($-R_2$-NH-)

ที่ซึ่ง P คือ พอลิเมอร์ควบคุม

P_1 คือ พอลิเมอร์ลอกแบบที่ใช้คาเฟอีน 0.25 มิลลิโมล เป็นตัวต้นแบบ

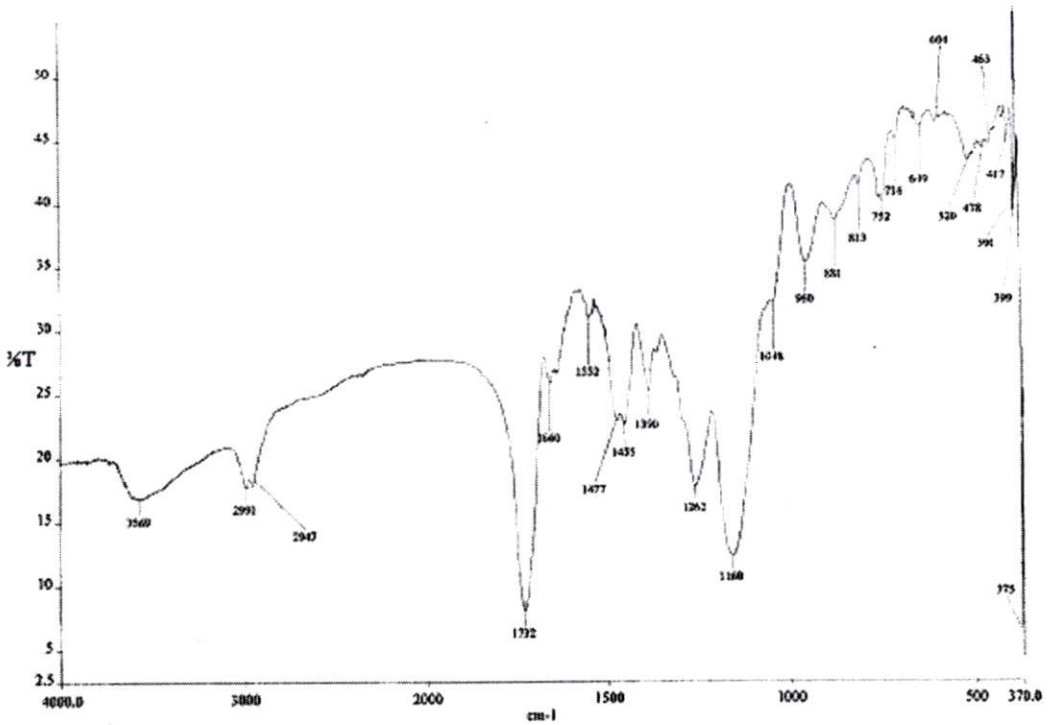
P_2 คือ พอลิเมอร์ลอกแบบที่ใช้คาเฟอีน 0.50 มิลลิโมล เป็นตัวต้นแบบ

P_3 คือ พอลิเมอร์ลอกแบบที่ใช้คาเฟอีน 0.75 มิลลิโมล เป็นตัวต้นแบบ

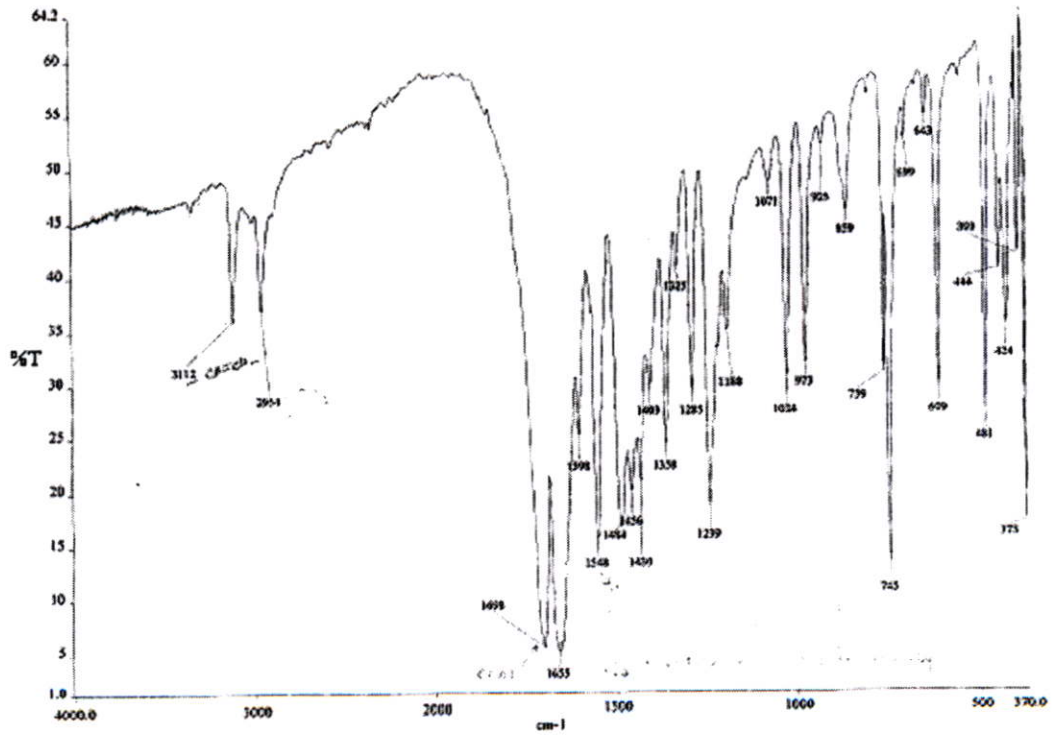


รูปที่ 4.1ก FT-IR สเปกตรัม ของพอลิเมอร์ลอกแบบที่สกัดเอาคาเฟอีนซึ่งใช้เป็นตัวต้นแบบออกแล้ว

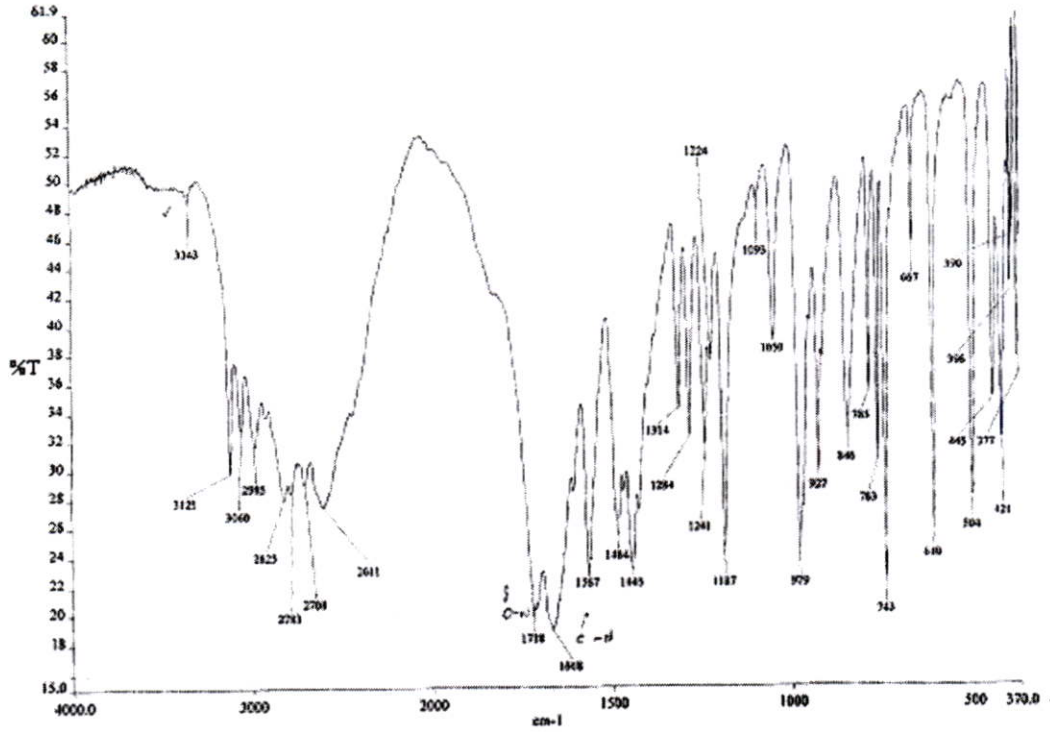
จากรูป 4.1ก เป็นการแสดง FT-IR สเปกตรัมของพอลิเมอร์ลอกแบบปรากฏพีกเกิดขึ้นที่ตำแหน่ง 1732 cm-1, 2955 cm-1, 2991 cm-1และ 3526 cm-1 ซึ่งเป็นพีกที่เกิดจากการ Stretching ของหมู่ –C=O, -CH_3, -CH_2 และ OH ตามลำดับ ซึ่งทุก ๆ สเปกตรัมของพอลิเมอร์ลอกแบบชนิดต่าง ๆ ที่ทำการสังเคราะห์ขึ้นจะมีลักษณะคล้ายกัน จากรูปที่ 4.1ข เป็นการแสดง FT-IR สเปกตรัมของพอลิเมอร์ลอกแบบที่ที่ยังไม่สกัดเอาคาเฟอีนซึ่งใช้เป็นตัวต้นแบบออก ซึ่งมีลักษณะของสเปกตรัม ที่ไม่แตกต่างกันมากนักดังนั้นเราจึงทำการทดสอบคุณสมบัติของพอลิเมอร์ลอกแบบด้วยเทคนิคการวิเคราะห์แบบอื่น ๆ ต่อไป



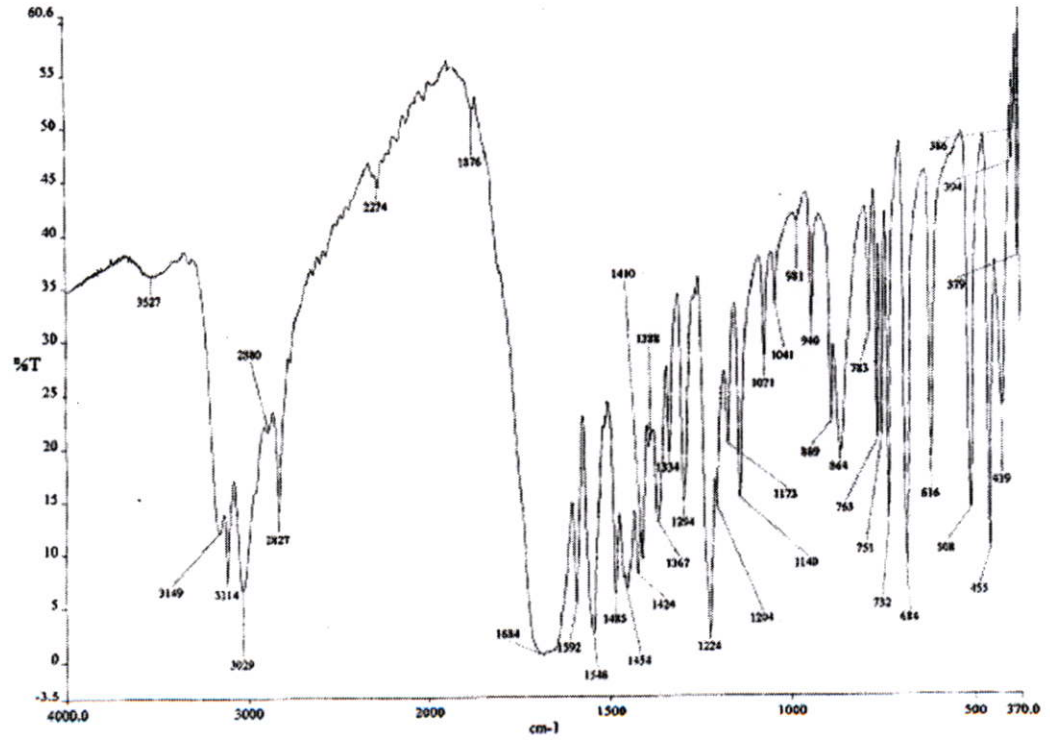
รูปที่ 4.1 ข FT-IR สเปกตรัม ของพอลิเมอร์ลอกแบบที่ยังไม่สกัดเอาคาเฟอีนซึ่งใช้เป็นตัวต้นแบบออก



รูปที่ 4.1ค FT-IR สเปกตรัม ของคาเฟอีน



รูปที่ 4.1ง FT-IR สเปกตรัม ของธีโอฟิลลิน



รูปที่ 4.1จ FT-IR สเปกตรัม ของธีโอโบรมีน

ในรูป 4.1ค เป็นการแสดง FT-IR สเปกตรัมของคาเฟอีน ปรากฏพีกเกิดขึ้นที่ตำแหน่ง 1550 - 1666 cm^{-1}, 1698 หรือ 1655 cm^{-1}, 2594 cm^{-1} และ 3112 cm^{-1} ซึ่งเป็นพีกที่เกิดจากการ Stretching ของหมู่ C=C หรือ C=N, C=O, $-CH_3$ และ –CH ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าพีกที่ได้จะมีลักษณะเหมือนกับของธีโอฟิลลิน และธีโอโบรมีน ดังรูปที่ 4.1ง และ4.1จ แต่ต่างกันตรงตำแหน่ง 3587 และ 3527 cm^{-1} ตามลำดับ ซึ่งเกิดจากการ Stretching ของหมู่ $-R_2$-NH

จากการเตรียมพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลแล้วนำไปหาขนาดอนุภาคโดยเครื่อง MASTERSIZER X พบว่ามีขนาดอนุภาคดังแสดงในตารางที่ 4.2 จากตารางนี้พบว่าขนาดอนุภาคของพอลิเมอร์ลอกแบบทั้ง 4 ชนิดมีขนาดใกล้เคียงกัน คืออยู่ในช่วง 40-50 μm.

ตารางที่ 4.2 แสดงขนาดอนุภาคของพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล

ชื่อสาร	ค่าเฉลี่ยของขนาดอนุภาค (d, μm.)	พื้นที่ผิว (Specific Surface Area, m^2/gm)	ขนาดของอนุภาคส่วนใหญ่ (Mode, μm.)
P E,S	37.36	0.3963	47.46
P_1 E,S	38.93	0.3710	47.25
P_2 E,S	49.97	0.2969	48.93
P_3 E,S	42.63	0.3501	52.58

ผลจากการวิเคราะห์ทดสอบความคงทนต่อความร้อน และการสลายตัวด้วย TGA ได้ผลดังตารางที่ 4.3 จากตารางนี้ พบว่าพอลิเมอร์ลอกแบบที่สังเคราะห์ได้ทั้งหมดนั้นมีความคงทนต่อความร้อนได้ถึงอุณหภูมิประมาณ 200 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการทดสอบความคงทนต่อความร้อน และการสลายตัวด้วย TGA

ชื่อสาร	อุณหภูมิที่สารเริ่มสลายตัว, Onset X (°C)	ปริมาณของสารที่เหลือหลังจากเริ่มสลายตัวคิดเป็นเปอร์เซ็นต์, Onset Y (%)	อุณหภูมิที่พอลิเมอร์เริ่มหลอมละลาย (Event mark, °C)
P S	225.969 377.631	93.1555 7.3691	234.997 380.162
P E, S	277.347	86.4288	295.466

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

P_1 S	233.704 295.016	90.0608 21.8055	244.966 299.232
P_1 E, S	215.114 281.075	95.1027 56.0647	223.743 284.058
P_2 S	241.226 443.577	93.4488 16.8344	261.888 332.518
P_2 E, S	212.942 301.729	90.7103 14.3823	221.981 308.806
P_3 S	232.300 397.342	91.8203 15.1446	243.136 400.115
P_3 E, S	250.946	96.976	274.904

หมายเหตุ P S คือ พอลิเมอร์ควบคุมที่ไม่ได้สกัดเอาสารปนเปื้อนออกแต่ผ่านการคัดแยกขนาดแล้ว

P E, S คือ พอลิเมอร์ควบคุมที่ผ่านการสกัดเอาสารปนเปื้อนออก และผ่านการคัดแยกขนาดแล้ว

P_1 S คือ พอลิเมอร์ลอกแบบที่ไม่ได้สกัดเอาคาเฟอีน (ตัวต้นแบบ) ออก แต่ผ่านการคัดแยกขนาดแล้ว

P_1 E, S คือ พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลที่ผ่านการสกัดเอาคาเฟอีน (ตัวต้นแบบ) ออก และผ่านการคัดแยกขนาดแล้ว

P_2 S คือ พอลิเมอร์ลอกแบบที่ไม่ได้สกัดเอาคาเฟอีน (ตัวต้นแบบ) ออก แต่ผ่านการคัดแยกขนาดแล้ว

P_2 E, S คือ พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลที่ผ่านการสกัดเอาคาเฟอีน (ตัวต้นแบบ) ออกแล้ว และผ่านการคัดแยกขนาดแล้ว

P_3 S คือ พอลิเมอร์ลอกแบบที่ไม่ได้สกัดเอาคาเฟอีน (ตัวต้นแบบ) ออก แต่ผ่านการคัดแยกขนาดแล้ว

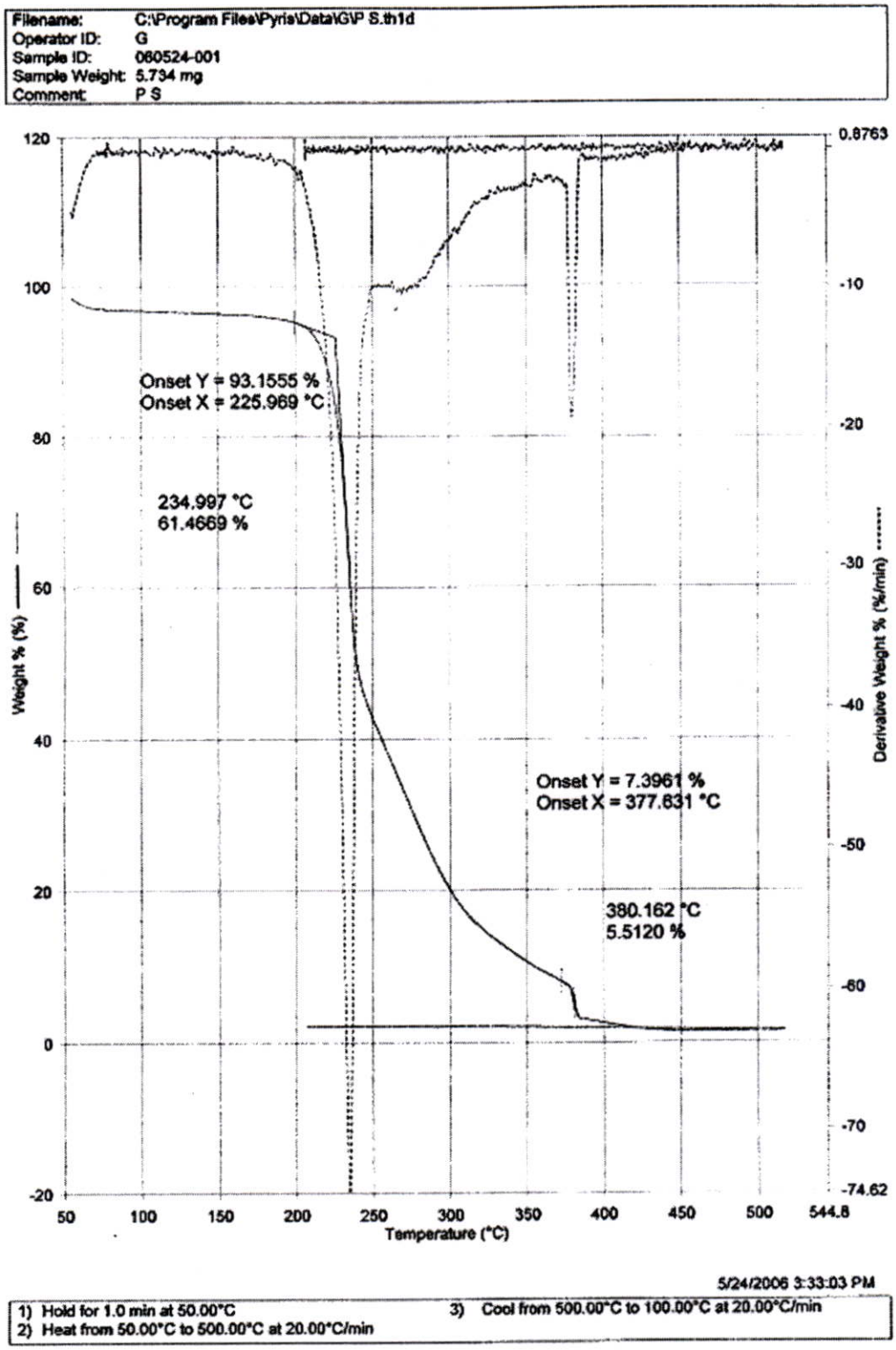
P_3 E, S คือ พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลที่ผ่านการสกัดเอา คาเฟอีน (ตัวต้นแบบ) ออก และผ่านการคัดแยกขนาดแล้ว

ในรูปที่ 4.2ก เป็นเทอร์โมแกรมของสาร P S ซึ่งพบว่าลักษณะเทอร์โมแกรมที่ได้เริ่มมีแนวโน้มลดลงที่อุณหภูมิ 225.969 °C น้ำหนักของพอลิเมอร์ลดลงประมาณ 7% โดยที่อุณหภูมิ 234.997 °C พอลิเมอร์เริ่มหลอมละลาย น้ำหนักลดลงประมาณ 38.5% และที่อุณหภูมิ 377.631 °C มี

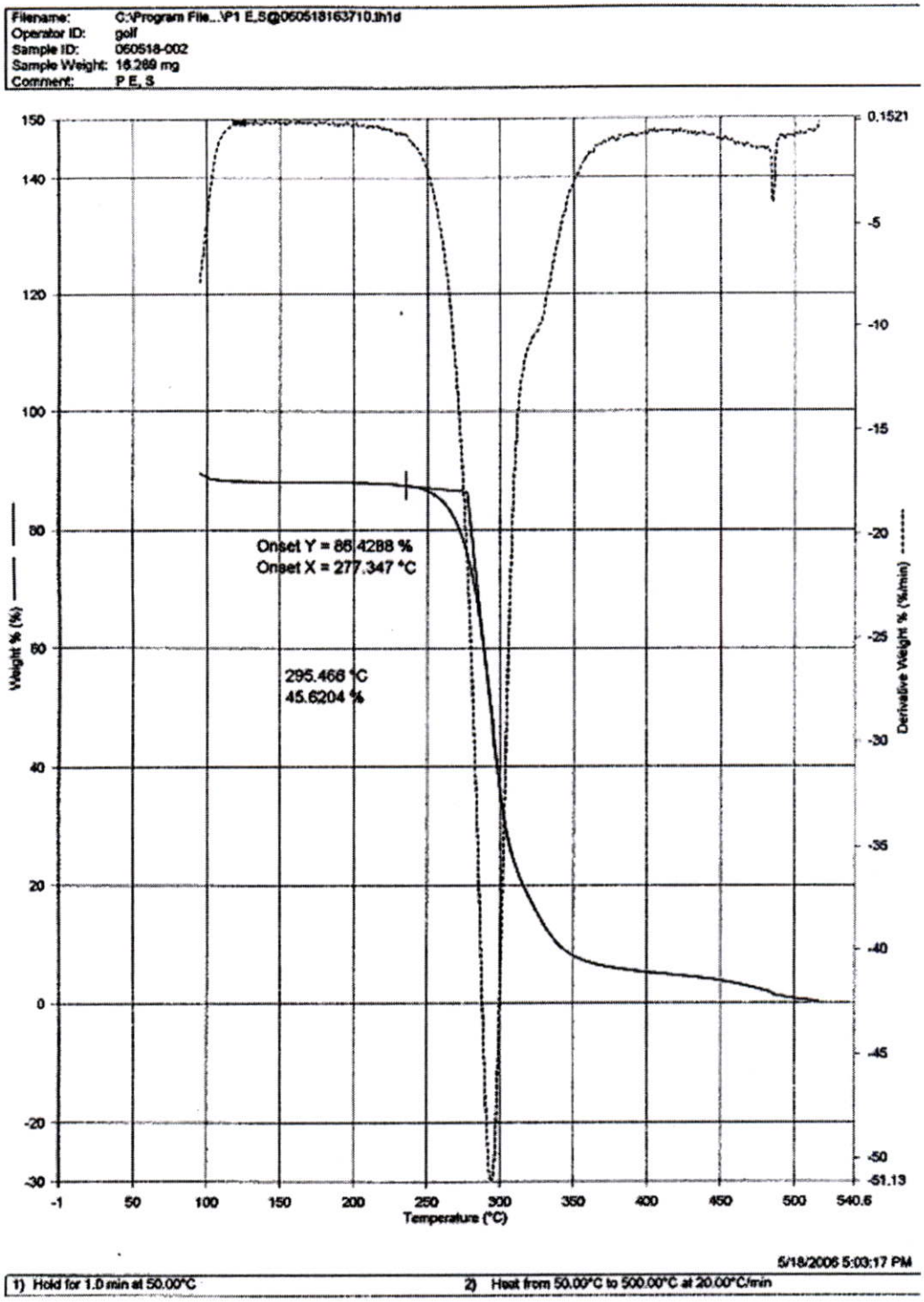
องค์ประกอบในพอลิเมอร์อีกชนิดเริ่มสลายตัวน้ำหนักของพอลิเมอร์ลดลงประมาณ 92.6% โดยที่อุณหภูมิ 380.162 °C เริ่มหลอมละลาย เหลือปริมาณของพอลิเมอร์อยู่ 5.512% และสลายตัวหมดที่อุณหภูมิประมาณ 450 °C

สำหรับรูปที่ 4.2 ข ซึ่งเป็นของสาร P E, S เทอร์โมแกรมที่ได้เริ่มมีแนวโน้มลดลงที่อุณหภูมิ 277.347 °C น้ำหนักลดลงประมาณ 13.6% โดยที่อุณหภูมิ 295.466 °C พอลิเมอร์เริ่มหลอมละลาย น้ำหนักลดลงประมาณ 54% พอลิเมอร์สลายตัวหมดที่อุณหภูมิประมาณ 500 °C จากเทอร์โมแกรมจะเห็นได้ว่าพอลิเมอร์ที่ผ่านการสกัดเอาสารปนเปื้อนต่างๆ จากการทำปฏิกิริยาออกแล้วจะไม่มีสารอื่น ๆ เจือปนทำให้ไม่พบการสลายตัวของสารอีกชนิดในเทอร์โมแกรม

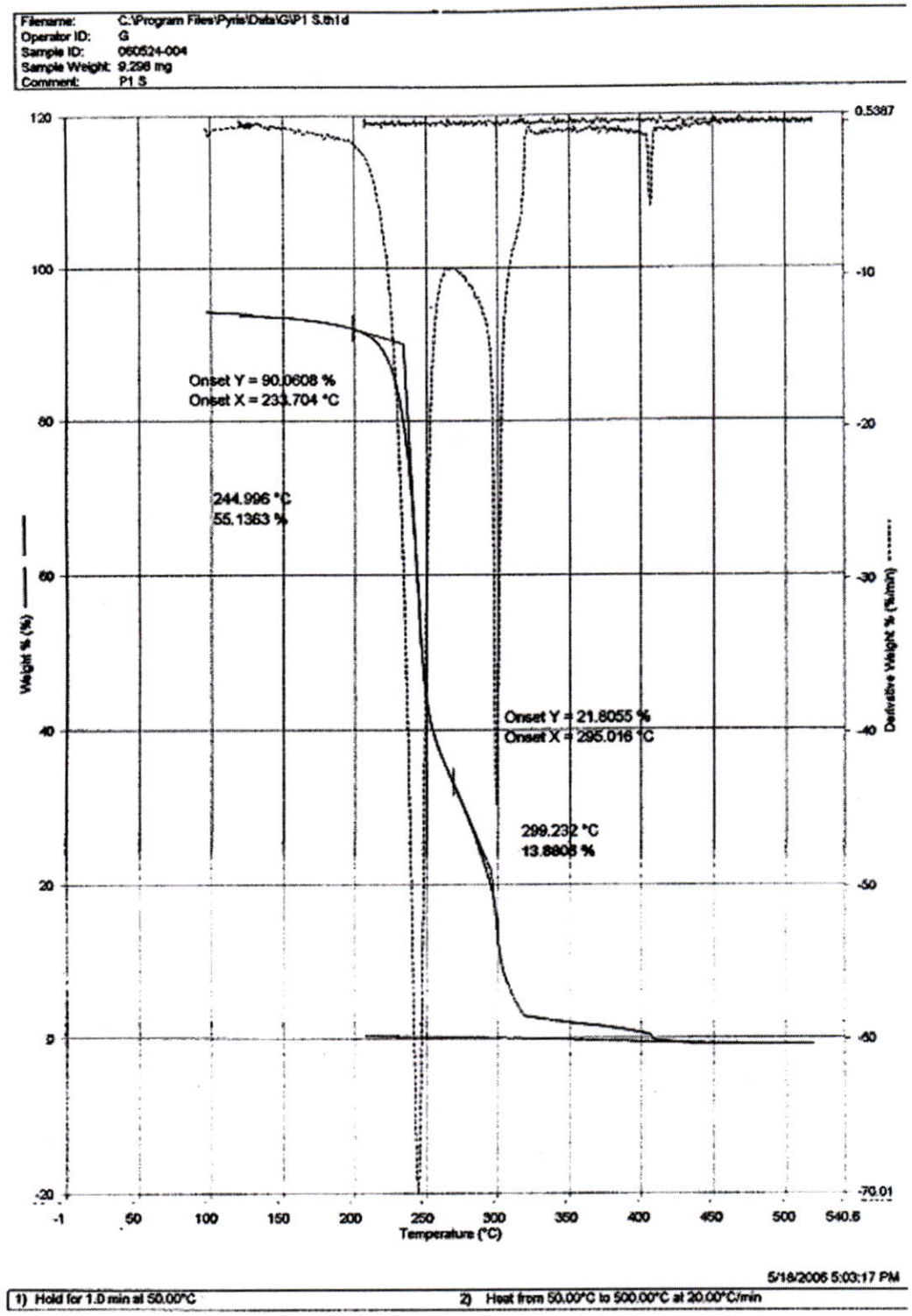
จากรูปที่ 4.2ค เป็นเทอร์โมแกรมของสาร P_1 S พบว่าได้เริ่มมีแนวโน้มลดลงที่อุณหภูมิ 233.704 °C น้ำหนักลดลงประมาณ 10% โดยที่อุณหภูมิ 244.996 °C พอลิเมอร์เริ่มหลอมละลาย น้ำหนักลดลงประมาณ 45% และที่อุณหภูมิ 295.016 °C มีองค์ประกอบในพอลิเมอร์อีกชนิดเริ่มสลายตัวน้ำหนักของพอลิเมอร์ลดลงประมาณ 78.2% โดยที่อุณหภูมิ 299.232 °C เริ่มหลอมละลาย เหลือปริมาณของพอลิเมอร์อยู่ 13.8906% และสลายตัวหมดที่อุณหภูมิประมาณ 450 °C



รูปที่ 4.2ก แสดงเทอร์โมแกรมของ P S คือ พอลิเมอร์ควบคุมที่ไม่ได้สกัดเอาสารปนเปื้อนออก แต่ผ่านการคัดแยกขนาดแล้ว น้ำหนัก 5.734 มิลลิกรัม เผาที่อุณหภูมิ 50-500 °C , 20 °C/นาที ภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจนที่ 20 psi



รูปที่ 4.2ข แสดงเทอร์โมแกรมของ P E, S คือ พอลิเมอร์ควบคุมที่ผ่านการสกัดเอาสารปนเปื้อนออก และผ่านการคัดแยกขนาดแล้ว น้ำหนัก 16.289 มิลลิกรัม เผาที่อุณหภูมิ 50-500 °C , 20 °C/นาที ภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจนที่ 20 psi



รูปที่ 4.2ค แสดงเทอร์โมแกรมของ P_1 S คือ พอลิเมอร์ลอกแบบที่ไม่ได้สกัดเอาคาเฟอีน (ตัวต้นแบบ) ออก แต่ผ่านการคัดแยกขนาดแล้ว น้ำหนัก 9.296 มิลลิกรัม เผาที่อุณหภูมิ 50-500 °C , 20 °C/นาที ภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจนที่ 20 psi

รูปที่ 4.2ง เป็นเทอร์โมแกรมของสาร P_1 E, S จากข้อมูลพบว่าได้เริ่มมีแนวโน้มลดลงที่อุณหภูมิ 215.114 °C น้ำหนักลดลงประมาณ 5% โดยที่อุณหภูมิ 223.743 °C พอลิเมอร์เริ่มหลอมละลาย น้ำหนักลดลงประมาณ 22% และที่อุณหภูมิ 281.075 °C มีองค์ประกอบในพอลิเมอร์อีกชนิดเริ่มสลายตัวน้ำหนักของพอลิเมอร์ลดลงประมาณ 44% โดยที่อุณหภูมิ 284.058 °C เริ่มหลอมละลายเหลือปริมาณของพอลิเมอร์อยู่ 54.5332% และสลายตัวหมดที่อุณหภูมิประมาณ 450 °C

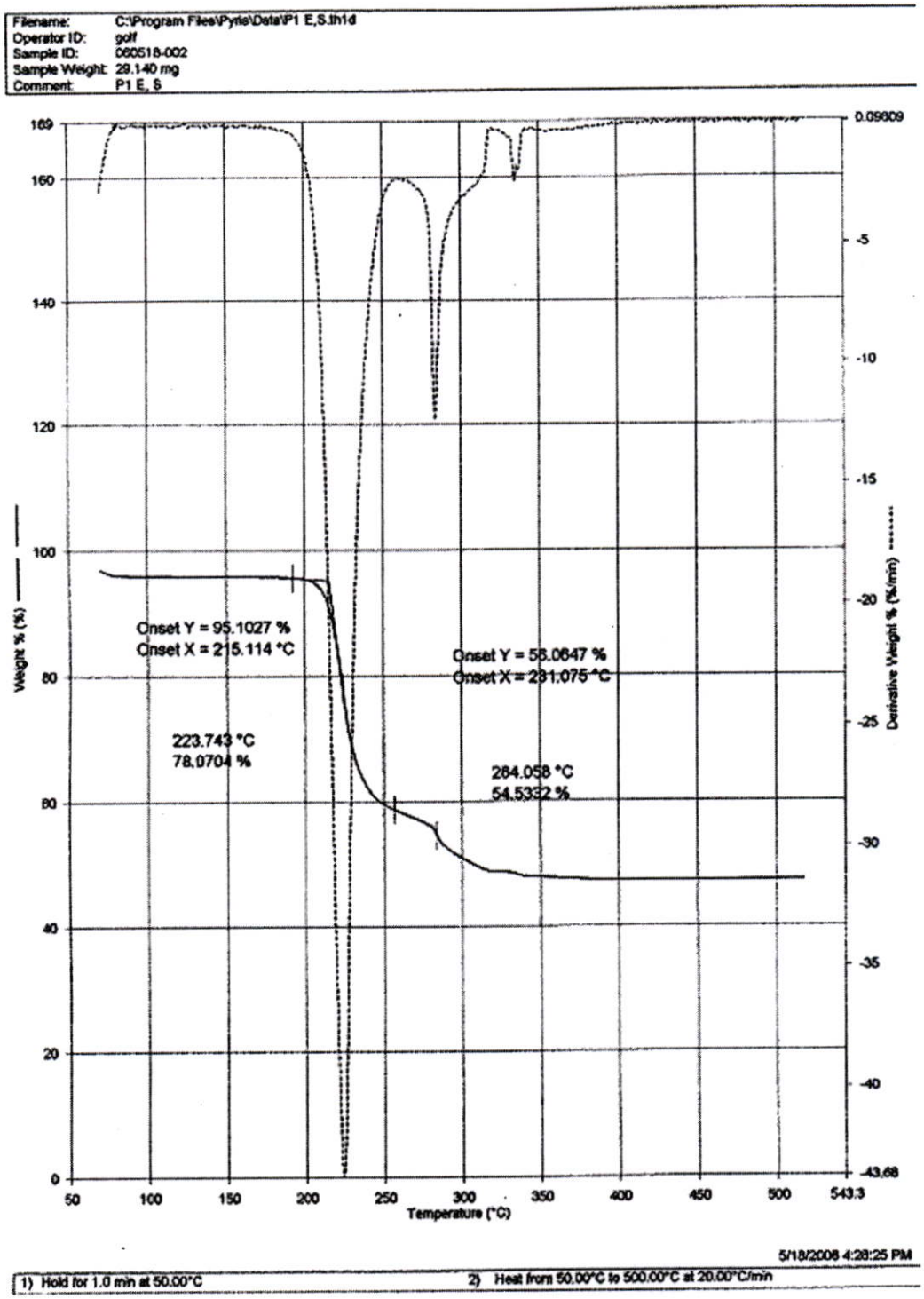
จากรูปที่ 4.2จ เป็นเทอร์โมแกรมของสาร P_2 S จากกราฟเริ่มมีแนวโน้มลดลงที่อุณหภูมิ 241.226 °C น้ำหนักลดลงประมาณ 7% โดยที่อุณหภูมิ 261.888 °C พอลิเมอร์เริ่มหลอมละลาย น้ำหนักลดลงประมาณ 36% และที่อุณหภูมิ 443.577 °C มีองค์ประกอบในพอลิเมอร์อีกชนิดเริ่มสลายตัวน้ำหนักของพอลิเมอร์ลดลงประมาณ 83.2% โดยที่อุณหภูมิ 332.518 °C เริ่มหลอมละลายเหลือปริมาณของพอลิเมอร์อยู่ 21.8255% และสลายตัวหมดที่อุณหภูมิประมาณ 500 °C

จากรูปที่ 4.2ฉ เทอร์โมแกรมรมของสาร P_2 E, S ที่ได้เริ่มมีแนวโน้มลดลงที่อุณหภูมิ 212.942 °C น้ำหนักลดลงประมาณ 10% โดยที่อุณหภูมิ 221.981 °C พอลิเมอร์เริ่มหลอมละลาย น้ำหนักลดลงประมาณ 50% และที่อุณหภูมิ 301.729 °C มีองค์ประกอบในพอลิเมอร์อีกชนิดเริ่มสลายตัวน้ำหนักของพอลิเมอร์ลดลงประมาณ 86% โดยที่อุณหภูมิ 308.806 °C เริ่มหลอมละลายเหลือปริมาณของพอลิเมอร์อยู่ 10.1352% และสลายตัวหมดที่อุณหภูมิประมาณ 900 °C

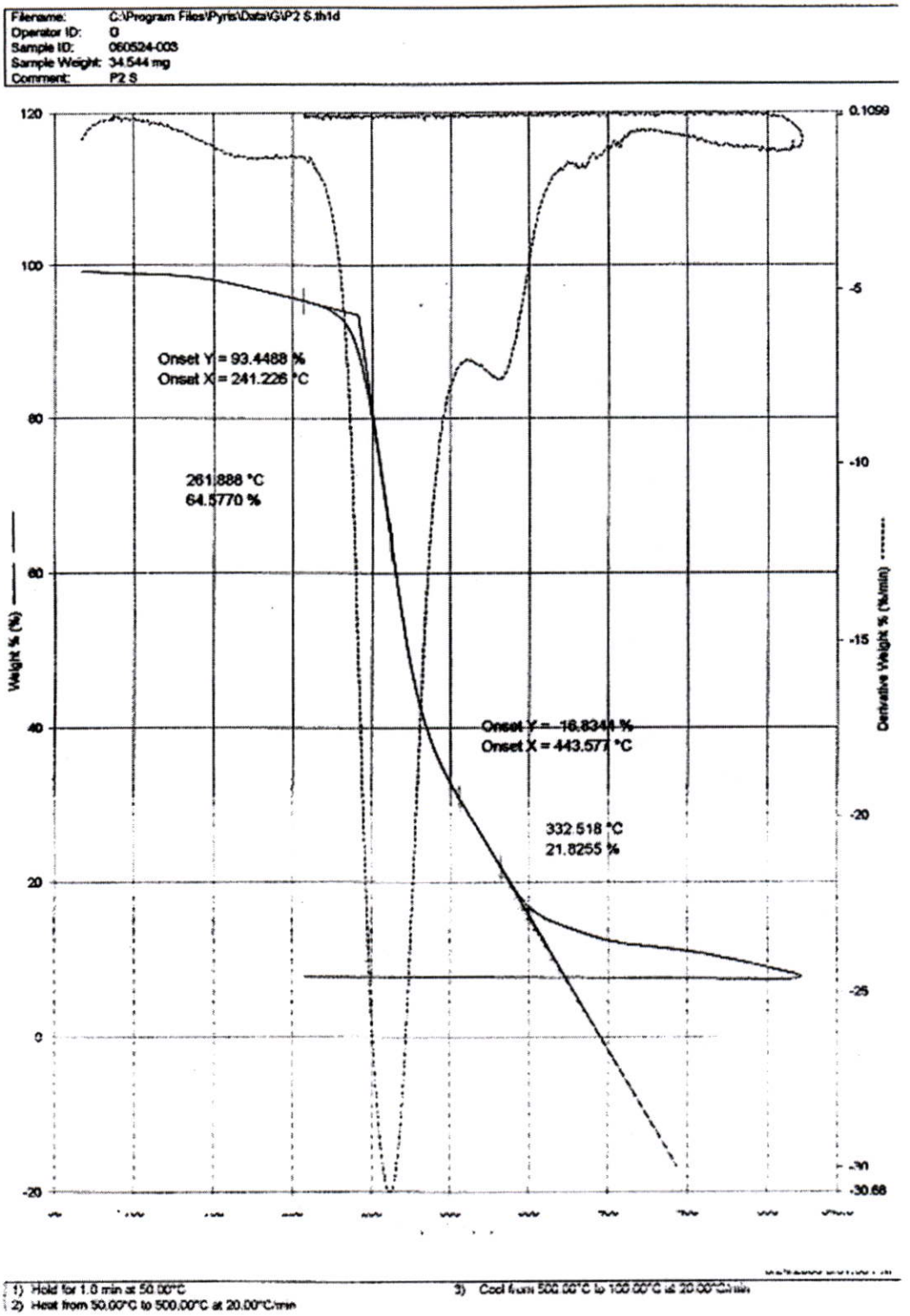
จากรูปที่ 4.2ช เทอร์โมแกรมของสาร P_3 S ที่ได้เริ่มมีแนวโน้มลดลงที่อุณหภูมิ 232.300 °C น้ำหนักลดลงประมาณ 9% โดยที่อุณหภูมิ 243.136 °C พอลิเมอร์เริ่มหลอมละลาย น้ำหนักลดลงประมาณ 40% และที่อุณหภูมิ 397.342 °C มีองค์ประกอบในพอลิเมอร์อีกชนิดเริ่มสลายตัวน้ำหนักของพอลิเมอร์ลดลงประมาณ 85% โดยที่อุณหภูมิ 400.115 °C เริ่มหลอมละลาย เหลือปริมาณของพอลิเมอร์อยู่ 13.7250% และสลายตัวหมดที่อุณหภูมิประมาณ 450 °C

จากรูปที่ 4.2ซ เทอร์โมแกรมของสาร P_3 E, S ที่ได้เริ่มมีแนวโน้มลดลงที่อุณหภูมิ 250.946 °C น้ำหนักลดลงประมาณ 4% โดยที่อุณหภูมิ 274.904 °C พอลิเมอร์เริ่มหลอมละลาย น้ำหนักลดลงประมาณ 44% และสลายตัวหมดที่อุณหภูมิประมาณ 500 °C

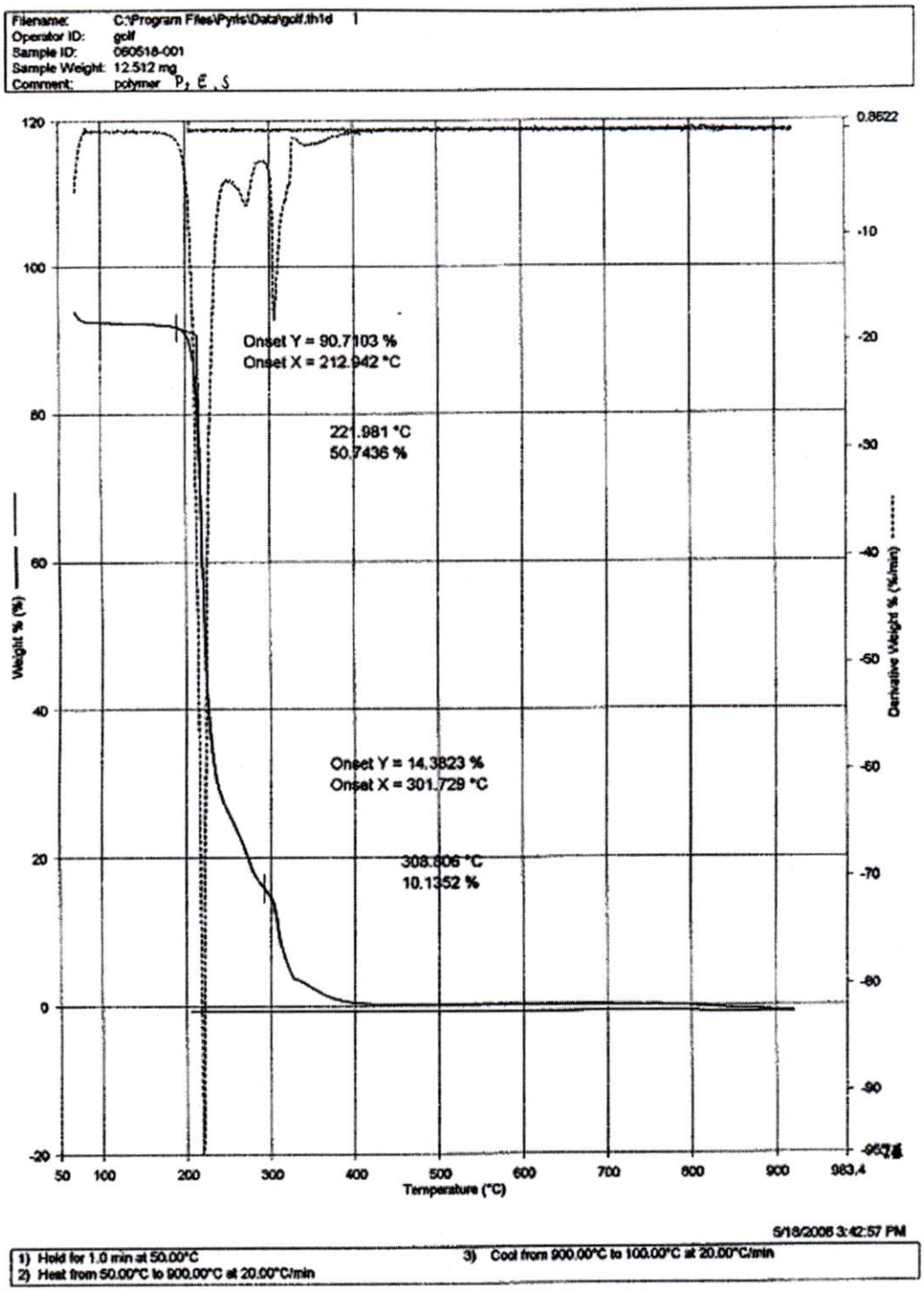
จากเทอร์โมแกรมทั้งหมดจะเห็นว่าพอลิเมอร์ลอกแบบที่ผ่านการสกัดเอาสารปนเปื้อน และคาเฟอีน (ตัวต้นแบบ) ออกแล้ว ส่วนใหญ่จะมีความบริสุทธิ์สูงกว่าที่ยังไม่ได้สกัดออก



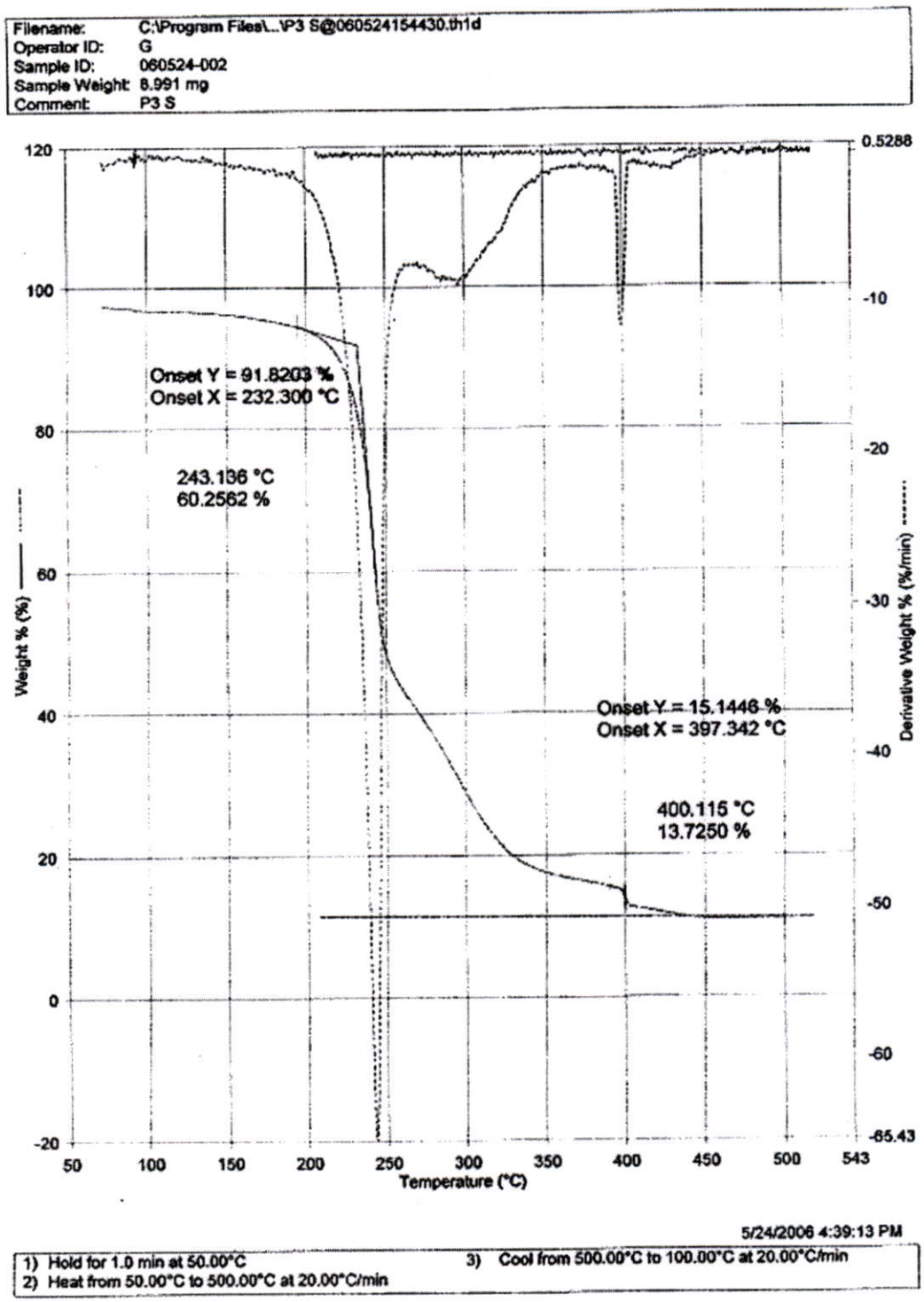
รูปที่ 4.2ง แสดงเทอร์โมแกรมของ P_1 E, S คือ พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลที่ผ่านการสกัดเอาคาเฟอีน (ตัวต้นแบบ) ออก และผ่านการคัดแยกขนาดแล้ว น้ำหนัก 29.140 กรัม เผาที่อุณหภูมิ 50-500 °C , 20 °C/นาที ภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจนที่ 20 psi



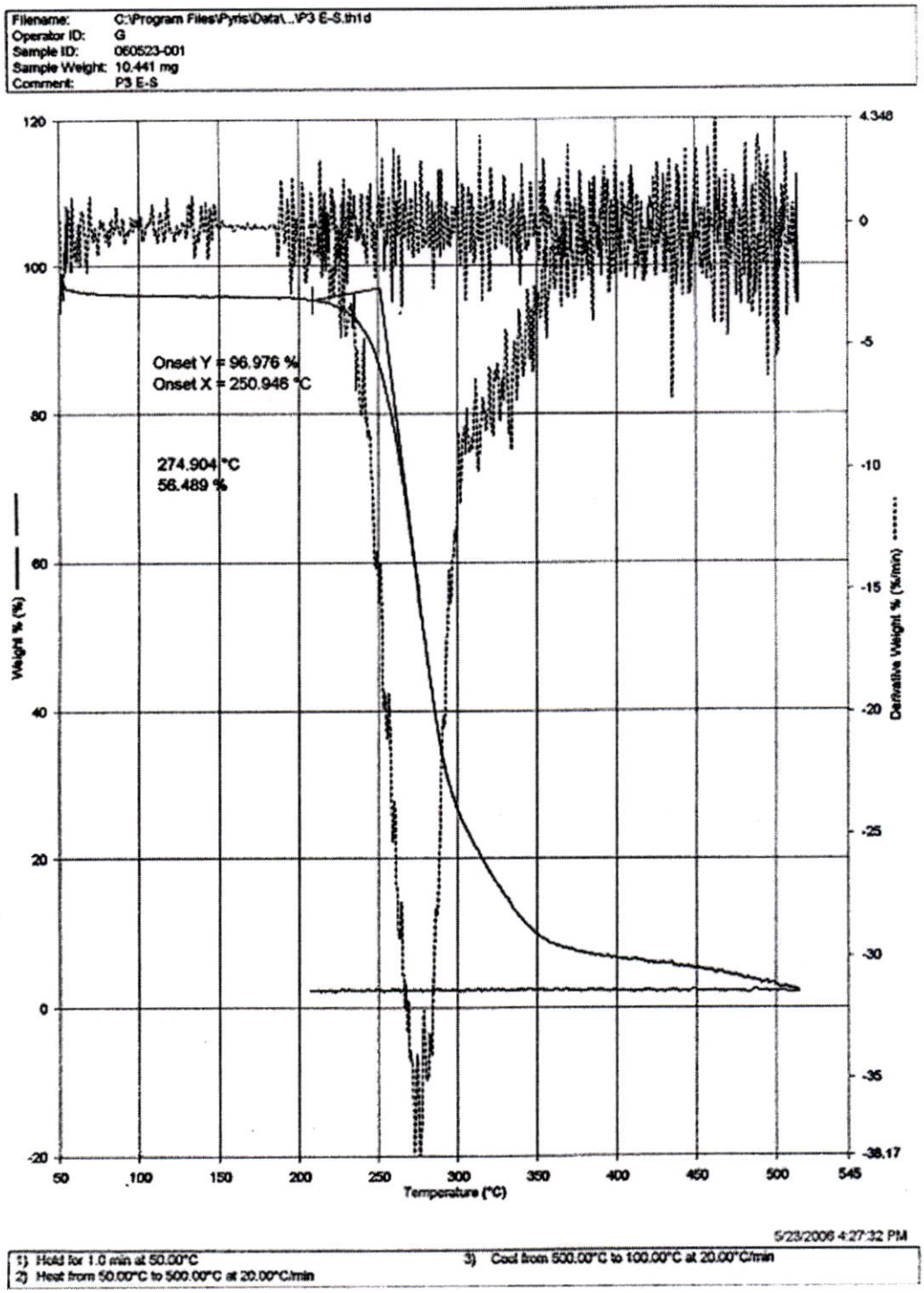
รูปที่ 4.2จ แสดงเทอร์โมแกรมของ P_2 S คือ พอลิเมอร์ลอกแบบที่ไม่ได้สกัดเอาคาเฟอีน (ตัวต้นแบบ) ออก แต่ผ่านการคัดแยกขนาดแล้ว น้ำหนัก 34.544 มิลลิกรัม เผาที่อุณหภูมิ 50-500 °C , 20 °C/นาที ภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจนที่ 20 psi



รูปที่ 4.2ฉ แสดงเทอร์โมแกรมของ P_2 E, S คือ พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลที่ผ่านการสกัดเอาคาเฟอีน (ตัวต้นแบบ) ออกแล้ว และผ่านการคัดแยกขนาดแล้ว น้ำหนัก 12.512 มิลลิกรัม เผาที่อุณหภูมิ 50-900 °C , 20 °C/นาที ภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจนที่ 20 psi

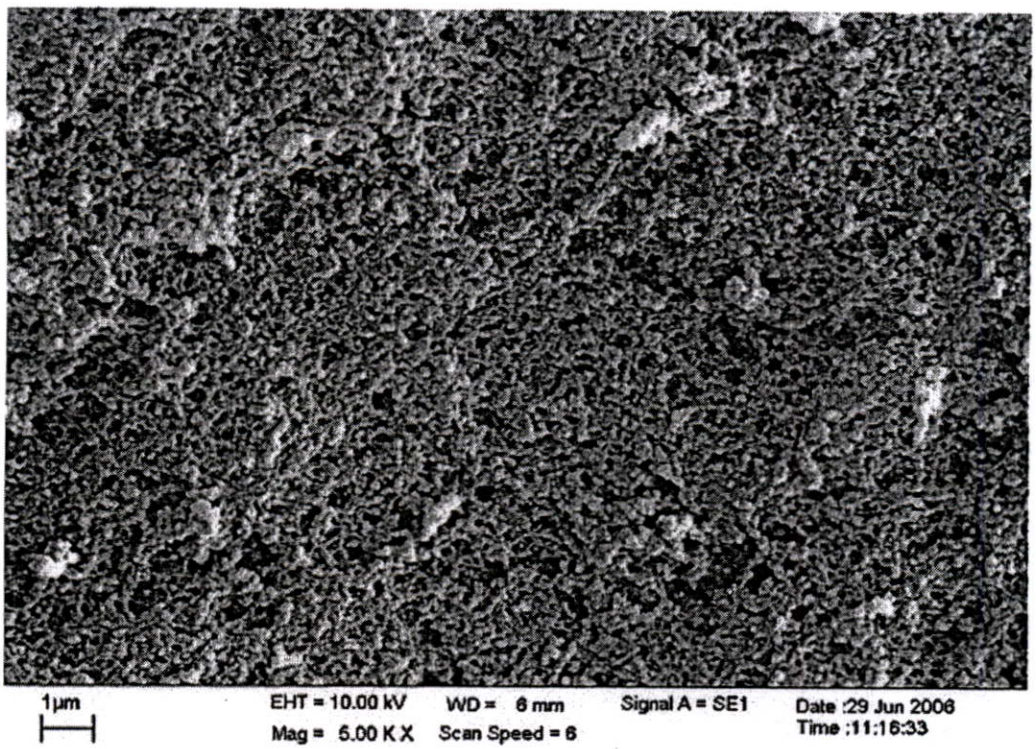


รูปที่ 4.2ช แสดงเทอร์โมแกรมของ P_3 S คือ พอลิเมอร์ลอกแบบที่ไม่ได้สกัดเอาคาเฟอีน (ตัวต้นแบบ) ออก แต่ผ่านการคัดแยกขนาดแล้ว น้ำหนัก 8.991 มิลลิกรัม เผาที่อุณหภูมิ 50-500 °C , 20 °C/นาที ภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจนที่ 20 psi

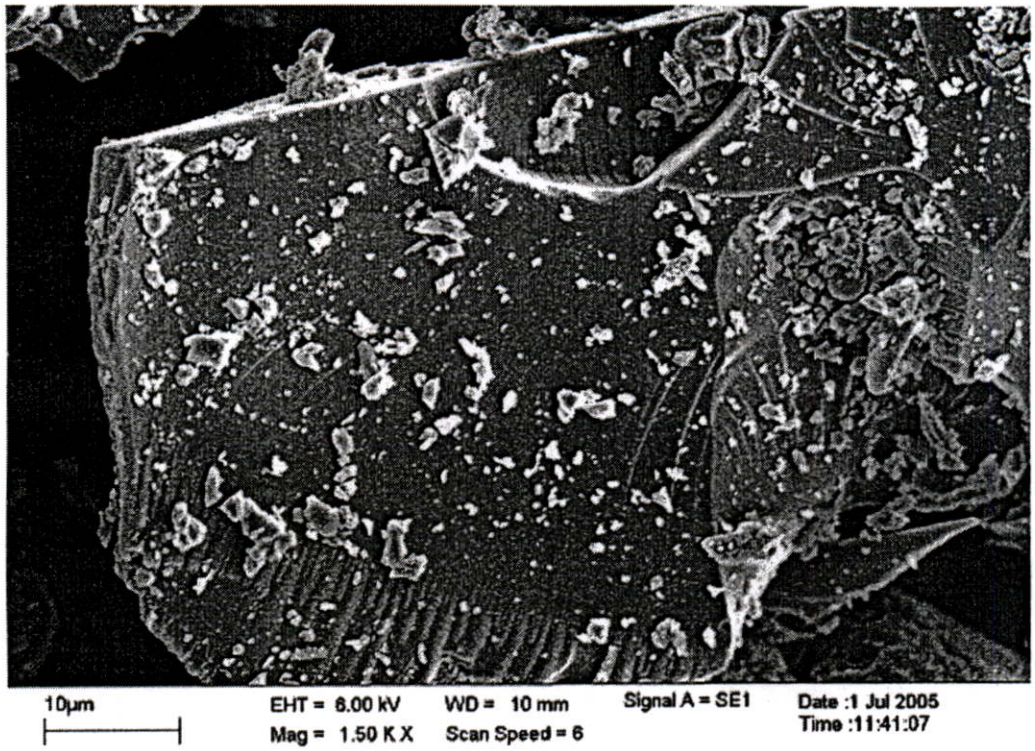


รูปที่ 4.2ซ แสดงเทอร์โมแกรมของ P_3 E, S คือ พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลที่ผ่านการสกัดเอาคาเฟอีน (ตัวต้นแบบ) ออก และผ่านการคัดแยกขนาดแล้ว น้ำหนัก 10.441 มิลลิกรัม เผาที่อุณหภูมิ 50-500 °C , 20 °C/นาที ภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจนที่ 20 psi

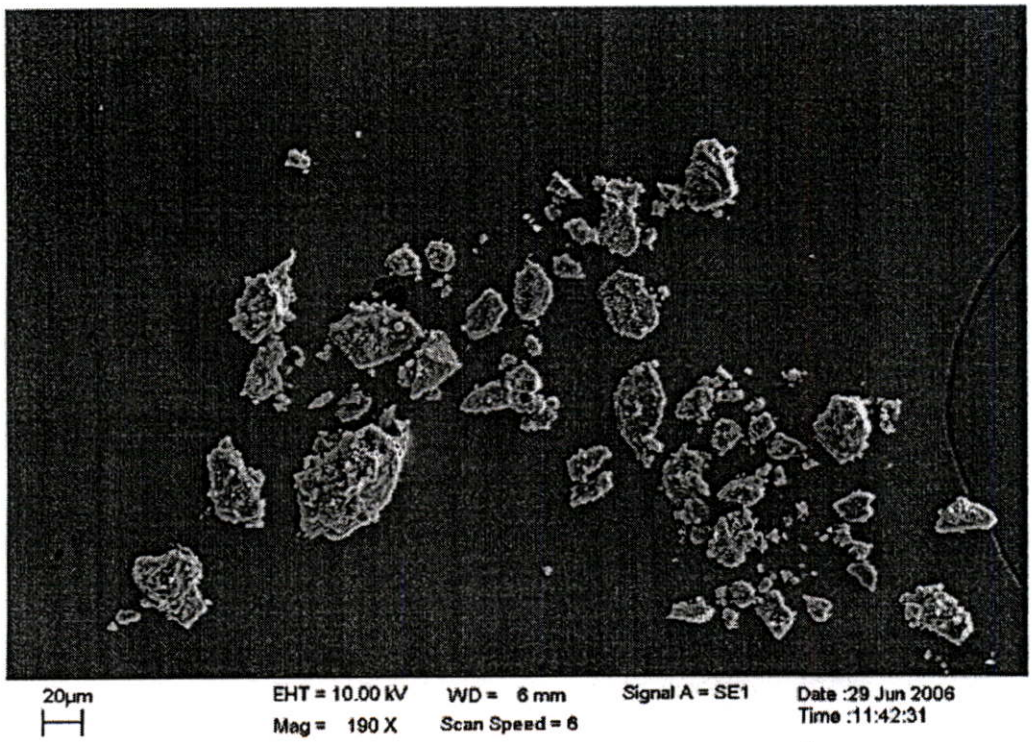
จากการตรวจสอบลักษณะโพรง และอนุภาคของพอลิเมอร์ลอกแบบด้วยเครื่อง SEM แล้วพบว่าได้ผลดังรูปที่ 4.3ก แสดงภาพพื้นผิวของพอลิเมอร์ลอกแบบที่ทำการสกัดเอาตัวต้นแบบ (คาเฟอีน) ออกไป พบว่ามีความเป็นรูพรุน หรือมีโพรงเพิ่มมากขึ้น เปรียบเทียบกับรูปที่ 4.3ข แสดงภาพพื้นผิวของพอลิเมอร์ลอกแบบที่ยังไม่ได้สกัดเอาตัวต้นแบบ (คาเฟอีน) ออกไป ส่วนรูปที่ 4.3ค นั้นแสดงลักษณะรูปร่าง และขนาดโดยทั่วไปของพอลิเมอร์ลอกแบบที่ผ่านการบด และคัดแยกขนาดโดยผ่านที่คัดแยกขนาดอนุภาค 90 ไมโครเมตร พบว่ามีรูปร่างแบบอิสระขนาดแตกต่างกันแต่มีขนาดไม่เกิน 90 ไมโครเมตร



รูปที่ 4.3ก แสดงภาพพื้นผิวของพอลิเมอร์ลอกแบบที่ทำการสกัดเอาตัวต้นแบบ (คาเฟอีน) ออกไป



รูปที่ 4.3ข แสดงภาพพื้นผิวของพอลิเมอร์ลอกแบบที่ยังไม่ได้สกัดเอาตัวต้นแบบ (คาเฟอีน) ออก



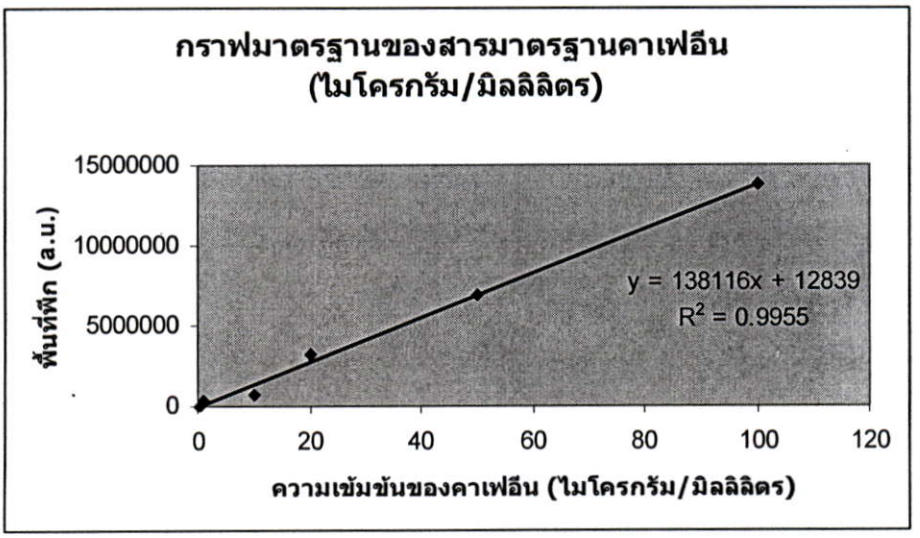
รูปที่ 4.3ค แสดงลักษณะรูปร่าง และขนาดโดยทั่วไปของพอลิเมอร์ลอกแบบที่ผ่านการบด และคัดแยกขนาดโดยผ่านที่คัดแยกขนาดอนุภาค 90 ไมโครเมตร

4.2 ผลการหาค่า reproducibility, %Recovery, ช่วงความสัมพันธ์ที่เป็นเชิงเส้น (Linear range), ปริมาตร breakthrough และสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r^2)

การหาค่า Response factor ของสารแต่ละชนิดสามารถหาได้จากการสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) โดยสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีก จะได้กราฟเป็นเส้นตรง ความชันของกราฟมาตรฐานนี้ คือ Response factor ของสารนั้น ๆ ซึ่งในการทดลองนี้เราทำการพล็อตกราฟมาตรฐานของคาเฟอีนตามข้อมูลในตารางที่ 4.4 ได้กราฟมาตรฐานดังรูปที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงข้อมูลความเข้มข้นของคาเฟอีนกับพื้นที่ใต้พีก

ความเข้มข้นของคาเฟอีน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	พื้นที่พีก (a.u.)
0.25	24757.67
0.50	32710.33
1.0	413588
10	758965. 67
20	3264976.33
50	6900965.67
100	13796490



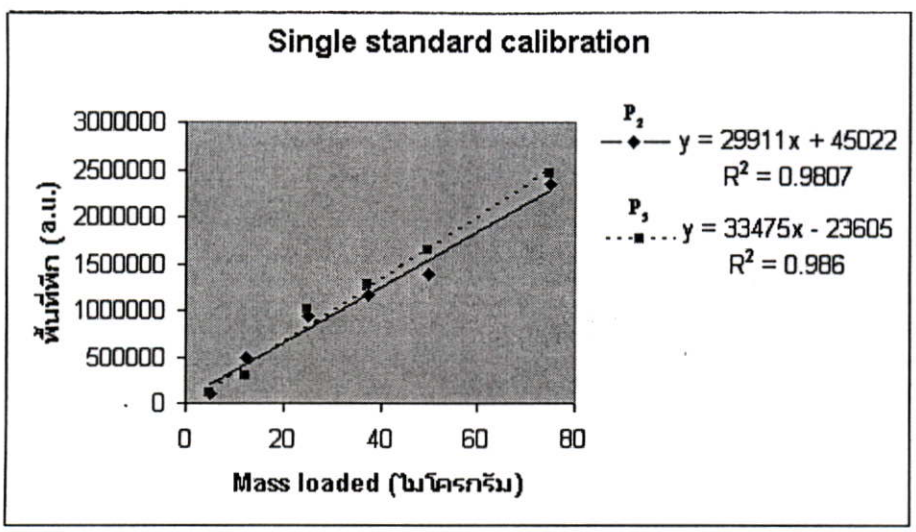
รูปที่ 4.4 แสดงกราฟมาตรฐานของคาเฟอีนโดยทำการพล็อตกราฟระหว่างความเข้มข้นของคาเฟอีน (ไมโครกรัม / มิลลิลิตร) และพื้นที่พีก (a.u.)

การหาปริมาตร Breakthrough คือหาปริมาตรที่เหมาะสมที่อนุภาคของพอลิเมอร์ลอกแบบจำนวน 200 ไมโครกรัม จะสามารถแสดงประสิทธิภาพในการจับจำเพาะกับคาเฟอีนได้ดีที่สุด โดยใช้สารมาตรฐานคาเฟอีนเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร ในการ loading ซึ่งจะทำการเปลี่ยนแปลงปริมาตรดังนี้ 100, 250, 500, 750, 1000 และ 1500 ไมโครลิตร จะได้ข้อมูลดังตารางที่ 4.5 นำข้อมูลที่ได้มาสร้าง Single standard calibration ดังแสดงในรูปที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 แสดงข้อมูลทั้งหมดจากการสร้าง Single standard calibration

Loading volume (ไมโครลิตร)	Mass loaded (ไมโครกรัม)	พื้นที่พีก (a.u.)*		สมการกราฟมาตรฐาน		r^2
		P_2	P_3	P_2	**y = 29911x+45022**	0.9807
100	5.0	93519.33	92837	P_3	**y = 33475x-23605**	0.986
250	12.5	487630.5	293111			
500	25.0	930862.5	1006214			
750	37.5	1155285	1255300			
1.000	50.0	1392796	1625771			
1,500	75.0	2341891	2447500			

*ค่าเฉลี่ยจากการทำซ้ำ 3 ครั้ง



รูปที่ 4.5 แสดง Single standard calibration ของ P_2 และ P_3 ซึ่งทำการพล็อตระหว่าง Mass loaded (ไมโครกรัม) และพื้นที่พีก (a.u.)

จากสมการ Langmuir คือ

$$q = \frac{q_m K_a C}{1 + K_a C} \tag{4.1}$$

$q = q_m$ ก็ต่อเมื่อเป็นพอลิเมอร์ลอกกแบบโมเลกุลที่ใช้เป็นชั้นเดียว (Monolayer) และ K_a เป็นค่าคงที่

ดังนั้นจากสมการที่ (4.1) จะได้

$$\frac{1}{q} = \frac{1}{q_m} + \frac{1}{K_a q_m C} \tag{4.2}$$

จากสมการที่ 4.2 เมื่อทำการพล็อตกราฟระหว่าง $\frac{1}{q}$ และ $\frac{1}{C}$ จะได้กราฟเป็นเส้นตรง ได้ค่าจุดตัดแกน Y คือ $\frac{1}{q_m}$ และได้ค่าความชัน คือ $\frac{1}{K_a q_m}$ [32]

Langmuir Isotherm เป็น Isotherm ที่นิยมใช้สำหรับอธิบายสมดุลในการดูดซับ โดยใน Langmuir Isotherm นี้เราจะตั้งสมมติฐานว่าตัวดูดซับ (adsorbent) มีพื้นผิวที่จะให้เกิดการดูดซับได้จำกัด (เช่นอาจเกิดการดูดซับได้เพียงชั้นเดียวเท่านั้น) โดยถ้าพื้นผิวนี้เต็มแล้วอัตราการดูดซับจะเท่ากับอัตราการปล่อยสารที่ถูกดูดซับออกจากพื้นผิวและยังสมมติว่าการดูดซับเป็นกระบวนการที่ผันกลับได้ (ไม่คิดถึงพลังงานที่ใช้) โดยสมการที่ใช้อธิบาย Langmuir Isotherm คือ

$$\frac{X}{M} = \frac{abC_e}{(1 + aC_e)} \tag{4.3}$$

โดยที่ a เป็นค่าคงที่ ซึ่งมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อขนาดของโมเลกุลใหญ่ขึ้น

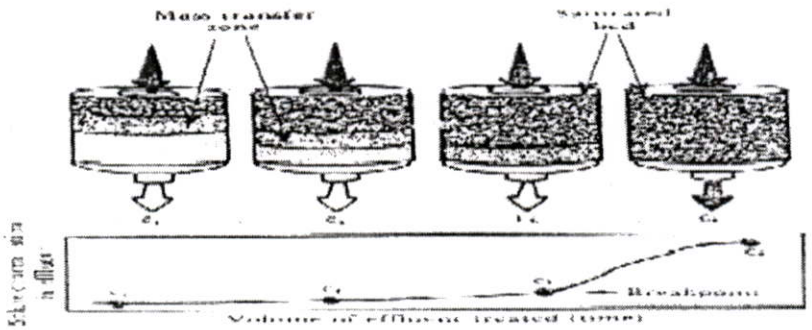
b เป็นค่าคงที่ที่เท่ากับปริมาณสารที่ถูกจับยึดแบบชั้นเดียวบนพื้นผิวทั้งหมด

ในกรณีที่มีการดูดซับสาร 2 ชนิด สมการการดูดซับของ Langmuir สามารถเขียนได้ดังต่อไปนี้

$$\frac{X_A}{M} = \frac{a_A b_A C_A}{(1 + a_A C_A + a_B C_B)} \tag{4.4}$$

$$\frac{X_B}{M} = \frac{a_B b_B C_B}{(1 + a_A C_A + a_B C_B)} \tag{4.5}$$

ในการสกัดสารของ SPE cartridge นั้นเราทำการทดลองโดยการ loading สารละลายมาตรฐานคาเฟอีนเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เข้าไปที่ปริมาตรต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 100-1,500 ไมโครลิตร และถ้าเราสามารถวัดความเข้มข้นที่จุดต่าง ๆ ภายใน cartridge ได้เราจะได้กราฟความเข้มข้นของสารที่ลดลงเรื่อย ๆ จากความเข้มข้นเท่าตอนแรก จนกระทั่งออกเป็นความเข้มข้นเป็นศูนย์ โดยกราฟนี้จะค่อย ๆ เคลื่อนที่ไปเรื่อย ๆ จากปลายด้านหนึ่งของ SPE cartridge ด้านขาเข้าไปยังปลายขาออก เพราะพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลช่วงแรก ๆ จะถูกใช้งานก่อน ทำให้พื้นผิวเต็มก่อน และเมื่อพื้นผิวเต็มก็จะไม่สามารถดูดซับอีกได้ ดังนั้นความเข้มข้นของสารที่เราสนใจจึงไม่ลดลง ดังแสดงในรูปที่ 4.6 ซึ่งเราเรียกส่วนที่เกิดการดูดซับนี้ว่า Mass Transfer Zone (MTZ) และเมื่อ MTZ เคลื่อนที่ไปจนถึงปลายขาออก เราจะพบว่ามีสารที่เราต้องการดูดซับส่วนหนึ่งเล็ดลอดออกมา เราเรียกจุดที่มีสารที่เราต้องการดูดซับเริ่มเจือปนออกมานี้ว่าจุด breakthrough ซึ่งเป็นจุดที่ SPE cartridge ไม่สามารถทำงานได้ 100% อีกต่อไป [33]



รูปที่ 4.6 แสดงเส้นโค้งการถ่ายเทมวลในระหว่างการดูดซับ (Breakthrough curve) [34]

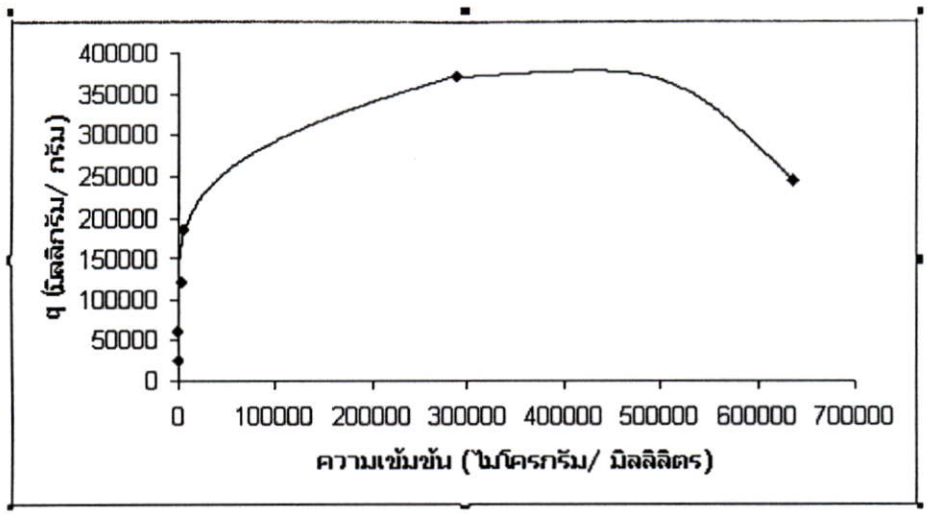
ตารางที่ 4.6 แสดงข้อมูลที่ได้จากการทดลอง และนำมาคำนวณหาความเข้มข้นของคาเฟอีนที่ถูกชะออกมาจาก SPE cartridge และนำมาพล็อตกราฟหาปริมาตรที่เหมาะสมในการ loading

Loading volume (ไมโครลิตร)	Mass loaded (มิลลิกรัม)	q (มิลลิกรัม/ กรัม)		ความเข้มข้นของคาเฟอีน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)*	
		P_2 0.20324 กรัม	P_3 0.20175 กรัม	P_2	P_3
100	5.0×10^3	24.6×10^3	24.8×10^3	0	0
250	12.5×10^3	61.5×10^3	61.9×10^3	852.67	952.333
500	25.0×10^3	123×10^3	123.9×10^3	3213.67	9222

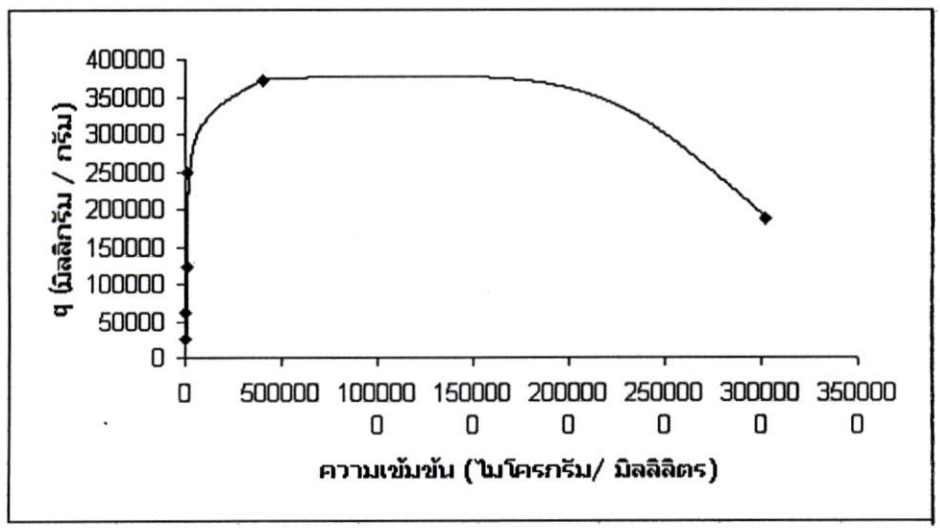
ตารางที่ 4.6(ต่อ)

750	37.5×10^3	184.5×10^3	185.9×10^3	5546.67	3018357.33
1,000	50.0×10^3	246×10^3	247.8×10^3	635847.67	9273
1,500	75.0×10^3	369×10^3	371.7×10^3	287218	399046

* ค่าเฉลี่ยจากการทำซ้ำ 3 ครั้ง



รูปที่ 4.7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง q (อัตราส่วนของปริมาณสารที่ต้องการวิเคราะห์ (มิลลิกรัม) ต่อปริมาณของพอลิเมอร์ลอกแบบชนิด P_2 จำนวน 0.20324 กรัม) ที่บรรจุใน SPE cartridge กับ ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)



รูปที่ 4.8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง q (อัตราส่วนของปริมาณสารที่ต้องการวิเคราะห์ (มิลลิกรัม) ต่อ ปริมาณของพอลิเมอร์ลอกแบบชนิด P_3 จำนวน 0.201754 กรัม) ที่บรรจุใน SPE cartridge กับ ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)

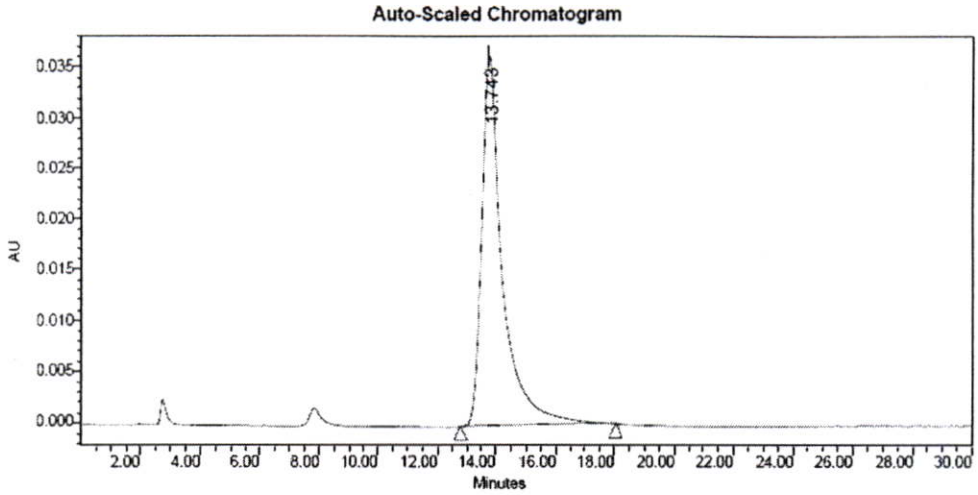
รูปที่ 4.7 แสดงการหาปริมาตรในการ loadind ที่เหมาะสมของคาเฟอีนที่ได้จากการ loading ที่ปริมาตรที่แตกต่างกันใน SPE cartridge โดยมีพอลิเมอร์ลอกแบบบรรจุอยู่จำนวน 200 มิลลิกรัม จากรูปที่ 4.7 และ 4.8 แสดงให้เห็นว่าที่ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร พอลิเมอร์ลอกแบบชนิด P_2 และ P_3 สามารถแสดงประสิทธิภาพในการดูดซับคาเฟอีนได้ดีที่สุด

ตารางที่ 4.7 แสดงค่า % Recovery ของคาเฟอีน (50 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร) ของพอลิเมอร์ลอกแบบทั้ง 4 ชนิด ซึ่งผลการทดลองได้มาจากการทำซ้ำ 3 ครั้ง

Fractions	%Recovery			
	P	P_1	P_2	P_3
Load caffeine (50 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	0.20	0.0	0.0	0.0
Load buffer (0.05 M CH_3COONH_4-NH_3(aq), pH 9)	8.16	1.10	0.1	0.15
1st washing (0.05 M CH_3COONH_4-NH_3(aq), pH 9)	7.58	1.63	0.2	0.45
1st elution (ACN-TEA 1 %)	11.20	80.6	90.31	89.65
2nd elution (ACN-CH_3COOH 1%)	60.5	16.1	9.35	20.30
Total	87.64	99.43	99.96	113.55

จะเห็นได้ว่า P_3 มี% Recovery มากกว่า 100% เนื่องจากในการเตรียมพอลิเมอร์ลอกแบบนั้นในการสกัดสกัดเอาคาเฟอีนซึ่งเป็นตัวต้นแบบออกมาไม่หมดนั่นเอง

จากรูปที่ 4.9 นี้แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะของพอลิเมอร์ลอกแบบชนิด P_2 ที่มีความจำเพาะต่อคาเฟอีน



รูปที่ 4.9 แสดงการสกัดของพอลิเมอร์ชนิด P_2 ที่สกัดสารผสมของคาเฟอีน ธีโอโบรมีน และธีโอฟิลลีน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร

บทที่ 5
สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

พอลิเมอร์ลอกแบบที่สังเคราะห์ได้นั้นมีทั้งหมด 4 ชนิด คือพอลิเมอร์ควบคุม (P) พอลิเมอร์ลอกแบบที่ใช้คาเฟอีนเป็นตัวต้นแบบจำนวน 0.25 มิลลิโมล (P_1) พอลิเมอร์ที่ใช้คาเฟอีนเป็นตัวต้นแบบจำนวน 0.50 มิลลิโมล (P_2) และพอลิเมอร์ที่ใช้คาเฟอีนเป็นตัวต้นแบบจำนวน 0.75 มิลลิโมล (P_3) พบว่า พอลิเมอร์ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการสกัดคาเฟอีนคือ P_2 ในการศึกษาคุณสมบัติของพอลิเมอร์โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FT-IR ทดสอบความคงทนต่อความร้อน และการสลายตัวด้วย TGA พบว่า อุณหภูมิที่พอลิเมอร์ควบคุม (P) เริ่มสลายตัว คือ 295.466 oC พอลิเมอร์ที่ใช้คาเฟอีนเป็นตัวต้นแบบจำนวน 0.25 มิลลิโมล (P_1) 223.743 oC พอลิเมอร์ที่ใช้คาเฟอีนเป็นตัวต้นแบบจำนวน 0.50 มิลลิโมล (P_2) 221.981 oC และพอลิเมอร์ที่ใช้คาเฟอีนเป็นตัวต้นแบบจำนวน 0.75 มิลลิโมล (P_3) 274.904 oC การหาขนาดของอนุภาคของพอลิเมอร์ลอกแบบด้วยเครื่อง Mastersizer X พบว่าพอลิเมอร์ควบคุม (P) มีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 47.48 μm. P_1 มีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 47.25 μm. P_2 มีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 48.93 μm. และ P_3 มีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 52.58 μm. นำพอลิเมอร์ลอกแบบทั้ง 4 ชนิดบรรจุใน catridge เพื่อนำไปสกัดตัวอย่างคาเฟอีน ก่อนนำไปตรวจวัดด้วยเครื่องลิควิดโครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูง (HPLC) พบว่าพอลิเมอร์ลอกแบบชนิด P_1, P_2 และ P_3 มีค่าเท่ากับ 99.43, 99.96 และ 113.55 ส่วน P มี %Recovery เท่ากับ 87.64 พบว่าพอลิเมอร์ลอกแบบทั้งหมดมีความจำเพาะต่อคาเฟอีน โดยเฉพาะพอลิเมอร์ลอกแบบ ชนิด P_2 พบว่ามีความจำเพาะต่อคาเฟอีนมากที่สุด ส่วน P_3 ยังสกัดเอาคาเฟอีน (ตัวต้นแบบ) ออกไม่หมด จึงมีคาเฟอีนเหลือค้างอยู่ในโพรงดูได้จากผลของ TGA เทอร์โมแกรมของ P_3 E S (พอลิเมอร์ลอกแบบชนิด P_3 ที่สกัดเอาคาเฟอีนออก และทำการคัดแยกขนาดแล้ว) พบคาเฟอีนอยู่ในเทอร์โมแกรม

5.2 แนวทางในการศึกษา และพัฒนา

จากการศึกษาประสิทธิภาพในการสกัดของพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล พบว่า P_2 มีประสิทธิภาพในการสกัดมากที่สุด ดังนั้นควรนำมาศึกษากับตัวอย่างคาเฟอีนที่มีอยู่ตามท้องตลาดต่อไป

เอกสารอ้างอิง

[1] Official Method of Analysis, AOAC Arlington VA., (1984)

[2] Krueger H., Kurzidin J. and Mueller R., *Chromatographia*, 9(5), 211, 1976.

[3] D.P. Hollis, *Anal.Chem.*, Washington, 35, 1682 , 1963.

[4] S. Khayyal, M.Ayad, *Anal.Lett.*, 16(B19), 1525, 1983.

[5] T. Bai, J.H. Jia, Yauxue Xuebau, *Anal.Lett.*, 23 (8), 616, 1988.

[6] Mena, M.L., Martinez-Ruiz, P., Reviejo, A.J. and Pingarron, J.M., *Anal. Chim. Acta*, 451, 297-304, 2002.

[7] ชัยวัฒน์ เจนวาณิชย์, *เคมีพอลิเมอร์พื้นฐาน*, กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์, 2535.

[8] Jonatta, M., Weiss, R., Mizaikoff, B., Brueggemann, O., Ye, L. And Mosbach K. Intern., *J. Environ. Anal. Chem.*, 80(2), 75-86, 2001.

[9] http://karstendaf.free.fr/Imprinting.html

[10] www.thaiscience.com/lab_vol/p17/p17MISPE.htm

[11] Fried, J.R., *Polymer Science and Technology*, Printice Hall PTR, 1995.

[12] ฉรงค์ ไชยสุต, วิธีการวิเคราะห์โดยอุปกรณ์, กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง, 2541.

[13] www.aoac.org/pdf/gr_d.pdf

[14] www.thaiscience.com/lab_vol/p17/p17MISPE.htm

[15] http://journals.tubitak.gov.tr/chem/issues/kim-02-26-2/kim-26-2-20-0006-10.pdf

[16] Hennion, M.C., *J. Chromatogr. A.*, 3, 856, 1999.

[17] https://eldorado.unidortmund.de/dspace/bitstream/2003/21720/1/Doktorarbeit+Manesiotis.pdf

[18] www.taylorandfrancis.metapress.com/ index/W66CEA9PC7DF13VT.pdf

[19] www.lcgceurope.com/lcgceurope/ article/articleDetail.jsp?id=102965

[20] www.mdpi.net/sensors/papers/s20100035.pdf

[21] http://193.132.193.215/eman2/fsheet2_1.asp

[22] http://www.infochembio.ethz.ch/links/en/analytchem_chromat.html

[23] แม้น อมรสิทธิ์ และอมร เพชรสม, หลักการ และเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ., กรุงเทพฯ: ชวนพิมพ์, 2534.

[24] http://jstp.siamdev.net/board/index.php?showtopic=257

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

[25] http://www.siamswim.com/knowleage/anamai15.html

[26] http://www.bkkfood.com/choicecoffee/fact.php

[27] http://www.elib-online.com/doctors46/med_pressure001.html

[28] Nishitani, E. And Sagesaka, Y.M., *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 675-685, 2004.

[29] Goto, T., Yoshida, Y., Kiso, M., and Nagashima, H., *J. Chromatogr. A*, 749, 295-299, 1996.

[30] Grand, A.N. and Bell, L.N., *J. Am. Diet. Assoc.*, 97, 179-182, 1997.

[31] Mena, M.L., Martinez-Ruiz, P., Reviejo, A.J. and Pingarron, J.M., *Anal. Chim. Acta*, 451, 297-304, 2002.

ภาคผนวก ก

เอกสารข้อมูลความปลอดภัยเคมีภัณฑ์

(Material Safety Data Sheet, MSDS)

เอกสารข้อมูลความปลอดภัยเคมีภัณฑ์

(Material Safety Data Sheet, MSDS)

คาเฟอีน (Caffeine)

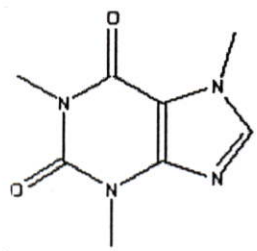
1. การชี้บ่งเคมีภัณฑ์ (Chemical Identification)

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

ชื่อเคมีทั่วไป: Caffeine

ชื่อพ้องอื่นๆ:1,3,7-Trimethylxanthine; 1,3,7-Trimethyl-2,6-dioxopurine; 7-Methyltheophylline; Alert-Pep; Cafeina; Cafipel; Guaranine; Koffein; Mateina; Methyltheobromine; No-Doz; Refresh'n; Stim; Theine; 1-Methyltheobromine; Methyltheobromide; Eldiatric c; Organex; 1,3,7-Trimethyl-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydropurine; Caffenium;

สูตรโมเลกุล: $C_8H_{10}N_4O_2$



สูตรโครงสร้าง: -

รหัส CAS No.: 58-08-2

รหัส EUEINECS/ELINCS: 200-362-1

2. ชื่อผู้ผลิต/จำหน่าย (Manufacturer and Distributor)

ชื่อผู้ผลิต/นำเข้า: J.T.Baker Inc.

3. การใช้ประโยชน์ (Uses): -

4. ค่ามาตรฐานและความเป็นพิษ (Standard and Toxicity)

LD50 (mg/kg.): 261-383 (หนู), **LC50 (mg/m^3):** 4.10-4.94 / 4 ชั่วโมง (หนู)

พรบ. ส่งเสริมและรักษาคุณภาพสิ่งแวดล้อม พ.ศ. 2535(ppm): -

พรบ. โรงงาน พ.ศ. 2535 (ppm): -

พรบ. ควบคุมยุทธภัณฑ์ พ.ศ. 2530: ☐ชนิดที่ 1 ☐ชนิดที่ 2 ☐ชนิดที่ 3

พรบ. คุ้มครองแรงงาน พ.ศ. 2541 (ppm) เฉลี่ย 8 ชั่วโมง: - ระยะสั้น - ค่าสูงสุด - สารเคมีอันตราย:

พรบ. วัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 : ☐ชนิดที่ 1 ☐ชนิดที่ 2 ☐ชนิดที่ 3 ☐ชนิดที่ 4

หน่วยงานที่รับผิดชอบ: -

5. คุณสมบัติทางกายภาพ และเคมี (Physical and Chemical Properties)

สถานะ: เป็นผง **สี:** สีขาว **กลิ่น:** ไม่มีกลิ่น **นน.โมเลกุล:** 194.19

จุดเดือด (°C): 178 **จุดหลอมเหลว/จุดเยือกแข็ง (°C):** 238 **ความถ่วงจำเพาะ(น้ำ=1):** 1.23

ความหนืด (mPa.sec): - **ความดันไอ (มม.ปรอท) :** - ที่ - °C **ความหนาแน่นไอ (อากาศ=1):** -

ความสามารถในการละลายน้ำที่ (กรัม/100 มล.) : 2.17 **ความเป็นกรด-ด่าง (pH) :** 6.9 ที่ 20 °C

แฟคเตอร์แปลงหน่วย 1 ppm = 7.94 **มก./ม3 หรือ 1 มก./ม3** = 0.13 **ppm ที่** 25 °C

ข้อมูลทางกายภาพและเคมีอื่น ๆ :

6. อันตรายต่อสุขภาพอนามัย (Health Effect)

สัมผัสทางหายใจ: การหายใจเอาฝุ่นของสารนี้เข้าไป จะก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อเยื่อบุเมือก และทางเดินหายใจ การสัมผัสสารนี้ที่เข้มข้นสูงๆ จะมีผลกระทบเช่นเดียวกับการกลืนหรือกินเข้าไป

สัมผัสทางผิวหนัง: การสัมผัสถูกผิวหนัง จะก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนัง เกิดผื่นแดง คัน และปวด

กินหรือกลืนเข้าไป: การกลืนหรือกินเข้าไปจะเป็นพิษ ปริมาณที่ทำให้ตายได้ในผู้ใหญ่ประมาณ 10 gm ถ้ากลืนหรือกินสารนี้ในปริมาณมากอาจทำให้เกิดอาการ ตื่นเต้น นอนไม่หลับ วิงเวียน ปวดศีรษะ และอาเจียน

สัมผัสถูกตา: การสัมผัสถูกตาจะก่อให้เกิดการระคายเคือง ตาแดง และปวดตา

การก่อมะเร็ง :

ความผิดปกติอื่น ๆ:

สารนี้จัดเป็นสารก่อมะเร็ง ประเภท 3 ตามบัญชีรายชื่อของ IARC สัมผัสเรื้อรัง การใช้คาเฟอินในปริมาณมากเกินไป อาจจะรบกวนการทำงานของระบบอาหารทำให้ท้องผูก ตื่นเต้น หาย

7. ความคงตัวและการเกิดปฏิกิริยา (Stability and Reaction)

- ความคงตัวทางเคมี: สารนี้เสถียรสภาวะปกติการใช้และการเก็บ
- สารที่เข้ากันไม่ได้: สารออกซิไดซ์ , เกลือซิลเวอร์ไอโอดีน , แทนนีน และสารละลายเข้นข้นของเบสซึ่งมีฤทธิ์กัดกร่อน
- สภาวะที่ควรหลีกเลี่ยง: ความร้อน เปลวไฟ แหล่งจุดติดไฟ และสารที่เข้ากันไม่ได้
- สารเคมีอันตรายที่เกิดจากการสลายตัว: การเผาไหม้ทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ คาร์บอนมอนนอกไซด์ และไนโตรเจนออกไซด์
- อันตรายจากการพอลิเมอร์: จะไม่เกิดขึ้น

8. การเกิดอัคคีภัยและการระเบิด (Fire and Explosion)

- ความเข้มข้นที่เพียงพอของฝุ่นละเอียดที่แพร่กระจายในอากาศ และมีแหล่งจุดติดไฟอาจทำให้เกิดอันตรายจากการระเบิดของฝุ่น

- สารนี้เมื่อสัมผัสกับสารอินทรีย์ที่เป็นของแข็ง อาจจะเกิดเพลิงไหม้ได้เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้งหรือสัมผัสกับแหล่งจุดติดไฟ

- สารดับเพลิง ในกรณีเกิดเพลิงไหม้ ให้ใช้น้ำฉีดเป็นฝอย ผงเคมีแห้ง โฟม แอลกอฮอล์ หรือคาร์บอนไดออกไซด์

9. การเก็บรักษา/สถานที่เก็บ/เคลื่อนย้าย/ขนส่ง (Storage and Handling)

- เก็บในภาชนะที่ปิดมิดชิด
- เก็บในที่เย็นและแห้ง
- เก็บในที่มีการระบายอากาศดีและป้องกันการเสียหายทางกายภาพ
- ภาชนะบรรจุสารที่เป็นถังเปล่าแต่มีกากสารเคมีเหลืออยู่ เช่น ฝุ่น ของแข็ง อาจเป็นอันตรายได้
- ให้สังเกตคำเตือนและข้อควรระวังทั้งหมดที่ระบุไว้สำหรับสารนี้

10. การกำจัดกรณีรั่วไหล (Leak and Spill)

- สารนี้จัดเป็นสารก่อมะเร็ง ประเภท 3 ตามบัญชีรายชื่อของ IARC
- สัมผัสเรื้อรัง การใช้คาเฟอินในปริมาณมากเกินไป อาจจะรบกวนการทำงานของระบบอาหารทำให้ท้องผูก ตื่นเต้น หาย

11. อุปกรณ์ป้องกันอันตรายส่วนบุคคล (PPD/PPE)

หน้ากากป้องกันการหายใจ ถุงมือ ชุดป้องกันสารเคมี แว่นตานิรภัย

12. การปฐมพยาบาล (First Aid)

หายใจเข้าไป ถ้าหายใจเข้าไป ให้เคลื่อนย้ายผู้ป่วยออกมาสู่บริเวณที่ที่มีอากาศบริสุทธิ์ ถ้าผู้ป่วยหยุดหายใจให้ช่วยผายปอด ถ้าหายใจติดขัดให้ออกซิเจนช่วยให้นำส่งไปพบแพทย์

กินหรือกลืนเข้าไป ถ้ากลืนหรือกินเข้าไป กระตุ้นให้เกิดการอาเจียน ห้ามไม่ให้นำสิ่งใดเข้าปากผู้ป่วยที่หมดสติ และนำส่งไปพบแพทย์ทันที

สัมผัสถูกผิวหนัง ถ้าสัมผัสถูกผิวหนัง ให้ล้างออกด้วยน้ำและสบู่ ปริมาณมากๆอย่างน้อย 15 นาที พร้อมทั้งถอดเสื้อผ้าที่เปรอะเปื้อนสาร เคมีออก ทำความสะอาดเสื้อผ้า และรองเท้าก่อนนำกลับมาใช้ใหม่ และนำส่งไปพบแพทย์

สัมผัสถูกตา ถ้าสัมผัสถูกตา ให้ล้างออกด้วยน้ำปริมาณมากๆอย่างน้อย 15 นาที พร้อมกระพริบตาถี่ๆ ขณะทำการล้าง และนำส่งไปพบแพทย์

13. ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (Environmental Impacts)

- เมื่อรั่วไหลลงสู่ดิน สารนี้จะสามารถเกิดการสลายตัวทางชีวภาพได้ในระดับปานกลาง
- เมื่อรั่วไหลลงสู่แหล่งน้ำ สารนี้จะสามารถเกิดการสลายตัวทางชีวภาพได้ในระดับปานกลาง
- คาดว่าสารนี้จะไม่เกิดการรวมตัวกันทางชีวภาพ

14. การเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ (Sampling and Analytical)

วิธีการเก็บตัวอย่าง: กระดาษกรอง หลอดเก็บตัวอย่าง, Imprinter

วิธีการวิเคราะห์: ชั่งน้ำหนัก สเปคโทรโฟโตมิเตอร์ แก๊สโครมาโทกราฟี อะตอมมิกแอบซอปชั่น

15. การปฏิบัติกรณีฉุกเฉิน (Emergency Response)

กรณีฉุกเฉินโปรดใช้บริการระบบให้บริการข้อมูลการระงับอุบัติภัยจากสารเคมีทางโทรศัพท์หรือสายด่วน AVERS ที่หมายเลขโทรศัพท์ 1650

เมทาไครลิก แอซิด (Methacrylic acid)

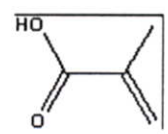
1. การชี้บ่งเคมีภัณฑ์ (Chemical Identification)

ชื่อเคมี IUPAC: 2-Methyl-2-Propenoic Acid

ชื่อเคมีทั่วไป: Methacrylic acid

ชื่อพ้องอื่นๆ:2-Methylacrylic Acid; 2-Methylpropenoic acid; Alpha-methylacrylic acid; 2-Methacrylic Acid; Methacrylic acid (stabilized with ca 250 ppm MEHQ); Methacrylate; 2-Methylene propionic acid

สูตรโมเลกุล : $C_4H_6O_2$



สูตรโครงสร้าง:

รหัส IMO:

รหัส UN/ID NO.: 2531, **รหัส EC NO. :** 607-088-00-5

รหัส CAS NO.: 79-41-4, **รหัส RTECS:** OZ 2975000

รหัส EUEINECS/ELINCS: 201-204-4, **ชื่อวงศ์:** -

2. ชื่อผู้ผลิต/จำหน่าย (Manufacturer and Distributor)

ชื่อผู้ผลิต/นำเข้า: Alfha Aesar , A Johnson Matthey Company Johnson Matthey Catalog Company INC

แหล่งข้อมูลอื่นๆ : 30 Bond Street Ward Hill, MA 01835-8099

3. การใช้ประโยชน์ (Uses):-

4. ค่ามาตรฐานและความเป็นพิษ (Standard and Toxicity)

LD50 (mg/kg): 1060 (หนู), **LC50 (mg/m^3) :** - / - ชั่วโมง (-)

พรบ. ส่งเสริมและรักษาคุณภาพสิ่งแวดล้อม พ.ศ. 2535(ppm): -

พรบ. โรงงาน พ.ศ. 2535 (ppm): -

พรบ. ควบคุมยุทธภัณฑ์ พ.ศ. 2530: ☐ชนิดที่ 1 ☐ชนิดที่ 2 ☐ชนิดที่ 3

พรบ. กุ้มครองแรงงาน พ.ศ. 2541 (ppm) เฉลี่ย 8 ชั่วโมง: - , ระยะสั้น -, ค่าสูงสุด -

สารเคมีอันตราย: ☐

พรบ. วัตถุอันตราย พ.ศ. 2535: ☐ชนิดที่ 1 ☐ชนิดที่ 2 ☐ชนิดที่ 3 ☐ชนิดที่ 4

หน่วยงานที่รับผิดชอบ:

5. คุณสมบัติทางกายภาพและเคมี (Physical and Chemical Properties)

สถานะ : ของเหลว, **สี:** ไม่มีสี, **กลิ่น:** กรด, **น้ำหนักโมเลกุล:** 86.09

จุดเดือด(°ซ.): 163, **จุดหลอมเหลว/ จุดเยือกแข็ง (°ซ.):** 16, **ความถ่วงจำเพาะ (น้ำ=1):** 1.01

ความหนืด(mPa.sec): 1.312, **ความดันไอ (mmHg):** 1 ที่ 20 °C

ความหนาแน่นไอ(อากาศ=1): 2.97

ความสามารถในการละลายน้ำที่(g/100 ml): ละลายได้ดีมาก ที่ 20 °C

ความเป็นกรด-ด่าง (pH): 2-2.2

แฟคเตอร์แปลงหน่วย 1 ppm = 3.52 mg/m^3 หรือ 1 mg/m^3 = 0.28 ppm ที่ 25 °C

ข้อมูลทางกายภาพและเคมีอื่น ๆ:-

6. อันตรายต่อสุขภาพอนามัย (Health Effect)

สัมผัสทางหายใจ: การหายใจเข้าไปจะก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อเยื่อบุเมือก กัดกร่อนเยื่อบุเมือก และทำให้เกิดอาการไอหายใจติดขัด ปวดหัว คลื่นไส้ อาเจียน

สัมผัสทางผิวหนัง: การสัมผัสถูกผิวหนังจะก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนัง มีฤทธิ์กัดกร่อนผิวหนังทำให้เป็นแผลไหม้อย่างรุนแรง

กินหรือกลืนเข้าไป: การกลืนหรือกินเข้าไปจะมีฤทธิ์กัดกร่อน ทำให้ปาก ลำคอ ทางเดินอาหาร ตลอดจน กระเพาะ ตับ ไตเป็นแผลไหม้

สัมผัสถูกตา: การสัมผัสถูกตาจะก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อตา และอาจทำให้ตาบอดได้

การก่อมะเร็ง, ความผิดปกติ, อื่น ๆ: สารนี้ทำลายตับ ไต

7. ความคงตัวและการเกิดปฏิกิริยา (Stability and Reaction)

- สารที่ควรหลีกเลี่ยง: สารออกซิไดซ์ ความร้อน เบสแก่ กรดแก่
- สารเคมีอันตรายที่เกิดจากการสลายตัว: ก๊าซคาร์บอนมอนนอกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์
- การสลายตัวเนื่องจากความร้อน/ สภาวะที่ต้องหลีกเลี่ยง: อันตรายจากภาชนะบรรจุสามารถเกิดขึ้นได้เนื่องจากความร้อน การสลายตัวจะไม่เกิดขึ้นถ้ามีการใช้และการเก็บตามข้อกำหนดที่ระบุไว้

8. การเกิดอัคคีภัยและการระเบิด (Fire and Explosion)

จุดวาบไฟ (°C): 67, **จุดลุกติดไฟได้เอง (°ซ.):** 400, **NFPA Code:**

ค่า LEL %: 1.6, **UEL %:** 8.7, **LFL %:** -, **UFL %:** -

- สารดับเพลิงที่เหมาะสมให้ใช้คาร์บอนไดออกไซด์ ผงเคมีแห้ง หรือโฟม สำหรับดับไฟ
- น้ำอาจจะไม่สามารถดับเพลิงได้
- กรณีเกิดเพลิงไหม้ให้สวมใส่อุปกรณ์ช่วยหายใจชนิดมีถังอากาศในตัว (SCBA) พร้อมชุดป้องกันสารเคมี
- ในขณะเกิดเพลิงไหม้จะทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนมอนนอกไซด์

9. การเก็บรักษา/สถานที่เก็บ/เคลื่อนย้าย/ขนส่ง (Storage and Handling)

- เก็บในภาชนะบรรจุที่ปิดมิดชิด
- เก็บในบริเวณที่เย็นและแห้ง มีการระบายอากาศที่ดี
- เก็บห่างจากความร้อนและการสัมผัสถูกแสงแดดโดยตรง
- ชื่อในการขนส่ง: กรดเมทาครีลิก (Methacrylic acid)
- ประเภทอันตราย: 8 (สารกัดกร่อน)
- รหัสหมายเลข UN: UN 2531
- ประเภทการบรรจุหีบห่อ: กลุ่ม III

10. การกำจัดกรณีรั่วไหล (Leak and Spill)

- วิธีการปฏิบัติในกรณีเกิดการหกรั่วไหล ให้สวมใส่อุปกรณ์ป้องกันอันตราย
- อพยพคนออกจากบริเวณ
- กั้นแยกบุคคลที่ไม่เกี่ยวข้องและไม่ได้สวมใส่อุปกรณ์ป้องกันให้ออกห่าง
- มีการระบายอากาศอย่างเพียงพอในบริเวณที่สารหกรั่วไหล

- ให้ดูดซับส่วนที่หกรั่วไหลด้วยสารดูดซับประเภททราย ไดอะโตไมท์ ขี้เลื่อย
- ป้องกันไม่ให้สารเคมีรั่วไหลออกสู่สิ่งแวดล้อมโดยปราศจากการอนุญาตจากหน่วยราชการ

11. อุปกรณ์ป้องกันอันตรายส่วนบุคคล (PPD/PPE)

หน้ากากป้องกันการหายใจ

ถุงมือ

ชุดป้องกันสารเคมี

แว่นตานิรภัย

12. การปฐมพยาบาล (First Aid)

หายใจเข้าไป: ถ้าหายใจเข้าไปให้เคลื่อนย้ายผู้ป่วยออกสู่บริเวณที่มีอากาศบริสุทธิ์ ถ้าผู้ป่วยหยุดหายใจให้ช่วยผายปอดรักษาร่างกายให้อบอุ่น นำส่งไปพบแพทย์

กินหรือกลืนเข้าไป: ถ้ากลืนหรือกินเข้าไป ให้นำส่งไปพบแพทย์โดยทันที

สัมผัสถูกผิวหนัง: ถ้าสัมผัสถูกผิวหนังให้ล้างออกทันทีด้วยน้ำและสบู่โดยให้น้ำไหลผ่าน ให้นำส่งไปพบแพทย์โดยทันที

สัมผัสถูกตา: ถ้าสัมผัสถูกตา ให้เปิดตากว้างๆ และล้างออกด้วยปริมาณน้ำปริมาณมากๆ

13. ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (Environmental Impacts)

- ไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อระบบนิเวศน์ หากมีการใช้และจัดการกับผลิตภัณฑ์อย่างเหมาะสม

14. การเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ (Sampling and Analytical)

NMAM No.: -, **OSHA No.:** PV2005

วิธีการเก็บตัวอย่าง: ☐กระดาษกรอง ☐ หลอดเก็บตัวอย่าง ☐ อิมพริ้นเตอร์

วิธีการวิเคราะห์: ☐ ชั่งน้ำหนัก ☐ สเปคโทรโฟโตมิเตอร์ ☐ ก๊าซโครมาโตกราฟฟี ☐ อะตอมมิกแอบซอปชั่น

ข้อมูลอื่น ๆ:

- การเก็บตัวอย่างใช้ 708 tubes
- อัตราไหลสำหรับเก็บตัวอย่าง 24 L. ที่ 0.1 L/min.
- ใช้วิธีวิเคราะห์แบบ Liquid chromatrography ใช้ UV detector

15. การปฏิบัติกรณีฉุกเฉิน (Emergency Response)

AVERS Guide: 38, DOT Guide: 153

- กรณีฉุกเฉินโปรดใช้บริการระบบให้บริการข้อมูลการระงับอุบัติภัยจากสารเคมีทางโทรศัพท์หรือสายด่วน AVERS ที่หมายเลขโทรศัพท์ 1650

ที่มาhttp://msds.pcd.go.th

ภาคผนวก ข.

วิธีการใช้เครื่อง FT-IR, Pyris I TGA HT, MASTERSIZER X

วิธีการใช้เครื่อง FT-IR

1. เปิดเครื่องคอมพิวเตอร์เข้าไปที่หน้าจอของ Spectrum

2. เข้าไปที่ INSTRUMENT แล้วกดเข้าไปที่ INITIALIZE แล้ตอบ YES รอจนกว่าเครื่องจะแสดงว่า READY

3. ตรวจสอบดู ENERGY โดยเข้าไปที่ MONITOR แล้วเข้าไปที่ ENERGY ตรวจสอบดูว่ามี ENERGY เท่าใด

4. การ ALIGN ต้องแน่ใจว่าไม่มีสารตัวอย่างอยู่ในช่องใส่สารตัวอย่าง

5. การ RUN ให้กดที่ INSTRUMENT แล้วเข้าไปที่ SCAN BACKGROUND ตั้งชื่อ FILE NAME และ DESCRIPTION ให้กำหนด RANGE START ที่ 4,000 ถึง 400 cm^{-1} และกำหนดจำนวนครั้งของการแสกน (SCAN NUMBER OF SCAN) ตอบ OK รอจนกว่าเครื่องจะทำงาน

6. ก่อนการตรวจวัดสารตัวอย่างควรตรวจวัดสารมาตรฐานโพลีสไตรลีน (Standard polystrylene) ก่อน

7. ทำการตรวจวัดสารตัวอย่างโดยนำสารตัวอย่างมาบดผสมกับ KBr แล้วนำไปอัดเป็นแผ่นบางด้วยเครื่องมือสำหรับอัดของเครื่อง FT-IR

8. หลังจากตรวจวัดสารตัวอย่างเรียบร้อยแล้วจะได้สเปกตรัม ให้กดเข้าไปที่ PEAKS จะมีตัวเลขบอกความยาวคลื่นในแต่ละพีก

9. ถ้าตัวเลขที่แสดงตรงยอดพีกซ้อนกันมากให้กดที่ตัวเลขจะมีแถบสีเขียวเกิดขึ้นให้ลากไปวางในตำแหน่งที่ต้องการ

10. ถ้าต้องการให้แสดงตัวเลขเพิ่มในยอดพีกอื่น ให้กดที่ V-CURSOR จะปรากฏเส้นสีเขียวยาวแนวตั้ง จากนั้นเลื่อนไปในตำแหน่งยอดพีกที่ต้องการแล้ว double click จะมีตัวเลขปรากฏตรงยอดพีก

11. ถ้าต้องการปรับเปลี่ยนแกน X หรือแกน Y ให้เข้าไปที่ FORMAT แล้วเติมตัวเลขตามต้องการ

12. เข้าไปที่ FILE แล้วกด PRINT

13. เมื่อเสร็จสิ้นการวัดแล้วให้นำตัวอย่างออกจากช่องใส่สารตัวอย่างของเครื่องแล้วปิดหน้าต่างคอมพิวเตอร์แต่ละหน้า และ SHUT DOWN

วิธีการใช้เครื่อง Pyris I TGA HT

1. เปิดวาล์วที่ถังแก๊สไนโตรเจน (N_2) และถัง Air

2. เปิดวาล์วสำหรับให้แก๊สเข้าเครื่อง TGA โดยดึงฝาสีดำปรับไปที่ความดัน 20 Psi สำหรับ purge ตัวอย่าง และ 40 Psi สำหรับ purge ระบบ เสร็จแล้วดันตัวฝาปิด

3. เปิดเครื่อง TGA และเครื่องคอมพิวเตอร์ double click ที่ off line ให้เป็น online

4. เข้าสู่หน้า Method Editor-Untitled มีหัวข้อดังต่อไปนี้

Sample Info Initial State Program View Program

5. กดเลือก Sample Info ใส่ข้อมูล

Sample ID: ใส่ข้อมูลปี-เดือน-วัน-ตัวอย่างที่ (เช่น 060518-001)

Operator ID: ใส่ข้อมูลที่ต้องการ

Comment: ใส่ข้อมูลที่ต้องการ

Enter Sample Weight

Weight 0.000 mg. Zero 0.000 mW

ใส่ข้อมูลเสร็จกดที่ Browse เข้าไปที่ File ใส่ชื่อ แล้วกดบันทึกข้อมูล (Save)

6. กดเลือก Initial State ไปที่ Set initial Value ดูที่ Temperature ใส่ค่าที่ต้องการเริ่มต้นคือ 50 องศาเซลเซียส

7. กดเลือก Program แล้วไปที่

- Initial Temp.ใส่ค่าที่ต้องการเริ่มต้นเช่น 100 °C กดเลือก Add a step เลือก Temperature scan แล้วลบอันเก่าทิ้ง
- Heat from 100 °C to 9000 °C at 200 °C /min กดที่ Add a step เลือก Temperature scan อีกครั้ง To Temperature Select Value ระหว่าง 600-1,000 หรือใส่ค่าที่ 800-1,000 °C rate 20 °C /min
- Cool from 900.000 °C to 100.000 °C at 200 °C /min

8. กดที่รูป Raise Furnace เป็นการยกเตาเผาขึ้น

9. รอจนน้ำหนัก Weight คงที่ กดเข้าไปที่รูป Get sample weight zero เพื่อทำให้น้ำหนักเป็นศูนย์

10. กดที่รูป Low Furnace เพื่อยกเตาเผาลง

11. ใส่สารตัวอย่างลงใน Pan โดยใช้ฐานรอง pan ไว้ (ใส่น้ำหนักสารไม่เกิน 100 มิลลิกรัม)

12. กดที่รูป Raise Furnace เพื่อยกเตาเผาขึ้น

13. กดที่รูป Go to temperature รอจนอุณหภูมิถึง initial temp.

14. กดที่รูป Get sample weight

15. กดที่รูป Start/Stop a Method เพื่อที่จะสั่งให้อุณหภูมิขึ้นตามต้องการ

16. ไปที่เมนูบาร์ เลือก Window กดที่ 1. Instrument Viewer-untitled เพื่อดูกราฟ

17. ไปที่เมนูบาร์ เลือก Display กด Auto Rescale เปลี่ยนแกน X จาก Time เป็น Temperature โดยกดที่กราฟรูปสุดท้ายที่เมนูบาร์รอจนเครื่องทำงานเสร็จ

18. การคำนวณไปที่เมนูบาร์ กด Math เลือก Derivative กราฟของ Derivative เกิดขึ้น

19. ที่เมนูบาร์ กด Cal เลือก On set กด mouse ค้างลาก * ไปวางที่จุดกราฟ Derivative เริ่มหลอมเหลว และลาก * ที่สองไปวางที่จุดตรงยอดพีคของกราฟ Derivative

20. กด Cal 2 ครั้ง

วิธีการใช้เครื่อง MASTERSIZER X

1. เปิดเครื่องคอมพิวเตอร์เลือกโปรแกรม Sizer
2. เปิดสวิตซ์แสงเลเซอร์ที่เครื่อง Mastersizer X
3. เช็คแสงเลเซอร์ Laser Power จะต้องมีแถบสีเขียว
4. ถ้าไม่ได้แถบสีเขียว ต้องทำความสะอาดเลนซ์ที่แสงเลเซอร์ผ่าน
5. เลือก Measure แล้วกดเข้าไปที่ Document ใส่รายละเอียด ชื่อผู้ทำการวัด และสารที่จะวัด
6. ที่เครื่องกระจายอนุภาค เติมสารละลายที่ใช่สำหรับเป็นตัวพา
7. กด SAMPLE PUMP ตั้งค่าที่ไม่เกิน 7
8. วัดค่า Background
9. เติมสารที่ต้องการวัดขนาดอนุภาค
10. กด U/SONIC STIR ตั้งค่าที่ไม่เกิน 7
11. กด U/SONIC ตั้งค่าขึ้นอยู่กับสารที่วัด
12. เติมสารจนค่า % Obscuration อยู่ประมาณ 15-30% สังเกตจะขึ้นแถบสีเขียว
13. กด Space bar เพื่อวัดค่าขนาดของอนุภาค รอจนเครื่องคำนวณเสร็จ
14. พิมพ์ข้อมูลแล้วเลือก Report
15. ถ้าไม่ต้องการวัดอีก ปิดหลอดกำเนิดแสงเลเซอร์ที่เครื่อง Masterizer X
16. ออกจากโปรแกรม Sizer แล้วไปที่โปรแกรม Main แล้วปิดเครื่อง แล้วเข้าไปที่ Exit window และปิดเครื่องคอมพิวเตอร์

ภาคผนวก ค.
การคำนวณพารามิเตอร์ต่างๆ

1. การสร้างกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานคาเฟอีน ธีโอโบรมีน และธีโอฟิลลีน

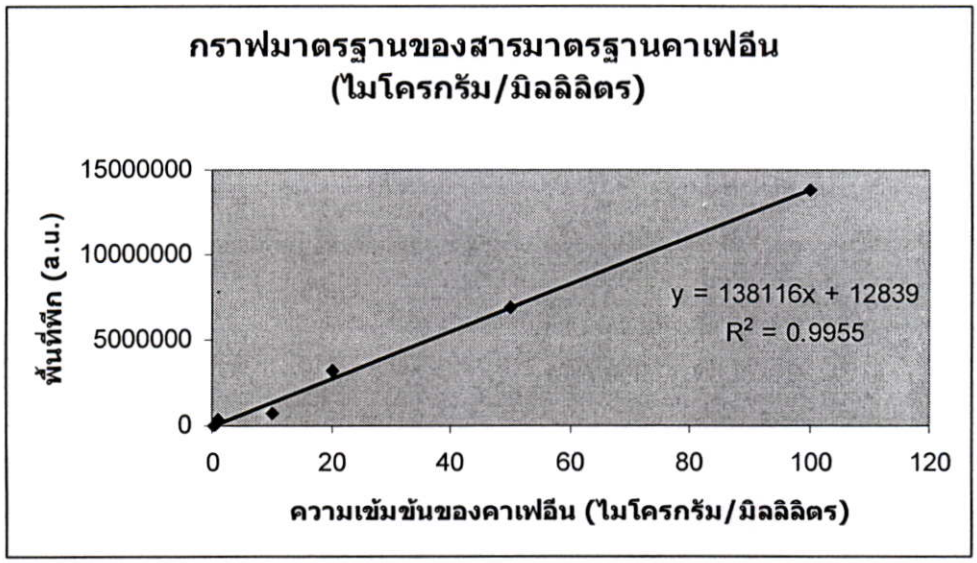
ตารางที่ ค1 ผลการทดลองจากการตรวจวัดสารมาตรฐาน 3 ชนิด คือ คาเฟอีน ธีโอโบรมีน และธีโอฟิลลีน

สารมาตรฐาน	ความเข้มข้น	พื้นที่ใต้พีก			ค่าเฉลี่ย(Means)
คาเฟอีน	0.25	38576	35697	0	24757.66667
	0.5	49505	48626	0	32710.33333
	1.0	402850	423961	413953	413588
	10	718339	758445	800113	758965.6667
	20	3234631	3234919	3325379	3264976.333
	50	6881232	6831706	6989959	6900965.667
	100	16908040	11675586	12805844	13796490
ธีโอโบรมีน	0.25	14343	13939	10972	138084.67
	0.5	20531	20031	19792	20118
	1.0	33388	34414	33950	33917.33
	10	352578	395793	357705	368692
	20	732597	736289	737083	735323
	50	1781975	1769437	1742115	1764509
	100	3492427	3475326	3480748	3482834
ธีโอฟิลลีน	0.25	51098	49393	38354	46281.67
	0.5	20327	19569	20087	19994.33
	1.0	41351	38700	39279	39776.67
	10	395760	357930	376872	376854
	20	837083	835297	836289	836223
	50	1782253	1782115	1789473	1784614
	100	3591859	3586437	3593538	3590611

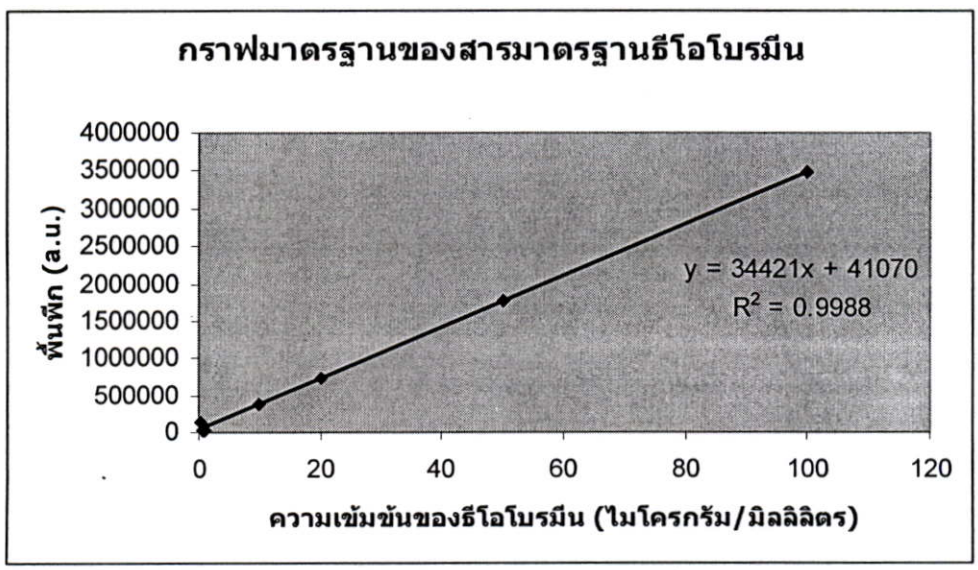
หมายเหตุ พื้นที่ใต้พีกได้จากค่าเฉลี่ยซึ่งทำการวัดทั้งหมด 3 ซ้ำ

นำผลการทดลองจากตารางที่ ค1 มาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีกของสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด ดังกราฟรูปที่ ค1-ค3 ตามลำดับ จากรูปกราฟทำให้ทราบถึงความชัน สัมประสิทธิ์

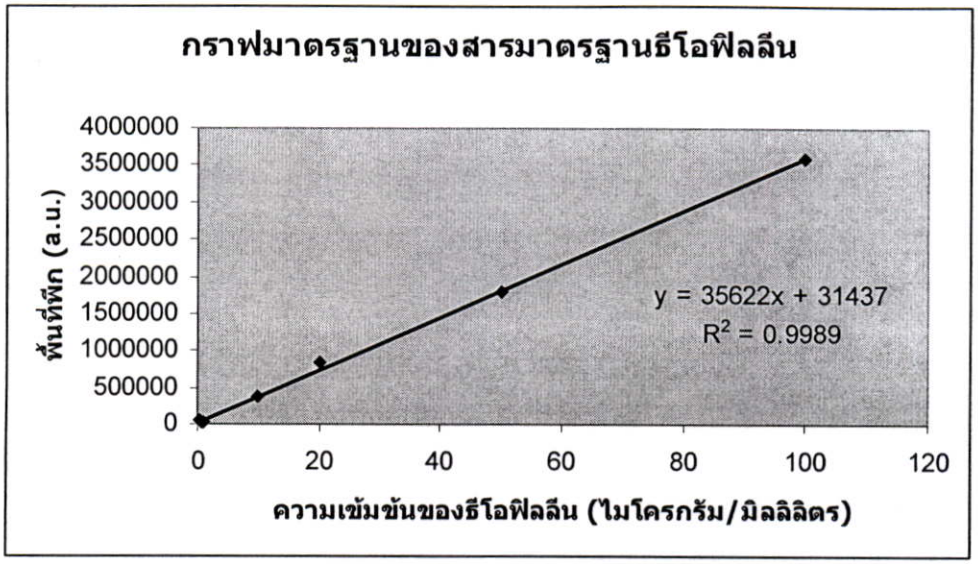
สหสัมพันธ์ (R^2) และ ความสัมพันธ์ที่มีลักษณะเป็นเชิงเส้น และจากกราฟทั้งสามรูปสามารถสรุปข้อมูลได้ดังตารางที่ ค2



รูปที่ ค1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีกและความเข้มข้นต่าง ๆ ของคาเฟอีน



รูปที่ ค2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีกและความเข้มข้นต่าง ๆ ของธีโอโบรมีน



รูปที่ ค3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีกและความเข้มข้นต่าง ๆ ของธีโอฟิลลีน

ตารางที่ ค2 สรุปผลข้อมูลที่ได้จากกราฟ ในรูป ค1- ค3

สารเคมี	ช่วงความเข้มข้นของสารที่มีความสัมพันธ์เป็นเชิงเส้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ความชัน	สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2)
คาเฟอีน	0-100	27552	0.9888
ธีโอโบรมีน	0-100	34421	0.9988
ธีโอฟิลลีน	0-100	35622	0.9989

2 การหาค่า Reproducibility

การหาค่า reproducibility ภายในพอลิเมอร์ลอกแบบอันเดียวกัน

ค่า reproducibility ในการวิเคราะห์บอกได้โดยใช้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviation, RSD) ซึ่งหาได้โดยการหารค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานด้วยค่าเฉลี่ย ค่า RSD นิยมนำเสนอในรูปของค่าเปอร์เซนต์เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) หรือ เรียกว่าค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of variation, *CV*) คำนวณโดยสูตร

ตารางที่ ค5 ข้อมูลและผลการหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของพอลิเมอร์ลอกแบบชนิด P_3

ครั้งที่	พื้นที่ใต้พีก		
	คาเฟอีน	ธีโอโบรมีน	คาเฟอีน
1	1303849	9589628	1303849
2	1398200	9438646	1398200
3	1375263	9481243	1375263
ค่าเฉลี่ย	1359104	9503172.33	1359104
S	49207.34	77843.19	49207.34
%RSD	3.62	0.82	3.62

3 การหาค่าร้อยละการได้คืนกลับ %Recovery

ความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์ หมายถึงความใกล้เคียงระหว่างผลการวิเคราะห์กับค่าที่แท้จริง

การตรวจวัดความถูกต้องแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์กระทำได้โดยการวิเคราะห์หาปริมาณของสารที่ทราบความบริสุทธิ์ (เช่น สารมาตรฐานอ้างอิง) โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ที่ต้องการตรวจสอบความถูกต้อง หรือโดยเปรียบเทียบผลของวิธีนี้กับอีกวิธีหนึ่งที่เคยถูกใช้อยู่แล้ว การวิเคราะห์ถ้าไม่สามารถเตรียมขึ้นได้ก็ยอมโดยการเติมสารที่ต้องการวิเคราะห์ลงไปในผลิตภัณฑ์ (spike)

วิเคราะห์ตัวอย่างที่เตรียมขึ้น หรือผลิตภัณฑ์ที่เติมสารที่ต้องการวิเคราะห์ลงไปในปริมาณที่ทราบแน่นอน คำนวณ และแสดงค่าความถูกต้องของการตรวจสอบโดยเทียบปริมาณสารที่เติมลงไป (% Recovery)

การคำนวณค่าร้อยละการได้คืนกลับของปริมาณสารที่เติมลงไป (% Recovery)

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(\text{ความเข้มข้นของ spike sample} - \text{ความเข้มข้นของ sample})}{\text{ความเข้มข้นของ Standard ที่เติมลงไป}} \times 100$$

$$\%\text{RSD, } CV = \frac{S}{\overline{X}} \times 100$$

เมื่อ S = standard deviation

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N}(x_i - \overline{X})^2}{N-1}}$$

และ $\overline{X}$ = ค่าเฉลี่ยของการวัดจำนวน N ครั้ง (Mean of N measurements)

$$\overline{X} = \frac{\sum_{i=1}^{N} x_i}{N}$$

N = จำนวนครั้งที่ทดลองทั้งหมด

ในที่นี้ค่า reproducibility หาได้โดยนำพอลิเมอร์ทั้งสองชนิด คือพอลิเมอร์ลอกแบบชนิด P_2 และ P_3 มาทำการสกัดและวิเคราะห์สารมาตรฐานผสมทั้งหมด 3 ชนิด คือ คาเฟอีน ธีโอโบรมีน และธีโอฟิลลีนที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้วนำพื้นที่ใต้พีกที่ได้ไปคำนวณหาค่าเปอร์เซนต์เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ซึ่งได้ผลดังตารางที่ ค4 และ ค5

ตารางที่ ค4 ข้อมูลและผลการหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของพอลิเมอร์ลอกแบบชนิด P_2

ครั้งที่	พื้นที่ใต้พีก		
	คาเฟอีน	ธีโอโบรมีน	ธีโอฟิลลีน
1	1060003	9189428	9548757
2	1026535	9137646	8988426
3	1079317	9471233	9248757
ค่าเฉลี่ย	1055285	9266102.33	9261980
S	26705.42	179525.2	280399.4
%RSD	2.53	1.94	3.03

ตารางที่ ค6 แสดงข้อมูล และผลการหา % Recovery ของพอลิเมอร์ลอกแบบทั้ง 4 ชนิด

Fractions	%Recovery			
	P	P_1	P_2	P_3
Load caffeine (50 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	0.20	0.0	0.0	0.0
Load buffer (0.05 M CH_3COONH_4-NH_3(aq), pH 9)	8.16	1.10	0.1	0.15
1st washing (0.05 M CH_3COONH_4-NH_3(aq), pH 9)	7.58	1.63	0.2	0.45
1^{st} elution (ACN-TEA 1 %)	11.20	80.6	90.31	89.65
2^{nd} elution (ACN-CH_3COOH 1%)	60.5	16.1	9.35	20.30
Total	87.64	99.43	99.96	113.55

ภาคผนวก ง.

Solid Phase Extraction (SPE)

เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง

Solid Phase Extraction (SPE)

การเตรียมตัวอย่างก่อนฉีดเข้าระบบโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) เป็นขั้นตอนที่สำคัญมาก เนื่องจากสิ่งสกปรกในตัวอย่างสามารถทำให้คอลัมน์และระบบอุดตันได้ จึงต้องมีการเตรียมตัวอย่างที่ดีและถูกต้อง

การเตรียมตัวอย่างเป็นขั้นตอนที่ต้องใช้เวลามาก ประมาณได้เป็น 60-70% ของเวลาทั้งหมดที่นักเคมีใช้ไปกับการวิเคราะห์ นอกเหนือจากเวลาที่ต้องเสียไปแล้ว เรายังสูญเสียตัวทำละลายไปอีกด้วย จากการประเมินทั่วไปพบว่าเทคนิคในการเตรียมตัวอย่างที่ใช้กันมากที่สุดคือ Liquid-Liquid Extraction (LLE) LLE มีข้อเสียที่อาจเกิด emulsion กรณีใช้กับตัวอย่างที่เป็นเนื้อเยื่อ การที่ต้องใช้เครื่องแก้วมากมายทำให้เป็นการเพิ่มสิ่งสกปรกต่างๆ ที่จะมารบกวนการวิเคราะห์ให้มากขึ้น ผลที่ได้ก็อาจไม่ถูกต้อง solvent ที่ใช้มีราคาและใช้ในปริมาณมาก ดังนั้นเราควรลดประมาณการใช้ลงและควรคำนึงถึงการทิ้งตัวทำละลายเหล่านั้นหลังการใช้งานว่ามีผลต่อสิ่งแวดล้อมอย่างไรด้วย

Solid Phase Extraction (SPE) เป็นเทคนิคการเตรียมตัวอย่างที่สามารถนำมาใช้แทน LLE โดยไม่ต้องสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมาก วิธีของ SPE มีหลักการคล้ายกับ LLE ตรงที่ใช้หลักการ partition เหมือนกัน โดยที่ SPE ไม่ได้เกิดระหว่างของเหลวกับของเหลวเหมือนกับของ LLE แต่จะเกิดระหว่างของแข็ง (คือ absorbent ที่อยู่ในแท่ง SPE) กับของเหลวหรือตัวทำละลาย

1. ข้อได้เปรียบของการใช้ SPE ในการสกัดเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค LLE

1. ลดปริมาณตัวทำละลายที่จำเป็นต้องใช้
2. ประหยัดเวลา
3. ลดขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างให้น้อยลงหรือเหลือขั้นตอนเดียว
4. สามารถใช้กับระบบการเตรียมตัวอย่างแบบอัตโนมัติได้
5. เลือกใช้ได้กับตัวทำละลายหลายชนิด

ดังนั้นจะเห็นว่า SPE เป็นเทคนิคที่ปัจจุบันนิยมใช้กันมากที่สุดในการเตรียมตัวอย่างการใช้ SPE ไม่เพียงแต่ทำความสะอาดตัวอย่างขจัดสารที่รบกวนการวิเคราะห์ออกเท่านั้น แต่ยังเป็นการช่วยอายุการใช้งานของคอลัมน์ ด้วยเหตุนี้ทางผู้วิจัยจึงได้นำเอา SPE มาใช้ในการสกัดน้ำนม

2. ขั้นตอนการสกัดด้วย SPE

Condition : เป็นการเตรียม sorbent หรือ packing ที่บรรจุอยู่ในแท่ง SPE ให้พร้อมรองรับสารตัวอย่าง

Load : เป็นการใส่ตัวอย่างลงไปเพื่อให้จับกับ sorbent

Rinse : เป็นการขจัดเอาสารที่จับกับ sorbent ได้น้อยหรือจับอยู่ที่ส่วนผิวของ sorbent ออก

Elusion : เป็นการดึงเอาสารที่เราสนใจที่เกาะกับ absorbent ออกเพื่อนำไป วิเคราะห์ต่อไป

Solid Phase Extraction เป็นวิธีที่เตรียมสารตัวอย่างสำหรับ HPLC วิธีหนึ่งที่ใช้หลักการ partition เหมือนกับวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย แต่ต่างกันที่ใช้ของแข็งเป็นตัวจับสารที่เราสนใจ โดยของแข็งจะถูกบรรจุอยู่ในแท่ง SPE เรียกว่า Sep-Pak

3. ข้อดีของการใช้ Sep-Pak ในการเตรียมสารตัวอย่างสำหรับ HPLC มีดังนี้

- ประหยัดค่าใช้จ่าย เนื่องจากใช้สารละลายและอุปกรณ์น้อย
- ให้ค่า Recovery สูง เพราะมีการถ่ายเทสารน้อยครั้ง
- ประหยัดเวลา เพราะมีขั้นตอนการเตรียมน้อย
- มีความปลอดภัยสูง ไม่เกิดปฏิกิริยารุนแรง
- ให้ความแม่นยำสูงเมื่อทำปริมาณวิเคราะห์ ไม่เกิดการปนเปื้อนจากสารอื่น
- สารไม่เปลี่ยนสภาวะ สามารถนำมาวิเคราะห์ได้ทันที
- ลดอันตรายจากสารตัวอย่างที่ระเหยได้ง่าย ลดปัญหาเครื่องแก้วแตก

ตารางที่ ง1 แนะนำการเลือกใช้ Sep-Pak Cartridges

Sorbent หรือ Packing Material	คุณสมบัติที่ผิว	การวิเคราะห์ที่ใช้
C_{18}	Hydrophobic bonded silica	- แยกสาร Hydrophobic ออกจากสารละลาย aqueous - ยาและ metabolite ของยา ในเลือด น้ำเหลือง และปัสสาวะ - สารอินทรีย์ปริมาณน้อยในตัวอย่างน้ำเสีย - กรดอินทรีย์ ในพวกเครื่องดื่มและไวน์

ตาราง ง1 (ต่อ)

Sorbent หรือ Packing Material	คุณสมบัติที่ผิว	การวิเคราะห์ที่ใช้
C_8	Hydrophobic non-polar bonded	- แยกสาร Hydrophobic ออกจากสารละลาย aqueous - ใช้เมื่อต้องการให้สาร retain น้อยลงกว่า C_{18} - ยาและ metabolite ของยา ในเลือด น้ำเหลือง และปัสสาวะ - Peptide ในตัวอย่างเลือด น้ำเหลือง และของเหลวในร่างกาย
Silica	Hydrophilic Polar (Neutral)	- แยกสารสารละลายที่มี polarity ต่ำถึงปานกลางออกจากสารละลาย non-aqueous - ไวตามิน A D E K - ยาฆ่าแมลง - ไขมันชนิดต่างๆ - สารสกัดจากธรรมชาติ pigment จากพืช - สารอินทรีย์สังเคราะห์
Florisil	Hydrophilic Polar (Slightly basic)	- แยกสารสารละลายที่มี polarity ต่ำถึงปานกลางออกจากสารละลาย non-aqueous - วิธีตาม AOAC และ EPA - ยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช ในอาหารและอาหารสัตว์ - ตัวอย่างที่มีไขมันสูง - สาร Polychlorinated biphenyls ใน Transformer oil

ตาราง ง1 (ต่อ)

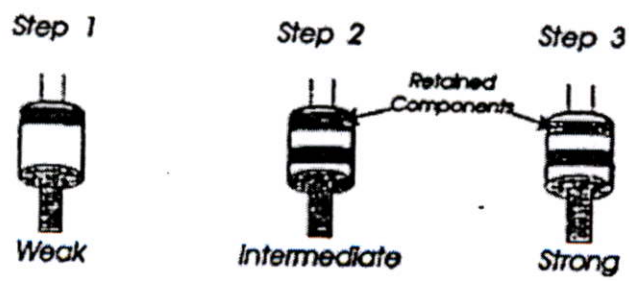
Sorbent หรือ Packing Material	คุณสมบัติที่ผิว	การวิเคราะห์ที่ใช้
Alumina A	Hydrophilic Polar (Acidic)	- แยกสาร Hydrophilic ออกจากสารละลาย non-aqueous - มีสมบัติเป็น Cation exchanger เล็กน้อย - แยกน้ำตาล คาเฟอีนในเครื่องดื่มประเภทโคลา - ไวตามินในอาหารและอาหารสัตว์ - ยาปฏิชีวนะ - สารผสมในอาหารและอาหารสัตว์
Alumina N	Hydrophilic Polar (Neutral)	- แยกสาร Hydrophilic ออกจากสารละลาย non-aqueous - ยาฆ่าวัชพืช - ปิโตรเลียมและน้ำมัน - สารผสมในอาหาร - สารอินทรีย์สังเคราะห์
Alumina B	Hydrophilic Polar (Basic)	- แยกสาร Hydrophilic ออกจากสารละลาย non-aqueous - มีสมบัติเป็น Cation exchanger เล็กน้อย - ยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช น้ำเสีย - พวก Steroid ต่างๆ
Accell plus CM	Hydrophilic Polar (Acidic) Cation exchanger	- แยกสาร Ion ที่มีประจุบวก ในสารละลาย aqueous หรือ non-aqueous - สกัดโปรตีน เอนไซม์ และ Immunoglobulin ต่างๆ ที่มีสภาวะเป็นด่างอ่อน - สารอินทรีย์สังเคราะห์ - แยก Peptide ขนาดต่างๆ

ตาราง ง1 (ต่อ)

Sorbent หรือ Packing Material	คุณสมบัติที่ผิว	การวิเคราะห์ที่ใช้
Aminopropyl NH2	Hydrophilic moderately polar (Slightly basic)	- ใช้เป็น weak anion exchanger - ยาและ metabolite ของยา - อุตสาหกรรมปิโตรเลียม และ lube oil - Saccharides -สารพวก Phenol และ pigment พวก Phenolic
Diol	Hydrophobic moderately non-polar neutral phase	- วิเคราะห์สารที่ละลายใน aqueous หรือ organic - ธาตุที่มีปริมาณน้อยในน้ำ - ยาปฏิชีวนะในเครื่องสำอาง - แยก Peptide และโปรตีนต่างๆ

4. ขั้นตอนการใช้ Sep-Pak ในการเตรียมสารตัวอย่าง

1. นำสารตัวอย่างผ่าน Sep-Pak โดยสารตัวอย่างละลายใน weak solvent (ตัวทำละลายที่ทำให้สารีที่สนใจจับกับ Sep-Pak ได้ โดยไม่พาสารที่สนใจหลุดออกมาด้วย) โดยพิจารณาจากคุณสมบัติของสารตัวอย่างที่เราสนใจและชนิดของ Sep-Pak ตามหลักการของ Chromatography
2. ใช้สารละลายที่เป็นIntermediate solvent ผ่าน Sep-Pak เพื่อชะสารที่ไม่ต้องการออกจาก Sep-Pak หรือเพื่อต้องทำการแยกชนิดของสารที่สนใจออกมา
3. ใช้สารละลายที่เป็น Strong solvent เพื่อชะสารที่เราสนใจออกขาก Sep-Pak หรือ เพื่อไล่สารที่ตกค้างใน Sep-Pak ออก

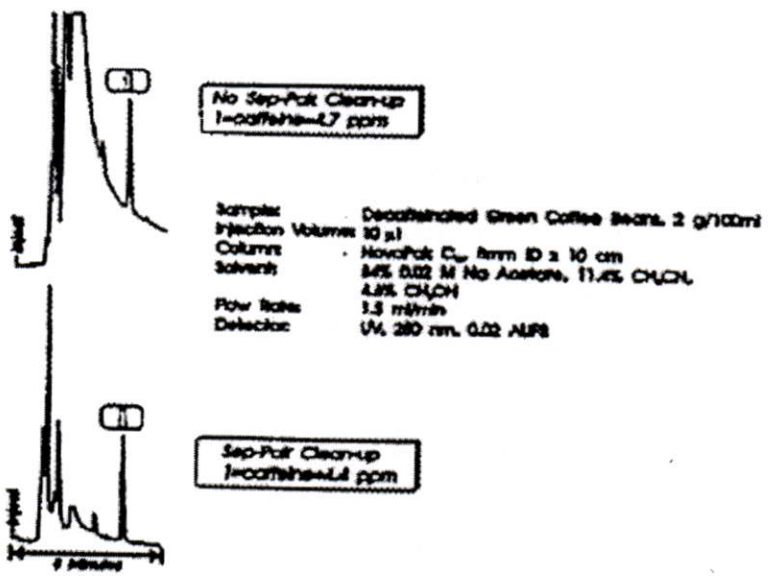


รูปที่ ง1 แสดงขั้นตอนการใช้ Sep-Pak C_{18} Cartridge ในการเตรียมสารตัวอย่าง

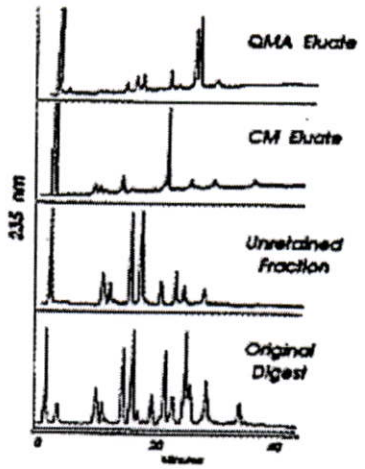
5. หลักการใช้งานทั่วไปของ Sep-Pak Cartridge

การทำความสะอาดตัวอย่าง เป็นวิธีที่ใช้มากที่สุดในการกำจัดสิ่งเจือปนที่ไม่ต้องการออกจากตัวอย่าง เพื่อเพิ่มความถูกต้องแม่นยำในการคำนวณทางด้านปริมาณวิเคราะห์ ซึ่งจะใช้ได้ดีกับตัวอย่างที่มีปริมาณน้อย

การเตรียมสารตัวอย่างที่ยุ่งยากซับซ้อน อาทิเช่น ตัวอย่างประเภทที่มีโปรตีนสูง ได้แก่ตัวอย่างประเภทเนื้อเยื่อต่าง ๆ ซึ่งก่อนที่จะนำตัวอย่างผ่าน Sep-Pak ต้องมีการปรับสภาพของตัวอย่างให้เหมาะสมเสียก่อน โดยทำให้เนื้อเยื่ออยู่ในรูปของสารละลายโดยการนำไปย่อย เป็นต้น สารที่ได้หลังจากการย่อยมักจะประกอบไปด้วยสารประกอบหลายชนิดที่มีคุณสมบัติต่างกัน ถ้านำมาฉีดเข้าสู่ระบบ HPLC โดยไม่ผ่าน Sep-Pak อาจเกิดปัญหาของการแยกของพีคไม่ชัดเจน



รูปที่ ง2 แสดงโครมาโทแกรมเปรียบเทียบระหว่างสารตัวอย่างก่อน และหลังผ่าน Sep-Pak



รูปที่ ง3 โครมาโทแกรมแสดงสารประกอบที่ได้จากการนำตัวอย่างผ่าน Sep-Pak เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่าน Sep-Pak

การเตรียมสารตัวอย่างที่มีปริมาณต่ำ ได้แก่ ตัวอย่างทางด้านสิ่งแวดล้อม เช่น การวิเคราะห์หา Polyaromatic Hydrocarbon (PAH) ในแหล่งน้ำธรรมชาติ เป็นต้น วิธีนี้ทำโดยนำน้ำตัวอย่างปริมาณมาก (ประมาณ 500-1000 มิลลิลิตร) ผ่าน Sep-Pak โดยใช้ระบบปั๊มสุญญากาศทำการปั๊มด้วยอัตราที่เหมาะสมเพื่อเก็บสารตัวอย่างให้อยู่ใน Sep-Pak หลังจากนั้นจึงทำการชะสารตัวอย่างออกจาก Sep-Pak

6. การเลือกใช้ Sep-Pak ในการเตรียมสารตัวอย่าง

การเลือกโดยพิจารณาจากคุณสมบัติของสารตัวอย่าง

- ตรวจสอบคุณสมบัติของสารตัวอย่างทั้งหมด ได้แก่ คุณสมบัติการละลาย ความมีขั้ว-ไม่มีขั้ว ความเสถียรของสารตัวอย่าง เป็นต้น
- เลือกชนิดของ Sep-Pak ให้เหมาะสมกับสารตัวอย่าง โดยให้สารที่สนใจสามารถจับกับ Packing ที่บรรจุใน Sep-Pak ได้ หรืออาจพิจารณาจากระบบ HPLC ที่มีอยู่ เช่น Reverse Phase หรือ Normal Phase
- เลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการใส่ตัวอย่างลงใน Sep-Pak และเลือกตัวทำละลายที่ใช้ชะสารออกจาก Sep-Pak

การเลือกจาก Waters Sep-Pak Cartridge Application Bibliography

Waters Sep-Pak Cartridge Application Bibliography เป็นหนังสือที่รวบรวมเกี่ยวกับ Application ในการวิเคราะห์สารตัวอย่างโดยใช้ Sep-Pak สำหรับเตรียมสาร ภายในหนังสือจะแสดงชื่อสารที่ต้องการ

วิเคราะห์ ประเภทของตัวอย่าง ชนิดของ Sep-Pak ที่ใช้ ตลอดจนเอกสารอ้างอิงจากวารสารที่ได้รับการตีพิมพ์ในทางวิชาการซึ่งมีมากกว่า 2000 เรื่อง หนังสือเล่มนี้สามารถขอดูได้จากบริษัทหรือแจกให้ในกรณีซื้อ Sep-Pak ในปริมาณมาก

Sep-Pak นี้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งซึ่งจะช่วยในการเตรียมสารตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ด้วยระบบ HPLC เป็นเรื่องที่ง่ายขึ้นเพราะเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็ว ประหยัดและปลอดภัยในการทำงาน สามารถนำไปใช้กับตัวอย่างได้หลายชนิด นอกจากนี้ยังจะช่วยให้ผลการวิเคราะห์ที่ได้มีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น

7. การเลือกตัวทำละลาย

การเลือกตัวทำละลายจะมีผลต่อการเตรียมตัวอย่างในแง่ที่ว่าจะได้ตัวอย่างออกมาสะอาดแค่ไหน และได้ค่า recovery เป็นอย่างไร ถ้าเราเลือกตัวทำละลายได้เหมาะสมสำหรับ rinse หรือ elute ตัวอย่าง ตัวอย่างก็จะสะอาด และได้ค่า recovery ดี การเลือกสามารถทำได้ง่ายด้วยการทดลองใช้ solvent ที่มี strength ต่างๆ กัน เหมือนกับหลักการเลือกตัวทำละลายและคอลัมน์ ในระบบ HPLC เราจะ load สารที่เราสนใจลงไปบน sorbent สารที่เราสนใจควรมีความเข้มข้นพอเหมาะต่อไป เราจะเลือกใช้ตัวทำละลายเป็นชุดๆ ที่ทราบปริมาตร แล้วค่อยๆเพิ่ม strength ขึ้นเรื่อยๆ แล้วเก็บแต่ละส่วนมาตรวจสอบว่า สารที่เราสนใจถูก elute ออกมาเท่าใด

8. อัตราการไหล (Flow rate)

การที่จะปรับสภาพของ sorbent ให้เรียบร้อยก่อน load ตัวอย่าง การ load ตัวอย่างและกระบวนการ elute จะต้องทำที่อัตราการไหลของตัวทำละลายที่เหมาะสม เพื่อไม่ให้เกิดปัญหาจากตัวอย่างไม่ถูกกักหรือ retain อย่างสมบูรณ์ หรือไม่ถึง equilibrium โดยทั่วไปแล้ว เราสามารถปรับสภาพ cartridge ได้โดยใช้อัตราการไหลสูงถึง 25 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนการ load ตัวอย่างและการ elute นั้นจะดีที่สุดเมื่อเราใช้อัตราการไหลไม่เกิน 10 มิลลิลิตรต่อนาที แต่ก็เป็นไปได้ที่ว่าค่า recovery อาจจะยอมรับได้เมื่อเราใช้อัตราการไหลสูงถึง 20 มิลลิลิตรต่อนาที (ซึ่งควรตรวจสอบโดยใช้ standard เสียก่อน) กรณีใช้ sorbent ซึ่งเป็นพวก ion exchange จะแนะนำให้ใช้อัตราการไหลต่ำกว่า เช่น 1-2 มิลลิลิตรต่อนาที Sep-Pak บางชนิดเช่น Sep-Pak light จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กกว่าแบบอื่น ก็ให้ลดอัตราการไหลลง 3 เท่า

เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูง

1. หลักการ

เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่เป็นของเหลวจะถูกปั๊มผ่านคอลัมน์แยกสารที่เป็นท่อบรรจุด้วยอนุภาคของแข็งซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสอยู่กับที่ (Stationary phase) เมื่อตัวอย่างซึ่งเป็นองค์ประกอบหลายชนิดละลายอยู่ในรูปของเหลว ถูกนำเข้าสู่ระบบปกติโดยการฉีดด้วยปริมาตรจำกัดที่จุดฉีด (Injector) ก่อนเข้าสู่คอลัมน์และแพร่กระจายเข้าสู่ระบบการไหล หน้าที่ของเฟสเคลื่อนที่ คือล้างตัวอย่างในขณะที่ไหลผ่านคอลัมน์ ทำให้เกิดการแยกองค์ประกอบแต่ละชนิดออกจากกัน อันเนื่องมาจากความแตกต่างของแรงที่เกิดเนื่องด้วยอันตรกิริยา ขององค์ประกอบกับเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ แต่ละองค์ประกอบจะใช้เวลาตั้งแต่เริ่มฉีดจนกระทั่งออกจากปลายคอลัมน์ซึ่งเป็นช่วงเวลาส่วนใหญ่ของการเคลื่อนที่ เป็นช่วงเวลาที่เป็นคุณสมบัติเฉพาะตัว (Characteristic time) ของแต่ละสาร แต่อย่างไรก็ดีต้องระมัดระวังว่าภายใต้สภาวะแวดล้อมของการแยกนั้น สารบางชนิดมีคุณสมบัติใกล้เคียงกัน อาจใช้เวลาในการแยกใกล้เคียงกันจนเกิดการทับซ้อนกันได้ กฎโดยทั่วไปที่เกี่ยวข้องกับการแยกคือ องค์ประกอบใดที่สามารถเกิดอันตรกิริยาหรือสามารถกระจายตัวอยู่ในชั้นของเฟสอยู่กับที่ได้ดีกว่า ก็จะใช้อยู่ในคอลัมน์ได้นานกว่าและในทางตรงกันข้าม สารใดที่มีอันตรกิริยาหรือสามารถกระจายตัวอยู่ในชั้นของเฟสเคลื่อนที่ได้ดีกว่า ก็จะถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็วกว่า หรือใช้เวลาในคอลัมน์น้อยนั่นเอง

เฟสอยู่กับที่ (Stationary phase)

ลักษณะของเฟสอยู่กับที่จะทำการบรรจุอยู่ในคอลัมน์ ใน LC หรือ HPLC วัสดุเหล่านี้สามารถจัดประเภทได้เป็น rigid gels, semi-rigid gels และ soft gels เฟสอยู่กับที่ที่นิยมคือ C_{18} alkyl group ซึ่งจะเกิดพันธะที่พื้นผิว silica (silica surface) ส่วนใหญ่นิยมใช้ silica gel เป็นเฟสอยู่กับที่ ใน open-column chromatography ดั้งเดิม และ TLC ส่วนใหญ่มักจะใช้ reverse-phase chemically-bonded packing ในการวิเคราะห์ ใน HPLC ส่วนใหญ่ใช้ใน biological sciences การวิเคราะห์โดยมากเป็น water-soluble หรือ solute-stationary phase mobile phase interactions สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณได้ทั้งคู่

silica gel มีพื้นที่ของการใช้ที่มันที่เข้ากันได้อย่างยอดเยี่ยม อย่างไรก็ดีส่วนมากมันได้รับการสนับสนุน adsorbent เพื่อใช้ในการเตรียมหรือการแยก ง่ายต่อการนำกลับมาใช้ โดยการกลั่นเป็นข้อได้เปรียบของ silica gel และ other normal-phase เป็น packing ที่นิยมมากกว่า เพื่อการแยกของสารประกอบเป็นกลุ่ม และเพื่อการแยกของ isomers reversed-phase packing บนที่มีส่วนเกี่ยวข้องอื่นๆ น่าจะเป็นที่นิยม

เพื่อการแยกของ homologues และเพื่อสารประกอบซึ่งคงสภาพเดิมอย่างแข็งแกร่ง หรือเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า silica gel

การเลือก Stationary phase ควรจะเน้นที่ข้อแตกต่างของการแยกที่อยู่ในสารประกอบ ความแตกต่างในคุณสมบัติ และเลขขั้วของหมู่ function, normal phase packing มีความแตกต่างกับ GC คือ GC ทำที่อุณหภูมิสูง เฟสอยู่กับที่อาจเพิ่ม back ground อย่างต่อเนื่องที่ detector ซึ่งไม่พบใน HPLC นอกจาก PH ของเฟสเคลื่อนที่ทำให้เฟสอยู่กับที่มีประสิทธิภาพเสื่อมลง กรณีทำให้เพิ่ม back ground และลด chromatographic performance

เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase)

HPLC ต้องการเฟสเคลื่อนที่ซึ่ง analyte สามารถละลายได้ การแยกของ HPLC ส่วนใหญ่ใช้ชนิด Reversed phase chromatography คือเฟสเคลื่อนที่ที่มีขั้วมากกว่าเฟสอยู่กับที่ในระบบนี้ analyte ที่มีขั้วมากกว่า จะ elute รวดเร็วกว่า analyte ที่มีขั้วน้อยกว่า

การการเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยตัวทำละลายเดี่ยวและตัวทำละลายผสมซึ่งมีประสิทธิภาพในการแยกอาจไม่เพียงพอ แต่เฟสเคลื่อนที่สามารถใช้ในขอบเขตที่กว้าง แม้จะมีปัญหาอยู่เมื่อของผสมประกอบด้วย analyte ที่มีขั้วสูง ซึ่งจะใช้เวลานาน ส่วนใน non-polar analyte ให้ผลในทางตรงกันข้าม ในกรณีนี้การแยกจะประสบความสำเร็จโดยใช้เพียงการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ระหว่างการวิเคราะห์

เฟสเคลื่อนที่ที่ทำให้เกิดการแยกโดยองค์ประกอบคงที่ เรียกว่า isocratic elution เมื่อองค์ประกอบเฟสเคลื่อนที่ถูกเปลี่ยนเรียกว่า gradient

บัฟเฟอร์ก็สามารถใช้ได้แต่ส่วนใหญ่ใช้เป็นสารจำพวก inorganic และ involatile material เช่น potassium phosphate หรือ sodium phosphate

สารละลายบัฟเฟอร์

สำหรับ mobile phase ที่เป็น buffer solution ในการเตรียมต้องระวังหลายๆ เรื่อง เช่น

- การเลือกชนิดของเกลือให้เหมาะสมกับช่วงของ pH ที่จะใช้และต้องเลือกชนิดของเกลือที่จะไม่มีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ต้องการวิเคราะห์จนมีปัญหากับ Baseline, Noise หรือ linear range
- ในการเตรียมต้องระวังเรื่อง ionic strange และ buffer capacity ด้วย

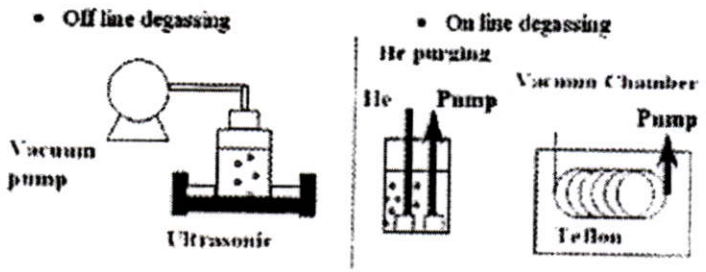
- สารละลายเมื่อเตรียมเสร็จแล้วต้องทำการกรอง (0.45 ไมครอน) ก่อนนำมาใช้ ในการใช้ยังต้องหลีกเลี่ยงที่จะไม่ทิ้งบัฟเฟอร์ ไว้ในระบบของ HPLC เพื่อป้องกันการเกิด crystallization และอาจเป็นสาเหตุของการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและเชื้อรา ซึ่งจะมีผลกระทบโดยตรงกับปั๊ม คอลัมน์ และ flow-line

เมื่อทำการเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่

สำหรับการเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่จะต้องคำนึงความสามารถในการละลายและต้องเป็นการเปลี่ยนแบบค่อยเป็นค่อยไป ในการเปลี่ยนความมีขั้วของเฟสเคลื่อนที่เพื่อให้สามารถเปลี่ยนเฟสได้อย่างสมบูรณ์และไม่ก่อให้เกิดปัญหาการตกค้างซึ่งจะเป็นปัญหาในการวิเคราะห์ และต้องระวังเรื่องการปนเปื้อนระหว่างเฟสเคลื่อนที่เดิมและเฟสเคลื่อนที่ใหม่ในการเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่

Degassing

ปริมาณของอากาศที่ละลายอยู่ในเฟสเคลื่อนที่เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่มีผลต่อ stability ของ detector baseline และ detector sensitivity การ degassing ในระบบ HPLC สามารถเลือกได้ 2 แบบคือ



รูปที่ ง4 แสดงระบบของ Degassing

ปัญหาที่เกิดจากการมีอากาศในเฟสเคลื่อนที่

การมีอากาศในเฟสเคลื่อนที่สามารถแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะคือ การเกิดฟองอากาศในเฟสเคลื่อนที่และการมีอากาศในเฟสเคลื่อนที่โดยไม่เป็นฟอง

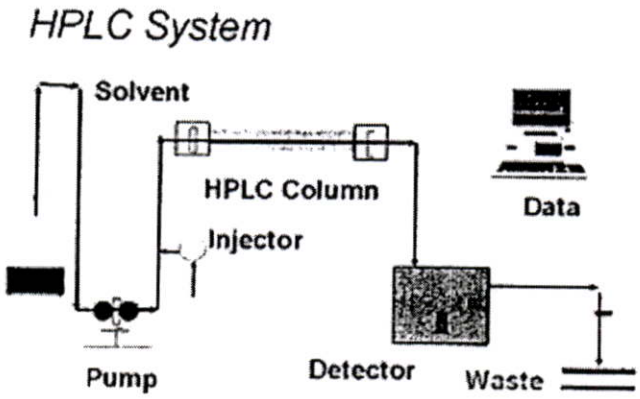
• การเกิดฟองอากาศในเฟสเคลื่อนที่

ปัญหาที่เกิดตามมาคือฟองอากาศจะเป็นสาเหตุให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ไม่คงที่ทำให้ retention time และพื้นที่พีคของสารไม่คงที่ และถ้ามีฟองอากาศในคอลัมน์จะทำให้ได้พีคที่มีลักษณะไม่สมบูรณ์ และถ้ามีการสะสมของฟองอากาศที่ตัวตรวจวัดก็จะเป็นสาเหตุของการเกิด Noise และ Baseline

• การมีอากาศในเฟสเคลื่อนที่โดยไม่เป็นฟอง

ปัญหาที่เกิดอาจมาจากการที่ออกซิเจนซึ่งละลายอยู่ทำการ oxidized ตัวอย่างหรือสารที่เป็นองค์ประกอบในเฟสเคลื่อนที่ในปริมาณมากจะทำให้ sensitivity ของ fluorescence detector ลดลงและอาจเป็นสาเหตุของการเกิด noise

2. องค์ประกอบของเครื่อง HPLC



รูปที่ ง5 แสดงองค์ประกอบของเครื่อง HPLC

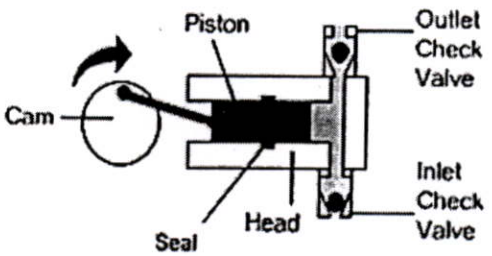
ภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase reservoir)

เป็นขวดสำหรับใส่ตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ในทางวิเคราะห์ ขวดที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่นี้ควรมีขนาดความจุประมาณ 1 ลิตร แต่ใน preparative HPLC ความจุของขวดควรมากกว่านี้ ในปัจจุบันขวดที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่นี้จะมีอุปกรณ์ที่ใช้ในการไล่อากาศที่ละลายอยู่ เช่น ออกซิเจน

จุดประสงค์ของการไล่อากาศในเฟสเคลื่อนที่คือต้องการกำจัดก๊าซออกซิเจนซึ่งอาจไปทำปฏิกิริยากับเฟสเคลื่อนที่บางชนิดได้ หรือแม้แต่กับเฟสคงที่ที่อยู่ในคอลัมน์ นอกจากนั้นยังเป็นการลดโอกาสที่จะทำให้เกิดฟองอากาศในเครื่องตรวจหาขณะทำการทดลองอยู่ การไล่ก๊าซที่ละลายอยู่นี้จะต้องทำเมื่อตัวทำละลายเป็นพวกสารมีขั้ว และมีบางบริษัทที่ผลิตเครื่อง HPLC สามารถใช้ได้กับระบบที่ไม่ต้องไล่ก๊าซออกก่อน

ปั๊ม (Pump)

ใน HPLC มีความต้านทานการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่จะไหลผ่านคอลัมน์ ซึ่งมีอนุภาคขนาดเล็กบรรจุอยู่ ความต้านทานการไหลจะมากเมื่อใช้อนุภาคขนาดเล็กๆ และคอลัมน์ที่มีขนาดเล็กด้วย จึงจำเป็นต้องใช้ความดันสูงเพื่อดันเฟสเคลื่อนที่ให้ไหลไปหรือใช้เพื่ออัดของเหลวที่เป็นเฟสเคลื่อนที่เข้าสู่คอลัมน์ด้วยความดัน



รูปที่ ง6 แสดงภาคตัดขวางของเครื่องปั๊ม

Sample Introduction (Injector)

ถึงแม้ว่าจะใช้คอลัมน์ที่มีประสิทธิภาพในการแยกสารที่ดีที่สุดก็ตาม แต่ถ้าการฉีดสารตัวอย่าง เข้าสู่เครื่อง HPLC นั้นไม่มีความระมัดระวังก็จะทำให้การแยกสารนั้นไม่ได้ผลดี ตามหลักการแล้วควรฉีดสารด้วยปริมาณน้อยๆ ตรงบริเวณกึ่งกลางของหัวคอลัมน์และต้องคอยระมัดระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศขณะฉีดสารเพื่อจะให้เกิดประสิทธิภาพการแยกเกิดขึ้นสมบูรณ์

ชนิดของ injector ที่แตกต่างกัน สามารถใช้ด้วยกันได้และเลือกให้เหมาะสมกับการวิเคราะห์ single type ของ injector ถูกใช้ใน HPLC ซึ่งต่างจาก GC Loop injector (บางทีก็เรียก valve injector) เป็นการนำตัวอย่างที่เป็นของเหลวเข้าสู่ liquid stream และทำให้มีปริมาณที่เหมาะสมในการนำตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์ โดยใช้ conventional syring เมื่อ loop เติมเฟสเคลื่อนที่แล้วนั้นจะถูกปั๊มเข้าไปด้วยอัตราการไหลที่เหมาะสม จากนั้นผ่านวาล์วเข้าไปสู่คอลัมน์ ที่เก็บคอลัมน์อยู่ในภาวะสมดุลด้วยเฟสเคลื่อนที่และรักษาระบบการทำงานของโครมาโทกราฟีเมื่อจะ injection rotating switch จะถูกเคลื่อนและ flow ถูกพาเข้าไปใน loop ทำให้มีระดับความสูงเท่ากันในคอลัมน์

พารามิเตอร์ 2 ตัวที่สำคัญคือ ความถูกต้อง (precision) และความแม่นยำ (accuracy) โดยความถูกต้องของการหาปริมาณวิเคราะห์ขึ้นกับขนาดของ loop โดยปกติจะเติม loop ได้เต็มสมบูรณ์โดยใน conventional syring ให้ปริมาตรที่มากกว่าความจุ loop (ของเหลวที่มากเกินพอจะเป็นของเสียไปที่ waste)

ซึ่งฟองอากาศจะไม่ถูกนำเข้าไปในตัวอย่างและสิ่งสำคัญคือ ต้องแน่ใจว่าไม่มี ฟองอากาศเข้าไปแทนตัวอย่าง ซึ่งจะทำให้ได้ความแม่นยำและถูกต้องที่สุด

การทำปริมาณวิเคราะห์ทำโดยใช้วิธี internal standard ควรถูกเลือกใช้ และถ้าตัวอย่างไม่เพียงพอสามารถเติมที่ loop ได้ loop ที่ไม่ถูกเทียบมาตรฐาน(calibrate) จะมีปริมาตร 20 ไมโครลิตร ซึ่งไม่มีผลต่อความแม่นยำของการวัด loop ที่เหมือนกัน ถูกใช้ในการทำกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณและสำหรับการหาตัวไม่ทราบค่า ความถูกต้องของการวัด ถ้า injector คำนึงถึงอื่นน้อยกว่าการมีอากาศเข้าสู่ injector อาจทาง liquid flow ซึ่งเป็นผลให้ได้สัญญาณที่ไม่เสถียรจาก mass spectrometer

การฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์ด้วยเทคนิค HPLC มีด้วยกัน 3 วิธีคือ

1) **Septum injector**

วิธีการนำสารเข้าเครื่องนี้จะคล้ายกับใน GC มาก แต่เข็มฉีดในGC จะใช้กับความดันเพียง 100 บาร์ ในกรณีที่ความดันสูงๆ จะนำมาใช้ฉีดสารไม่ได้ จึงได้มีการสร้างเข็มฉีดที่ใช้กับความดันสูงๆ ถึง 600 บาร์ขึ้นมา และบางทีอาจเป็นวิธีที่ง่ายที่สุดจากวิธีทั้งหมด คือการออกแบบที่ไม่แน่นอนทำให้มันง่ายที่จะสร้างสำหรับใช้ในห้องทดลองโดยใช้วัสดุอย่างง่ายๆ ในการสร้าง

ข้อดีของการฉีดสารแบบ Septum คือ

- ฉีดในปริมาตรที่เราต้องการได้
- ปริมาณน้อยๆก็สามารถฉีดสารได้
- วิธีการฉีดสารง่าย และราคาถูก
- เป็นการฉีดสารเข้าสู้คอลัมน์โดยตรง จนทำให้สัมผัสกับเฟสอยู่กับที่โดยตรง

ความแม่นยำในการนำสารตัวอย่างเข้าจะดีขึ้น ถ้าประกอบด้วย on-column injector แต่มีข้อเสียของการใส่วัตถุนั้นโดนที่มันจะไปรบกวนการส่งผ่านของสารตัวอย่างตรงบริเวณศูนย์กลาง ปัญหานี้แก้ไขได้โดยการใช้ capillary tube นำสารเข้าบริเวณส่วนหัวของคอลัมน์

2) **Sampling valve**

ระบบฉีดสารประเภทนี้ถือว่าเป็นที่นิยมอย่างกว้างขวางในเทคนิค HPLC เนื่องจากสารมารถนำมาใช้ในความดันและอุณหภูมิสูงได้ รวดเร็วและสามารถทำซ้ำได้ สามารถใช้กับตัวอย่างที่มีปริมาณมากๆ ได้ แล้วยังมีความผิดพลาดน้อยกว่า 0.1 % และสามารถฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์แบบอัตโนมัติได้อย่างง่ายดาย

3) **Automatic valve**

การฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์โดยวิธีนี้นั้นจะใช้งานสะดวกมาก เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีจำนวนมาก หรือเมื่อต้องการฉีดสารตัวอย่างที่เหมือนกันซ้ำๆ Automatic injector มีประโยชน์หลายอย่าง ซึ่งอาจทำงานได้ด้วยตัวมันเองหรือควบคุมโดย LC computer การนำตัวอย่างเข้าสู่ระบบอาจทำได้โดยการ

ผลักดันโดนใช้แรงลม ตัวอย่างประมาณ 100 มิลลิลิตร อาจถูกบรรจุลงในที่ใส่สารที่ถูกปิดอย่างมิดชิด ซึ่งในบางระบบนั้นจะมีความซับซ้อนมาก และมันยังอาจควบคุมการฉีดที่มีปริมาณของตัวอย่างที่ไม่คงที่ได้ในช่วงระยะเวลาที่แน่นอนและเป็นลำดับ

คอลัมน์ (Column)

เป็นส่วนประกอบที่มีราคาน้อยที่สุด แต่ถือว่าเป็นหัวใจของระบบ คอลัมน์ HPLC โดยทั่วไปมีความยาว 25-30 เซนติเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4-5 มิลลิเมตร และบรรจุด้วยสารบรรจุขนาดอนุภาค 10 ไมโครเมตร ในปัจจุบันมีแนวโน้มว่าจะใช้คอลัมน์ที่มีความยาวและขนาดของอนุภาคน้อยลง ทั้งนี้เนื่องจากความสามารถผลิตสารบรรจุที่มีขนาดเล็กลงมา 3-5 ไมโครเมตรและใช้เทคนิคการบรรจุสารที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นมานั้นเอง ทำให้ประสิทธิภาพในการแยกต่อหน่วยความยาวคอลัมน์ดีขึ้น

ข้อควรระวังในการใช้คอลัมน์

- อย่าใช้คอลัมน์ที่มีความดันมากเกินไป
- ไม่ควรใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีค่า pH มากหรือน้อยจนเกินไป ควรใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มี pH ในช่วง 3.5-6.5
- ห้ามเก็บคอลัมน์ไว้ในบัฟเฟอร์หรือในสารละลายที่มีเกลือเป็นองค์ประกอบเพราะอาจทำให้เกิดตะกอนได้และไม่ควรใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีตะกอนหรือขุ่น ควรกรองเฟสเคลื่อนที่เสมอ
- ระวังไม่คอลัมน์ถูกกระแทก
- ไม่เก็บคอลัมน์ไว้ที่อุณหภูมิสูง
- ถ้าคอลัมน์ใกล้เสื่อมสภาพให้ล้างด้วย 1% กรดอะซิติก

ตัวตรวจวัด (Detector)

ตัวตรวจวัดที่ได้นำมาใช้มากที่สุดใน HPLC ได้แก่ Ultraviolet absorbance (UV) และ Refractive index (RI) ตัวตรวจวัดชนิด UV มีประโยชน์สำหรับการวิเคราะห์สารอินทรีย์เป็นส่วนใหญ่ ตัวตรวจวัดชนิดนี้มีทั้งความยาวคลื่นเดียว (มักจะใช้ที่ 254 นาโนเมตร Mercury arc lamp) และแบบที่เปลี่ยนความยาวคลื่นได้ (Variable wavelength) ในช่วง 190-600 นาโนเมตร ซึ่งตัวตรวจวัดใน HPLC ปั๊มรุ่น P1000 Isocratic pumps ตัวตรวจวัด UV รุ่น 1000 ของบริษัท Shimazu (รุ่นที่ใช้ในการทดลอง) เป็นแบบที่เปลี่ยนความยาวคลื่นได้ (Deuterium arc lamp) การดูดกลืนแสงนี้เป็นคุณสมบัติของโมเลกุล ดังนั้นแต่ละสารประกอบจึงมีการดูดกลืนแสงที่จำเพาะของตัวเอง ตัวตรวจวัดชนิด UV จัดเป็นชนิดที่มีความไวสูง สามารถตรวจวัดสามารถแยกประเภทในปริมาณต่ำถึงระดับนาโนกรัม

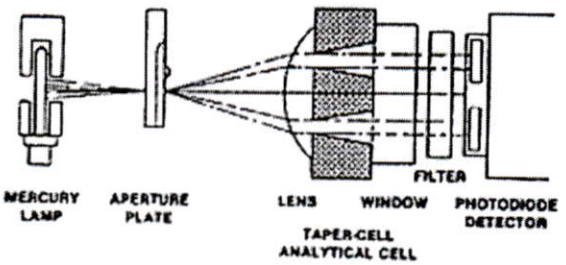
ตารางที่ ง2 แสดงคุณสมบัติของตัวตรวจวัดชนิดต่างๆ

ชนิด	ความไว (กรัม/มล.)	ผลของอุณหภูมิ	ผลของอัตราการไหล	หมายเหตุ
UV absorption	$5x10^{-5}$	น้อย	ไม่มีผล	นิยมใช้วัดในช่วง 254-280 nm
IR absorption	10^{-6}	น้อย	ไม่มีผล	-
Fluorometry	10^{-10}	น้อย	ไม่มีผล	-
Refractive index	$5x10^{-7}$	-	ไม่มีผล	วัดความแตกต่างดัชนีหักเหของสารตัวอย่างและเฟสเคลื่อนที่
Conductivity	10^{-8}	$\pm 1\ ^{\circ}C$	มีผล	-
Flame ionization	10^{-8}	ไม่มีผล	มีผล	สารตัวอย่างถูกเผาให้เป็นไอออนและถูกจับโดยแอโนดเพลท
Mass spectrometry	10^{-10}	ไม่มีผล	ไม่มีผล	วิเคราะห์สารได้ถึง 0.2-1.0 nanogram

ตัวตรวจวัดที่นิยมใช้มากที่สุดในปัจจุบันเป็น การวัดการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นแสงอัลตร้าไวโอเลต เนื่องจากสารส่วนใหญ่ประกอบไปด้วยหมู่ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นดังกล่าวได้ดี เนื่องจากงานวิจัยนี้ใช้ตัวตรวจวัด UV Detector เป็นหลัก ซึ่งจะกล่าวรายละเอียดเพิ่มดังนี้

หลักการทำงานของเครื่องวัดชนิดนี้อาศัยการดูดกลืนแสงยูวีของสารตัวอย่าง ในปัจจุบัน UV-Visible ตัวตรวจวัดที่นิยมใช้ใน HPLC แบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด คือ

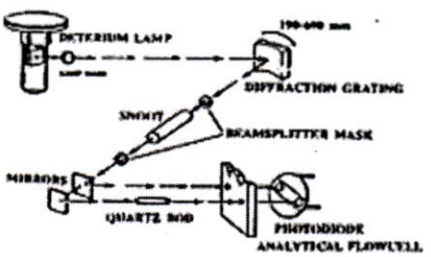
1. Fixed-wavelength UV detector ตัวตรวจวัดชนิดนี้ ประกอบด้วยแหล่งกำเนิดแสงที่ใช้เป็นหลอดที่ทำด้วยปรอทความดันต่ำ ซึ่งจะให้แสงที่ความยาวคลื่น 254 nm โดยแสงผ่าน aperture plate ตรงไปยังเลนส์ ที่ทำด้วยควอทซ์ ซึ่งจะทำให้แสงผ่านเข้าไปในเซลล์อ้างอิงและเซลล์ของสารตัวอย่าง ต่อจากนั้นแสงจะผ่านกระจกควอทซ์และแผ่นกรองซึ่งจะแยกความยาวคลื่นที่เราสนใจ ก่อนที่แสงนั้นจะถึงโฟโตไดโอด โฟโตไดโอดจะทำการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแสงทั้งเซลล์อ้างอิงและเซลล์ของสารตัวอย่างเป็นสัญญาณไฟฟ้าและผ่านเข้าไปในส่วนของการขยายสัญญาณ



รูปที่ ง7 Fixed-wavelength UV detector

ข้อจำกัดของตัวตรวจวัดประเภทนี้จะไม่สามารถตรวจวัดสารประกอบที่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่ำกว่า 254 นาโนเมตร เพราะมีสารประกอบสำคัญหลายชนิดใช้ความยาวคลื่นในช่วง 195-225 นาโนเมตร นอกจาก mercury lamp แล้วอาจใช้แหล่งกำเนิดแสงอย่างอื่น เช่น Zn lamp (206 nm) Cd lamp (214 nm) เป็นต้น สำหรับ D_2 lamp จะเปล่งแสงออกมาอย่างต่อเนื่องในช่วงยูวี (200-400 nm) และบางช่วงของ visible เมื่อต้องการความยาวคลื่นใดๆ ก็จะใช้โมโนโครโมเตอร์แยกแสงให้ได้ความยาวคลื่นที่ต้อง

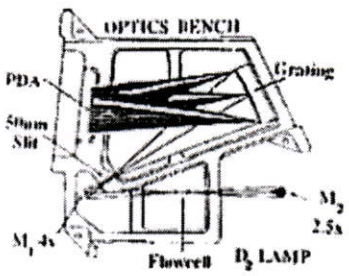
2. Variable UV detector ตัวตรวจวัดชนิดนี้จะแตกต่างจากตัวตรวจวัดประเภทแรกคือใช้แหล่งกำเนิดแสงเป็น D_2 lamp และใช้โมโนโครโมเตอร์แยกแสงและเลือกตามต้องการได้ จึงสามารถตรวจวัดสารตัวอย่างได้ทั่วไปเพราะสามารถเลือกความยาวคลื่นที่สารตัวอย่างดูดกลืนแสงได้ดีที่สุด



รูปที่ ง8 Variable UV detector

3. Photodiode array detector (PDA) ตัวตรวจวัดประเภทนี้จัดว่าเป็น solid state detector ซึ่งประกอบด้วยโฟโตไดโอดจำนวนมาก สามารถวัดแสงได้หลายความยาวคลื่นในเวลาเดียวกัน มีลักษณะดังรูป ระบบทางเดินของแสงจะต่างจาก UV visible detector ทั่วๆ ไปคือระบบทางเดินของแสงจะเป็นแบบ reverse optics จากรูปแสงจากแหล่งกำเนิดหรือหลอดยูวีจะผ่านไปยัง flow through cell ก่อนที่จะไปยังโม

โนโครโมเตอร์หรือเกตติง เมื่อแสงตกกระทบบนเกรตติงจะกระจายออกไปเป็นความยาวคลื่นต่างๆแล้วไปตกกระทบกับแผงของโฟโตไดโอดดังรูป



รูปที่ ง9 Photodiode array detector

PDA (996) เป็นตัวตรวจวัดที่จะช่วยให้ข้อมูลทางโครมาโทกราฟีมีความเด่นชัดและผลลัพธ์เป็นที่น่าเชื่อมากขึ้น เนื่องจาก มีการใช้เทคโนโลยี Taper beam และระบบการเก็บข้อมูลในคอมพิวเตอร์ซึ่งมี Milennium 2010 เป็น software ควบคุมการทำงานและการเก็บข้อมูลรวมทั้งการประมวลผลในรูปแบบ 3D graphic spectral contrast peak purity เป็นต้น จากการใช้เทคโนโลยีของ taper beam ช่วยขจัด refractive index effect ซึ่งจะเป็นการเพิ่ม sensitivity ในส่วนของ spectral contrast เราสามารถเก็บข้อมูลมาเปรียบเทียบโดยใช้สเปกตรัมมาเปรียบเทียบกัน ซึ่งทำให้ทำ compound confirmation ได้

ส่วนประมวลผล (Data system)

ส่วนประมวลผลข้อมูล คือส่วนที่เปลี่ยนแปลงสัญญาณอนาลอกเป็นดิจิตอล

ส่วนทิ้งของเสีย (Waste)

ส่วนทิ้งของเสีย

3. ข้อปฏิบัติในการใช้เครื่อง HPLC ในการวิเคราะห์

มีขั้นตอนปฏิบัติดังนี้

- การเตรียมเฟสเคลื่อนที่น้ำที่นำมาใช้ในการเตรียม ควรเลือกใช้ที่มีความบริสุทธิ์สูง เช่น น้ำกลั่น 2 ครั้ง หรือ 3 ครั้ง และปราศจากไอออนชนิดต่างๆ สำหรับสารเคมีที่ใช้เช่นเมทานอลควรใช้เกรด HPLC grade เมื่อผสมเฟสเคลื่อนที่เสร็จแล้วต้องกรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.45 ไมครอน

สำหรับ membrane filter ก็ต้องเลือกให้ถูกว่าชนิดใดใช้กรองเฟสเคลื่อนที่ที่มีน้ำเป็นส่วนผสมได้ ชนิดใดกรองตัวตัวทำละลายอินทรีย์ หลังจากกรองแล้วนำเฟสเคลื่อนที่ไปทำการไล่อากาศที่ละลายอยู่ เช่นก๊าซออกซิเจน เพื่อต้องการกำจัดก๊าซออกซิเจนซึ่งอาจทำปฏิกิริยากับเฟสเคลื่อนที่บางชนิดได้ หรือแม้แต่เฟสอยู่กับที่ที่อยู่ในคอลัมน์ นอกจากนั้นยังเป็นการลดโอกาสที่ทำให้เกิดฟองอากาศ (bubble) ในเครื่องตรวจวัดขณะทำการทดลองอยู่ การไล่ก๊าซที่ละลายอยู่นี้จะต้องทำเมื่อตัวทำละลายเป็นพวกสารมีขั้ว (polar solvent) กำจัดก๊าซที่ละลายอยู่ในตัวทำละลาย (degas) อาจใช้การ sonicate ในเครื่อง ultrasonic ประมาณ 15 นาที หรือผ่านก๊าซฮีเลียม 15 นาที

- เมื่อเตรียมสารตัวอย่างเสร็จแล้วก่อนนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC จะต้องกรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.45 ไมครอน ทุกครั้ง เพื่อป้องกันการอุดตันที่หัวคอลัมน์ ซึ่งทำให้ความดันระบบสูงกว่าปกติ
- ก่อนฉีดสารตัวอย่าง ต้องรอคอลัมน์ถึงสมดุลด้วยเฟสเคลื่อนที่ก่อน โดยดูจาก baseline บนเครื่องบันทึกผลที่ต่อกับตัวตรวจวัด
- ก่อนฉีดสารตัวอย่างควรตรวจสอบรอยรั่วตามข้อต่างๆ รวมทั้งที่ eng fitting ของคอลัมน์ด้วย ซึ่งโดยมากมักรั่วเล็กน้อย และตรวจสอบได้ก็ต่อเมื่อใช้มือแตะจะรู้สึกเย็นเนื่องจากตัวทำละลายระเหยไป ถ้ามีรอยรั่วเกิดขึ้นมักจะทำให้ระดับ baseline ยกขึ้น มีอากาศเข้าไปในระบบและอาจมีผลกระทบต่อค่าความสูง และพื้นที่ของพีค ทำให้ผลการหาปริมาณแต่ละครั้งไม่เท่ากัน
- ไม่ควรขันข้อต่อของคอลัมน์แน่นเกินไป เพราะจะทำให้เกลียวของ fitting เป็นรอยจนรั่วได้ ซึ่งแม้จะขันต่อไปอีกก็ไม่สามารถหยุดรอยรั่วได้ เมื่อมีรอยรั่วเกิดขึ้นควรขันเพิ่มอีกเพียงเล็กน้อย และถ้ายังรั่วอยู่ควรถอดออกมาทั้งหมดแล้วจึงใส่กลับเข้าไปใหม่
- การเลือกคอลัมน์และตัวตรวจวัด เลือกชนิดคอลัมน์ให้เหมาะสมกับงาน ในกรณีที่เริ่มใช้คอลัมน์โดยไม่รั่วประวัติของคอลัมน์นั้นเลย ให้ล้างคอลัมน์(ไม่ต้องต่อเข้าตัวตรวจวัด) ก่อนตามวิธีที่เหมาะสม ส่วนตรวจวัดควรเลือกให้เหมาะสมกับสารที่จะวิเคราะห์
- การใช้คอลัมน์ในงาน HPLC ควรหลีกเลี่ยง หรือป้องกันการเปลี่ยนแปลงความดัน อุณหภูมิและสัดส่วนของเฟสเคลื่อนที่โดยกะทันหัน เนื่องจากจะทำให้การจัดตัวของอนุภาคสารที่บรรจุ ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดช่องว่างในคอลัมน์ ควรเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลเป็นขั้นๆ ขั้นละ 0.1 มิลลิลิตรต่อนาที เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงความดันอย่างกะทันหัน (pressure shock) ควรให้เวลาหลายๆ นาทีในการให้คอลัมน์อยู่ที่ความดันปกติของการทำงาน และปล่อยให้ความดันค่อยๆ ลดลงมา เมื่อต้องการให้ปั๊มเลิกทำงาน การใช้ guard column สามารถช่วยยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์ เนื่องจาก

จะมีแผ่นกรองที่มีขนาดรูอนุภาคประมาณ 0.5 ไมครอน ทำหน้าที่กรองอนุภาคที่อาจหลุดมาจากขั้นตอนการกรองตัวอย่าง และขณะเดียวกันก็เป็นการกรองเฟสเคลื่อนที่ซ้ำอีกครั้ง

- เพื่อยืดการใช้งานของคอลัมน์ ไม่ควรใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มี pH สูงหรือต่ำมาก ควรใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มี pH อยู่ในช่วง 3.5-6.5
- ตรวจดูอัตราการไหลคงที่หรือไม่ โดยสังเกตจากความดัน ถ้าคงที่จึงเริ่มวิเคราะห์ได้ ถ้าไม่คงที่อาจมีปัญหาที่การ degas ไม่ดีพอ ต้องทำการ degas ใหม่
- เมื่อฉีดสารตัวอย่างที่มีการเติมสารปนเปื้อนลงไป ควรล้างคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมประมาณ 200-300 มิลลิลิตร โดยใช้อัตราการไหลต่ำๆ
- ไม่ควรเก็บคอลัมน์ไว้ในที่ชื้นหรืออุณหภูมิที่ทำให้คอลัมน์และอนุภาคเกิดการขยายและหดตัวกลับไปกลับมา เพราะจะทำให้เกิดช่องว่างขึ้นในคอลัมน์ ดังนั้นควรเก็บอุณหภูมิระหว่าง 15-30 °C และเก็บในสภาพเปียก เช่น เก็บคอลัมน์ประเภท Liquid solid chromatography ด้วยตัวทำละลายที่แห้ง หรือเก็บคอลัมน์ประเภท reverse phase ในตัวทำละลายอินทรีย์ 100% เป็นต้น

ประวัติผู้เขียน

นางสาวพิมพัตรา แพงบุดดี เกิดวันที่ 26 ธันวาคม พ.ศ. 2521 ที่จังหวัดสุรินทร์ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขา วิทยาศาสตร์ (เคมี) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ปีการศึกษา 2540 และในปีการศึกษา 2544 ได้เข้าศึกษาต่อระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี (เคมีวิเคราะห์) คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปัจจุบันทำงานทางด้านทรัพย์สินทางปัญญาให้กับบริษัท Axis Associates International ในตำแหน่ง Registered Thai Patent Agent