

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุดิบและสารเคมี

- ไคโตซาน เกรดความหนืดต่ำ บริษัท Fluka (Japan)
- กรดมีเทนซัลโฟนิก บริษัท Acros organic (USA)
- กรดแอสติก บริษัท BDH Laboratory Supplies (England)
- ฟอสฟอรัสเพนทอกไซด์ บริษัท CARLO ERBA (Italy)
- สารละลายแอสีโตน เกรดทางการค้า บริษัท Zen point (Thailand)
- สารละลายเอทานอล เกรดทางการค้า บริษัท Zen point (Thailand)
- โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต บริษัท Scharlau chemie S.A. (Spain)

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

- เครื่องปั่นกวนเชิงกล (Mechanical Stirrer)
- อุปกรณ์เครื่องแก้ว
- ตู้อบสาร
- แท่นให้ความร้อน (hot plate)
- เครื่องอัลตราโซนิก
- Cellu Sep T₂ MWCO 6,000-8,000

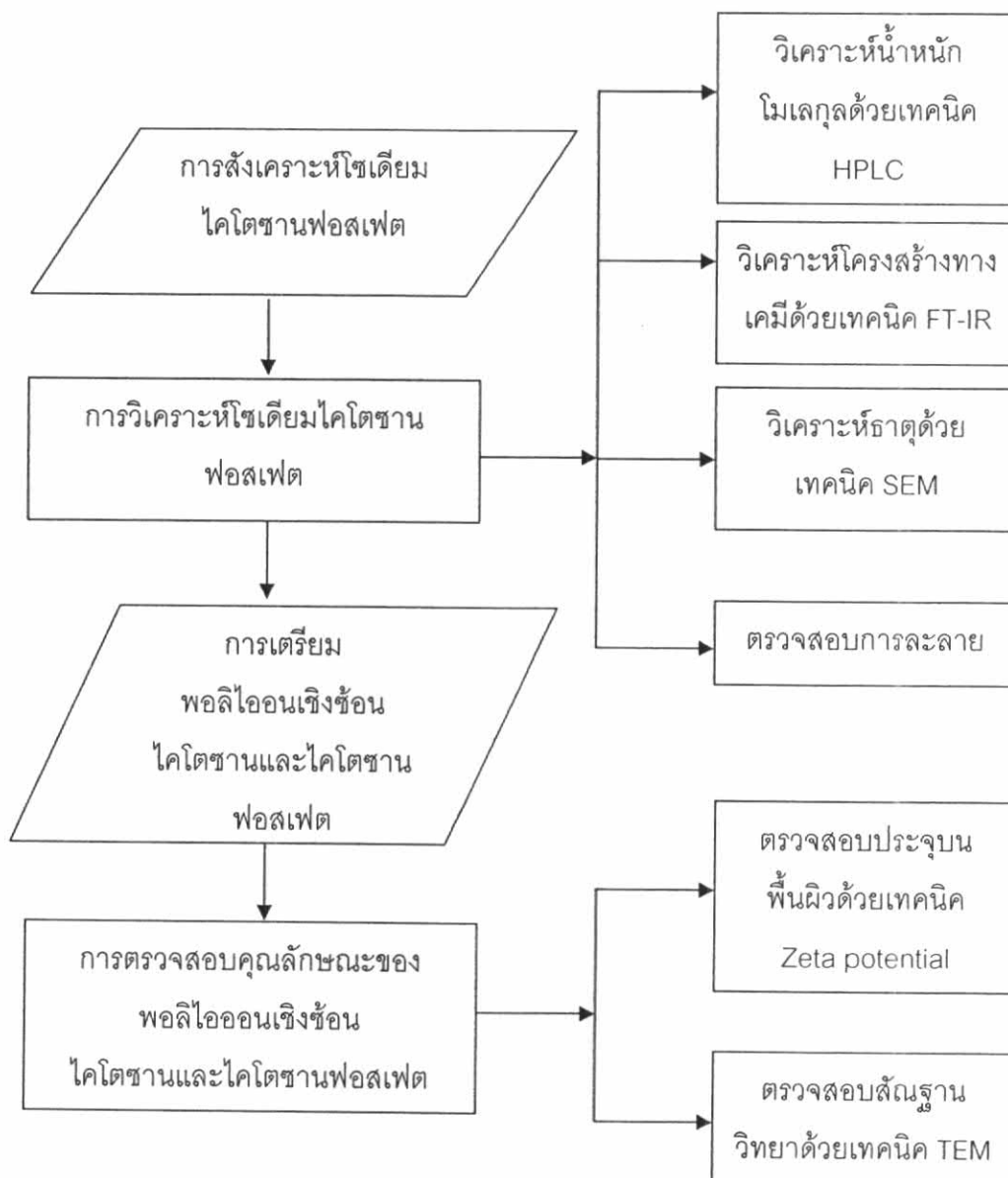
3.3 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์

- เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนลิกวิดโครมาโทกราฟี (High performance liquid chromatography, HPLC) ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น LC10AT (ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
- เครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (FT-IR) ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น Spectrum one (ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) ยี่ห้อ JEOL รุ่น JSM-5800 ชนิดแจกแจงพลังงาน (Energy Dispersive X-ray Spectrometer) (ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
- เครื่องวิเคราะห์ประจุบนพื้นผิว (Zeta potential) รุ่น Zeta Meter 3.0+ (ฝ่ายวิจัย วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM) ยี่ห้อ JEOL รุ่น JEM-2100 (ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

3.4 ขอบเขตการทดลอง

ขอบเขตการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.1

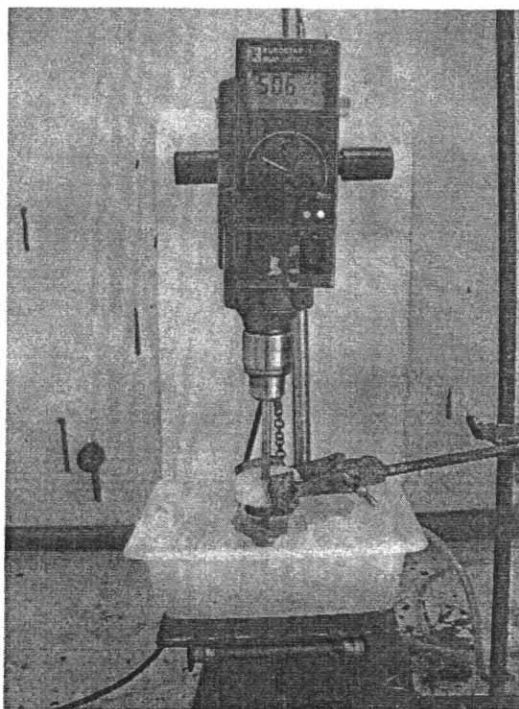


รูปที่ 3.1 แผนผังขอบเขตการทดลอง

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การสังเคราะห์โซเดียมไคโตซานฟอสเฟต

1. ชั่งไคโตซาน 4 กรัม มาละลายในกรดมีเทนซัลโฟนิก 28 มิลลิลิตร ปั่นกวนด้วยเครื่องปั่นกวนเชิงกลเป็นเวลา 30 นาที ที่ความเร็ว 250 รอบ/นาที
2. นำสารละลายแช่ลงในอ่างน้ำแข็ง ที่อุณหภูมิ 0-5 องศาเซลเซียสและค่อยๆเติมฟอสฟอรัสเพนทอกไซด์ (ตามอัตราส่วนโดยโมลของฟอสฟอรัสเพนทอกไซด์ต่อหนึ่งหน่วยซ้ำของไคโตซาน คือ 0.1, 0.5, 1, 2) ดังแสดงในตาราง 3.1 จากนั้นปรับความเร็วเครื่องปั่นกวนเชิงกลเพิ่มขึ้นให้ได้ความเร็ว 500 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 3.2
3. นำสารละลายที่เกิดปฏิกิริยาไปตกตะกอนในแอสีโตน 250 มิลลิลิตร ประมาณ 2 ครั้ง หลังจากนั้นกำจัดสารอินทรีย์ โดยเลือกใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด และเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้ ตัวทำละลายชนิดแรก คือ แอสีโตนในการกำจัดสารอินทรีย์ ประมาณ 4 ครั้ง ตัวทำละลายชนิดที่สอง คือ เอทานอลในการกำจัดสารอินทรีย์ประมาณ 4 ครั้ง
4. กรองตะกอน และ อบแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
5. นำสารที่ได้ไปละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไป dialysis ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อกำจัดสารโมเลกุลเล็กๆที่ไม่เกิดปฏิกิริยาให้ออกไป แล้วจึง dialysis ต่อด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 M เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้อนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้อยู่ในรูปของเกลือโซเดียม
6. นำสารละลายเกลือโซเดียมของอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ข้างต้น ปรับ pH เป็น 7.4 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 6 N และ dialysis อีกครั้งด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อกำจัดเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่เกิดขึ้น
7. นำสารละลายที่ได้ไปทำแห้งภายใต้ความดัน ณ จุดเยือกแข็ง และนำสารที่สังเคราะห์ ได้ไปตรวจสอบสมบัติการละลายและตรวจสอบโครงสร้างทางเคมี ด้วยเทคนิค FT-IR



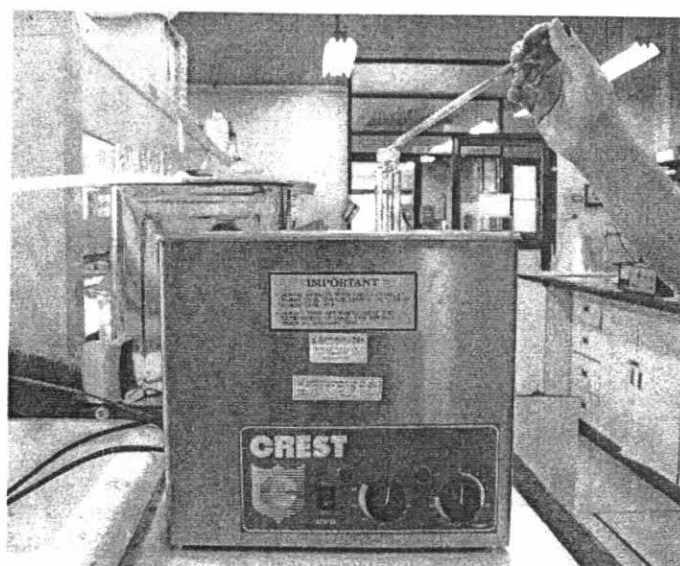
รูปที่ 3.2 อุปกรณ์การดึงเคาะหีโซเดียมโคโคซานฟอสเฟต

ตารางที่ 3.1 อัตราส่วนของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

อัตราส่วนโดยโมลของ ฟอสฟอรัสเพนทอกไซด์ต่อ หนึ่งหน่วยซ้ำของโคโคซาน	โคโคซาน (โมล)	ฟอสฟอรัสเพนทอกไซด์ (โมล)
0.1	0.0119	0.0011
0.5		0.0059
1		0.0119
2		0.0238

3.5.2 การเตรียมพอลิไอออนเชิงซ้อนโคโตซานและโคโตซานฟอสเฟต

1. ละลายโคโตซานด้วยกรดแอสติก 0.1 M ด้วยร้อยละโดยน้ำหนักดังแสดงในตาราง 3.2
2. ละลายโคโตซานฟอสเฟตด้วยสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 M ด้วยร้อยละโดยน้ำหนักดังแสดงในตาราง 3.2
3. ในการทดลองนี้ควบคุมอัตราส่วนโดยน้ำหนักของโคโตซานต่อโคโตซานฟอสเฟตให้คงที่เท่ากับ 1:1 แต่ลดความเข้มข้นของสารละลายโคโตซานในข้อ 1 และสารละลายโคโตซานฟอสเฟตในข้อ 2 เพื่อศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเตรียมพอลิไอออนเชิงซ้อนโคโตซานและโคโตซานฟอสเฟต
4. หยดสารละลายโคโตซานฟอสเฟตลงในสารละลายโคโตซานด้วยอัตราการหยด 15 หยดต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้การสั่นด้วยเครื่องอัลตราโซนิก ดังแสดงดังรูป 3.3
5. เติมน้ำกลั่นลงไปปริมาณ 1 เท่าของสารละลายที่ใช้ เพื่อให้อนุภาคของสารเกิดการกระจายตัวและสั่นด้วยเครื่องอัลตราโซนิกต่ออีกประมาณ 10 นาที
6. สังเกตลักษณะของพอลิไอออนเชิงซ้อนทันทีภายหลังจากการเตรียม และสังเกตลักษณะอีกครั้งหลังจากตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 3.3 อุปกรณ์การเตรียมพอลิไอออนเชิงซ้อน

ตารางที่ 3.2 อัตราส่วนของสารที่ใช้เตรียมพอลิไอออนเชิงซ้อนไคโตซานและไคโตซานฟอสเฟต เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลาย

อัตราส่วนโดยน้ำหนักของ ไคโตซานต่อไคโตซาน ฟอสเฟต	ร้อยละโดยน้ำหนักของ ไคโตซานฟอสเฟต	ร้อยละโดยน้ำหนักของ ไคโตซาน
1:1	0.5	0.5
	0.25	0.25
	0.125	0.125
	0.06	0.06
	0.03	0.03
	0.015	0.015
	0.007	0.007
	0.003	0.003

3.5.3 การวิเคราะห์และตรวจสอบสมบัติของไคโตซาน ฟอสฟอริลไคโตซานและ ไซเตียมไคโตซานฟอสเฟต

3.5.3.1 การตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนลิควิด โครมาโทกราฟี (High performance liquid chromatography, HPLC)

การตรวจสอบหาน้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่างด้วยเครื่อง HPLC ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น LC10AT ดังรูปที่ 3.4 โดยใช้ Column ยี่ห้อ Shodex รุ่น OH805HQ บรรจุด้วย Polyhydroxymethacrylate gel ภายใต้ภาวะในการทดสอบ flow rate 0.6 ml/min และใช้สาร pullulan เป็นสารมาตรฐาน

การวิเคราะห์สารตัวอย่าง

การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของโคโตซาน: นำโคโตซานละลายในสารละลายแอสซีเทตบัฟเฟอร์ 0.1 M รวมทั้งใช้แอสซีเทตบัฟเฟอร์เป็นเฟสเคลื่อนที่ และใช้ pullulan ที่ละลายในแอสซีเทตบัฟเฟอร์เป็นสารมาตรฐาน

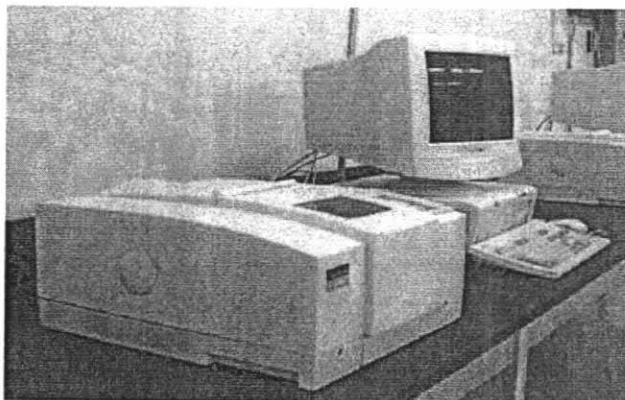
การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของอนุพันธ์โคโตซาน: นำอนุพันธ์ของโคโตซานหลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยา 3 ชั่วโมงแล้วมาละลายในน้ำกลั่น และใช้น้ำกลั่นเป็นเฟสเคลื่อนที่ รวมทั้งใช้ pullulan ที่ละลายในน้ำกลั่นเป็นสารมาตรฐาน



รูปที่ 3.4 เครื่อง HPLC ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น LC10AT

3.5.3.2 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (FT-IR)

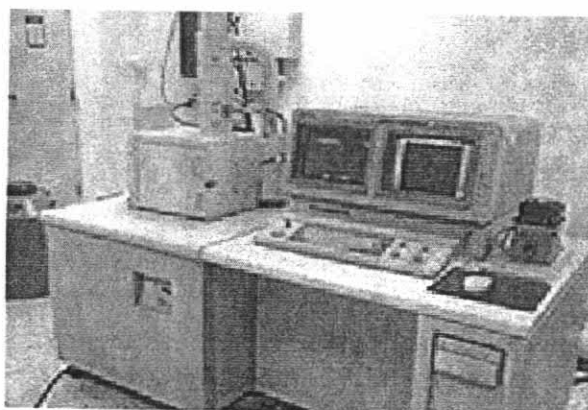
นำโคโตซานและอนุพันธ์โคโตซานที่เตรียมได้ไปอัดแผ่นกับผงโปแตสเซียมโบรไมด์ (KBr) ในอัตราส่วน 1:100 แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (FT-IR) ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น Spectrum One ดังแสดงในรูปที่ 3.5 โดยใช้ resolution 4.0 cm^{-1} และ number of scan เท่ากับ 16 เพื่อหาแถบดูดกลืนที่เกิดจากหมู่ฟังก์ชันต่างๆ



รูปที่ 3.5 เครื่อง FT-IR Spectrometer ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น Spectrum One

3.5.3.3 การวิเคราะห์ธาตุเชิงปริมาณในโครงสร้างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ชนิดแจกแจงพลังงานรังสีเอกซ์ (Energy Dispersive X-ray Spectrometer, EDS)

การวิเคราะห์ธาตุในโครงสร้างจุลภาคชนิดแจกแจงพลังงานรังสีเอกซ์ (Energy Dispersive X-ray Spectrometer) ทำโดยนำอนุพันธ์โคโตซานที่ต้องการวิเคราะห์ไปวางบนเทปกาวคาร์บอนที่แปะอยู่บนฐานวางตัวอย่าง เนื่องจากโครงสร้างของอนุพันธ์โคโตซานมีธาตุคาร์บอนเป็นองค์ประกอบอยู่มากทำให้อิเล็กตรอนสามารถวิ่งผ่านได้โดยไม่ต้องเคลือบด้วยผงคาร์บอน ซึ่งการทำงานของเครื่องจะทำภายใต้สุญญากาศจากนั้นจึงตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดยี่ห้อ JEOL รุ่น JSM-5800 โดยใช้ศักย์ไฟฟ้า 20 กิโลโวลต์ ที่กำลังขยาย 2,500 เท่า โดยตั้งระยะห่างระหว่างลำแสงอิเล็กตรอนและตัวอย่างให้คงที่ที่ 15 ไมโครเมตร ดังแสดงในรูปที่ 3.6



รูปที่ 3.6 เครื่อง SEM ยี่ห้อ JEOL รุ่น JSM-5800

$$\text{Degree of substitution} = \frac{\%P}{\%N}$$

โดยที่ %P คือ ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นองค์ประกอบจากการแทนที่หมู่ฟอสเฟต

%N คือ ปริมาณไนโตรเจนที่เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างโคโตซาน

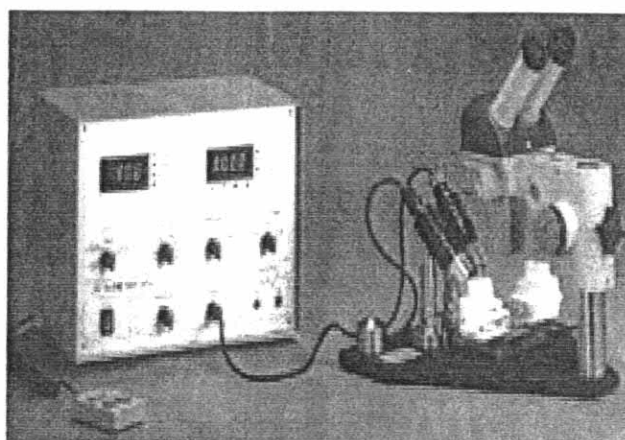
3.5.3.4 การตรวจสอบสมบัติการละลาย

การตรวจสอบการละลายของโคโตซานและอนุพันธ์โคโตซานที่สังเคราะห์ได้ สามารถทำได้โดยการชั่งโคโตซานและอนุพันธ์โคโตซานประมาณ 2 มิลลิกรัม นำไปละลายในตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ 0.1 M กรดแอสซิติค 0.1 M โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต และน้ำกลั่น ในปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นจึงสังเกตและวิเคราะห์ผลที่ได้

3.5.4 การวิเคราะห์พอลิไอออนเชิงซ้อนโคโตซานและโคโตซานฟอสเฟต

3.5.4.1 การตรวจสอบประจุบนพื้นผิวด้วยเทคนิคซีต้าโพเทนเชียล (Zeta potential)

การตรวจสอบประจุบนพื้นผิวด้วยเทคนิคซีต้าโพเทนเชียล (Zeta potential) รุ่น Zeta Meter 3.0+ ดังแสดงในรูป 3.7 เป็นการตรวจสอบประจุบนพื้นผิวของอนุภาคโคโตซาน อนุภาคโคโตซานฟอสเฟต และพอลิไอออนเชิงซ้อนโคโตซานและโคโตซานฟอสเฟต โดยการนำสารละลายที่มีการกระจายตัวของอนุภาคตัวอย่างที่ต้องการทดสอบใส่ลงในเซลล์ จากนั้นให้ศักย์ไฟฟ้า 150 มิลลิโวลต์ ใช้กล้องจุลทรรศน์ดูการเคลื่อนที่ของอนุภาค โดยอนุภาค ที่มีประจุบวกจะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วอิเล็กโทรดที่เป็นลบ ในทำนองเดียวกัน อนุภาคที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วอิเล็กโทรดที่เป็นบวก ทำการทดสอบ 7 ครั้ง แล้วนำค่าที่ได้ไปหาค่าเฉลี่ย

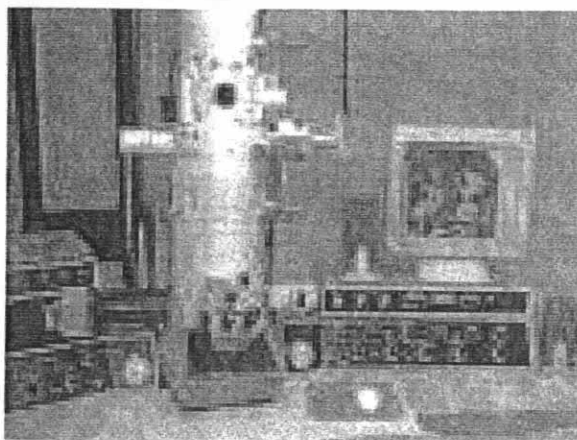


รูปที่ 3.7 เครื่อง Zeta potential รุ่น Zeta Meter 3.0+

3.5.4.2 การตรวจสอบสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสารละลายสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ โดยนำสารละลายของสารที่ต้องการทดสอบไปหยดลงบนแผ่นตะแกรงคอปเปอร์ที่เคลือบด้วยแผ่นฟิล์ม poly(vinyl formvar) จากนั้นทิ้งไว้ให้แห้ง และนำไปตรวจสอบด้วย TEM ยี่ห้อ JEOL รุ่น JEM-2100 ดังรูปที่ 3.8 ใช้กำลังขยาย 12 กิโลโวลต์ กระแสอิเล็กตรอน 68 ไมโครแอมแปร์

การศึกษาลักษณะการเรียงตัวของพอลิเมอร์ประจุบวกและพอลิเมอร์ประจุลบภายในพอลิไอออนเชิงซ้อนโคโตซานและโคโตซานฟอสเฟต โดยนำสารละลายของสารที่ต้องการทดสอบไปหยดลงบนแผ่นตะแกรงคอปเปอร์ที่เคลือบด้วยแผ่นฟิล์ม poly(vinyl formvar) จากนั้นย้อมสารตัวอย่างด้วยสี Uranyl acetate (UO_2^{2+}) ซึ่งมีประจุบวก หรือย้อมสารตัวอย่างด้วยสี Phosphotungstic acid ($\text{PW}_{12}\text{O}_{40}^{3-}$) ซึ่งมีประจุลบ ทิ้งไว้ให้แห้ง และนำไปตรวจสอบด้วย TEM ยี่ห้อ JEOL รุ่น JEM-2100 ดังรูปที่ 3.8 ใช้กำลังขยาย 12 กิโลโวลต์ กระแสอิเล็กตรอน 68 ไมโครแอมแปร์ เช่นกัน



รูปที่ 3.8 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ยี่ห้อ JEOL รุ่น JEM-2100