

บทที่ 4

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

4.1 เคมีภัณฑ์

- ไฮโซออกเทน (C_8H_{18}) มีความบริสุทธิ์ระดับห้องปฏิบัติการ จากบริษัท Ajax chemicals, Australia.
- เตตระเอทอกซีซิลเลน (TEOS, $(C_2H_5O)_4Si$) มีความบริสุทธิ์ 98% , โซเดียมบิส (2-เอทิล-เฮกซิล)ซัลโฟซัลเฟต (AOT) มีความบริสุทธิ์ 98% และเจลลาติน ชนิด A 300 Bloom จากบริษัท Aldrich chemicals company, USA.
- กรดไฮโดรคลอริก (HCl) 35.4% จากบริษัท BDH, England.
- แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) 30% จากบริษัท Carlo Erba, Italy.
- เชมมิกเมนทอล ((\pm) menthol) มีความบริสุทธิ์ประมาณ 99% , เฮกซิลอะซิเตต ($CH_3CO_2(CH_2)_5CH_3$) มีความบริสุทธิ์ประมาณ 99% จากบริษัท Aldrich chemicals company, USA.

4.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด(เทคนิค SEM) รุ่น JSM จากบริษัท Jeols, Japan.
- เครื่องฉายทอง รุ่นSCD 040 จากบริษัท Balzers
- เครื่องวัดพื้นที่ผิวของสาร รุ่น FlowSorb II 2300 จากบริษัท Micromeritics
- นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (เทคนิค $MAS^{29}SiNMR$) รุ่น DPX-300 จากบริษัท Brukes, Switzerland.
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง รุ่น MP220 จากบริษัท Mettler Toledo, Germany.
- เครื่องกวนแบบแม่เหล็ก จากบริษัท Ika Labortechnik, Germany.
- ข่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น TE-8J จากบริษัท Techne, England.
- ตู้อบจากบริษัท Memmert, Germany.
- เครื่องปฏิกรณ์แบบถังกวนที่มีขนาดดังแสดงในรูปที่ 4.1

4.3 การศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์วัสดุซิลิกา-เจลลาตินนาโนคอมโพสิต

4.3.1 การศึกษาอิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการสังเคราะห์วัสดุซิลิกา-เจลลาตินนาโนคอมโพสิต

เตรียมสารละลายของ AOT ในไอโซฮอกเทน 250 มิลลิโมลาร์ โดยใส่ AOT 1.111 กรัม ในไอโซฮอกเทน 10 มิลลิลิตร แล้วใส่สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เพื่อใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการไซล-เจลของ TEOS เป็นปริมาตร 1.35 มิลลิลิตร เพื่อให้อัตราส่วนเชิงโมลของน้ำต่อ AOT (W_0) คงที่ที่ 30 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนแบบแม่เหล็ก จนกระทั่งได้สารละลายไมโครอิมัลชันซึ่งมีลักษณะใสและเป็นเนื้อเดียวกันนั้นจึงเติมเจลลาตินลงไปปริมาณพอเหมาะ (1.7 ถึง 14 %โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) กวนให้เข้ากันที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ให้ความร้อนจนกระทั่งสารละลายเหนียวและเป็นเนื้อเดียวกัน กวนให้เย็นตัวลงที่อุณหภูมิห้อง เมื่อสารละลายเย็นตัวลงจะได้เจลใส (ไมโครอิมัลชัน-เบสค์ออร์แกโนเจล) จากนั้นให้ความร้อนอีกครั้งเพื่อให้เจลหลอมเหลวที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก เมื่อเจลหลอมเหลวจึงเติม TEOS ปริมาตร 4.18 มิลลิลิตร ลงไปเพื่อควบคุมอัตราส่วนเชิงโมลของน้ำต่อ TEOS ให้คงที่ที่ 4 กวนให้เกิดปฏิกิริยาไซล-เจลที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง การเตรียมนี้เตรียมในภาชนะปิดทิ้งไว้ 1 วัน จึงเปิดภาชนะแล้วทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ทำการทดลองซ้ำในลักษณะเช่นเดียวกันเมื่อไม่มีตัวเร่งปฏิกิริยา (น้ำบริสุทธิ์) และเมื่อใช้สารละลายแอมโมเนีย 1 โมลาร์ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแทนสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเพื่อเปรียบเทียบลักษณะของวัสดุที่สังเคราะห์และการเร่งปฏิกิริยาของกระบวนการไซล-เจล นำซิลิกา-เจลลาตินนาโนคอมโพสิตที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์ขนาดรูพรุนและลักษณะของพื้นผิวภายนอก ประสิทธิภาพการเกิดปฏิกิริยาไซล-เจล และพื้นที่ผิวในการแลกเปลี่ยนมวลสารตามวิธีในหัวข้อ 4.5

4.3.2 การศึกษาอิทธิพลของอัตราส่วนเชิงโมลของน้ำต่อ TEOS (r) ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์วัสดุซิลิกา-เจลลาตินนาโนคอมโพสิต

หลังจากที่ได้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เหมาะสมจากการทดลองในหัวข้อ 4.3.1 ทำการเตรียมวัสดุซิลิกา-เจลลาตินนาโนคอมโพสิตตามวิธีเช่นเดียวกับในหัวข้อ 4.3.1 แต่แปรเปลี่ยนค่า r โดยใช้ค่า r เป็น 2 4 10 15 และ 20 จากนั้นนำซิลิกา-เจลลาตินนาโนคอมโพสิตที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์ขนาดรูพรุนและลักษณะของพื้นผิวภายนอก ประสิทธิภาพการเกิดปฏิกิริยาไซล-เจล และพื้นที่ผิวในการแลกเปลี่ยนมวลสารตามวิธีในหัวข้อ 4.5

4.3.3 การศึกษาอิทธิพลของปริมาณเจลาตินที่เหมาะสมในการสังเคราะห์วัสดุซิลิกา-เจลาตินนาโนคอมโพสิต

หลังจากที่ได้ตัวเร่งปฏิกิริยาและค่า r ที่เหมาะสมจากการทดลองในหัวข้อ 4.3.1 และ 4.3.2 ตามลำดับ ทำการเตรียมวัสดุซิลิกา-เจลาตินนาโนคอมโพสิตตามวิธีเช่นเดียวกับในหัวข้อ 4.3.1 แต่แปรเปลี่ยนปริมาณเจลาตินโดยใช้เจลาติน 1.7 ถึง 14 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นนำซิลิกา-เจลาตินนาโนคอมโพสิตที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์ขนาดรูพรุนและลักษณะของพื้นผิวภายนอก, ประสิทธิภาพการเกิดปฏิกิริยาไซล-เจล และพื้นที่ผิวในการแลกเปลี่ยนมวลสารตามวิธีในหัวข้อ 4.5

4.3.4 การศึกษาอิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่างเมื่อใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา 2 ชนิดในการสังเคราะห์วัสดุซิลิกา-เจลาตินนาโนคอมโพสิต

หลังจากที่ได้ทำการทดลองเพื่อหาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์วัสดุซิลิกา-เจลาตินนาโนคอมโพสิต ในหัวข้อ 4.3.1 พบว่าการใช้สารละลายแอมโมเนีย 1 โมลาร์ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะได้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและคอนเดนเซชันของ TEOS เป็นอนุภาคสีขาวและจากการศึกษาอิทธิพลของปริมาณเจลาตินในหัวข้อ 4.3.3 พบว่าวัสดุที่สังเคราะห์จากเจลาตินที่มีความเข้มข้นสูงจะทำให้มีโครงข่ายของเจลาตินเด่นกว่าซิลิกา ในหัวข้อนี้จึงได้ทำการทดลองเพื่อศึกษาผลของการเร่งปฏิกิริยา 2 ขั้นตอน ในระบบที่มีปริมาณเจลาตินสูง ขั้นตอนแรกทำการทดลองเช่นเดียวกับในหัวข้อ 4.3.1 โดยการละลายเจลาติน 8 และ 14 % ลงในระบบไมโครอิมัลชันของ AOT/ สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 โมลาร์/ ไอโซออกเทน แล้วจึงให้เกิดปฏิกิริยากับ TEOS เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงเติมสารละลายแอมโมเนีย 30 % โดยปริมาตร 0.7 มิลลิลิตร หรือ 1.4 มิลลิลิตร ในระบบทำให้ค่า r เพิ่มขึ้นเป็น 6 และ 8 ผสมด้วยเครื่องกวนแบบแม่เหล็กต่อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นวางทิ้งไว้ 1 วัน จึงเปิดภาชนะแล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

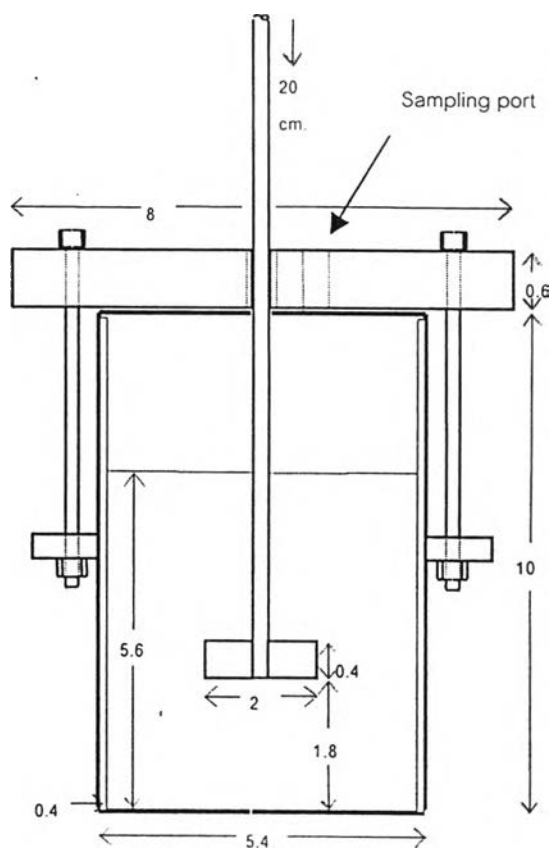
4.4 การศึกษาความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้วัสดุประเภทซิลิกา-เจลลาตินนาในคอมโพสิต เพื่อเป็นพาหะสำหรับตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ

4.4.1 การทดลองหาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการตรึงรูป

ทดลองทำการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida cylindracea* ลงในซิลิกา-เจลลาตินนาในคอมโพสิตที่เหมาะสมซึ่งได้เลือกไว้แล้วในหัวข้อ 4.3.3 ในช่วงปริมาณเจลลาติน 8 ถึง 10 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ด้วยวิธีการใส่เอนไซม์ในปริมาณที่เหมาะสมลงในเจลที่เตรียมได้ภายหลังจากการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและคอนเดนเซชันระหว่าง TEOS และสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็นกลางโดยการเติมสารละลายแอมโมเนีย 1 โมลาร์ ในปริมาณที่เหมาะสม ผสมด้วยเครื่องกวนแบบแม่เหล็กเป็นเวลาประมาณ 10 นาที เพื่อหยุดการเร่งปฏิกิริยาของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกและเพื่อปรับให้ภาวะเหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ จากนั้นจึงค่อย ๆ เติมเอนไซม์ลงในระบบและปั่นกวนจนกระทั่งเอนไซม์ไม่สามารถละลายเป็นเนื้อเดียวกับเจลได้จึงหยุดการเติมเอนไซม์ เลือกนำระบบที่สามารถตรึงเอนไซม์ได้มากที่สุดและยังคงเป็นเนื้อเดียวมาใช้ในการเร่งปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ซิฟิเคชัน ของเรซิมิกแมนทอลกับเฮกซิลอะซิเตต

4.4.2 การทดสอบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

การทดสอบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป (enzyme activity) ในการแยก (-)เมนทอลออกจากเรซิมิกแมนทอลทำได้โดยการใช้ปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ซิฟิเคชันระหว่างเรซิมิกแมนทอลกับเฮกซิลอะซิเตต และใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่ภาวะที่เหมาะสมแล้วนำมาเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยผสมเรซิมิกแมนทอลที่มีความเข้มข้น 73 มิลลิโมลาร์ กับเฮกซิลอะซิเตตที่มีความเข้มข้น 360 มิลลิโมลาร์ ลงในไอโซออกเทนซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ปริมาณที่เหมาะสม สารละลายทั้งหมดถูกเติมลงในเครื่องปฏิกรณ์แบบถังกวนที่มีปริมาตร 230 มิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.1 ซึ่งถูกแช่อยู่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิให้เกิดปฏิกิริยาที่ 30 องศาเซลเซียส และใช้ความเร็วรอบในการหมุนของใบพัดเป็น 110 รอบต่อนาที (rpm) เก็บตัวอย่างในเวลาที่เหมาะสมเพื่อนำไปวิเคราะห์ (-)เมนทอลซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ด้วยเครื่องแก๊ส-โครมาโตกราฟี ทำการเปรียบเทียบอัตราการเกิดปฏิกิริยาเบื้องต้น (initial rate) ของเอนไซม์ที่ถูกตรึงกับเอนไซม์อิสระ



รูปที่ 4.1 เครื่องปฏิกรณ์แบบถังกวน ขนาดแสดงในหน่วยเซนติเมตร

4.4.3 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ (storage stability)

การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์โดยการตรวจสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ภายหลังจากที่ถูกเก็บไว้ในตัวพุงในระยะเวลา 15 วัน และ 35 วัน แล้วจึงนำมาใช้ในเร่งปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันเช่นเดียวกับในหัวข้อที่ 4.4.2

4.4.4 การทดสอบความสามารถในการกักเก็บเอนไซม์ของวัสดุจริง

การทดสอบความสามารถในการกักเก็บเอนไซม์ของตัวพุงทำได้โดยหลังจากการใช้งานของเอนไซม์เสร็จรูปในหัวข้อ 4.4.2 และ 4.4.3 แยกเอาเอนไซม์ที่จับออกจากสารละลายของปฏิกิริยาแล้วยังคงเดินเครื่องปฏิกรณ์แบบดังกล่าว ทุกๆ 2 ชั่วโมงเก็บตัวอย่างนำมาวิเคราะห์ความเข้มข้นของเมนทิลอะซิเตต

4.5 การวิเคราะห์

ในงานวิจัยนี้จะใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดเพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างของพื้นผิวภายนอกของวัสดุซิลิกา-เจลนาโนคอมโพสิต ใช้เทคนิค MAS²⁹SiNMR เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างของซิลิกาซึ่งเกิดจากกระบวนการโซล-เจล ใช้เครื่องวัดพื้นที่ผิวของสารในการวัดพื้นที่ผิวในการถ่ายเทมวลสารของวัสดุชนิดนี้ และใช้แก๊ส-โครมาโตกราฟีในการวิเคราะห์ปริมาณ(-)เมนทอลซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสที่สร้าง

4.5.1 การวิเคราะห์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ลักษณะทางโครงสร้างของพื้นผิวภายนอกของตัวอย่างสามารถหาได้โดยนำตัวอย่างที่แห้งสนิท (สามารถทำแห้งตัวอย่างได้ด้วยของไหลคาร์บอนไดออกไซด์ที่จุดวิกฤตด้วยเครื่อง CPD) ขนาดระดับมิลลิเมตรมาอบทอง ด้วยเครื่องอบทอง แล้วจึงนำมาใส่ไว้ในช่องตัวอย่างในคอลัมน์ สร้างสุญญากาศภายในคอลัมน์ จากนั้นลำแสงอิเล็กตรอนปฐมภูมิจะถูกโฟกัสให้ตกบนผิวตัวอย่าง และถูกผลักดันให้เคลื่อนไปบนผิวตัวอย่างนั้น ปฏิกริยาระหว่างอิเล็กตรอนกับผิวตัวอย่างทำให้มีอิเล็กตรอนทุติยภูมิซึ่งมีพลังงานต่ำหลุดออกมาจากบริเวณชั้นบนของผิวตัวอย่าง ซึ่งจะถูกจับและรวมเป็นสัญญาณ ในที่สุดจะถูกแปรเป็นภาพขาวดำปรากฏบนจอโทรทัศน์

4.5.2 การวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค MAS²⁹SiNMR

นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปีใช้วิเคราะห์สารโดยอาศัยสมบัติที่สารเกิดการดูดกลืนการแผ่รังสีแม่เหล็กไฟฟ้า โดยงานวิจัยนี้จะนำวัสดุซิลิกา-เจลลาตินนาโนคอมโพสิตซึ่งมีนิวคลีโอ ²⁹Si ไปวางในสนามแม่เหล็กแล้วให้พลังงานในช่วงความถี่ของคลื่นวิทยุที่เหมาะสม จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอที่เรียกว่า เรโซแนนซ์ ขึ้น ซึ่งภาวะนี้สามารถตรวจวัดได้จากการดูดกลืนพลังงานจากความถี่คลื่นวิทยุ ผลที่ได้แสดงในรูป chemical shift ของสเปกตรัม²⁹Si งานวิจัยนี้ใช้เครื่อง AVANCE 300 MHz Digital NMR Spectrometer ที่อุณหภูมิห้อง(23±1c) ผลการวิเคราะห์ประกอบด้วย ²⁹Si CP/MAS NMR spectrum

4.5.3 การวิเคราะห์ด้วยเครื่องวัดพื้นที่ผิวของสาร

พื้นที่ผิวของสารเป็นสมบัติทางกายภาพที่มีความสำคัญต่อการนำไปใช้ประกอบการพิจารณาเพื่อนำสารนั้นไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ที่มีคุณภาพตามที่ต้องการหรือตามมาตรฐานที่กำหนด ตัวอย่างที่เตรียมได้จากการทดลองจะวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FlowSorb II 2300 เพื่อหาพื้นที่ผิวของซิลิกา-เจลลาตินนาโนคอมโพสิตที่สังเคราะห์ โดยการวัดปริมาตรก๊าซไนโตรเจนที่ถูกดูดซับเป็นชั้นของโมเลกุลชั้นแรกพื้นที่ผิวของสาร แล้วจึงนำมาคำนวณเป็นพื้นที่ผิวของสาร ก่อนทำการวัดทำการไล่ก๊าซออกจากตัวอย่าง(outgassing)ที่อุณหภูมิ 40 c ด้วยตู้อบสูญญากาศ 1 ชั่วโมง

4.5.4 การวิเคราะห์โดยใช้เครื่องแก๊ส-โครมาโตกราฟี

การวิเคราะห์โดยใช้เครื่องแก๊ส-โครมาโตกราฟีทำได้โดยเก็บสารตัวอย่างประมาณ 0.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นจึงฉีดสารตัวอย่างจำนวน 1 ไมโครลิตร เข้าไปในเครื่องแก๊ส-โครมาโตกราฟี (Shimudzu รุ่น 7AG) ต่อเข้ากับเครื่องบันทึกข้อมูล (Integrator Shimudzu รุ่น14R) โดยมีดีเทคเตอร์ (detector) แบบเฟรมไอโอไนส์ดีเทคเตอร์ (FID = flame ionization detector) คอลัมน์ที่ใช้แบบสเตนเลส มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.3 มิลลิเมตร ยาว 2 เมตร บรรจุด้วย FFAD 10% Chromosorb ใช้ไนโตรเจนเป็นวัฏภาคตัวพา (carrier phase) เข้าไปในคอลัมน์โดยใช้อัตราการไหลของไนโตรเจนเป็น 45 มิลลิลิตรต่อนาทีอุณหภูมิภายในตู้อบ (oven), ดีเทคเตอร์ (detector) และอินเจคเตอร์ (injector) ควบคุมอุณหภูมิคงที่ที่ 150, 220 และ 220 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่าง (the coefficient of the variation)ของผลการทดลองวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้งเป็น ±8.68%