บทที่ 3

วิธีการวิจัย

ในการวิจัยเพื่อเตรียมเยื่อบางไคโตซานและเยื่อประกอบไคโตซาน ได้แบ่งวิธีดำเนินการออกเป็นขั้นตอนสำคัญๆ ได้ 4 ขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมและทดสอบเยื่อบางไคโตซานโดยวิธีอบแห้ง
2. เตรียมและทดสอบเยื่อบางไคโตซานโดยวิธีเปลี่ยนเฟส
3. ทดสอบเยื่อบางโพลิอีเทอร์ซัลโฟน
4. เตรียมและทดสอบเยื่อประกอบไคโตซาน/โพลิอีเทอร์ซัลโฟน

ทุกขั้นตอนจะมีวัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการ ดังต่อไปนี้

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 วัสดุ

- ไคโตซาน (Chitosan MW ~ 600 000, Fluka)
- เยื่อบางโพลิอีเทอร์ซัลโฟน ขนาดรู 0.22 ไมครอน เส้นผ่าศูนย์กลาง 4.7 เซนติเมตร (Polyethersulfone, PES GPWP04700, Millipore)
- บีกเกอร์ขนาด 1,000 500 250 50 และ 25 ml
- น้ำกลั่น
- ถาดสเตนเลส ขนาด 18 x 24 เซนติเมตร
- กระจกขนาด 20 x 25 เซนติเมตร
- กระดาษกาว
- ปากคีบปลายแบน (Forcep)
- นาฬิกาจับเวลา (Casio รุ่น HS-5)
- ไมโครมิเตอร์ (Micrometer)
- มัลติมิเตอร์ (Multimeter รุ่น YX-361 TR, Sanwa)
- ตู้อบ (Memmert, modell 400)
- เครื่องกวนแบบให้ความร้อน (Hot plate with stirrer; Heidolph, MR3001)
- เครื่องชั่งสารระบบดิจิตอลแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler, PL400)
- เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometers, Spectronic® 20^{+} series)

- เครื่องกรองสารละลายความดันสูง
- อุปกรณ์สำหรับวัดความหนืดสารละลาย ยี่ห้อ Schcott รุ่น 51610 / I
- ระบบการกรองแบบปิดตาย (Dead End Unit)

3.1.2 สารเคมี

- โพลิเอทิลีนไกลกอล (Polyethylene glycol MW 10,000 35,000, Fluka)
- โบวิ่งเซรูมอัมโบมิน (Bovine serum abumin, BSA MW 67,000, Calbiochem)
- กรดอะซีติก (CH_3COOH, Merck)
- กรดไฮโดรคลอริก (HCl, Merck)
- กลีเซอริน (Glycerin, วิทยาศรม)
- โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl, AR Grade, Merck)
- โซเดียมโฮดรอกไซด์ (NaOH, AR Grade, Merck)
- เบเรียมคลอไรด์ ($Ba_2Cl_2 \bullet 2HO_2$, Scharlau)
- โปแตสเซียมไอโอไดซ์ (Potassium iodide, Scharlau)
- ไอโอดีน (I_2 , AR Grade, Scharlau)
- Bio-Rad D_c Protein Assay Reagent A (Rio-Rad Laborotories)
- Bio-Rad D_c Protein Assay Reagent B (Rio-Rad Laborotories)

3.1.3 อุปกรณ์สำหรับวัดค่าอิมพีแดนซ์

- เครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้ากระแสสลับ (Function generator 15 MHz, Model DS340)
- เครื่องออสซิสโลสโคป (Oscilloscpoe รุ่น ss-7802A 20 MHz, Iwatsu)
- เครื่องขยายสัญญาณไฟฟ้า (Differential Amplifier)
- สายโคแอกเชียล
- ลวดนิเกิลอัลลอยด์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 125 ไมครอน
- ลวดเงิน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.35 มิลลิเมตร
- Calomel electrode 1 คู่ (Activon, AEP111 single junction refference probes)
- Chamber สำหรับประกอบเยื่อบางเพื่อวัดสมบัติทางไฟฟ้าของเยื่อบาง

3.2 การเตรียมเยื่อบางไคโตซาน

การเตรียมเยื่อบางไคโตซานมี 2 วิธีคือการอบแห้งและการเปลี่ยนเฟส โดยมีวิธีการเตรียมดังนี้

3.2.1 การเตรียมเยื่อบางแบบอบแห้ง

เตรียมสารละลายไคโตซานเข้มข้น 2% (w/v) ในกรดอะซีติก 1%(v/v) คนด้วยเครื่องกวนสาร ให้ไคโตซานละลายเป็นเนื้อเดียวกัน โดยกวนอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำไปกรองด้วยชุดกรองสารละลายด้วยความดันเพื่อแยกส่วนที่ไม่ละลายออก สารละลายไคโตซานที่กรองได้จะมีฟองอากาศแทรกอยู่ วางทิ้งไว้จนกว่าไม่มีฟองอากาศจะสารละลายไคโตซานเหลวพร้อมขึ้นรูปเป็นเยื่อแผ่น หลังจากนั้นเทสารละลายไคโตซาน 100 มิลลิลิตร ลงในถาดสเตนเลสขนาด 18 x 24 ซม. นำไปอบที่อุณหภูมิ 43 ^{0}C นาน 48 ชั่วโมง จะได้เยื่อบางแล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เทสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (4% w/v NaOH) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ลงในถาดแช่เยื่อบางเป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง เพื่อปรับสภาพเยื่อบางให้เป็นกลาง เทสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ออกจากถาดแล้วทำความสะอาดเยื่อบางโดยเติมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตรลงไปแช่ไว้เป็นเวลา 30 นาที เปลี่ยนน้ำกลั่นหลังจาก 15 นาทีแรกของการล้าง เมื่อสิ้นสุดการล้างเยื่อบาง 30 นาทีพบว่า pH ของน้ำที่แช่เยื่อบาง มีค่าเท่ากับ 7.1 ซึ่งเท่ากับ pH ของน้ำกลั่น จากนั้นนำเยื่อบางตรึงบนกระจกด้วยกระดาษกาวที่ขอบเยื่อบาง วางทิ้งให้แห้งที่ปลอดฝุ่น จะได้เยื่อบางไคโตซานแบบอบแห้งซึ่งเรียกว่า เยื่อบาง CH2D

3.2.2 การเตรียมเยื่อบางแบบเปลี่ยนเฟส

เทสารละลายไคโตซาน 2% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในถาดสเตนเลส ขนาด 18 x 24 ซม. นำไปอบที่อุณหภูมิ 43 ^{0}C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (หากใช้เวลาในการอบน้อยหรือมากกว่านี้ไม่สามารถขึ้นรูปเป็นเยื่อแผ่นได้) แล้วเปลี่ยนเฟสโดยการเทสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ลงบนสารละลายไคโตซาน แช่เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำความสะอาดเยื่อบางเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1 จะได้เยื่อบางโดยเรียกชื่อว่า CH2PH นอกจากนี้ได้เตรียมเยื่อบางไคโตซาน 1% เรียกชื่อว่า CH1PH ด้วยเพื่อเปรียบเทียบผลกับเยื่อบาง CH2PH พบว่า CH1PH ไม่สามารถขึ้นรูปเป็นเยื่อแผ่นได้ เนื่องจากขณะเปลี่ยนเฟสในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ สารละลายไคโตซานขณะเป็นเจลมีลักษณะเป็นเส้นคล้ายวุ้น จึงใช้ความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานเป็น 2% แทน งานวิจัยนี้ทดสอบเยื่อบาง CH2PH

3.2.3 การเตรียมเยื่อบางซึ่งผสมโพลิเอธีลีนไกลคอล แบบเปลี่ยนเฟส

เตรียมเยื่อบางไคโตซานผสมโพลีเอทิลีนไกลคอล (Polyethylene glycol, PEG) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล MWCO 10000 Da โดยผสม 5% , 8% และ 10% (w/v) ในสารละลายไคโตซาน 2% ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เทสารละลายผสมแต่ละชุดลงในถาดสเตนเลส หลังจากอบและแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ดังวิธีในข้อ 3.2.2 แล้วต้มเยื่อบางในสารละลาย 4% (w/v)NaOH ที่อุณหภูมิ 80 ^{0}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อช่วยให้ PEG ละลายออกจากเยื่อบาง (จุดหลอมเหลวของ PEG อยู่ในช่วง 62 –65 ^{0}C , Fluka) แล้วทำความสะอาดเยื่อบางเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.2.1 หลังจากนั้นแช่เยื่อบางในสารละลาย 10% กลีเซอรีน เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อช่วยให้เยื่อบางไม่ฉีกขาดขณะแห้ง แล้วทำความสะอาดเยื่อบางด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง แล้วตรึงเยื่อบางบนกระจกด้วยกระดาษกาว วางทิ้งไว้ให้แห้งในที่ปลอดฝุ่น เรียกเยื่อบางว่า CH25PEG, CH28PEG และ CH210PEG ตามลำดับ ผลจากการเตรียมพบว่าเยื่อบาง CH210PEG ไม่สามารถขึ้นรูปเป็นเยื่อแผ่นได้ทั้งนี้อาจเนื่องจากมีสาเหตุจากการเติมสาร PEG ลงในสารละลายไคโตซานมากเกินไป งานวิจัยนี้ทดสอบเยื่อบาง CH25PEG และ CH28PEG

3.3 การเตรียมเยื่อประกอบโพลิอีเทอร์ซัลโฟน /ไคโตซาน

จากการศึกษาในหัวข้อ 4.1 ทำให้ทราบว่าการเติม PEG ในสารละลายไคโตซานช่วยเพิ่มรูพรุนของเยื่อบาง การทดลองในขั้นตอนการเตรียมไคโตซานบนเยื่อบาง PES ในหัวข้อต่อไปจึงใช้สารละลายไคโตซานที่เติมและไม่เติม PEG ซึ่งใช้วิธีเตรียมเยื่อประกอบ 2 แบบ ดังนี้

3.3.1 เยื่อประกอบโพลิอีเทอร์ซัลโฟน/ไคโตซานแบบอัดความดัน

ใช้สารละลายไคโตซานเหลว 2% ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ในระบบ Dead End อัดความดัน 100 kPa เป็นเวลา 5 นาที เป็นสารป้อนผ่านเยื่อบางโพลิอีเทอร์ซัลโฟน (PES) หลังจากนั้นนำเยื่อบางออกจากชุดการกรองแล้วแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4% (w/v) NaOH เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำความสะอาดเยื่อบางที่ได้ เช่นเดียวกับข้อ 3.2.1 แล้วนำเยื่อบางวางทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องและปลอดฝุ่น จะได้เยื่อบางประกอบซึ่งเรียกว่าเยื่อประกอบ PES/CH2P

3.3.2 เยื่อประกอบโพลิอีเทอร์ซัลโฟน/ไคโตซานแบบรีดบนผิวหน้า

เนื่องจากเยื่อบาง PES ผิวหน้ามีลักษณะแววมันทำให้ยากแก่การเคลือบไคโตซานจึงแช่เยื่อบางในน้ำเป็นเวลา 10 นาที ก่อนวางบนกระจกแล้วเทสารละลายไคโตซาน 2% ซึ่งผสม 5% PEG (w/v) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงบนกระจกใกล้เยื่อบาง เคลือบสารละลายไคโตซานโดยใช้ไม้บรรทัดซึ่งพันกระดาษกาวให้ความหนา 0.30 มิลลิเมตร ปล่อยให้สารละลายไคโตซาระเหยที่อุณหภูมิห้อง

24 ^{0}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการเปลี่ยนเฟสโดยการนำกระจกซึ่งมีเยื่อบางอยู่แช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ประมาณ 10 นาที แล้วนำเยื่อบางที่ได้ไปต้มที่อุณหภูมิ 80 ^{0}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อไล่โมเลกุลของ PES ออกจากไคโตซานและทำความสะอาดเช่นเดียวกันข้อ 3.2.1 จะได้เยื่อบางประกอบซึ่งเรียกว่าเยื่อประกอบ PES/CH25PEG

3.4 การทดสอบเยื่อบาง

3.4.1 ทดสอบการบวมน้ำของเยื่อบาง

นำเยื่อบางและเยื่อบาง PES ตัดเป็นแผ่นสี่เหลี่ยมขนาด 1 x 1 เซนติเมตร จำนวน 5 แผ่น นำไปชั่งด้วยเครื่องชั่งสารระบบดิจิตอลแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง บันทึกน้ำหนักแห้งแต่ละแผ่น จากนั้นแช่เยื่อบางในน้ำกลั่น เป็นเวลา 1 , 3 , 5 , 7 และ 9 นาที นำเยื่อบางที่แช่น้ำไว้แต่ละช่วงของเวลา ซับน้ำที่ผิวเยื่อบางด้วยกระดาษกรอง มาชั่งน้ำหนัก แล้วบันทึกน้ำหนัก แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การบวมน้ำของเยื่อบางแต่ละชนิด จากสมการ (1)

3.4.2 ทดสอบฟลักซ์ของน้ำผ่านเยื่อบาง

นำเยื่อบางที่เตรียมได้ ข้อ 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3 ตัดเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.70 เซนติเมตร และเยื่อบาง PES วัดความหนาของเยื่อบางโดยใช้ไมโครมิเตอร์ แล้วแช่เยื่อบางในน้ำกลั่นเป็นเวลา 10 นาที ก่อนทดสอบ ประกอบเยื่อบางเข้ากับชุดการกรองแบบ Dead End เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ใช้ความดันแก่ระบบในช่วง 50 – 250 kPa บันทึกน้ำหนักของน้ำที่ไหลผ่านเยื่อบางต่อเวลา เป็นเวลา 3 นาที บันทึกน้ำหนักแต่ละนาที แล้วค่อยๆ เพิ่มความดันครั้งละ 50 kPa คำนวณหาค่าฟลักซ์ของน้ำผ่านเยื่อบางแต่ละความดัน เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฟลักซ์ของน้ำผ่านเยื่อบาง (J) กับความดัน (P) และวัดค่าความหนืดของน้ำ ดูการวัดความหนืดของสารละลายจากภาคผนวก 1 เพื่อคำนวณหาค่าความต้านทานการไหลของน้ำผ่านเยื่อบาง (R_m) จากสมการ (2)

3.4.3 ทดสอบการกรองสารละลาย BSA ของเยื่อบาง

นำเยื่อบางที่เตรียมได้ ข้อ 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3 ตัดเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.70 เซนติเมตร และเยื่อบาง PES วัดความหนาของเยื่อบางโดยใช้ไมโครมิเตอร์ แล้วแช่เยื่อบางในน้ำกลั่นเป็นเวลา 10 นาที ก่อนทดสอบ ประกอบเยื่อบางเข้ากับชุดการกรองแบบ Dead End เติมสารละลาย BSA เข้มข้น 1 mg/ml ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งมีค่า pH = 7.10 และใช้ความดันคงที่ 100 kPa ในระหว่างการกรองบันทึกน้ำหนักของเพอมิเอทของน้ำทุก 1 นาที เป็นเวลา 30 นาที เพื่อนำไปเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฟลักซ์ของของสารละลายผ่านเยื่อบางกับเวลาของการกรอง

และนำเพอมิเอทที่ได้จากการกรองนาทีที่ 5, 15 และ 30 นาทีไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วเปรียบเทียบผลการดูดกลืนแสงกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของสารละลาย BSA ในเพอมิเอท ดูวิธีการหาความเข้มข้นของสารละลาย BSA จากภาคผนวก 2

หลังการกรองสารละลาย BSA นำเยื่อบางทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น แล้วนำเยื่อบางประกอบเข้ากับชุดการกรองเช่นเดิมเพื่อวัดฟลักซ์น้ำกลั่นผ่านเยื่อบางหลังจากการกรองสารละลาย ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 3.4.2 แล้วคำนวณหาค่า R_f และ R_p จากสมการ (8), (9)

3.4.4 ทดสอบการกรองสารละลาย PEG ของเยื่อบาง

ทดสอบการกรองสารละลาย PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 10,000 และ 35,000 ที่ความเข้มข้น 50 ppm. ด้วยเยื่อบางที่เตรียมได้ ข้อ 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3 และเยื่อบาง PES ทางการค้า ขนาดรูเฉลี่ย 0.22 ไมครอน ทำการทดลองเช่นเดียวกันข้อ 3.4.3 วิธีการหาความเข้มข้นของสารละลาย PEG ที่ไหลผ่านเยื่อบาง ดูจาก ภาคผนวก 3 การคำนวณหาค่า R_f และ R_p ทำเช่นเดียวกันกับข้อ 3.4.3

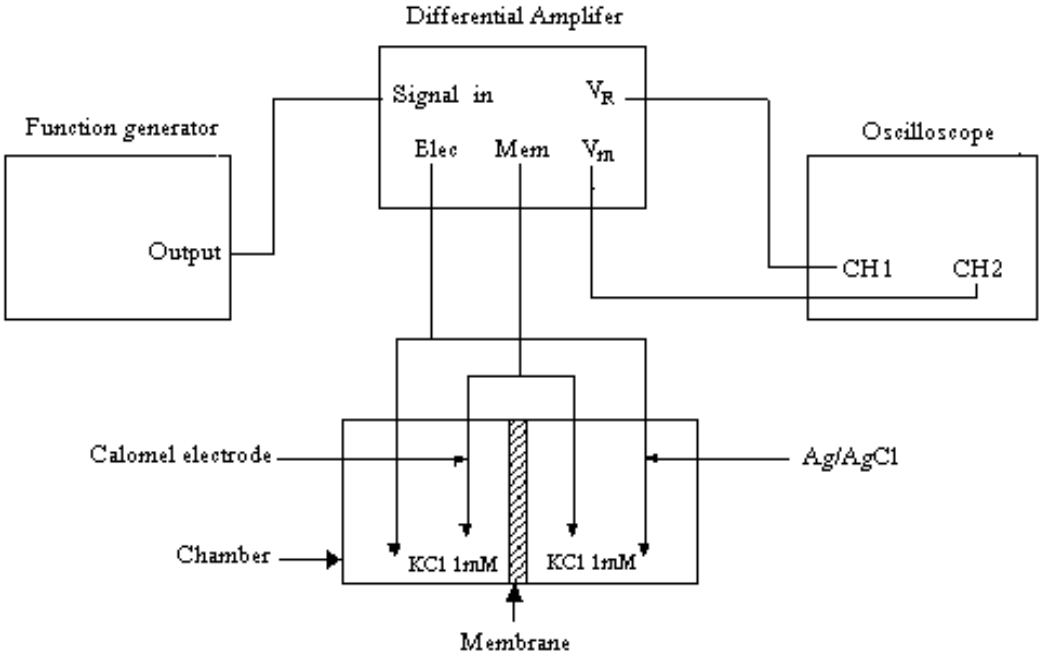
ภาพประกอบ 18 ชุดการกรองแบบ Dead End ประกอบด้วย

1. ถังก๊าซไนโตรเจน
2. วาล์วปรับความดัน
3. เกจวัดความดัน
4. เยื่อบาง (membrane)
5. สารป้อน (feed)
6. เพอมิเอท
7. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง

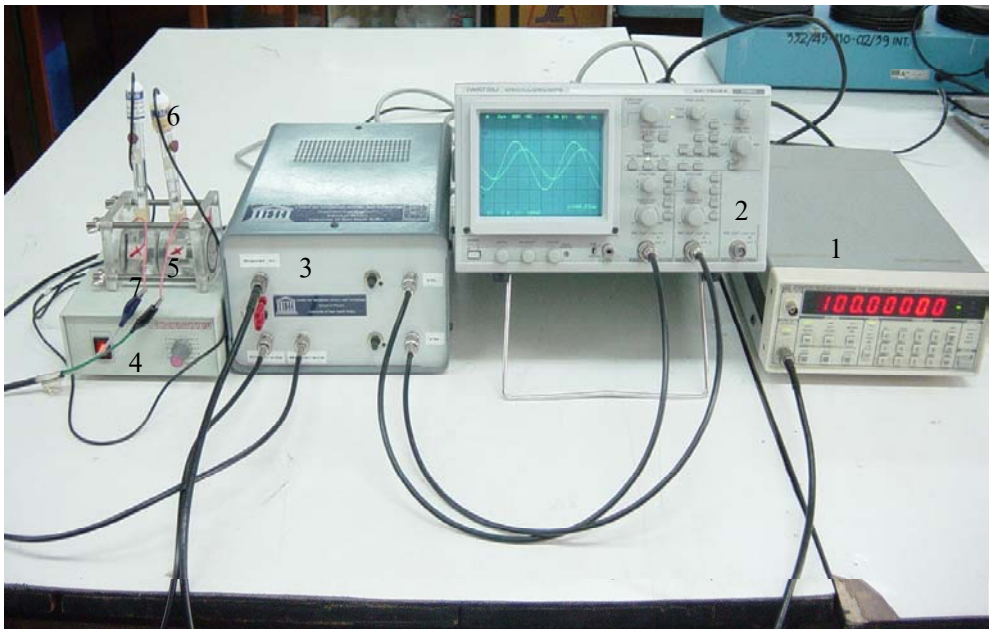
3.4.5 ทดสอบคุณสมบัติทางไฟฟ้าของเยื่อบาง

ทดสอบคุณสมบัติทางไฟฟ้าของเยื่อบางที่เตรียมได้ ข้อ 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3 และเยื่อบาง PES โดยการวัดค่าอิมพีแดนซ์ (Z) ความนำไฟฟ้า (G_{eff}) และความจุทางไฟฟ้า (C_{eff}) ของเยื่อบางในสารละลายอิเลคโตรไลต์ และเปรียบเทียบดังกล่าว ก่อนและหลังกรองสารละลาย โดยทำการทดลองตามขั้นตอน ภาพประกอบ 19 โดยประกอบเยื่อบางลงใน two Chamber system เติมสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 1 mM ลงใน Chamber ทั้งสองด้านของเยื่อบาง ต่อปลายทั้งสองของ Calomel electrode (Hg_2Cl_2) วัดความต่างศักย์คร่อมเยื่อบาง (V_m) ต่อเข้ากับ Differential Amplifier ซึ่งมีความต้านทาน (R = 12 kΩ) ต่ออนุกรมกับระบบวัดเพื่อสามารถคำนวณกระแสของวงจรได้ ใช้ Ag/AgCl เป็นตัวจ่ายสัญญาณไฟฟ้าให้แก่ระบบวัด

จ่ายสัญญาณกระแสไฟฟ้าสลับแก่ระบบ แล้วประมาณค่าศักย์ไฟฟ้า V_R, V_m และผลมุมต่างเฟส ($\Delta\phi$) ระหว่าง V_Rและ V_m จาก CH1 และ CH2 จาก Oscilloscope คำนวณค่าอิมพีแดนซ์ (Z) สภาพนำไฟฟ้า (G_{eff}) และความจุทางไฟฟ้า (C_{eff}) ของเยื่อบางจากสมการ (9) (10) (11) เปลี่ยนความถี่ระหว่าง 50 Hz – 100 kHz แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง (Z) , (G_{eff}) , (C_{eff}) กับความถี่ (f)



ภาพประกอบ 19 ไดอะแกรมอุปกรณ์การวัดค่าอิมพีแดนซ์ (Z) สภาพนำไฟฟ้า (G_{eff}) และความจุทางไฟฟ้า (C_{eff}) ของเยื่อบางโดยใช้กระแสไฟฟ้าสลับ



ภาพประกอบ 20 อุปกรณ์วัดค่าอิมพีแดนซ์ (Z) สภาพนำไฟฟ้า (G_{eff}) และความจุทางไฟฟ้า (C_{eff}) ของเยื่อบาง โดยใช้กระแสไฟฟ้าสลับ ประกอบด้วย

1. เครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้ากระแสสลับ
2. ออสซิลโลสโคป
3. เครื่องขยายสัญญาณ
4. เครื่องกวนสารละลาย
5. Chamber สำหรับประกอบเยื่อบาง
6. Calomel electrode
7. Ag/AgCl

3.5 ถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope :SEM)

การเตรียมตัวอย่างเยื่อบางสำหรับการถ่ายภาพ SEM เพื่อดูขนาดของรูพรุนเยื่อบาง โดยตัดเยื่อบาง ขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 เซนติเมตร 2 ชิ้น มาวางบนสตับ (Stub) สำหรับถ่ายภาพรูพรุนบนผิวหน้าและรูพรุนบนผิวด้านหลังของแผ่นเยื่อบาง ทำการฉาบ (coating) ผิวเยื่อบางด้วยไอของทองคำ เพื่อให้ชิ้นตัวอย่างนำไฟฟ้า แล้วนำมาส่องดูขนาดรูด้วยเครื่อง SEM ที่กำลังขยาย 5,000 และ 20,000 เท่า นำภาพถ่าย SEM มาวิเคราะห์หาขนาดรูพรุนเยื่อบางโดยใช้โปรแกรมคาร์นอย (Carnoy Softwave) และคำนวณหาความพรุน (Porosity) ของเยื่อบาง จากสมการ

$$\text{Porosity} = (A_p / A_m) \times 100 \qquad (12)$$

เมื่อ A_p คือ พื้นที่รูของเยื่อบาง

A_m คือ พื้นที่ทั้งหมดของเยื่อบาง