



## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสังเคราะห์ตัวดูดซับลอกแบบโมเลกุลสำหรับการเลือกดูดซับไฟโตสเตอรอล

Preparation of molecularly imprinted adsorbents

for selective adsorption of phytosterols

รศ.ดร. ดวงกมล ณ ระนอง และคณะ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัย

จากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

คณะวิศวกรรมศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชื่อโครงการ	การสังเคราะห์ตัวดูดซับลอกแบบโมเลกุลสำหรับการเลือกดูดซับไฟโตสเตอรอล
แหล่งเงินทุน	งบประมาณเงินแผ่นดิน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ประจำปีงบประมาณ	พ.ศ. 2558
ระยะเวลาทำการวิจัย	1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2557 ถึง 30 กันยายน 2558
หัวหน้าโครงการ	รศ.ดร.ดวงกมล ณ ระนอง
หน่วยงานต้นสังกัด	ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาการสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบสติกมาสเตอรอล และการดูดซับไฟโตสเตอรอลในสารละลายสเตอรอลผสมในเฮปแทน เพื่อใช้เป็นแนวทางในการนำกลับไฟโตสเตอรอลจากผลิตภัณฑ์พลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มในอุตสาหกรรมในอนาคต การทดลองแบ่งเป็นสองส่วน คือ การสังเคราะห์พอลิเมอร์ และการประเมินประสิทธิภาพในการดูดซับไฟโตสเตอรอลของพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้น โดยพิจารณาพอลิเมอร์ลอกแบบ 2 ชนิด ได้แก่ poly(acrylamide-co-ethylene glycol dimethacrylate) (PAM) และ poly(2-(trifluoromethyl)acrylic acid-co-trimethylolpropane trimethacrylate) (PMAA) ใช้ central composite design method (CCD) ในการกำหนดสภาวะภายในขอบเขตของการสังเคราะห์ที่พิจารณา จากนั้นนำผลการทดลองที่ได้มาพิจารณาอิทธิพลของตัวแปรในการสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบที่มีต่อประสิทธิภาพของตัวดูดซับที่ได้ โดยประเมินจากร้อยละการดูดซับของไฟโตสเตอรอลและอัตราส่วนการดูดซับของไฟโตสเตอรอลเทียบกับสติกมาสเตอรอล พบว่า อัตราส่วนของสารที่ทำให้เกิดการเชื่อมโยง (crosslink) มีผลต่อร้อยละการดูดซับของไฟโตสเตอรอลมากที่สุด โดย PAM ลอกแบบสติกมาสเตอรอลมีร้อยละการดูดซับของไฟโตสเตอรอลเท่ากับ 37 ซึ่งสูงกว่า PAM ไม่ลอกแบบที่มีร้อยละการดูดซับของไฟโตสเตอรอลเท่ากับ 33 หรือคิดเป็น 1.13 เท่า ในขณะที่ PMAA ลอกแบบสติกมาสเตอรอลมีร้อยละการดูดซับของไฟโตสเตอรอลเท่ากับ 55 ซึ่งสูงกว่า PMAA ไม่ลอกแบบที่มีร้อยละการดูดซับของไฟโตสเตอรอลเท่ากับ 42 หรือคิดเป็น 1.31 เท่า

**คำสำคัญ:** ไฟโตสเตอรอล, การดูดซับ, พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล, ปาล์มน้ำมัน

## ABSTRACT

This study emphasized on synthesis of stigmasterol imprinted polymer and adsorption of phytosterols from a solution of sterol mix in heptane which will be used as a pilot study for recovery of phytosterol from industrial wastes. The experiment is separated into two parts including, firstly, the synthesis of polymers and, secondly, the evaluation of phytosterol adsorption efficiency of synthesized polymers which percentage of phytosterol adsorption and adsorption ratio of phytosterol with respect to stigmasterol will be considered. In this study, poly(acrylamide-co-ethylene glycol dimethacrylate) (PAM) and poly(2-(trifluoromethyl)acrylic acid-co-trimethylolpropane trimethacrylate) (PMAA) were fabricated under conditions bounded by means of central composite design method (CCD). The study indicated that the variation of crosslink ratio gave the greatest impact on percentage of phytosterol adsorption. The imprinted PAM delivered a 37 percent of phytosterol adsorption which was more than that of non-imprinted PAM, at 33 percent, approximately 1.13 times. While the imprinted PMAA showed a 55 percent of phytosterol adsorption which was higher than that of non-imprinted PMAA, at 42 percent, roughly 1.31 times.

**Keywords:** phytosterol, adsorption, molecularly imprinted polymer, oil palm

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประเภทเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

ขอขอบคุณ นายณัฐวัฒน์ นนธ์อินสิน และนายกฤติน บิลอัปเดตล่ำห์ นักศึกษาระดับปริญญาตรี หลักสูตรวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี สจล. และนายชินกฤต ละดาดก นักศึกษาระดับปริญญาเอก หลักสูตรวิศวกรรมศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี สจล. สำหรับผลการทดลองในส่วนต่าง ๆ ที่ทำให้งานวิจัยนี้บรรลุวัตถุประสงค์

คณะผู้วิจัย

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	VI
สารบัญรูป.....	VII
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3. ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.4. วิธีดำเนินการวิจัย.....	3
1.5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>4</b>
2.1. ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.2. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
2.3. เอกสารอ้างอิง.....	7
<b>บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....</b>	<b>9</b>
3.1. วิธีสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบ.....	9
3.2. การออกแบบการทดลอง.....	9
3.3. การพิสูจน์สมบัติของพอลิเมอร์ลอกแบบ.....	11
3.4. การดูดซับสเตอรอล.....	11
<b>บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....</b>	<b>13</b>
4.1. Poly(AM-co-EGDMA); PAM.....	13
4.2. Poly(TFMAA-co-TRIM); PMAA.....	24
4.3. สรุป.....	35
4.4. เอกสารอ้างอิง.....	36
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....</b>	<b>38</b>
<b>บทที่ 6 สรุปผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย.....</b>	<b>39</b>
ภาคผนวก.....	40
ประวัตินักวิจัย.....	94

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1-1 คุณสมบัติของไฟโตสเตอรอลที่สภาวะมาตรฐาน	4
3.2-1 สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ PAM และ PMAA	10
3.2-2 อัตราส่วนที่ใช้ในการสังเคราะห์ PAM ภายใต้สภาวะที่กำหนดโดย CCD	10
3.2-3 อัตราส่วนที่ใช้ในการสังเคราะห์ PMAA ภายใต้สภาวะที่กำหนดโดย CCD	11

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1-1 โครงสร้างของไฟโตสเตอรอลแต่ละประเภท	4
2.1-2 ขั้นตอนการสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบ	5
4.1-1 อินฟราเรดสเปกตรัมของ (ก) PAM ไม่ลอกแบบสติกมาสเตอรอล (ข) EGDMA และ (ค) acrylamide monomer	14
4.1-2 โครงสร้างของ acrylamide monomer (ซ้าย) และ EGDMA (ขวา)	15
4.1-3 โครงสร้างของ PAM	15
4.1-4 อินฟราเรดสเปกตรัมของ (ก) PAM ไม่ลอกแบบสติกมาสเตอรอล (ข) PAM ลอกแบบ สติกมาสเตอรอล	16
4.1-5 พื้นผิวของพอลิเมอร์ที่กำลังขยายต่างๆ (ก) NIP-A 500 เท่า (ข) NIP-A 20,000 เท่า (ค) MIP-A-STD 500 เท่า (ง) MIP-A-STD 20,000 เท่า	17
4.1-6 ร้อยละการดูดซับของไฟโตสเตอรอลของ PAM ลอกแบบสติกมาสเตอรอลที่สภาวะต่าง ๆ เทียบกับ PAM ไม่ลอกแบบ	18
4.1-7 ระนาบของค่าการดูดซับสเตอรอล เมื่อปริมาณ crosslink และ template เปลี่ยนแปลง โดยปริมาณตัวทำละลายคงที่ เท่ากับ (ก) 5, (ข) 6 และ (ค) 7 ml	20
4.1-8 ระนาบค่าร้อยละการดูดซับสเตอรอล เมื่อปริมาณ crosslink และตัวทำละลายเปลี่ยนแปลง โดยปริมาณของ template คงที่ เท่ากับ (ก) 0.15, (ข) 0.20 และ (ค) 0.25 mmol	21
4.1-9 ระนาบของค่าร้อยละการดูดซับสเตอรอล เมื่อปริมาณ template และตัวทำละลาย เปลี่ยนแปลง โดยปริมาณ crosslink คงที่ เท่ากับ (ก) 2.5, (ข) 3 และ (ค) 3.5 mmol	22
4.1-10 อัตราส่วนการดูดซับของไฟโตสเตอรอลเทียบกับการดูดซับสติกมาสเตอรอลของ MIP-A-STD	23
4.2-1 อินฟราเรดสเปกตรัมของ (ก) PMAA ไม่ลอกแบบสติกมาสเตอรอล (ข) MAA และ (ค) EGDMA	25
4.2-2 โครงสร้างของ TFMAA (ซ้าย) และ EGDMA (ขวา)	26
4.2-3 โครงสร้างของ PMAA	26
4.2-4 อินฟราเรดสเปกตรัมของ (ก) PMAA ไม่ลอกแบบ (ข) PMAA ลอกแบบสติกมาสเตอรอล	27
4.2-5 พื้นผิวของพอลิเมอร์ที่กำลังขยายต่าง ๆ (ก) NIP-T 500 เท่า (ข) NIP-T 20,000 เท่า (ค) MIP-T-STD 500 เท่า (ง) MIP-T-STD 20,000 เท่า	28
4.2-6 ร้อยละการดูดซับสเตอรอลของ PMAA ลอกแบบสติกมาสเตอรอลที่สภาวะต่าง ๆ เทียบกับ PMAA ไม่ลอกแบบ (เส้นประสีแดง)	29
4.2-7 ระนาบของค่าการดูดซับของไฟโตสเตอรอลเมื่อปริมาณ crosslink และ template เปลี่ยนไป โดยปริมาณของตัวทำละลายคงที่ เท่ากับ (ก) 12.5, (ข) 15 และ (ค) 17.5 ml	31
4.2-8 ระนาบของค่าการดูดซับไฟโตสเตอรอลเมื่อปริมาณ crosslink และตัวทำละลายเปลี่ยนไป โดยปริมาณ template คงที่ เท่ากับ (ก) 0.1125, (ข) 0.125 และ (ค) 0.1375 mmol	32
4.2-9 ระนาบของค่าการดูดซับไฟโตสเตอรอลเมื่อปริมาณ template และตัวทำละลายเปลี่ยนไป โดยที่ปริมาณ crosslink คงที่ เท่ากับ (ก) 0.75, (ข) 1 และ (ค) 1.25 mmol	33
4.2-10 อัตราส่วนการดูดซับไฟโตสเตอรอลเทียบกับการดูดซับสติกมาสเตอรอลของ MIP-T-STD	34

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ไฟโตสเตอรอล (Phytosterols) เป็นสารกลุ่มสเตอรอลที่มีในพืช มีโครงสร้างคล้ายคอเลสเตอรอล (cholesterol) และช่วยลดการดูดซึมคอเลสเตอรอลโดยเฉพาะชนิด Low Density Lipoprotein (LDL) ในร่างกายมนุษย์ได้ จึงมีการนำไปใช้ในอาหารเพื่อสุขภาพ นอกจากนี้ไฟโตสเตอรอลยังสามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตยาได้หลายชนิด แต่การสังเคราะห์ไฟโตสเตอรอลด้วยปฏิกิริยาเคมีมีต้นทุนสูงและยุ่งยาก จึงมีการพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อสกัดไฟโตสเตอรอลจากพืชต่าง ๆ เช่น wheat, rye, cereal, rapeseed และเทคโนโลยีในการนำกลับไฟโตสเตอรอลจากกรดไขมันที่ได้จากหอการค้าจัดกลั่นในกระบวนการกลั่นพืช น้ำมัน เช่น ถั่วเหลือง เป็นต้น สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีการผลิตไฟโตสเตอรอลเชิงการค้าจึงต้องนำเข้าจากต่างประเทศ

ประเทศไทยมีการผลิตน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์เพื่อการบริโภคและใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลเป็นปริมาณมาก สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) รายงานว่าในปี พ.ศ. 2553 มีการผลิตไบโอดีเซลมากถึง 45.04 ล้านตัน จึงประมาณได้ว่ามีกรดไขมันปาล์ม (Palm Fatty Acid Distillate: PFAD) ที่เป็นผลพลอยได้จากการกลั่นน้ำมันปาล์มเกิดขึ้นถึง 2.25 ล้านตัน จากการค้นคว้ารายงานการวิจัยพบว่ากรดไขมันปาล์มมีไฟโตสเตอรอล (phytosterols) อยู่ร้อยละ 0.2-15 ขึ้นอยู่กับกระบวนการและสถานะในการกลั่นน้ำมันปาล์ม เป็นที่น่าเสียดายว่ากรดไขมันปาล์มส่วนใหญ่ถูกนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นราคาถูกในการผลิตไบโอดีเซล การพัฒนากระบวนการนำกลับไฟโตสเตอรอลเพื่อใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารและยาให้มีความคุ้มค่าเชิงเศรษฐศาสตร์จึงมีความสำคัญที่จะช่วยเพิ่มมูลค่ากรดไขมันปาล์มและทำให้กระบวนการโดยรวมในการผลิตน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และไบโอดีเซลมีความคุ้มค่าเชิงเศรษฐศาสตร์ยิ่งขึ้น ซึ่งหากผู้ประกอบการมีกำไรเพิ่มขึ้น ภาครัฐก็ไม่อาจลดงบประมาณที่นำมาอุดหนุนผู้ผลิตไบโอดีเซลลงได้

การผลิตไฟโตสเตอรอลในต่างประเทศทำโดยการนำกลับไฟโตสเตอรอลจากกรดไขมันจากยอดหอการค้าจัดกลั่น (Deodorized Distillate; DD) ในกระบวนการผลิตน้ำมันถั่วเหลืองบริสุทธิ์เป็นหลัก โดยนำ DD มาทำปฏิกิริยาเปลี่ยนเป็นสารประกอบเมทิลเอสเทอร์ และนำไปกลั่นโมเลกุล (Molecular Distillation) เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของไฟโตสเตอรอลในเมทิลเอสเทอร์ จากนั้นจึงตกผลึก (Crystallization) หรือสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction) เพื่อแยกไฟโตสเตอรอลออก แต่เทคโนโลยีดังกล่าวไม่สามารถนำมาใช้ประยุกต์ใช้กับการแยกไฟโตสเตอรอลออกจากกรดไขมันปาล์มได้ เนื่องจากกรดไขมันปาล์มมีองค์ประกอบหลักต่างจากกรดไขมันที่มาจากน้ำมันถั่วเหลือง และมีจุดเยือกแข็งสูงกว่าอุณหภูมิที่ใช้ตกผลึกไฟโตสเตอรอล

คณะวิจัยมีแนวคิดที่จะนำการดูดซับ-คายซับมาใช้ในการนำกลับไฟโตสเตอรอลจากกรดไขมันปาล์ม เนื่องจากการดูดซับเป็นเทคนิคที่เหมาะสมในการแยกสารที่มีความเข้มข้นต่ำในสารละลาย ทั้งนี้ประสิทธิภาพของกระบวนการจะขึ้นอยู่กับความสามารถในการเลือกดูดซับของวัสดุดูดซับที่ใช้และความยากง่ายในการคายซับไฟโตสเตอรอลออกจากวัสดุดูดซับ

เทคนิคการลอกแบบโมเลกุล (molecular imprint technique) ถูกนำมาใช้ในการสังเคราะห์สารดูดซับหรือตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะเจาะจงกับขนาด รูปร่าง และลักษณะของโมเลกุลต้นแบบ (template) โดยวัสดุที่ได้สามารถแยกไอโซเมอร์ที่มีโครงสร้างคล้ายกันมากได้อย่างมีประสิทธิภาพ ที่ผ่าน

มาจึงมีการนำวัสดุที่สังเคราะห์ด้วยวิธีนี้ไปประยุกต์ใช้ในงานหลายด้าน เช่น การแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง (high performance liquid chromatography), การทำหัวตรวจวัด (sensor), การนำส่งยา (drug delivery) ฯลฯ

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการสังเคราะห์วัสดุดูดซับที่มีความจำเพาะเจาะจงในการเลือกดูดซับสารกลุ่มไฟโตสเตอรอลโดยใช้เทคนิคการลอกแบบโมเลกุล โดยวัสดุดูดซับที่สังเคราะห์ได้จะถูกนำไปตรวจสอบสมบัติทางกายภาพ และทดสอบประสิทธิภาพในการดูดซับ-คายซับสารกลุ่มไฟโตสเตอรอล

## 1.2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1. สังเคราะห์วัสดุดูดซับไฟโตสเตอรอลด้วยเทคนิคการลอกแบบโมเลกุล
- 1.2.2. ศึกษาอิทธิพลของปัจจัยในขั้นการสังเคราะห์ (synthesis parameter) ที่มีต่อประสิทธิภาพในการดูดซับ-คายซับไฟโตสเตอรอลของวัสดุดูดซับที่ได้

## 1.3. ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้ทำการสังเคราะห์ poly(acrylamide-co-ethylene glycol dimethacrylate) (PAM) และ poly(2-(trifluoromethyl)acrylic acid-co-trimethylolpropane trimethacrylate) (PMAA) โดยใช้เทคนิคการลอกแบบโมเลกุล (molecular imprinting technique) เพื่อให้รูพรุนของวัสดุดูดซับที่สังเคราะห์ได้มีความจำเพาะเจาะจงกับโมเลกุลของไฟโตสเตอรอลในกระบวนการดูดซับ และคายซับไฟโตสเตอรอลได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยในการสังเคราะห์จะปรับเปลี่ยน สัดส่วนของ monomer, crosslinker, initiator ในสารละลายที่ทำปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน, อุณหภูมิและระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา จากนั้นจะนำวัสดุดูดซับที่สังเคราะห์ ได้ภายใต้สภาวะต่างๆ ไปตรวจสอบสมบัติทางกายภาพ (ขนาดอนุภาค, พื้นที่ผิวจำเพาะ, ขนาดและการกระจายขนาดของรูพรุน), สมบัติทางเคมี (หมู่ฟังก์ชันที่แสดงโครงสร้างทางเคมี) และทดสอบประสิทธิภาพในการดูดซับ-คายซับไฟโตสเตอรอลในสารละลาย จำลอง (model solution) โดยใช้ชุดทดลองแบบกะ คำนวณค่าความจุในการดูดซับไฟโตสเตอรอล, ร้อยละการนำกลับไฟโตสเตอรอล และค่าการเลือกดูดซับไฟโตสเตอรอล เปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัสดุที่สังเคราะห์ด้วยเทคนิคการลอกแบบโมเลกุล (MIM) กับวัสดุดูดซับที่สังเคราะห์โดยไม่ใช้ โมเลกุลต้นแบบ (NIM)

#### 1.4. วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้จะสังเคราะห์วัสดุลอกแบบโมเลกุล (molecular imprinted materials: MIM) ภายใต้สภาวะต่าง ๆ จากนั้นนำ MIM ที่ได้ไปวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และประสิทธิภาพในการนำกลับไฟโตสเตอรอล โดยมีรายละเอียดการดำเนินงาน ดังนี้

- การสังเคราะห์วัสดุลอกแบบโมเลกุล จะทำการปรับเปลี่ยน สัดส่วนของ monomer, crosslinker, initiator ในสารละลายสำหรับทำปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน, อุณหภูมิและระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา
- การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ ทำโดยใช้การดูดซับเชิงกายภาพของแก๊สไนโตรเจน (BET) วัดพื้นที่ผิวจำเพาะ ขนาดรูพรุนและการกระจายขนาดรูพรุน และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) วัดขนาดอนุภาค
- สมบัติทางเคมีจะทำการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันที่แสดงโครงสร้างทางเคมีโดยใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)
- ประสิทธิภาพในการนำกลับไฟโตสเตอรอล จะพิจารณาการดูดซับและคายซับไฟโตสเตอรอลโดยใช้สารละลายจำลอง (model solution) โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ MIM กับวัสดุที่ไม่ลอกแบบโมเลกุล (NIM) การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการนำกลับทำโดยนำสารละลายก่อนและหลังการดูดซับมาหาปริมาณไฟโตสเตอรอลด้วยเครื่องวิเคราะห์แก๊สโครมาโตกราฟ (GC) และโครมาโตกราฟของเหลวประสิทธิภาพสูง (HPLC) คำนวณหาความจุในการดูดซับ (Adsorption Capacity), ค่าการเลือกดูดซับไฟโตสเตอรอล (Selectivity to Phytosterol Adsorption) และร้อยละการนำกลับ (% Recovery) ไฟโตสเตอรอล

#### 1.5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.5.1. องค์ความรู้เกี่ยวกับการสังเคราะห์สารด้วยเทคนิคการลอกแบบโมเลกุล สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดในการสังเคราะห์วัสดุดูดซับเพื่อนำกลับสารเคมีมูลค่าสูงชนิดอื่นได้
- 1.5.2. นักศึกษาที่เข้าร่วมโครงการมีความรู้ด้านการสังเคราะห์สารด้วยเทคนิคการลอกแบบโมเลกุล และการออกแบบกระบวนการนำกลับสารเคมีด้วยเทคนิคการดูดซับ-คายซับ
- 1.5.3. ไฟโตสเตอรอลที่ได้มีมูลค่าสูง จึงเป็นการเพิ่มมูลค่ากับวงจรการผลิตน้ำมันปาล์มและไบโอดีเซลโดยรวม

## บทที่ 2

### ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

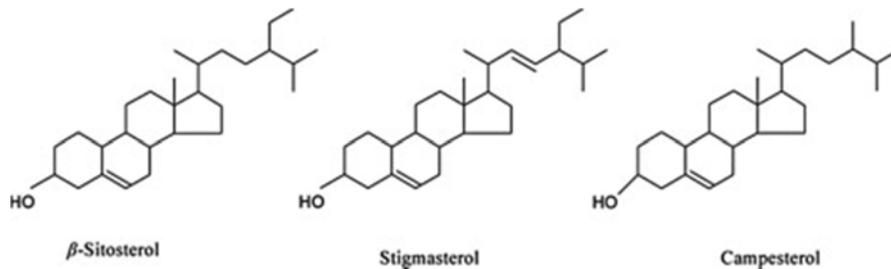
#### 2.1. ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

##### 2.1.1. ไฟโตสเตอรอล

ไฟโตสเตอรอล (phytosterols) เป็นสารประกอบพวกสเตียรอยด์ที่พบในพืชไขมัน มีโครงสร้างคล้ายคอเลสเตอรอลที่เป็นสารกลุ่มสเตียรอยด์ซึ่งพบในสัตว์ โครงสร้างหลักของไฟโตสเตอรอลประกอบด้วยวงคาร์บอน 4 วงเชื่อมต่อกัน มีหมู่ฟังก์ชัน (functional group) คือ หมู่ไฮดรอกซิล เกาะอยู่ที่ตำแหน่ง 3 บีตา (3 $\beta$ -hydroxyl group)

ไฟโตสเตอรอลในธรรมชาติมีอยู่ด้วยกันหลายชนิด ทั้งที่อยู่ในรูปสเตอรอลอิสระ (free sterols) และสารประกอบเอสเทอร์ของสเตอรอล (sterol esters หรือ steryl esters) โดยสเตอรอลที่อยู่ในรูป บีตา-ซิโทสเตอรอล ( $\beta$ -sitosterol), สติกมาสเตอรอล (stigmasterol) และแคมเปสเตอรอล (campesterol) เป็นไฟโตสเตอรอลที่มีอยู่เป็นปริมาณมากในธรรมชาติ และนิยมนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารและยา

ไฟโตสเตอรอลทั้ง 3 ชนิดมีโครงสร้างหลักเหมือนกันทุกประการ แตกต่างกันที่โครงสร้างของหมู่อัลคิลที่มาเกาะกับวงคาร์บอน ดังแสดงในรูปที่ 2-1-1 สมบัติของไฟโตสเตอรอลทั้งสามแสดงในตารางที่ 2-1-1



รูปที่ 2.1-1 โครงสร้างของไฟโตสเตอรอลแต่ละประเภท

ตารางที่ 2.1-1 คุณสมบัติของไฟโตสเตอรอลที่สภาวะมาตรฐาน [1-3]

ชนิด	สูตรโมเลกุล	มวลโมเลกุล (g/mol)	จุดเดือด (°C)	จุดหลอมเหลว (°C)	ความหนาแน่น (g/cm <sup>3</sup> )
$\beta$ -sitosterol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	414.71	501.9	139-142	0.970
stigmasterol	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O	412.69	490.4	161-170	0.953
campesterol	C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O	400.68	489.5	156-160	0.980

## 2.1.2. การสังเคราะห์สารด้วยวิธีลอกแบบโมเลกุล

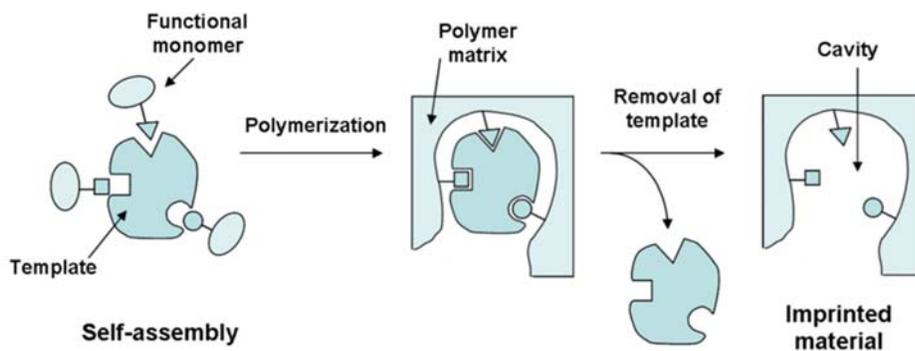
วัสดุดูดซับมักเป็นสารที่มีโครงสร้างโมเลกุลขนาดใหญ่ประกอบด้วยหน่วยย่อยขนาดเล็กจำนวนมาก ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะทางเคมี มีรูพรุนภายในขนาดต่างกันจำนวนมาก วัสดุดูดซับที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยวิธีทั่วไป เมื่อถูกนำมาใช้เป็นสารดูดซับจึงมักเกิดการดูดซับแบบไม่จำเพาะเจาะจงต่อสารใดสารหนึ่ง

การสังเคราะห์วัสดุด้วยวิธีแบบลอกแบบโมเลกุล (Molecular Imprinting Technique) เป็นเทคนิคหนึ่งที่น่ามาใช้เพื่อเพิ่มความจำเพาะของตัวดูดซับกับสารที่ต้องการดูดซับ โดยนำสารที่ต้องการดูดซับมาทำเป็นโมเลกุลต้นแบบ (template) เทคนิคนี้ถูกใช้อย่างกว้างขวางในงานที่ต้องการความจำเพาะของโมเลกุล เช่น การแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี การเร่งปฏิกิริยาเคมี การทำหัวตรวจวัด ฯลฯ [4-7] เทคนิคนี้สามารถปรับสมบัติของช่องว่างภายใน (cavities) ของวัสดุดูดซับให้มีสภาพใกล้เคียงกับโมเลกุลของสารที่ต้องการดูดซับได้ทั้งขนาดและรูปร่าง และแนวโน้มในการสร้างอันตรกิริยา ทั้งนี้ลักษณะของช่องว่างที่ได้ จะขึ้นกับพันธะทางเคมีและอันตรกิริยาระหว่างโครงสร้างของวัสดุดูดซับและสารที่ใช้เป็นโมเลกุลต้นแบบ (template) สมบัติและความสามารถในการจดจำโมเลกุลต้นแบบของพอลิเมอร์ที่ได้ นอกจากนี้ยังขึ้นกับอันตรกิริยาระหว่างสารที่เป็นโครงสร้างหลักกับโมเลกุลต้นแบบแล้ว ยังขึ้นกับชนิดของ cross-linker, ตัวทำละลายที่เลือกใช้ และตัวแปรในการสังเคราะห์ (synthesis parameters) เช่น ความเข้มข้นของสาร (โมโนเมอร์, โมเลกุลต้นแบบ, cross-linker), อุณหภูมิ และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา [5]

รูปที่ 2.1-2 แสดงขั้นตอนหลักในการสังเคราะห์สารด้วยวิธีลอกแบบโมเลกุลสำหรับกรณีสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล การสังเคราะห์จะเริ่มจาก นำ monomer, crosslinker, template และตัวเริ่มปฏิกิริยา (initiator) มาผสมกันเป็นสารละลาย แล้วให้ความร้อนแก่สารละลายเพื่อให้สารทำปฏิกิริยากันกลายเป็นพอลิเมอร์ จากนั้นจึงกำจัด template ออกจากพอลิเมอร์ที่ได้

การกำจัด template ออกจากวัสดุลอกแบบที่ได้ อาจทำได้โดยการใช้ตัวทำละลายชะออกหรือเผาไล แต่เนื่องจากโดยทั่วไปโมเลกุลต้นแบบมักเป็นสารที่มีราคาแพงและโครงสร้างของวัสดุที่ได้จะถูกทำลายได้เมื่อสัมผัสกับความร้อนเป็นเวลานาน จึงนิยมใช้การชะด้วยตัวทำละลายเพื่อนำกลับโมเลกุลต้นแบบมาใช้ในการสังเคราะห์ใหม่ ลดต้นทุนการสังเคราะห์วัสดุลอกแบบโมเลกุล

ตัวทำละลายที่นิยมใช้มีหลายชนิด ได้แก่ เบนซิลแอลกอฮอล์ (benzyl alcohol), คลอโรโทลูอีน (chlorotoluene), คลอโรเบนซีน (chlorobenzene), แอนิซอล (anisole), เฮปเทน (heptane) ทั้งนี้การเลือกตัวทำละลายจำเป็นต้องคำนึงถึงสมบัติของวัสดุลอกแบบโมเลกุลหลังการกำจัดโมเลกุลต้นแบบด้วย โดยจะต้องไม่สูญเสียสมบัติการเลือกดูดซับต่อสารที่ต้องการ



รูปที่ 2.1-2 ขั้นตอนการสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบ [8]

## 2.2. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ที่ผ่านมา มีงานวิจัยที่ทำการศึกษาพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลสารกลุ่มสเตอรอยด์อยู่บ้างแต่ไม่มากนัก Qiujin และคณะ [9] สังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลของ  $17\beta$ -estradiol โดยใช้ 2-(trifluoromethyl) acrylic acid เป็นโมโนเมอร์และ trimethylolpropane trimethacrylate เป็น cross-linker และนำพอลิเมอร์ลอกแบบที่สังเคราะห์ได้ไปใช้เป็นวัสดุติดซับเพื่อแยกสารในการวิเคราะห์องค์ประกอบในนมด้วยโครมาโตกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง (HPLC) พบว่าเมื่อใช้พอลิเมอร์ลอกแบบที่สังเคราะห์จะมีประสิทธิภาพดีกว่าพอลิเมอร์ที่ไม่ได้ลอกแบบโมเลกุลโดยทำให้รูปร่างของโครมาโตแกรมที่ได้ชัดเจนขึ้นและผลการวิเคราะห์มีความแม่นยำ Kitahara และคณะ [10] สังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลโดยใช้สไตรีนเป็นโมโนเมอร์และไดไวนิลเบนซีนเป็น cross-linker เนื่องจากพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์จากสไตรีนและไดไวนิลเบนซีนมีความคงทนสูงกว่าพอลิเมอร์ชนิดอื่น นิยมใช้ทั่วไปทั้งในการผลิตเรซินเกรดการค้าและการสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล สามารถปรับเปลี่ยนสถานะในการสังเคราะห์ได้ง่าย Kitahara และคณะได้นำ cholesterol ซึ่งเป็นโมเลกุลต้นแบบไปตรึงบนพื้นผิวของซิลิกาที่มีความพรุนก่อน และนำไปใส่ในสารละลายขณะทำปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน พบว่าพอลิเมอร์ลอกแบบที่ได้มีความจำเพาะเจาะจงต่อโมเลกุลของ cholesterol มากกว่าพอลิเมอร์ที่ไม่ได้ลอกแบบถึง 5.7 เท่าเมื่อนำไปใช้เป็นวัสดุติดซับในคอลัมน์แยกสารเพื่อวิเคราะห์ด้วยโครมาโตกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง

Jin Y. และคณะ [11] กล่าวถึงการเตรียมพอลิเมอร์ลอกแบบด้วยวิธีการเตรียมแบบตกตะกอน โดย monomer และสารเชื่อมโยงที่ใช้คือ TFMAA และ TRIM ตามลำดับ ขั้นตอนแรกจะผสม monomer และสารเชื่อมโยงเข้าด้วยกันในอะซิโตนไตริลซึ่งเป็นตัวทำละลาย หลังจากนั้นจึงเติมตัวเร่งปฏิกิริยาลงไป ในที่นี้คือ AIBN ขั้นตอนต่อมาสารละลายจะถูกทำให้อิมพัลส์โดยป้อนก๊าซไนโตรเจนไหลผ่านเป็นเวลา 5 นาที เพื่อป้องกันออกซิเจนที่อาจทำปฏิกิริยากับสารต่าง ๆ ได้ หลังจากนั้นจะให้ความร้อนกับสารละลายผ่านอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิเท่ากับ  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  ความเร็วรอบเท่ากับ 190 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พอลิเมอร์ที่เกิดขึ้นจะแขวนลอยอยู่ในสารละลาย จากนั้นจะแยกเก็บพอลิเมอร์ออก ขั้นตอนสุดท้ายคือการนำ Template ออกโดยนำพอลิเมอร์ลอกแบบมาล้างด้วยสารละลายเมทานอลที่มีความเข้มข้นของกรดอะซิติกร้อยละ 10 โดยปริมาตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วยอะซิโตนไตริลบริสุทธิ์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

Nor Azah Yusof [12] และคณะ รายงานถึงการเตรียมพอลิเมอร์แบบบัลด์ ขั้นตอนแรกคือละลายโมเลกุล 2,4-ไดไนโตรฟีนิล (2,4-dinitrophenyl) ซึ่งเป็น template ลงในปิกลีเกอร์ หลังจากนั้นเติม monomer สารเชื่อมโยง และตัวเริ่มปฏิกิริยา คือ acrylamide EGDMA และ benzoyl peroxide ลงในปิกลีเกอร์ หลังจากนั้นนำไปไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจนเป็นเวลา 10 นาที พอลิเมอร์ที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นก้อน ขั้นตอนต่อมาบดพอลิเมอร์แล้วนำ template ออกโดยการล้างพอลิเมอร์ด้วยสารละลายเมทานอล-กรดอะซิติกที่มีความเข้มข้น 1 : 2 จนกว่า template จะถูกล้างออกจนหมด

Duan และคณะ [13] ศึกษาอิทธิพลของตัวแปรในการสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบโอลิโกเมอร์ไซยานิดิน (oligomeric procyanidins; OPCs) ที่มีการรายงานว่าสามารถใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ เห็นได้ว่าตัวแปรที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการดูดซับของพอลิเมอร์ลอกแบบ OPCs ที่สุดคือการสร้างพันธะระหว่าง template และ monomer ดังนั้นการสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบจำเป็นที่จะต้องให้ template ให้มีอัตราส่วนมากเกินพอในการสังเคราะห์ เพื่อให้พอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นเกิดการลอกแบบให้มาก crosslink นับเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความแข็งแรงของช่องว่างที่เกิดจากการลอกแบบ เป็นตัวแปรที่กำหนดมาตรฐานวิทยาของพอลิเมอร์ และมีส่วนช่วยในการเพิ่มความทนทานเชิงกลและความเสถียรของโครงสร้างพอลิเมอร์ ตัวทำละลายที่ใช้จะทำหน้าที่เป็นตัวกลางที่ให้สารตั้งต้นทุกชนิดมาทำปฏิกิริยากัน

และยังมีหน้าที่ในการสร้างรูพรุนของพอลิเมอร์อีกด้วย อย่างไรก็ตามตัวทำละลายที่ดีที่สุดสำหรับการสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลควรจะเป็นสารที่มีขั้วน้อย เช่น โทลูอีน เนื่องจากความเป็นขั้วของตัวทำละลายอาจไปทำลายอันตรกิริยาระหว่าง template และ monomer เป็นผลทำให้ความสามารถในการเลือกดูดซับของพอลิเมอร์ลอกแบบลดลง

### 2.3. เอกสารอ้างอิง

- [1] Antonietta R., Sara V., Nedda B., Silvana B., Marcello I. “Phytosterols in grapes and wine, and effects of agrochemicals on their levels.” *Food Chemistry*. 141. 3473-3479. 2013.
- [2] “83-46-5  $\beta$ -Sitosterol.” [Online]. Available:<http://www.chemnet.com/cas/es/83-46-5/beta-Sitosterol.html>. 2013.
- [3] “83-48-7 Stigmasterol.” [Online]. Available:<http://www.chemnet.com/cas/en/83-48-7/stigmasterol.html>. 2013.
- [4] Alexander, C., Davidson, L., Hayes, W., “Imprinted polymers: Artificial molecular recognition materials with applications in synthesis and catalysis,” (2003), *Tetrahedron*, 59, 2025-2057.
- [5] Ramstrom, O., Ansell, R. J., “Molecular imprinting technology: Challenges and prospects for the future,” (1998), *Chirality*, 10, 195-209.
- [6] Mayes, A. G., Whitcombe, M. J., “Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers,” (2005), 1742-1778.
- [7] Cheong, W. J., Yang, S. H., Ali, F., “Molecular imprinted polymers for separation science: A review of reviews”, (2013), *J. Sep. Sci.*, 36, 609-628.
- [8] “Molecular Imprinting.” [Online]. Available:[http://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Molecular\\_imprinting.png](http://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Molecular_imprinting.png). 2013.
- [9] Qiujin, Z., Liping, W., Shengfang, W., Wasswa, J., Xiaohong, G., Jian, T., “Selectivity of molecularly imprinted solid phase extraction for sterol compounds,” (2009), *Food Chemistry*, 113, 608-615.
- [10] Kitahara, K.-I., Yoshihama, I., Hanada, T., Kokuba, H., Arai, S., “Synthesis of monodispersed molecularly imprinted polymer particles for high-performance liquid chromatographic separation of cholesterol using templating polymerization in porous silica gel bound with cholesterol molecules on its surface,” (2010), *J. Chromatography A*, 1217, 7249-7254.
- [11] Jin Y., Zhang Y. P., Zhang Y. J., Chen J., Zhou X., Bai L. “Synthesis and Evaluation of Molecularly Imprinted Polymer for the Determination of the Phthalate Esters in the Bottled Beverages by HPLC.” *Hindawi Journal of Chemistry*. Volume 2013. 1-9. 2013.

- [12] Nor D. Z., Nor A. Y., Jelas H., Abdul Halim Abdullah. "Synthesis and Evaluation of a Molecularly Imprinted Polymer for 2,4-Dinitrophenol." *International Journal of Molecular Sciences*. 10. 354-365. 2009.
- [13] Yuqing D., Yu Q., Feifei X., Haihui Z., Yongsheng Y., Can Z., Haile M. 2010. "Optimization of the process parameters of synthesis of oligomeric procyanidins imprinted polymer." 5(19). 2953-2964.

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้สังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบสติกมาสเตอร์อล 2 ชนิด คือ poly(acrylamide-co-ethylene glycol dimethacrylate) (PAM) และ poly(2-(trifluoromethyl)acrylic acid-co-trimethylolpropane trimethacrylate) (PMAA) การทดลองแบ่งเป็น 3 ส่วน คือ

- (1) การสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบ
- (2) การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมี
- (3) การวัดประสิทธิภาพการดูดซับและคายซับสเตอร์อล

#### 3.1. วิธีสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบ

การสังเคราะห์ PAM และ PMMA ทำโดยซิง template monomer crosslink และ initiator ตามที่กำหนด แล้วนำมาละลายในตัวทำละลายที่อุณหภูมิห้อง เมื่อสังเกตได้ว่าสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันทั้งหมดแล้ว จึงป้อนแก๊สไนโตรเจนเพื่อไล่อากาศออกจากภาชนะที่ใช้ในการสังเคราะห์ (10 นาที) จากนั้นเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 220 rpm (1 ชั่วโมง) เพิ่มอุณหภูมิในเครื่องเขย่าเป็น 60 องศาเซลเซียส และปล่อยให้ทำปฏิกิริยาพอลิเมโรเซชันในเครื่องเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาแล้วนำพอลิเมอร์ที่ได้มาบดด้วยครกบดสารและนำไปล้างด้วยน้ำกลั่น (250 ml) แยกน้ำกลั่นออกจากผงพอลิเมอร์โดยเหวี่ยงแยกที่ความเร็วรอบ 4000 rpm เป็นเวลา 20 นาที โดยล้างและแยกน้ำล้างรวม 4 รอบ นำผงพอลิเมอร์ที่ได้ไปอบในเตาอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

การกำจัดสารตั้งต้นที่เหลือในขั้นตอนการสังเคราะห์และโมเลกุลต้นแบบออกจากพอลิเมอร์ที่ได้ ทำโดยบรรจุพอลิเมอร์ลงในชุด reflux ที่บรรจุสารละลาย acetonitrile : water : methanol : acetic acid (อัตราส่วน 85 : 9.9 : 5 : 0.1 โดยปริมาตร) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

#### 3.2. การออกแบบการทดลอง

ตารางที่ 3.2-1 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ PAM และ PMAA สภาวะในการสังเคราะห์ถูกกำหนดจากผลการออกแบบการทดลองด้วยวิธี central composite design (CCD) โดยมีจำนวนการทำซ้ำการทดลองที่สภาวะมาตรฐานเท่ากับ 3

ตารางที่ 3.2-2 และตารางที่ 3.2-3 แสดงอัตราส่วนที่ใช้ในการสังเคราะห์สารที่สภาวะที่กำหนดจากวิธี CCD ของการสังเคราะห์ PAM และ PMAA ตามลำดับ การสังเคราะห์พอลิเมอร์ด้วยวิธีปกติโดยไม่ลอกแบบโมเลกุลจะถูกทำภายใต้สภาวะเดียวกันโดยไม่เติมโมเลกุลต้นแบบ เพื่อเปรียบเทียบกับพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ด้วยวิธีโมเลกุลลอกแบบ

ตารางที่ 3.2-1 สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ PAM และ PMAA

Component	PAM	PMAA
template	stigmasterol	
monomer	acrylamide	TFMAA
crosslink	EGDMA	TRIM
initiator	benzoyl peroxide	
solvent	acetone	

ตารางที่ 3.2-2 อัตราส่วนที่ใช้ในการสังเคราะห์ PAM ภายใต้สภาวะที่กำหนดโดย CCD

No.	monomer (mmol)	crosslink (mmol)	template (mmol)	solvent (ml)	initiator (mmol)
1	1	2.5	0.15	5	0.32
2	1	3.5	0.15	5	0.32
3	1	2.5	0.25	5	0.32
4	1	3.5	0.25	5	0.32
5	1	2.5	0.15	7	0.32
6	1	3.5	0.15	7	0.32
7	1	2.5	0.25	7	0.32
8	1	3.5	0.25	7	0.32
9	1	2	0.2	6	0.32
10	1	4	0.2	6	0.32
11	1	3	0.1	6	0.32
12	1	3	0.3	6	0.32
13	1	3	0.2	4	0.32
14	1	3	0.2	8	0.32
15	1	3	0.2	6	0.32

ตารางที่ 3.2-3 อัตราส่วนที่ใช้ในการสังเคราะห์ PMMA ภายใต้สภาวะที่กำหนดโดย CCD

No.	monomer (mmol)	crosslink (mmol)	template (mmol)	solvent (ml)	initiator (mmol)
1	1	0.75	0.1125	12.5	0.0852
2	1	1.25	0.1125	12.5	0.0852
3	1	0.75	0.1375	12.5	0.0852
4	1	1.25	0.1375	12.5	0.0852
5	1	0.75	0.1125	17.5	0.0852
6	1	1.25	0.1125	17.5	0.0852
7	1	0.75	0.1375	17.5	0.0852
8	1	1.25	0.1375	17.5	0.0852
9	1	0.5	0.125	15	0.0852
10	1	1.5	0.125	15	0.0852
11	1	1	0.1	15	0.0852
12	1	1	0.15	15	0.0852
13	1	1	0.125	10	0.0852
14	1	1	0.125	20	0.0852
15	1	1	0.125	15	0.0852

### 3.3. การพิสูจน์สมบัติของพอลิเมอร์ลอกแบบ

ลักษณะรูปร่างและพื้นผิวของวัสดุถูกตรวจวัดด้วยเครื่อง scanning electron microscope (SEM: EVO®MA10, ZEISS) ที่กำลังขยาย 500 และ 20000 เท่า โดยใช้กำลังไฟฟ้า (extra high tension voltage level; EHT) 15.00 kV

หมู่ฟังก์ชันที่แสดงโครงสร้างทางเคมีวิเคราะห์โดยเทคนิค fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR: IRPrestige-21, Shimadzu, Japan) ใช้ตัวตรวจวัดแบบ MIRacle ATR (PIKE Technologies, Inc.) ที่ resolution เท่ากับ  $4 \text{ cm}^{-1}$

### 3.4. การดูดซับสเตอร์อล

การดูดซับแบบกะทำโดยเตรียมสารละลายสเตอร์อลในเฮปแทน (600 ppm) ปริมาตร 20 ml ในขวดรูปชมพู่ (50 ml) แล้วเติมตัวดูดซับลงในสารละลาย (ร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก) จากนั้นนำไปแช่ใน incubation shaker ซึ่งควบคุมอุณหภูมิให้คงที่เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส มีความเร็วรอบในการเขย่า 220 rpm เมื่อครบ 6 ชั่วโมง จึงเก็บตัวอย่างสารละลายไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นสเตอร์อลในสารละลาย

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของสเตอร์อลในสารละลาย ทำโดยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีที่มีตัวตรวจวัดแบบฟเลมไอออไนเซชัน (gas chromatograph with flame ionization detector; GC-FID)

ประสิทธิภาพของตัวดูดซับประเมินจาก

(1) ร้อยละสเตอรอลที่ถูกดูดซับ (%Adsorption, สมการที่ 3.1-1)

$$\% \text{ Adsorption} = \frac{W_{A0} - W_A}{W_{A0}} \times 100\% \quad (3.1-1)$$

(2) ความจุของตัวดูดซับ (Adsorption capacity, สมการที่ 3.1-2)

$$q = \frac{W_{A0} - W_A}{W_{\text{adsorbent}}} \quad (3.1-2)$$

(3) สัดส่วนปริมาณการดูดซับสเตอรอลเทียบกับปริมาณการดูดซับสตีกลมาสเตอร์ (ratio of sterols adsorption and stigmasterol adsorption, สมการที่ 3.1-3)

$$\text{Adsorption ratio} = \frac{\% \text{ Adsorption of phytosterol}}{\% \text{ Adsorption of stigmasterol}} \quad (3.1-3)$$

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิจารณ์

งานวิจัยนี้สังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบสติกมาสเตอรอล 2 ชนิด คือ poly(acrylamide-co-ethylene glycol dimethacrylate) (PAM) และ poly(2-(trifluoromethyl)acrylic acid-co-trimethylolpropane trimethacrylate) (PMAA) ในบทที่ 4 จึงจะอธิบายผลการทดลองแยกตามชนิดของพอลิเมอร์แต่ละชนิด

#### 4.1. Poly(AM-co-EGDMA); PAM

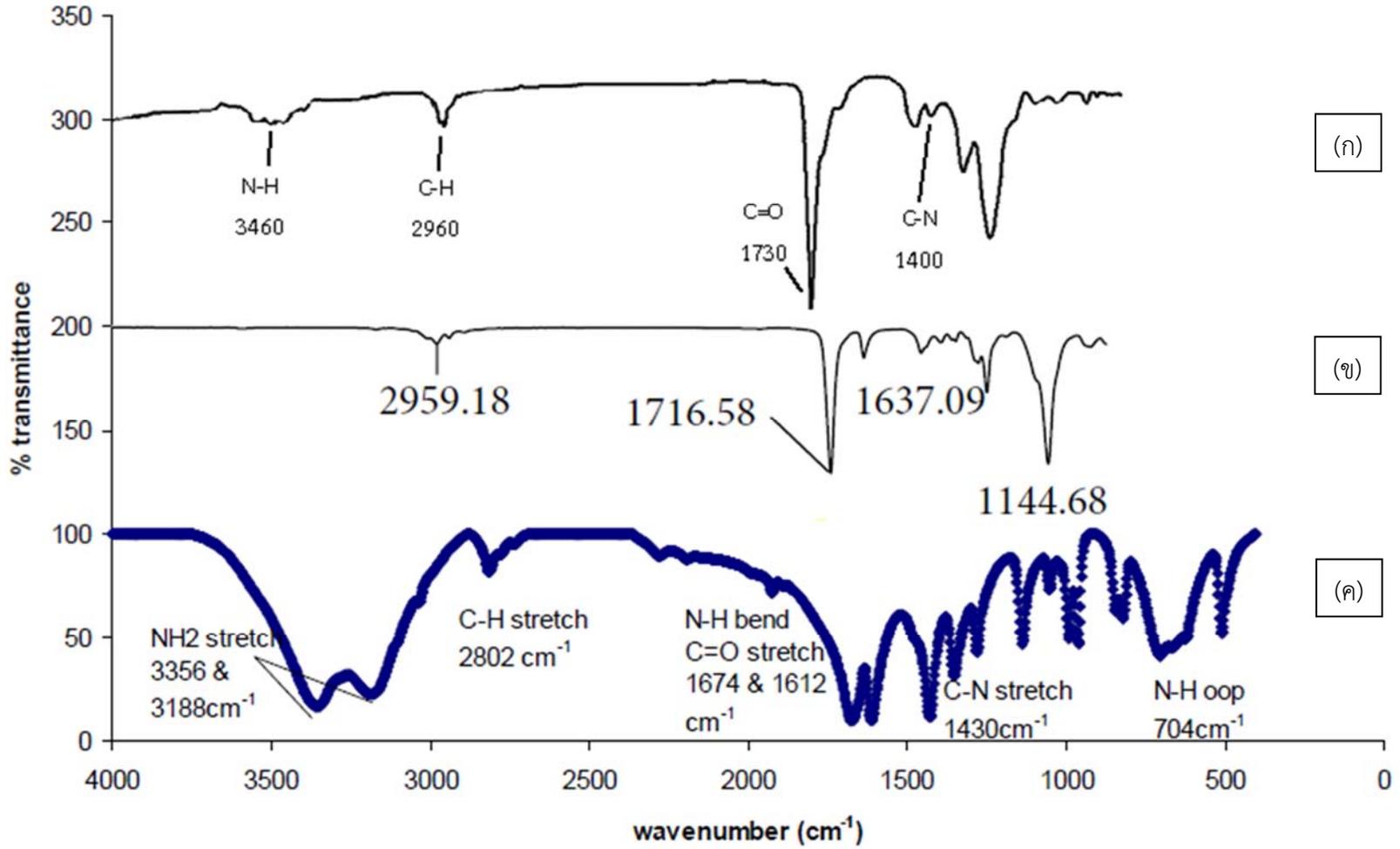
##### 4.1.1. สมบัติของ PAM

PAM ที่สังเคราะห์ได้เป็นของแข็งสีขาว มีลักษณะเป็นผงแป้ง ไม่ละลายในน้ำและเฮกเซน แต่ดูดซับน้ำได้ดีมาก เมื่อสัมผัสกับความชื้นในบรรยากาศที่อุณหภูมิห้องจะจับตัวกันเป็นก้อน

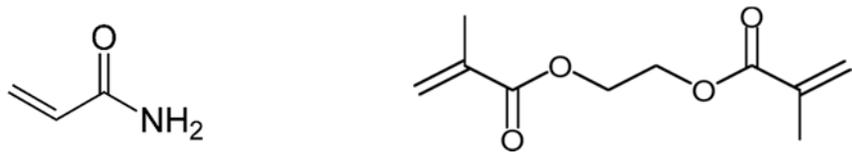
รูปที่ 4.1-1 (ก) แสดงอินฟราเรดสเปกตรัมของ PAM ที่ไม่ลอกแบบ จะเห็นว่ามีพีคเกิดขึ้นที่ตำแหน่ง  $3460\text{ cm}^{-1}$ ,  $1730\text{ cm}^{-1}$ ,  $1400\text{ cm}^{-1}$  และ  $2960\text{ cm}^{-1}$  [9] ซึ่งบ่งบอกถึงพันธะในหมู่เอไมด์ คือ พันธะ N-H พันธะ C=O พันธะ C-N และพันธะในหมู่เอทิล ได้แก่ พันธะ C-H ตามลำดับ ซึ่งสามารถอนุมานว่าเกิด PAM ขึ้นแล้ว เนื่องจาก Nor Azah Yusof และคณะ [7] รายงานว่าอินฟราเรดสเปกตรัมของ acrylamide monomer จะปรากฏพีคของพันธะ C=C ที่ตำแหน่ง  $1600\text{ cm}^{-1}$  ดังรูปที่ 4.1-1 (ค) เช่นเดียวกับที่ Jin Y. และ คณะ [6] รายงานว่าอินฟราเรดสเปกตรัมของ EGDMA จะปรากฏพีคของพันธะ C=C ที่ตำแหน่ง  $1637\text{ cm}^{-1}$  ดังรูปที่ 4.1-1 (ข)

เมื่อ acrylamide monomer และ EGDMA ซึ่งมีโครงสร้างดังรูปที่ 4.1-2 สร้างพันธะกันเกิดเป็นพอลิเมอร์แล้ว พันธะคู่ที่ปลายด้านซ้ายของ acrylamide monomer และที่ปลายทั้งสองด้านของ EGDMA จะรวมกันเกิดเป็นโครงสร้างร่างแหดังรูปที่ 4.1-3 ทำให้พันธะคู่หายไป เป็นผลให้ไม่สามารถระบุพีคของพันธะ C=C ที่ตำแหน่ง  $1600\text{ cm}^{-1}$  ในรูปที่ 4.1-1 (ก) ได้

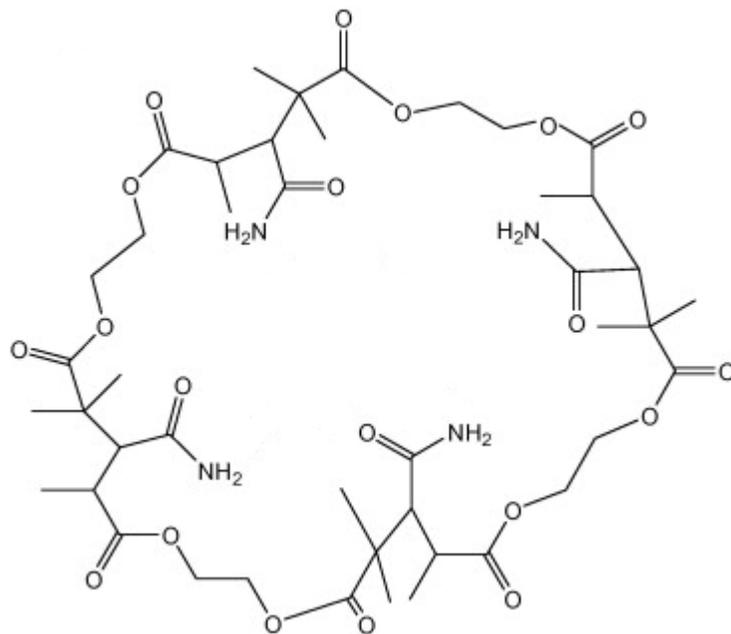
รูปที่ 4.1-4 (ข) แสดงอินฟราเรดสเปกตรัมของ PAM ลอกแบบสติกมาสเตอรอล จะเห็นว่ามีพีคเกิดขึ้นที่ตำแหน่งที่  $3460\text{ cm}^{-1}$ ,  $1730\text{ cm}^{-1}$ ,  $1400\text{ cm}^{-1}$  และ  $2960\text{ cm}^{-1}$  [9] ซึ่งบ่งบอกถึงพันธะในหมู่เอไมด์ คือ พันธะ N-H พันธะ C=O พันธะ C-N และพันธะในหมู่เอทิล ได้แก่ พันธะ C-H ตามลำดับ แต่จะมีความแตกต่างจาก PAM ที่ไม่ลอกแบบในขอบเขตความยาวคลื่นที่  $2960\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งเป็นบริเวณที่มีพีคที่แสดงถึงพันธะ C-H เด่นชัดขึ้นกว่าอินฟราเรดสเปกตรัมของ PAM ไม่ลอกแบบในรูปที่ 4.1-4 (ก) เนื่องจากมีอันตรกิริยาของสติกมาสเตอรอลกับพอลิเมอร์เกิดขึ้นทำให้พบพันธะ C-H มากขึ้น



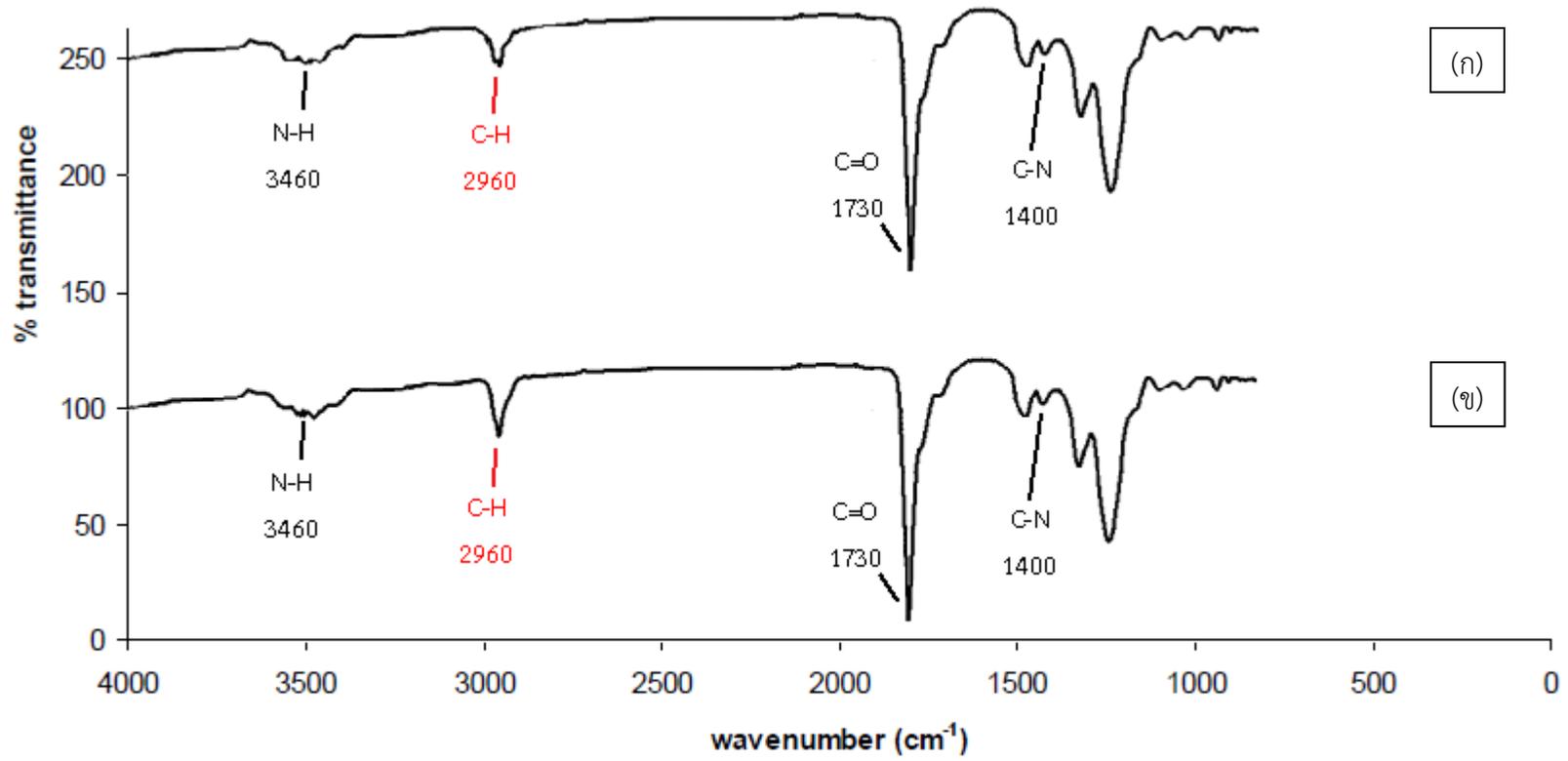
รูปที่ 4.1-1 อินฟราเรดสเปกตรัมของ (ก) PAM ไม่ลอกแบบสติกมาสเตอร์อล (ข) EGDMA [6] และ (ค) acrylamide monomer [7]



รูปที่ 4.1-2 โครงสร้างของ acrylamide monomer (ซ้าย) และ EGDMA (ขวา) [10], [11]

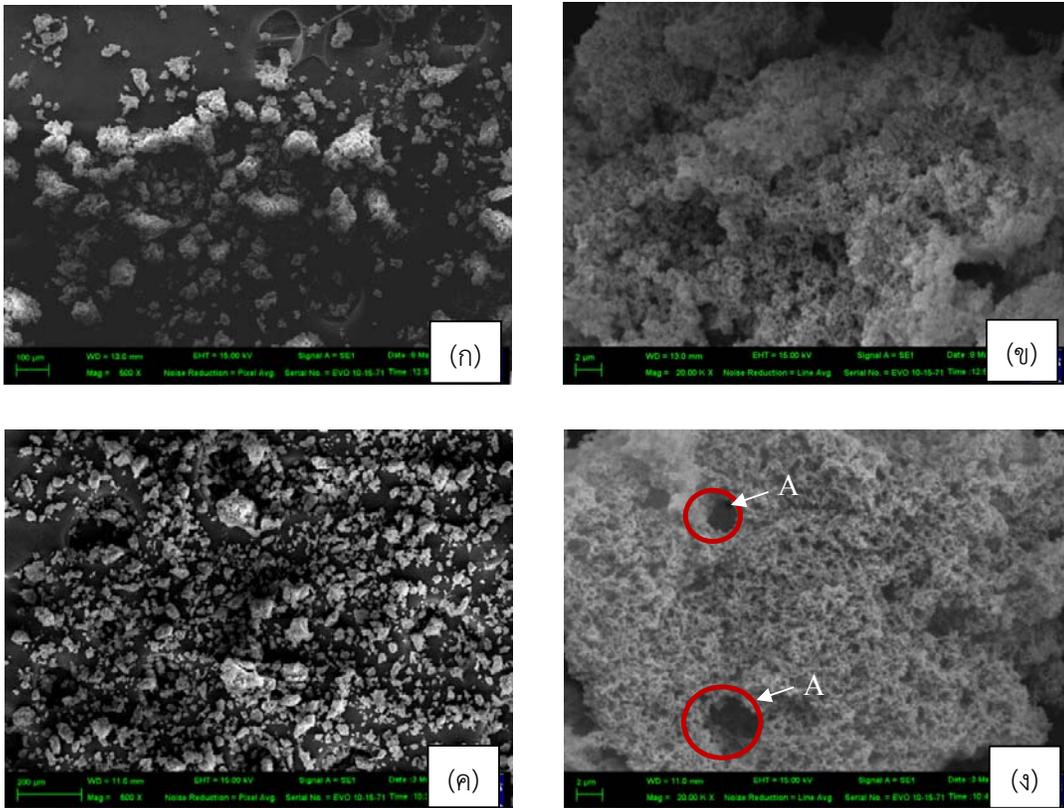


รูปที่ 4.1-3 โครงสร้างของ PAM [12]



รูปที่ 4.1-4 อินฟราเรดสเปกตรัมของ (ก) PAM ไม่ลอกแบบสติกมาสเตอรอล (ข) PAM ลอกแบบสติกมาสเตอรอล

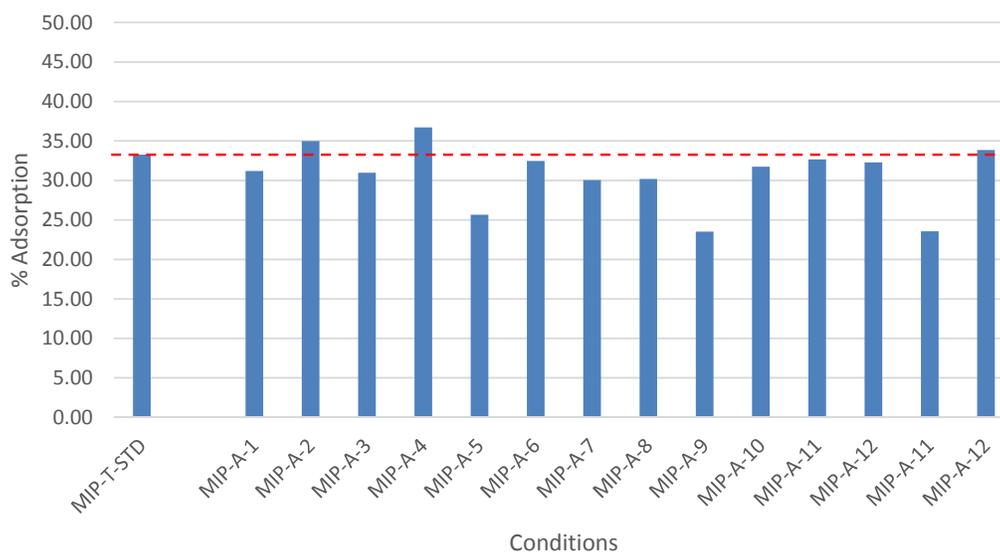
รูปที่ 4.1-5 (ก) แสดงภาพถ่ายพื้นผิวของ NIP-A ที่กำลังขยายเท่ากับ 500 เท่า จะเห็นว่าอนุภาคของ PAM ที่ได้รวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อน ไม่กระจายตัวมาก และมีขนาดของอนุภาคระหว่าง 10-150 ไมครอน รูปที่ 4.1-5 (ข) แสดงภาพถ่ายพื้นผิวของ NIP-A ที่กำลังขยายเท่ากับ 20,000 เท่า จะเห็นว่าพอลิเมอร์ที่ได้มีรูพรุนภายในขนาดใหญ่กระจายอยู่ทั่วไป โดยรูพรุนมีขนาดเล็กกว่า 0.5 ไมครอน อยู่ในประเภท macropore ตามเกณฑ์ของระบบ IUPAC [13] รูปที่ 4.1-5 (ค) แสดงภาพถ่ายพื้นผิวของ MIP-A-STD ที่กำลังขยายเท่ากับ 500 เท่า จะเห็นว่า ลักษณะของพอลิเมอร์มีการกระจายตัวมากขึ้น และมีขนาดของอนุภาคระหว่าง 10-150 ไมครอน รูปที่ 4.1-5 (ง) แสดงภาพถ่ายพื้นผิวของ MIP-A-STD ที่กำลังขยายเท่ากับ 20,000 เท่า จะเห็นว่าภายในอนุภาคของ PAM มีรูพรุนขนาดใหญ่กระจายอยู่ทั่วไป และลักษณะของรูพรุนมีความขรุขระน้อยลง ขนาดของรูพรุนคล้ายกับ NIP-A ที่กำลังขยายเดียวกัน แต่ MIP-A-STD มีโพรงขนาด 2 ไมครอนเพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงด้วยสัญลักษณ์ (A)



รูปที่ 4.1-5 พื้นผิวของพอลิเมอร์ที่กำลังขยายต่างๆ (ก) NIP-A กำลังขยาย 500 เท่า (ข) NIP-A กำลังขยาย 20,000 เท่า (ค) MIP-A-STD กำลังขยาย 500 เท่า (ง) MIP-A-STD กำลังขยาย 20,000 เท่า (EHT = 15.00 kV)

#### 4.1.2. อิทธิพลของตัวแปรในการสังเคราะห์ต่อประสิทธิภาพในการดูดซับสเตอรอลของ PAM

รูปที่ 4.1-6 แสดงร้อยละการดูดซับสเตอรอลของพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ภายใต้สภาวะต่าง ๆ จากรูป จะเห็นว่าปริมาณของ crosslink ที่มาก (เช่น MIP-A-4) จะส่งผลให้ร้อยละการดูดซับสเตอรอลสูงขึ้น ทั้งนี้ เนื่องจาก crosslink ในปริมาณที่เหมาะสมจะช่วยให้พอลิเมอร์มีความเสถียรและแข็งแรงมากขึ้น ในขณะที่ การเพิ่ม template (MIP-A-12) ไม่ส่งผลต่อร้อยละการดูดซับสเตอรอลมากนัก ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะ ปริมาณ template ที่ใช้ในการสังเคราะห์สูงเกินกว่าขีดความสามารถในการลอกแบบลงบนพอลิเมอร์แล้ว



รูปที่ 4.1-6 ร้อยละการดูดซับของไฟโตสเตอรอลของ PAM ลอกแบบสติกมาสเตอรอลที่สภาวะต่าง ๆ เทียบกับ PAM ไม่ลอกแบบ (เส้นประสีแดง)

#### 4.1.3. การวิเคราะห์ผลการทดลองเชิงสถิติ

ผลการทดลองที่ได้เมื่อนำมาพล็อตกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสองตัวแปรใด ๆ จะทำให้ทราบอิทธิพลของสองตัวแปรนั้นต่อร้อยละการดูดซับสเตอรอลได้ ดังจะอธิบายรายละเอียดต่อไปนี้

##### **อิทธิพลของปริมาณ crosslink และ template**

รูปที่ 4.1-7 (ก) แสดงระนาบของร้อยละการดูดซับสเตอรอลเมื่อปริมาณ crosslink และ template เปลี่ยนไป โดยมีปริมาณของตัวทำละลายคงที่เท่ากับ 5 ml จากรูปจะเห็นได้ว่าการเพิ่มปริมาณ crosslink ทำให้ร้อยละการดูดซับสเตอรอลเพิ่มขึ้น แต่การเพิ่มปริมาณ template จะทำให้ร้อยละการดูดซับสเตอรอลเพิ่มขึ้น สำหรับระนาบของร้อยละการดูดซับไฟโตสเตอรอลเมื่อเปลี่ยนแปลงปริมาณของ crosslink และ template เมื่อใช้ตัวทำละลายคงที่เท่ากับ 6 ml และ 7 ml แสดงดังรูปที่ 4.1-7 (ข) และ (ค) ตามลำดับ จะเห็นว่าปริมาณของตัวทำละลายที่เพิ่มขึ้นทำให้ร้อยละการดูดซับสเตอรอลเพิ่มขึ้น

##### **อิทธิพลของปริมาณ crosslink และตัวทำละลาย**

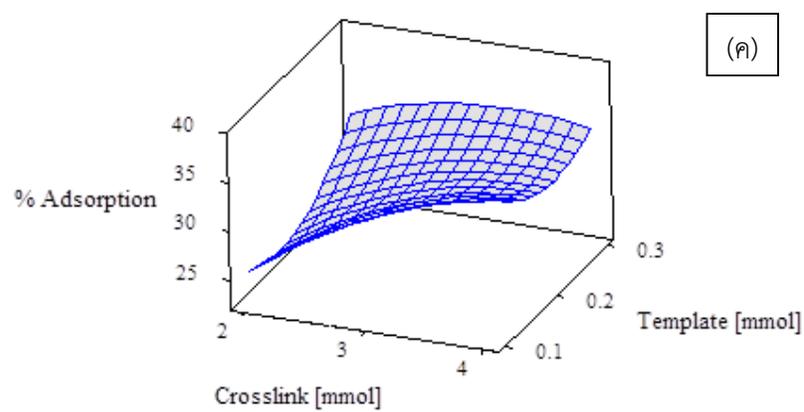
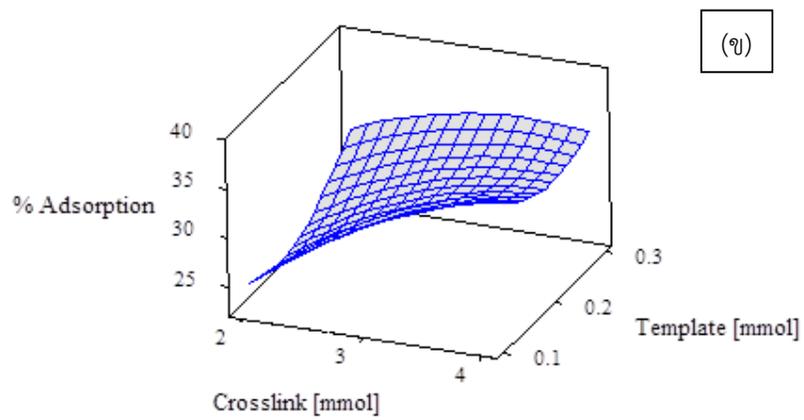
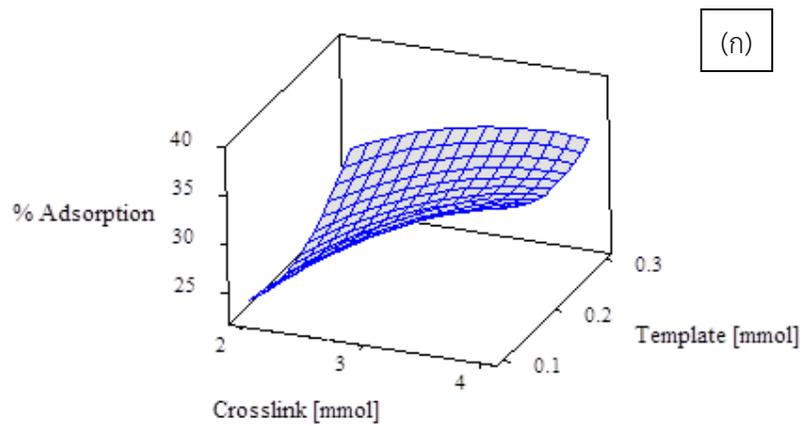
รูปที่ 4.1-8 (ก) แสดงระนาบของร้อยละการดูดซับสเตอรอลเมื่อปริมาณของ crosslink และตัวทำละลายเปลี่ยนไป โดยปริมาณของ template คงที่เท่ากับ 0.15 mmol พบว่าการเพิ่มปริมาณ crosslink ทำให้ร้อยละการดูดซับสเตอรอลเพิ่มขึ้น ส่วนปริมาณตัวทำละลายมีผลต่อร้อยละการดูดซับสเตอรอลเพียงเล็กน้อย

รูปที่ 4.1-8 (ข) และ (ค) แสดงระนาบของร้อยละการดูดซับสเตอรอลเมื่อปริมาณของ crosslink และตัวทำละลายเปลี่ยนไป โดยปริมาณ template คงที่เท่ากับ 0.20 mmol และ 0.25 mmol ตามลำดับ จะเห็นว่าปริมาณของ template ที่เพิ่มขึ้นทำให้ร้อยละการดูดซับสเตอรอลลดลง

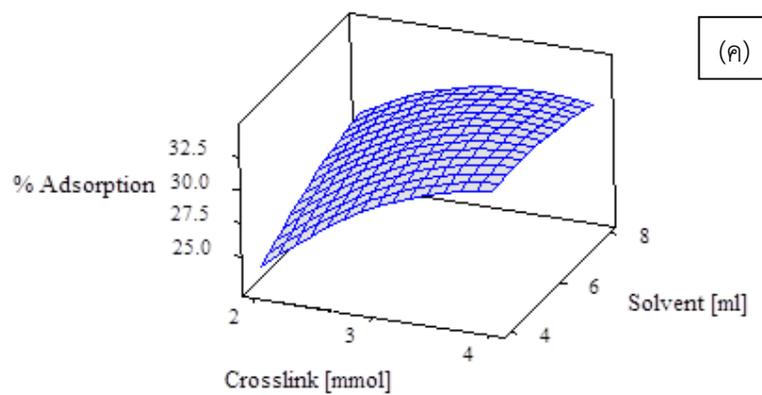
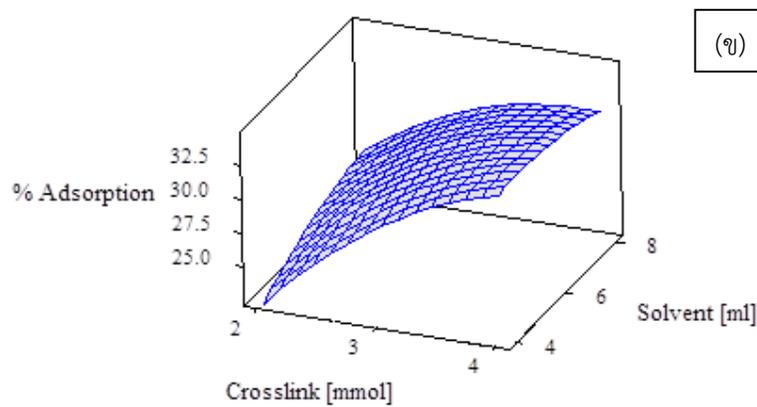
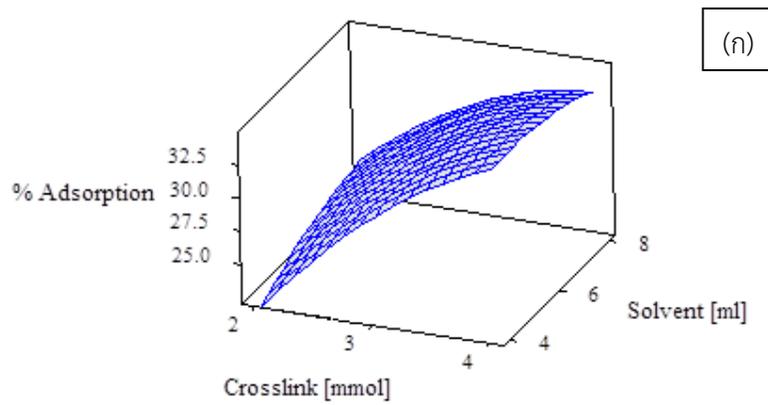
##### **อิทธิพลของปริมาณ template และตัวทำละลาย**

รูปที่ 4.1-9 (ก) แสดงระนาบของค่าการดูดซับเมื่อปริมาณ template และ ตัวทำละลายเปลี่ยนไป โดยปริมาณของ crosslink มีค่าคงที่เท่ากับ 2.5 mmol พบว่าปริมาณของ template ที่น้อยลงหรือเพิ่มขึ้น ทำให้ร้อยละการดูดซับสเตอรอลเพิ่มขึ้นโดยจะแปรผันกับตัวแปรสังเคราะห์อื่น ๆ เมื่อปริมาณตัวทำละลายเพิ่มขึ้นจะทำให้ร้อยละการลดลงของไฟโตสเตอรอลเพิ่มขึ้น

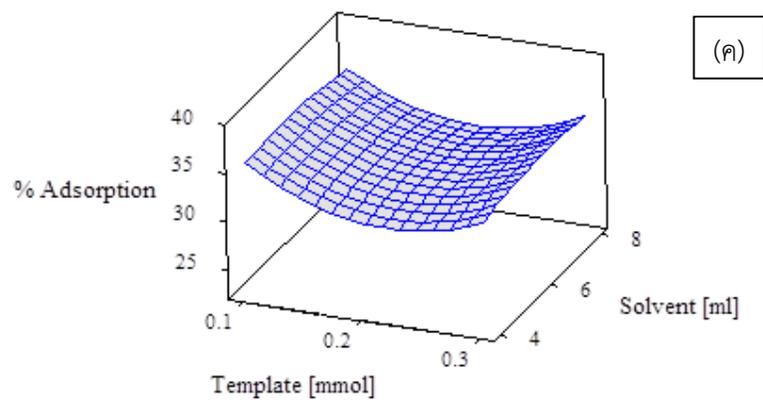
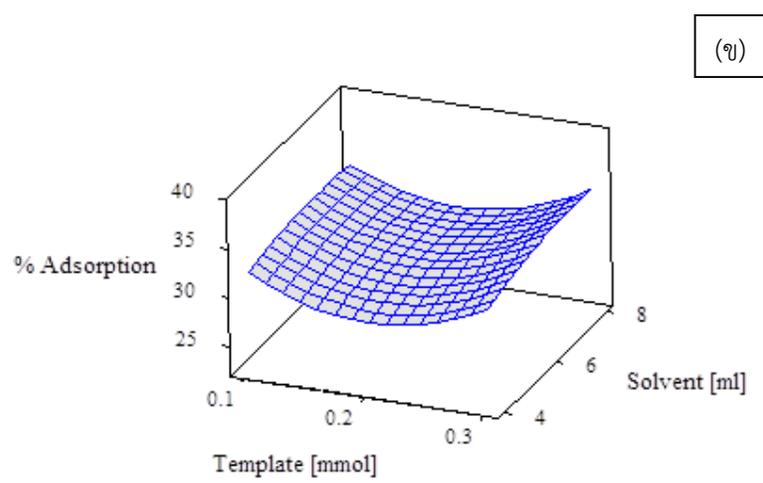
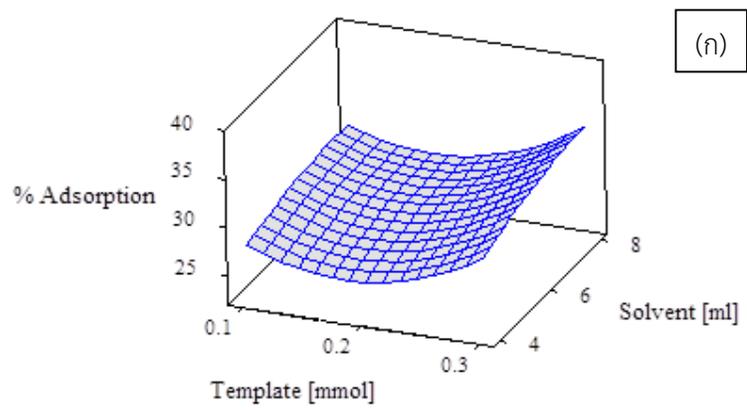
รูปที่ 4.1-9 (ข) และ (ค) แสดงระนาบของค่าการดูดซับเมื่อปริมาณ template และตัวทำละลายเปลี่ยนไป โดยปริมาณ crosslink มีค่าคงที่เท่ากับ 3 mmol และ 3.5 mmol ตามลำดับ พบว่าเมื่อปริมาณ crosslink เพิ่มขึ้นจะทำให้ร้อยละการดูดซับสเตอรอลเพิ่มขึ้น



รูปที่ 4.1-7 ระบุว่าค่าการดูดซับสเตอรอล เมื่อปริมาณ crosslink และ template เปลี่ยนแปลง โดย ปริมาณตัวทำละลายคงที่ เท่ากับ (ก) 5, (ข) 6 และ (ค) 7 ml



รูปที่ 4.1-8 ระบายค่าร้อยละการดูดซับสเตอรอล เมื่อปริมาณ crosslink และตัวทำละลายเปลี่ยนแปลง โดยปริมาณของ template คงที่ เท่ากับ (ก) 0.15, (ข) 0.20 และ (ค) 0.25 mmol

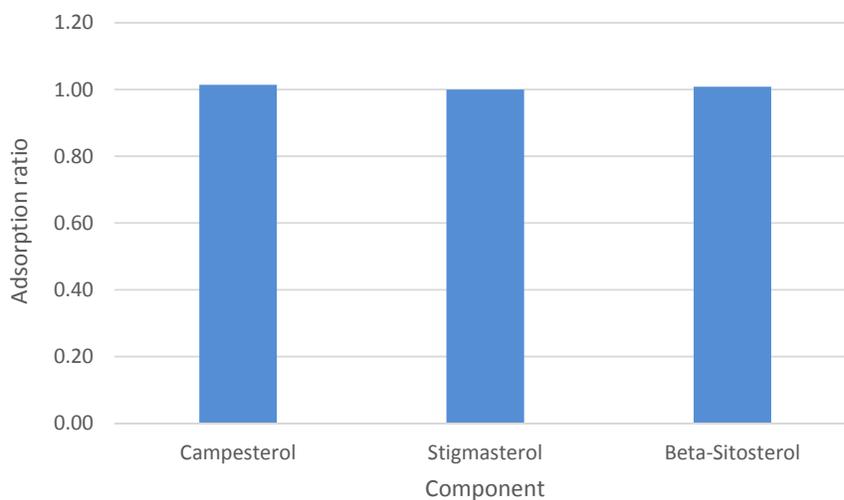


รูปที่ 4.1-9 ระบายของค่าร้อยละการดูดซับสเตอรอล เมื่อปริมาณ template และตัวทำละลายเปลี่ยนแปลง โดยปริมาณ crosslink คงที่ เท่ากับ (ก) 2.5, (ข) 3 และ (ค) 3.5 mmol

### อิทธิพลของตัวแปรในการสังเคราะห์ที่ส่งผลต่ออัตราส่วนการดูดซับ

รูปที่ 4.1-10 แสดงอัตราส่วนการดูดซับของไฟโตสเตอรอลเทียบกับการดูดซับสตีกลมาสเตอร์ของ MIP-A-STD พบว่า การเลือกดูดซับสารใดสารหนึ่งไม่แตกต่างกันมากนัก เพราะโครงสร้างของสารที่ถูกดูดซับแตกต่างกันน้อยมาก พอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ภายใต้สภาวะอื่นก็แสดงพฤติกรรมที่มีแนวโน้มเช่นเดียวกับรูปที่ 3.2-10

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้ทั้งหมดไปวิเคราะห์เชิงสถิติเพื่อสร้างแบบจำลอง จะสามารถทำนายได้ว่า อัตราส่วนของ monomer : crosslink : template : solvent เท่ากับ 1 mmol : 3.5 mmol : 0.3 mmol : 7 ml เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุด (optimum) ในการสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบ PAM ซึ่งจะช่วยให้ร้อยละการดูดซับสเตอรอลมากที่สุดที่ 37 คิดเป็น 1.13 เท่าของ PAM ไม่ลอกแบบ



รูปที่ 4.1-10 อัตราส่วนการดูดซับของไฟโตสเตอรอลเทียบกับการดูดซับสตีกลมาสเตอร์ของ MIP-A-STD

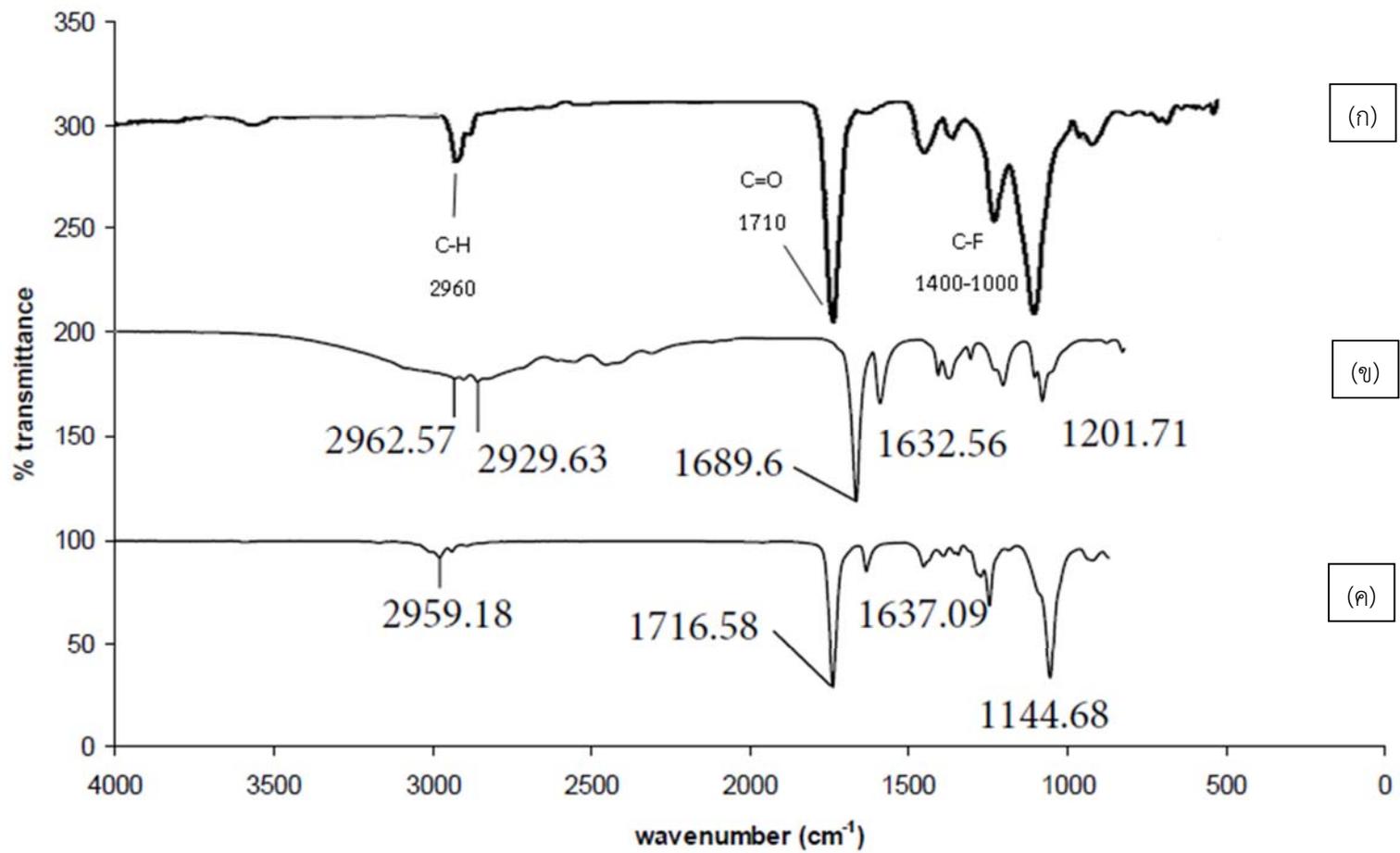
## 4.2. Poly(TFMAA-co-TRIM); PMAA

### 4.2.1. สมบัติของ PMAA

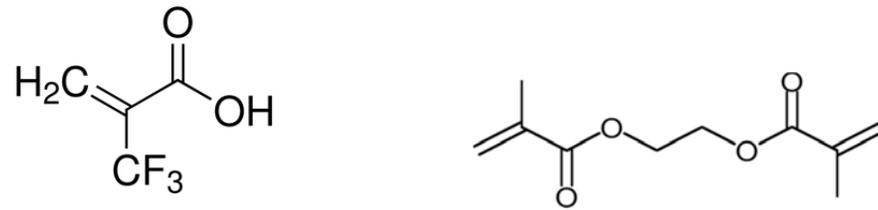
PMAA ที่สังเคราะห์ได้เป็นของแข็งสีขาว มีลักษณะเป็นผงแป้ง ไม่ละลายในน้ำและเฮปแทน ดูดซับน้ำได้ดี เมื่อตั้งทิ้งไว้ให้สัมผัสกับความชื้นในบรรยากาศที่อุณหภูมิห้องจะจับตัวเป็นก้อนบ้าง แต่น้อยกว่า PAM รูปที่ 4.2-1 (ก) แสดงอินฟราเรดสเปกตรัมของ PMAA ที่ไม่ลอกแบบ จะเห็นว่าไม่มีพีคเกิดขึ้นที่ตำแหน่ง  $1710\text{ cm}^{-1}$ ,  $2960\text{ cm}^{-1}$  และช่วง  $1400\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$  [9] ซึ่งบ่งบอกถึงพันธะ C=O ในหมู่คาร์บอกซิลิก และพันธะในหมู่เอทิล ได้แก่ พันธะ C-H และพันธะ C-F ซึ่งเป็นสารประกอบฟลูออไรด์ตามลำดับ ซึ่งสามารถอนุมานว่าเกิด PMAA ขึ้นแล้ว เนื่องจาก Jin Y. และคณะ [6] รายงานว่าอินฟราเรดสเปกตรัมของ MAA จะปรากฏพีคของพันธะ C=C ที่ตำแหน่ง  $1632\text{ cm}^{-1}$  และ อินฟราเรดสเปกตรัมของ EGDMA จะปรากฏพีคของพันธะ C=C ที่ตำแหน่ง  $1637\text{ cm}^{-1}$  ดังรูปที่ 4.2-1 (ข) และ (ค) ตามลำดับ

เมื่อ MAA และ EGDMA ซึ่งมีโครงสร้างดังรูปที่ 4.2-2 เกิดเป็นพอลิเมอร์แล้ว พันธะคู่ที่ปลายด้านซ้ายของ MAA และที่ปลายทั้งสองด้านของ EGDMA จะรวมกันเกิดเป็นโครงสร้างร่างแหดังรูปที่ 4.2-3 ทำให้พันธะคู่หายไป เป็นผลให้ไม่สามารถระบุพีคของพันธะ C=C ที่ตำแหน่ง  $1600\text{ cm}^{-1}$  ในรูปที่ 4.2-1 (ก) ได้นั่นเอง

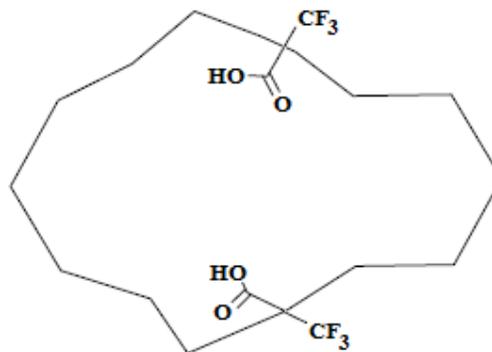
จากรูปที่ 4.2-4 (ข) แสดงอินฟราเรดสเปกตรัมของ PMAA ลอกแบบสติกมาสเตอรอล จะเห็นได้ว่าพีคเกิดขึ้นที่ตำแหน่งที่  $1710\text{ cm}^{-1}$ ,  $2960\text{ cm}^{-1}$  และช่วง  $1400\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$  [9] ซึ่งบ่งบอกถึงพันธะ C=O และพันธะในหมู่เอทิล ได้แก่ พันธะ C-H และพันธะ C-F ซึ่งเป็นสารประกอบฟลูออไรด์ตามลำดับ จะมีความแตกต่างจาก PMAA ในขอบเขตความยาวคลื่นที่  $2960\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งเป็นบริเวณที่มีพีคที่แสดงถึงพันธะ C-H เด่นชัดขึ้นกว่าอินฟราเรดสเปกตรัมของ PMAA ไม่ลอกแบบสติกมาสเตอรอลในรูปที่ 4.2-4 (ก) เนื่องจากมีอันตรกิริยาของสติกมาสเตอรอลกับพอลิเมอร์เกิดขึ้น ทำให้พบพันธะ C-H มากขึ้น



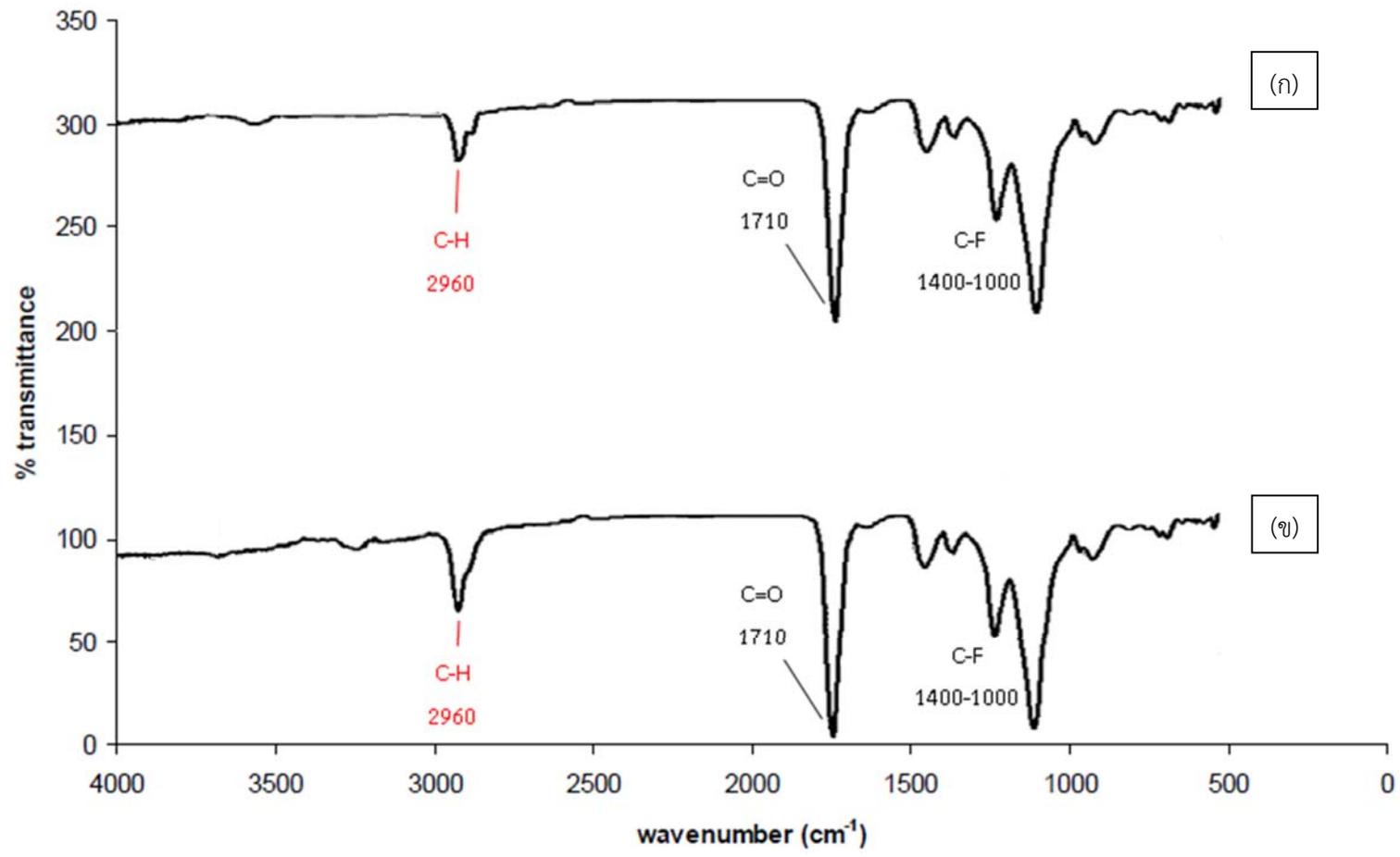
รูปที่ 4.2-1 อินฟราเรดสเปกตรัมของ (ก) PMAA ไม่ลอกแบบสติกมาสเตอร์อล (ข) MAA [6] และ (ค) EGDMA [6]



รูปที่ 4.2-2 โครงสร้างของ TFMAA (ซ้าย) และ EGDMA (ขวา) [14], [11]

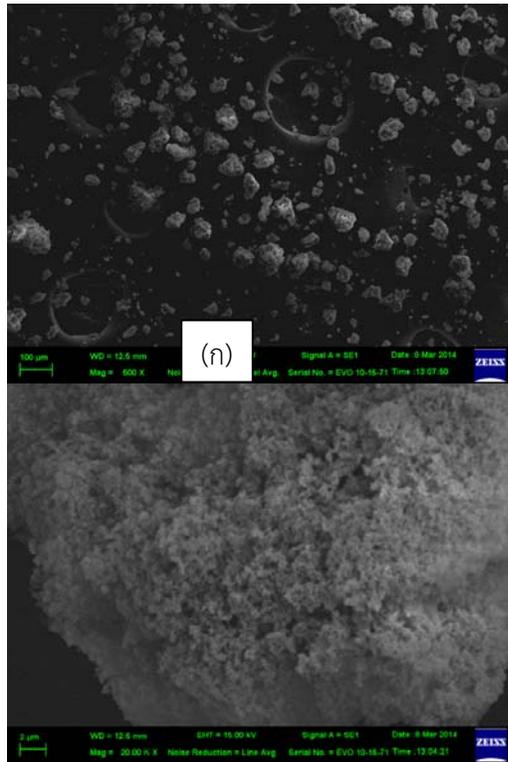


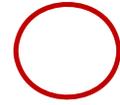
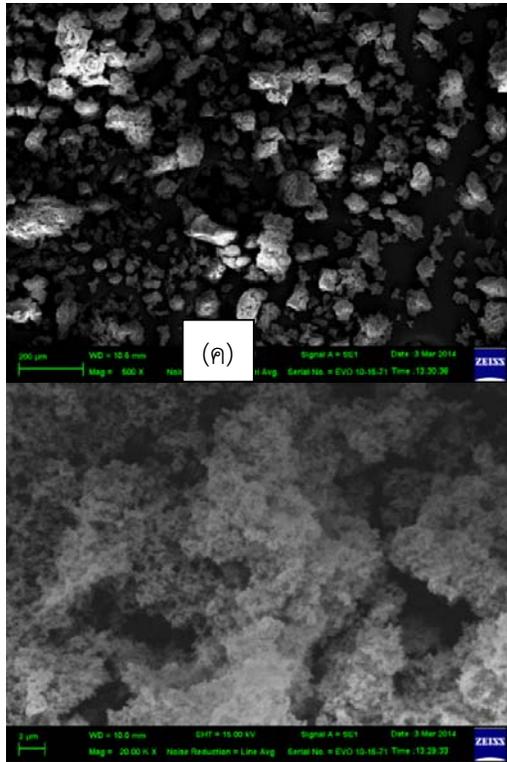
รูปที่ 4.2-3 โครงสร้างของ PMAA [15]



รูปที่ 4.2-4 อินฟราเรดสเปกตรัมของ (ก) PMAA ไม่ลอกแบบสติกมาสเตอรอล (ข) PMAA ลอกแบบสติกมาสเตอรอล

รูปที่ 4.2-5 (ก) แสดงภาพถ่ายพื้นผิวของ NIP-T ที่กำลังขยายเท่ากับ 500 เท่า เห็นได้ว่า ลักษณะของ PMAA มีการกระจายตัว และมีขนาดของอนุภาคระหว่าง 10-100 ไมครอน รูปที่ 4.2-5 (ข) แสดงภาพถ่ายพื้นผิวของ NIP-T ที่กำลังขยายเท่ากับ 20,000 เท่า เห็นได้ว่า ลักษณะของรูพรุนภายในพอลิเมอร์มีขนาดใหญ่กระจายอยู่ทั่วไป ขนาดของรูพรุนน้อยกว่า 0.5 ไมครอน ซึ่งตามเกณฑ์ของระบบ IUPAC [13] แล้วพิจารณาว่าเป็นรูพรุนแบบ macropore รูปที่ 4.2-5 (ค) แสดงภาพถ่ายพื้นผิวของ MIP-T-STD ที่กำลังขยายเท่ากับ 500 เท่า จะเห็นว่าลักษณะของพอลิเมอร์มีการกระจายตัวมากขึ้น และมีขนาดของอนุภาคระหว่าง 10-150 ไมครอน รูปที่ 4.2-5 (ง) แสดงภาพถ่ายพื้นผิวของ MIP-T-STD ที่กำลังขยายเท่ากับ 20,000 เท่า เห็นได้ว่า ลักษณะของรูพรุนภายในพอลิเมอร์มีขนาดใหญ่กระจายอยู่ทั่วไป และลักษณะของรูพรุนมีความขรุขระน้อยลง ขนาดของรูพรุนคล้ายกับ NIP-A ที่กำลังขยายเดียวกัน แต่ MIP-A-STD มีโพรงขนาด 4 ไมครอนเพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงด้วยสัญลักษณ์ (A)

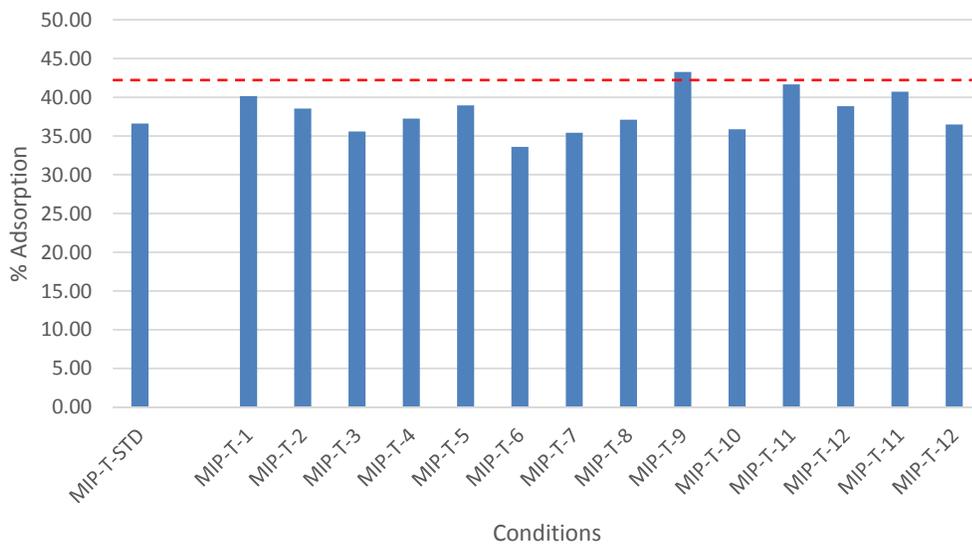




รูปที่ 4.2-5 พื้นผิวของพอลิเมอร์ที่กำลังขยายต่าง ๆ (ก) NIP-T กำลังขยาย 500 เท่า (ข) NIP-T กำลังขยาย 20,000 เท่า (ค) MIP-T-STD กำลังขยาย 500 เท่า (ง) MIP-T-STD กำลังขยาย 20,000 เท่า (EHT = 15.00 kV)

#### 4.2.2. อิทธิพลของตัวแปรในการสังเคราะห์ที่ส่งผลต่อการดูดซับสเตอรอลของ PMAA

รูปที่ 4.2-6 แสดงร้อยละการดูดซับสเตอรอลของ PMAA ที่สังเคราะห์ภายใต้สภาวะต่าง ๆ จากรูปจะเห็นว่าปริมาณของ crosslink ที่น้อยลง (เช่น MIP-T-9) ส่งผลให้ร้อยละการดูดซับสเตอรอลเพิ่มขึ้น จึงหมายความว่าปริมาณโมเลกุลของ crosslink มากเกินไปจะขัดขวางการเกิดอันตรกิริยาระหว่าง monomer และ template ส่งผลให้การลอกแบบเป็นไปอย่างไม่สมบูรณ์ เช่นเดียวกับการลดปริมาณตัวทำละลายลง (เช่น เทียบ MIP-T-1 กับ MIP-T-5) จะส่งผลให้ร้อยละการลดลงของไฟโตสเตอรอลเพิ่มขึ้น เนื่องจากตัวทำละลายมีผลต่อขนาดของรูพรุนของพอลิเมอร์ ซึ่งคาดว่าสภาวะมาตรฐานที่ใช้สังเคราะห์ PMAA อาจมีปริมาณของตัวทำละลายมากเกินไป ส่งผลให้รูพรุนมีขนาดไม่เหมาะสมกับโมเลกุลของไฟโตสเตอรอล เมื่อลดปริมาณตัวทำละลายลงจึงเห็นว่าพอลิเมอร์มีประสิทธิภาพสูงขึ้น



รูปที่ 4.2-6 ร้อยละการดูดซับสเตอรอลของ PMAA ลอกแบบสตีกลาสเตอรอลที่สภาวะต่าง ๆ เทียบกับ PMAA ไม่ลอกแบบ (เส้นประสีแดง)

#### 4.2.3. การวิเคราะห์ผลการทดลองเชิงสถิติ

เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาพล็อตกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรสองตัวแปรจะทำให้ทราบอิทธิพลของตัวแปรทั้งสองต่อร้อยละการดูดซับสเตอรอล ดังจะอธิบายรายละเอียดได้ดังนี้

##### *อิทธิพลของปริมาณ crosslink และ template*

จากรูปที่ 4.2-7 (ก) แสดงกราฟของร้อยละการดูดซับสเตอรอลเมื่อปริมาณของ crosslink และ template เปลี่ยนไป โดยปริมาณของตัวทำละลายคงที่เท่ากับ 12.5 ml พบว่าปริมาณ crosslink ที่เพิ่มขึ้น ทำให้ร้อยละการดูดซับสเตอรอลลดลง ส่วนปริมาณของ template ที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ร้อยละการดูดซับสเตอรอลเพิ่มขึ้น รูปที่ 4.2-7 (ข) และ (ค) แสดงกราฟของร้อยละการดูดซับสเตอรอลเมื่อปริมาณ crosslink และ template เปลี่ยนไป โดยปริมาณของตัวทำละลายคงที่เท่ากับ 15 ml และ 17.5 ml ตามลำดับ จากรูปจะเห็นว่า การเพิ่มปริมาณตัวทำละลายทำให้ร้อยละการลดลงของสเตอรอลเพิ่มขึ้น เฉพาะอัตราส่วนที่มีปริมาณ crosslink น้อย และปริมาณ template เพิ่ม

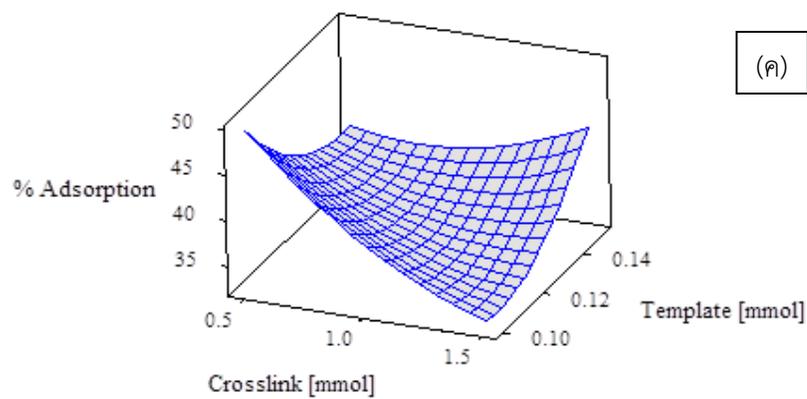
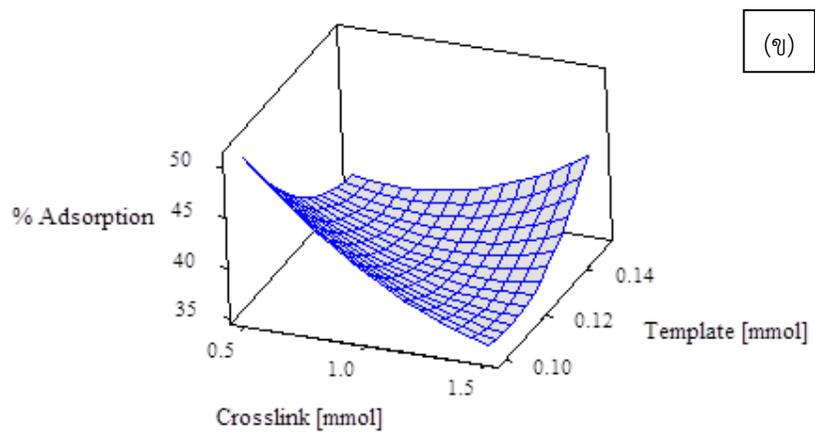
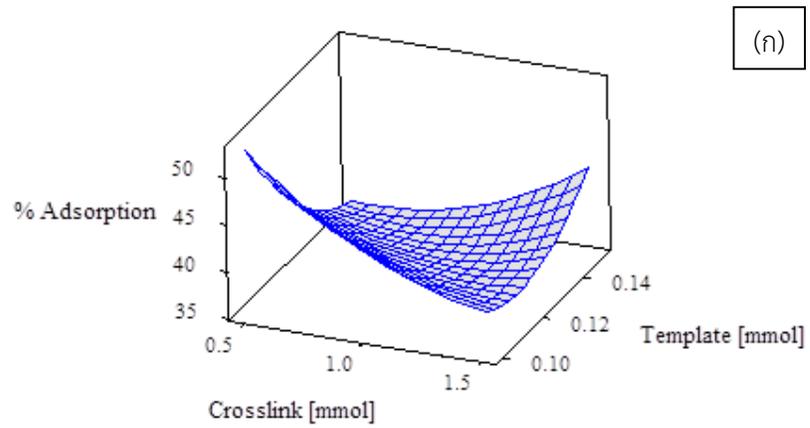
##### *อิทธิพลของปริมาณ crosslink และตัวทำละลาย*

จากรูปที่ 4.2-8 (ก) แสดงกราฟของร้อยละการดูดซับสเตอรอลเมื่อปริมาณ crosslink และตัวทำละลายเปลี่ยนไป โดยปริมาณ template คงที่เท่ากับ 0.1125 mmol พบว่า ปริมาณ crosslink ที่ลดลง ทำให้ร้อยละการดูดซับสเตอรอลเพิ่มขึ้น ส่วนปริมาณของตัวทำละลายที่มากขึ้น ส่งผลให้ร้อยละการดูดซับสเตอรอลเพิ่มขึ้นมากกว่าปริมาณของตัวทำละลายที่น้อยลง รูปที่ 4.2-8 (ข) และ (ค) แสดงกราฟของร้อยละการดูดซับสเตอรอลเมื่อปริมาณ crosslink และตัวทำละลายเปลี่ยนไป โดยปริมาณ template คงที่เท่ากับ 0.125 mmol และ 0.1375 mmol ตามลำดับ จะเห็นว่าปริมาณ template ที่เพิ่มขึ้นทำให้ร้อยละการดูดซับสเตอรอลลดลงอย่างเห็นได้ชัดในอัตราส่วนปริมาณ crosslink น้อย แต่ส่งผลให้ร้อยละการดูดซับของสเตอรอลเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในอัตราส่วนของปริมาณ crosslink มาก

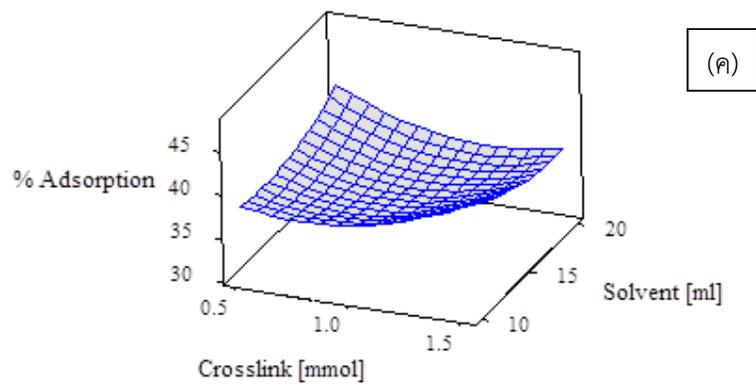
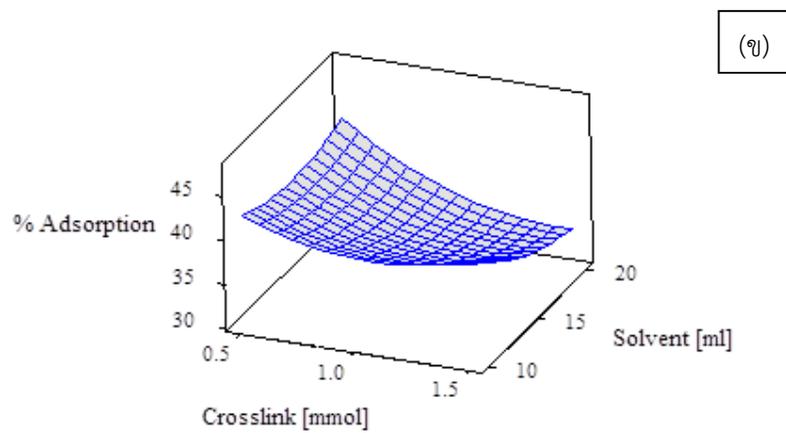
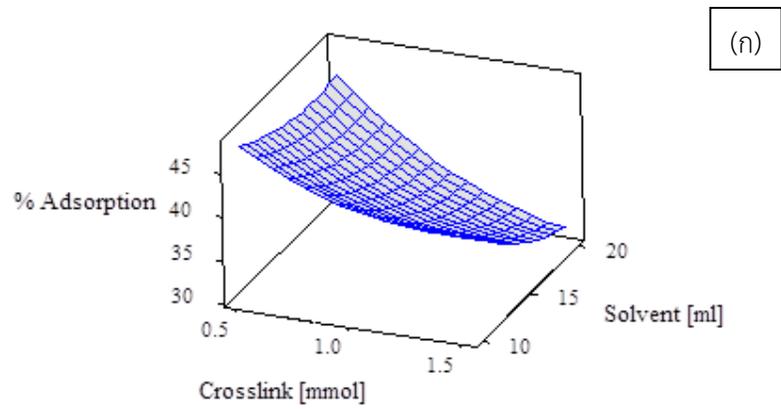
##### *อิทธิพลของปริมาณ template และตัวทำละลาย*

รูปที่ 4.2-9 (ก) แสดงกราฟของค่าการดูดซับเมื่อปริมาณ template และตัวทำละลายเปลี่ยนไป เมื่อปริมาณ crosslink คงที่เท่ากับ 0.75 mmol จากรูปจะพบว่าปริมาณ template ที่น้อยลงหรือเพิ่มขึ้น ทำให้ร้อยละการดูดซับสเตอรอลเพิ่มขึ้น โดยจะแปรผันกับตัวแปรสังเคราะห์อื่น ๆ ส่วนปริมาณของตัวทำละลายเพิ่มขึ้น ทำให้ร้อยละการดูดซับสเตอรอลเพิ่มขึ้น

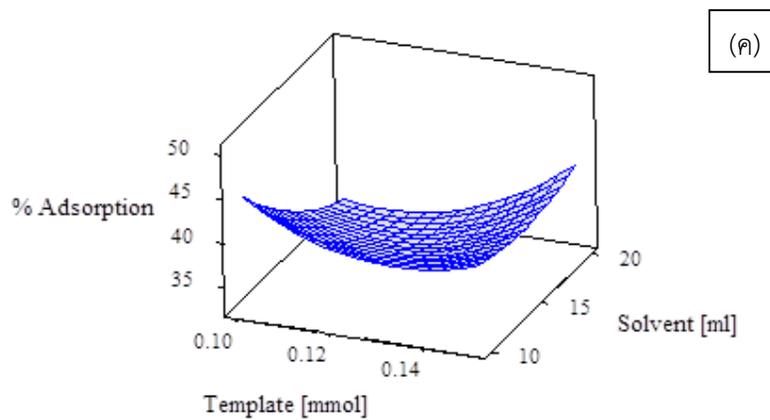
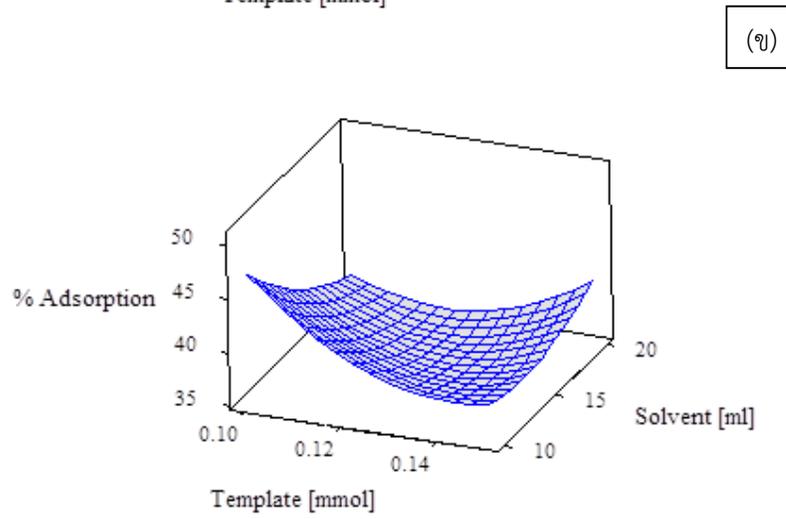
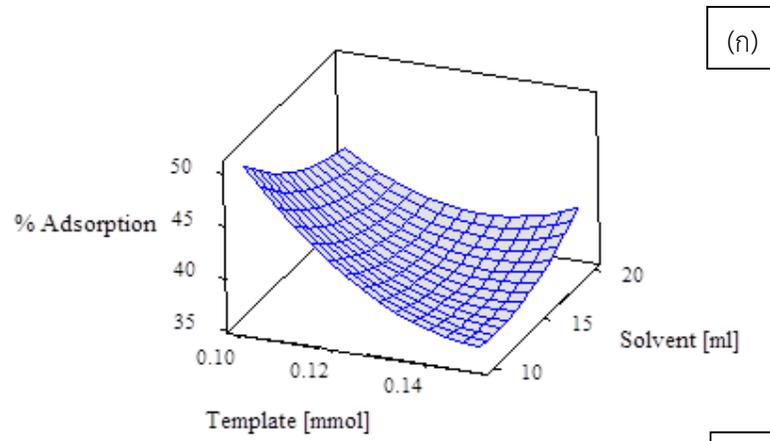
รูปที่ 4.2-9 (ข) และ (ค) แสดงกราฟของค่าการดูดซับเมื่อปริมาณ template และตัวทำละลายเปลี่ยนไป โดยปริมาณของ crosslink คงที่เท่ากับ 1 mmol และ 1.25 mmol ตามลำดับ จากรูปจะเห็นว่าปริมาณ crosslink ที่เพิ่มขึ้น ทำให้ร้อยละการลดลงของไฟโตสเตอรอลเพิ่มขึ้น



รูปที่ 4.2-7 ระนาบของค่าการดูดซับของไฟโตสเตอรอลเมื่อปริมาณ crosslink และ template เปลี่ยนไป โดยปริมาณของตัวทำละลายคงที่ เท่ากับ (ก) 12.5, (ข) 15 และ (ค) 17.5 ml



รูปที่ 4.2-8 ระนาบของค่าการดูดซับของไฟโตสเตอรอลเมื่อปริมาณ crosslink และตัวทำละลายเปลี่ยนไป โดยปริมาณ template คงที่ เท่ากับ (ก) 0.1125, (ข) 0.125 และ (ค) 0.1375 mmol

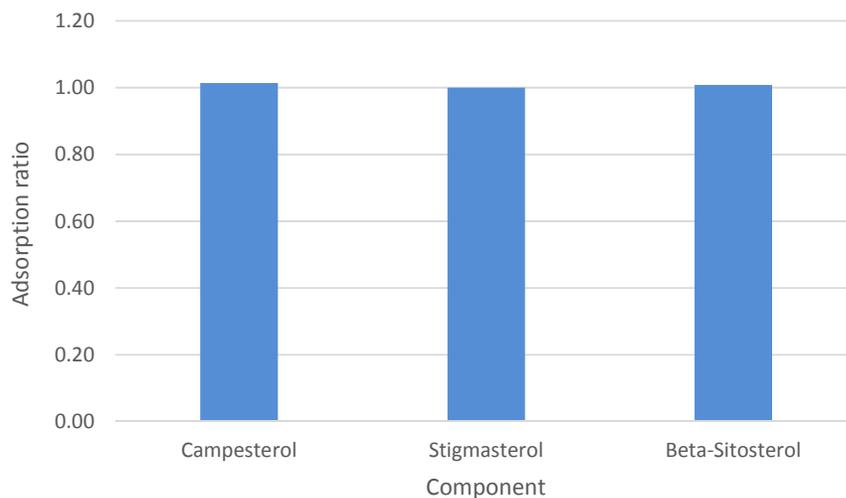


รูปที่ 4.2-9 ระนาบของค่าการดูดซับของไฟโตสเตอรอลเมื่อปริมาณ template และตัวทำละลายเปลี่ยนไป โดยที่ปริมาณ crosslink คงที่ เท่ากับ (ก) 0.75, (ข) 1 และ (ค) 1.25 mmol

### อิทธิพลของตัวแปรในการสังเคราะห์ที่ส่งผลต่ออัตราส่วนการดูดซับ

รูปที่ 4.2-10 แสดงอัตราส่วนการดูดซับของสเตอรอลเทียบกับการดูดซับสติกมาสเตอรอลของ MIP-A-STD พบว่าการเลือกดูดซับสารใดสารหนึ่งไม่แตกต่างกันมากนัก เพราะโครงสร้างของสารที่ถูกดูดซับแตกต่างกันน้อยมาก นอกจากนี้ PMAA ที่สังเคราะห์ภายใต้สภาวะอื่น ๆ ก็มีแนวโน้มเช่นเดียวกัน

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้ทั้งหมดไปวิเคราะห์เชิงสถิติเพื่อสร้างแบบจำลองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารต่างๆ ที่ใช้ในการสังเคราะห์กับประสิทธิภาพ PMAA ที่ได้ จะสามารถทำนายได้ว่าอัตราส่วน monomer : crosslink : template : solvent เท่ากับ 1 mmol : 0.5 mmol : 0.1 mmol : 12.5 ml ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุด (optimum) ในการสังเคราะห์ PMAA ลอกแบบสติกมาสเตอรอล โดยให้ร้อยละการดูดซับสเตอรอลมากที่สุดเท่ากับ 55 คิดเป็น 1.31 เท่าของ PMAA ไม่ลอกแบบ



รูปที่ 4.2-10 อัตราส่วนการดูดซับไฟโตสเตอรอลเทียบกับการดูดซับสติกมาสเตอรอลของ MIP-T-STD

### 4.3. สรุป

จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพ คุณลักษณะ สภาพพื้นผิว และประสิทธิภาพในการดูดซับไฟโตสเตอรอลของ poly(acrylamide-co-ethylene glycol dimethacrylate) (PAM) และ poly(2-(trifluoromethyl)acrylic acid-co-trimethylolpropane trimethacrylate) (PMAA) ทั้งลอกแบบและไม่ลอกแบบสติกมาสเตอรอล พบว่า พอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นทั้งสองชนิดมีลักษณะภายนอกเป็นของแข็งสีขาว เป็นผงคล้ายแป้ง สามารถดูดซับน้ำได้โดยที่ PAM จะดูดซับน้ำได้มากกว่า PMAA พอลิเมอร์ทั้งสองชนิดไม่ละลายในน้ำหรือตัวทำละลายที่ใช้ในการศึกษา การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของพอลิเมอร์ทั้งสองชนิดด้วยเครื่อง FT-IR ให้เหตุผลที่สามารถอนุมานได้ว่าของแข็งที่ได้เป็น PAM และ PMAA จริง ลักษณะของอนุภาคและสภาพพื้นผิวสามารถตรวจได้โดยใช้เครื่อง scanning electron microscope (SEM) ขึ้นกับชนิดของพอลิเมอร์ กล่าวคือ อนุภาคของ PAM หลังจากลอกแบบแล้วมีการกระจายตัวมากขึ้น ส่วนอนุภาคของ PMAA หลังจากลอกแบบจะรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนมากกว่า PAM และรูพรุนของพอลิเมอร์ทั้งสองชนิดหลังจากถูกลอกแบบแล้วมีโพรงขนาด 1-2 ไมครอนเพิ่มขึ้น

จากการศึกษาตัวแปรในการสังเคราะห์ที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการดูดซับไฟโตสเตอรอลของพอลิเมอร์ พบว่า อัตราส่วนของ crosslink ที่เติมลงในขั้นตอนการสังเคราะห์มีผลต่อประสิทธิภาพในการดูดซับไฟโตสเตอรอลของพอลิเมอร์มากที่สุด เนื่องจาก crosslink เป็นส่วนสำคัญในการรักษาเสถียรภาพของโครงสร้างและรูพรุนหรือโพรงภายในพอลิเมอร์

โดยสรุปแล้วพอลิเมอร์ทั้งสองชนิดสามารถดูดซับไฟโตสเตอรอลในสารละลายสเตอรอลผสมในเฮปแทนได้ แต่พอลิเมอร์ที่มีผลร้อยละการลดลงของไฟโตสเตอรอลมากที่สุด คือ PMAA ที่สังเคราะห์ขึ้นโดยใช้อัตราส่วนของ monomer : crosslink : template : solvent เป็น 1 mmol : 0.5 mmol : 0.125 mmol : 15 ml สามารถดูดซับไฟโตสเตอรอลในสารละลายได้เท่ากับร้อยละ 43

อย่างไรก็ตามจากการทำนายผลการทดลองเชิงสถิติด้วยโปรแกรม MiniTab แสดงให้เห็นว่า PAM ลอกแบบสติกมาสเตอรอลสามารถให้ผลร้อยละการลดลงของไฟโตสเตอรอลได้สูงสุดที่ประมาณ 37 เมื่อสังเคราะห์โดยใช้อัตราส่วน monomer : crosslink : template : solvent เท่ากับ 1 mmol : 3.5 mmol : 0.3 mmol : 7 ml ซึ่งมากกว่า PAM ไม่ลอกแบบประมาณร้อยละ 15 ในขณะที่ PMAA ลอกแบบสติกมาสเตอรอลสามารถให้ผลร้อยละการลดลงของไฟโตสเตอรอลได้สูงสุดที่ประมาณ 55 เมื่อสังเคราะห์โดยใช้อัตราส่วน monomer : crosslink : template : solvent เท่ากับ 1 mmol : 0.5 mmol : 0.1 mmol : 12.5 ml ซึ่งมากกว่า PMAA ไม่ลอกแบบร้อยละ 31

#### 4.4. เอกสารอ้างอิง

- [1] ชณัฐตา เอี่ยมอสุสาหะ, ชิตชนก ประเสริฐวิทยา. 2555. “การแยกสารกลุ่มไฟโตสเตอรอลจากกรดไขมันปาล์ม.” ปรินญานินพนธ์ วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- [2] Antonietta R., Sara V., Nedda B., Silvana B., Marcello I. “Phytosterols in grapes and wine, and effects of agrochemicals on their levels.” Food Chemistry. 141. 3473-3479. 2013.
- [3] “83-46-5  $\beta$ -Sitosterol.” [Online]. Available:<http://www.chemnet.com/cas/es/83-46-5/beta-Sitosterol.html>. 2013.
- [4] “83-48-7 Stigmasterol.” [Online]. Available:<http://www.chemnet.com/cas/en/83-48-7/stigmasterol.html>. 2013.
- [5] “Molecular Imprinting.” [Online]. Available:[http://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Molecular\\_imprinting.png](http://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Molecular_imprinting.png). 2013.
- [6] Jin Y., Zhang Y. P., Zhang Y. J., Chen J., Zhou X., Bai L. “Synthesis and Evaluation of Molecularly Imprinted Polymer for the Determination of the Phthalate Esters in the Bottled Beverages by HPLC.” Hindawi Journal of Chemistry. Volume 2013. 1-9. 2013.
- [7] Nor D. Z., Nor A. Y., Jelas H., Abdul Halim Abdullah. “Synthesis and Evaluation of a Molecularly Imprinted Polymer for 2,4-Dinitrophenol.” International Journal of Molecular Sciences. 10. 354-365. 2009.
- [8] Yuqing D., Yu Q., Feifei X., Haihui Z., Yongsheng Y., Can Z., Haile M. 2010. “Optimization of the process parameters of synthesis of oligomeric procyanidins imprinted polymer.” 5(19). 2953-2964.
- [9] “บทที่ 10 อินฟราเรด สเปกโตรสโคปี.” [Online]. เข้าถึงได้จาก : <http://e-book.ram.edu/e-book/c/CM328/CM328-10.pdf> (สืบค้นเมื่อ 9 ธันวาคม 2556)
- [10] Czuppon T., Kemeny Z., Kovari E., Recseg K. “Process for recovery of plant sterols from by-product of vegetable oil refining.” European patent. no. 2004000979. 2003.
- [11] “STEROLS.” [Online]. Available:<http://www.cyberlipid.org/sterols/ster0003.htm>. 2013.
- [12] “การแปรรูปปาล์มน้ำมัน.” [Online]. เข้าถึงได้จาก : <http://www.doa.go.th/palm/linkTechnical/oil%20palm%20processing.html> (สืบค้นเมื่อ 20 สิงหาคม 2556)
- [13] Posada R.L., Shi J., Kakuda Y., Xue S.J. “Extraction of tocotrienols from palm fatty acid distillates using molecular distillation.” Separation and Purification Technology. 57. pp. 220-229. 2007.
- [14] เดชา ฉัตรศิริเวช. 2552. กระบวนการดูดซับ: Adsorption Process. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

- [15] Zhu Q., Wang L., Wu S., Joseph W., Gu X., Tang J. “Selectivity of molecularly imprinted solid phase extraction for sterol compounds” Food chemistry. 113. 608-615. 2009.
- [16] Harry O., Fred L., Joseph S., Kenneth S., Aaron T. “Synthesis and characterization of molecularly imprinted polymers and their application in preconcentrators for gas phase sensors.” Department of Chemistry. 2003.
- [17] ผศ.ดร.สุภาสินี ลิ้มปานภาพ. “บทที่ 9 พอลิเมอร์.” [Online]. เข้าถึงได้จาก : <http://www.physics.kku.ac.th/315205/sites/default/files/chapter09.pdf> (สืบค้นเมื่อ 8 กันยายน 2556)
- [18] “Polymerization Techniques – Dispersed system.” [Online]. Available: <http://www.stanford.edu/class/cheme160/lectures/lecture13.pdf>. 2013.
- [19] กระบวนการสังเคราะห์พอลิเมอร์. [Online]. เข้าถึงได้จาก : <http://www.seem.kmutt.ac.th/research/pentec/download/Chapter%203%20Polymerization%20method.pdf> (สืบค้นเมื่อ 8 กันยายน 2556)
- [20] Peter J. D. Brian Vincent. School of Chemistry. University of Bristol. “Suspension polymerization to form polymer beads.” 161. 259-269. 2000.
- [21] JOSE’ M. A. “Emulsion Polymerization: From fundamental Mechanisms to Process Developments.” 2003.
- [22] C.S. Chern. Department of Chemical engineering. National Taiwan University of science and Technology. “Emulsion polymerization mechanisms and kinetics.” 31. 443-486. 2006.
- [23] George O. “Principles of polymerization”. 4<sup>th</sup> edition. 10. United State of America. Wiley-interscience. 2004.
- [24] Timothy J., Addlison. “Purification of sterol with activated carbon as adsorbent and chlorobenzene as desorbent.” 4,882,065. 1989.

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพ คุณสมบัติ สภาพพื้นผิว และประสิทธิภาพในการดูดซับไฟโตสเตอรอลของ poly(acrylamide-co-ethylene glycol dimethacrylate) (PAM) และ poly(2-(trifluoromethyl)acrylic acid-co-trimethylolpropane trimethacrylate) (PMAA) ทั้งลอกแบบและไม่ลอกแบบสติกมาสเตอรอล พบว่า พอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นทั้งสองชนิดมีลักษณะภายนอกเป็นของแข็งสีขาว เป็นผงคล้ายแป้ง สามารถดูดซับน้ำได้โดยที่ PAM จะดูดซับน้ำได้มากกว่า PMAA พอลิเมอร์ทั้งสองชนิดไม่ละลายในน้ำหรือตัวทำละลายที่ใช้ในการศึกษา การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของพอลิเมอร์ทั้งสองชนิดด้วยเครื่อง FT-IR ให้เหตุผลที่สามารถอนุมานได้ว่าของแข็งที่ได้เป็น PAM และ PMAA จริง ลักษณะของอนุภาคและสภาพพื้นผิวสามารถตรวจได้โดยใช้เครื่อง scanning electron microscope (SEM) ขึ้นกับชนิดของพอลิเมอร์ กล่าวคือ อนุภาคของ PAM หลังจากลอกแบบแล้วมีการกระจายตัวมากขึ้น ส่วนอนุภาคของ PMAA หลังจากลอกแบบจะรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนมากกว่า PAM และรูพรุนของพอลิเมอร์ทั้งสองชนิดหลังจากถูกลอกแบบแล้วมีโพรงขนาด 1-2 ไมครอนเพิ่มขึ้น

จากการศึกษาตัวแปรในการสังเคราะห์ที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการดูดซับไฟโตสเตอรอล

ของพอลิเมอร์ พบว่า อัตราส่วนของ crosslink ที่เติมลงในขั้นตอนการสังเคราะห์มีผลต่อประสิทธิภาพในการดูดซับไฟโตสเตอรอลของพอลิเมอร์มากที่สุด เนื่องจาก crosslink เป็นส่วนสำคัญในการรักษาเสถียรภาพของโครงสร้างและรูพรุนหรือโพรงภายในพอลิเมอร์

โดยสรุปแล้วพอลิเมอร์ทั้งสองชนิดสามารถดูดซับไฟโตสเตอรอลในสารละลายสเตอรอลผสมในเฮปแทนได้ แต่พอลิเมอร์ที่มีผลร้อยละการลดลงของไฟโตสเตอรอลมากที่สุด คือ PMAA ที่สังเคราะห์ขึ้นโดยใช้อัตราส่วนของ monomer : crosslink : template : solvent เป็น 1 mmol : 0.5 mmol : 0.125 mmol : 15 ml สามารถดูดซับไฟโตสเตอรอลในสารละลายได้เท่ากับร้อยละ 43

อย่างไรก็ตามจากการทำนายผลการทดลองเชิงสถิติด้วยโปรแกรม MiniTab แสดงให้เห็นว่า PAM ลอกแบบสติกมาสเตอรอลสามารถให้ผลร้อยละการลดลงของไฟโตสเตอรอลได้สูงสุดที่ประมาณ 37 เมื่อสังเคราะห์โดยใช้อัตราส่วน monomer : crosslink : template : solvent เท่ากับ 1 mmol : 3.5 mmol : 0.3 mmol : 7 ml ซึ่งมากกว่า PAM ไม่ลอกแบบประมาณร้อยละ 15 ในขณะที่ PMAA ลอกแบบสติกมาสเตอรอลสามารถให้ผลร้อยละการลดลงของไฟโตสเตอรอลได้สูงสุดที่ประมาณ 55 เมื่อสังเคราะห์โดยใช้อัตราส่วน monomer : crosslink : template : solvent เท่ากับ 1 mmol : 0.5 mmol : 0.1 mmol : 12.5 ml ซึ่งมากกว่า PMAA ไม่ลอกแบบร้อยละ 31

## บทที่ 6

### สรุปผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย

- 6.1. วารสารวิชาการระดับนานาชาติที่มี impact factor
  - 6.1.1. Chinakrit Ladadok and Duangkamol Na-Ranong, “Kinetics, isotherm and thermodynamics of sterol adsorption on styrene-divinylbenzene anion exchange resins” Submitted to Science Asia (ISI, Scopus)
  - 6.1.2. Chinakrit Ladadok and Duangkamol Na-Ranong, “Molecular imprinted silica for the recovery of sterols synthesized by the acid-catalyzed sol-gel gelation method” To be submitted to Science Asia (ISI, Scopus)
- 6.2. การประชุมวิชาการระดับนานาชาติ
  - 6.2.1. Duangkamol Na-Ranong, Nattawat Nonthanasin and Krittin Binabdullah, “Synthesis and characterizations of molecularly imprinted polymer for sterol separation”, 64th Canadian Chemical Engineering Conference, Niagara Falls, ON, Canada, October 19-22, 2014
  - 6.2.2. Ratanaporn Yuangsawad, Nuengruthai Chuayrueng, Nattawat Nonthanasin, Krittin Binabdullah and Duangkamol Na-Ranong, “Synthesis of Molecularly Imprinted Polymer for Sterol Separation”, MATEC Web of Conferences, 62, 04006, 2016
- 6.3. การจัดงานเผยแพร่ผลงานประจำปี
  - 6.3.1. งานเผยแพร่ผลงานวิจัย (ประจำปี 2559) จัดโดยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- 6.4. วิทยานิพนธ์ หลักสูตรวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต จำนวน 1 เรื่อง
  - 6.4.1. ปีการศึกษา 2556: การสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบสติกมาสเตอรอล
- 6.5. วิทยานิพนธ์ หลักสูตรวิศวกรรมศาสตรดุษฎีบัณฑิต จำนวน 1 เรื่อง
  - 6.5.1. การนำกลับสเตอรอลจากกรดไขมันปาล์ม (คาดว่าจะสำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2561)
- 6.6. บัณฑิตสำเร็จการศึกษา จำนวน 3 คน
  - 6.6.1. ระดับปริญญาตรี: นายณัฐวัฒน์ นนท์ธนสิน และ นายกฤติน บิลอับดุลลาห์ (ปีการศึกษา 2556)
  - 6.6.2. ระดับปริญญาเอก: นายชินกฤต ละดาดก (คาดว่าจะสำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2561)

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.  
ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง

ตารางที่ ก-1 ข้อมูลดิบ

- PAM

ชื่อสาร	น้ำหนักของสารละลาย (g)	น้ำหนักของตัวดูดซับ (g)
NIP-A	1.3599	0.0143
MIP-A-STD	1.3645	0.0142
MIP-A-1	1.3750	0.0141
MIP-A-2	1.3601	0.0141
MIP-A-3	1.3601	0.0141
MIP-A-4	1.3638	0.0142
MIP-A-5	1.3686	0.0142
MIP-A-6	1.3665	0.0141
MIP-A-7	1.3661	0.0140
MIP-A-8	1.3733	0.0140
MIP-A-9	1.3663	0.0141
MIP-A-10	1.3635	0.0142
MIP-A-11	1.3805	0.0141
MIP-A-12	1.3615	0.0141
MIP-A-13	1.3600	0.0140
MIP-A-14	1.3663	0.0141

- PMAA

ชื่อสาร	น้ำหนักของสารละลาย (g)	น้ำหนักของตัวดูดซับ (g)
NIP-T	1.3738	0.0141
MIP-T-STD	1.3992	0.0141
MIP-T-1	1.3585	0.0141
MIP-T-2	1.3574	0.0141
MIP-T-3	1.3745	0.0140
MIP-T-4	1.3596	0.0141
MIP-T-5	1.3695	0.0140
MIP-T-6	1.3685	0.0142
MIP-T-7	1.3577	0.0140
MIP-T-8	1.3650	0.0140
MIP-T-9	1.3649	0.0142
MIP-T-10	1.3593	0.0140
MIP-T-11	1.3708	0.0142
MIP-T-12	1.3651	0.0140
MIP-T-13	1.3615	0.0141
MIP-T-14	1.3666	0.0142

ตารางที่ ก-2 องค์ประกอบของสเตอรอลผสมที่ใช้เป็นสารละลายการดูดซับ

Component	Sterol-mix			
	Concentration	Area ratio	µg	ppm
campesterol	0.2363	0.3304	4.4273	34.06
stigmasterol	0.2822	0.3828	5.2342	40.26
β-sitosterol	0.4815	0.6594	8.8872	68.36
Total	1.0000	1.3726	18.5440	142.65

ตารางที่ ก-3 องค์ประกอบของสเตอรอลผสมที่ถูกดูดซับด้วยตัวดูดซับชนิดต่างๆ เมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง

- PAM

Component	NIP-A			MIP-A-STD		
	Area ratio	µg	ppm	Area ratio	µg	ppm
campesterol	0.3141	4.2192	22.34	0.3300	4.4217	22.65
stigmasterol	0.3725	5.0939	26.97	0.3850	5.2637	26.97
β-sitosterol	0.6400	8.6366	45.72	0.6604	8.9005	45.60
Total	1.3266	17.9429	94.99	1.3754	18.5801	95.18

Component	MIP-A-1			MIP-A-2		
	Area ratio	µg	ppm	Area ratio	µg	ppm
campesterol	0.2921	3.9384	23.18	0.3104	4.1712	21.93
stigmasterol	0.3422	4.6844	27.57	0.3616	4.9472	26.01
β-sitosterol	0.5953	8.0574	47.42	0.6313	8.5230	44.81
Total	1.2297	16.6761	98.15	1.3033	17.6376	92.73

Component	MIP-A-3			MIP-A-4		
	Area ratio	µg	ppm	Area ratio	µg	ppm
campesterol	0.3261	4.3715	23.17	0.2689	3.6419	21.34
stigmasterol	0.3838	5.2472	27.81	0.3135	4.2946	25.16
β-sitosterol	0.6656	8.9685	47.53	0.5506	7.4769	43.80
Total	1.3755	18.5814	98.47	1.1329	15.4112	90.28

Component	MIP-A-5			MIP-A-6		
	Area ratio	µg	ppm	Area ratio	µg	ppm
campesterol	0.3440	4.5998	24.51	0.2781	3.7602	22.82
stigmasterol	0.4299	5.8724	31.29	0.3278	4.4890	27.24
β-sitosterol	0.7026	9.4476	50.33	0.5626	7.6330	46.32
Total	1.4765	19.9012	106.03	1.1686	15.8772	96.34

Component	MIP-A-7			MIP-A-8		
	Area ratio	µg	ppm	Area ratio	µg	ppm
campesterol	0.3253	4.3618	23.38	0.2795	4.9888	30.48
stigmasterol	0.3901	5.3326	28.58	0.3501	6.4976	39.69
β-sitosterol	0.6632	8.936	47.89	0.5712	10.2675	62.72
Total	1.3786	18.6220	99.80	1.2008	21.7325	132.76

Component	MIP-A-9			MIP-A-10		
	Area ratio	µg	ppm	Area ratio	µg	ppm
campesterol	0.3304	4.4273	34.06	0.2841	3.8359	23.05
stigmasterol	0.3828	5.2342	40.26	0.3305	4.5250	27.19
β-sitosterol	0.6594	8.8872	68.36	0.5786	7.8409	47.12
Total	1.3726	18.5440	142.65	1.1932	16.1991	97.35

Component	MIP-A-11			MIP-A-12		
	Area ratio	µg	ppm	Area ratio	µg	ppm
campesterol	0.3253	3.8359	22.50	0.3180	4.2681	22.14
stigmasterol	0.3901	4.5250	27.50	0.4110	5.6160	29.13
β-sitosterol	0.6632	7.8409	46.09	0.6497	8.7613	45.44
<b>Total</b>	<b>1.3786</b>	<b>16.1991</b>	<b>96.04</b>	<b>1.3786</b>	<b>18.6221</b>	<b>96.59</b>

Component	MIP-A-13			MIP-A-14		
	Area ratio	µg	ppm	Area ratio	µg	ppm
campesterol	0.3287	4.4051	23.98	0.3055	4.1087	22.21
stigmasterol	0.4854	6.6251	36.06	0.3637	4.9755	26.89
β-sitosterol	0.6724	9.0557	49.30	0.6203	8.3813	45.30
<b>Total</b>	<b>1.4865</b>	<b>20.0323</b>	<b>109.05</b>	<b>1.2895</b>	<b>17.4580</b>	<b>94.37</b>

- PMAA

Component	NIP-T			MIP-T-STD		
	Area ratio	µg	ppm	Area ratio	µg	ppm
campesterol	0.2666	3.6135	19.48	0.2989	4.0245	21.29
stigmasterol	0.3126	4.2832	23.09	0.3561	4.8724	25.78
β-sitoserol	0.5462	7.4207	40.00	0.6062	8.1987	43.38
Total	1.1255	15.3144	82.56	1.2612	17.0882	90.41

Component	MIP-T-1			MIP-T-2		
	Area ratio	µg	ppm	Area ratio	µg	ppm
campesterol	0.3304	3.6097	19.79	0.2616	3.5496	20.48
stigmasterol	0.3828	4.3176	23.67	0.3213	4.4003	25.39
β-sitoserol	0.6594	7.6482	41.93	0.5331	7.2510	41.84
Total	1.3726	15.5731	85.38	1.1161	15.1908	87.66

Component	MIP-T-3			MIP-T-4		
	Area ratio	µg	ppm	Area ratio	µg	ppm
campesterol	0.2719	3.6808	20.22	0.2284	3.1251	20.99
stigmasterol	0.4056	5.5430	30.46	0.2759	3.7851	25.42
β-sitoserol	0.5557	7.5437	41.45	0.4692	6.4220	43.13
Total	1.2332	16.7222	91.88	0.9734	13.3266	89.50

Component	MIP-T-5			MIP-T-6		
	Area ratio	µg	ppm	Area ratio	µg	ppm
campesterol	0.2856	3.8547	19.96	0.2771	3.7472	22.30
stigmasterol	0.3732	5.1045	26.43	0.3303	4.5230	26.92
β-sitoserol	0.5814	7.8773	40.79	0.5639	7.6499	45.54
Total	1.2402	16.8139	87.07	1.1714	15.9138	94.73

Component	MIP-T-7			MIP-T-8		
	Area ratio	µg	ppm	Area ratio	µg	ppm

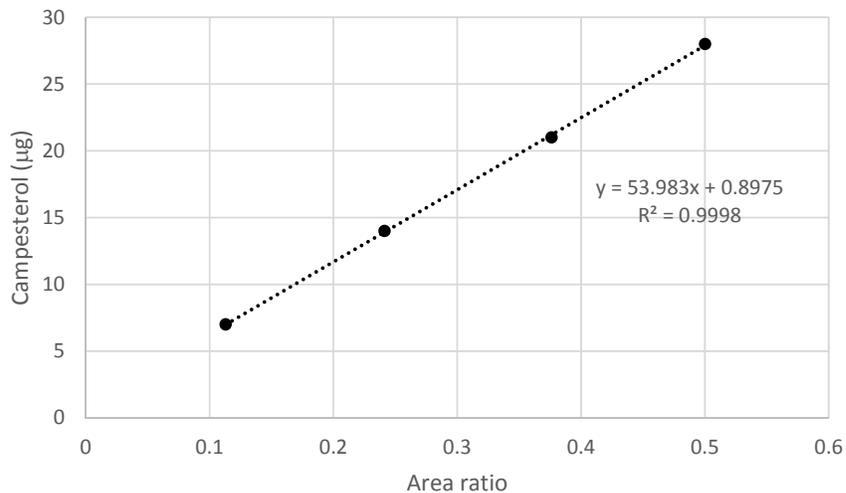
campesterol	0.2799	3.7822	21.58	0.2948	3.9724	21.08
stigmasterol	0.3403	4.6576	26.57	0.3525	4.8240	25.60
$\beta$ -sitoserol	0.5694	7.7218	44.05	0.5995	8.1113	43.05
Total	1.1896	16.1519	92.14	1.2468	16.9000	89.70

Component	MIP-T-9			MIP-T-10		
	Area ratio	$\mu\text{g}$	ppm	Area ratio	$\mu\text{g}$	ppm
campesterol	0.2365	3.2288	19.24	0.3073	4.1324	21.60
stigmasterol	0.2805	3.8470	22.93	0.3631	4.9673	25.97
$\beta$ -sitoserol	0.4759	6.5098	38.79	0.6222	8.4061	43.94
Total	0.9929	13.5811	80.94	1.2927	17.4994	91.48

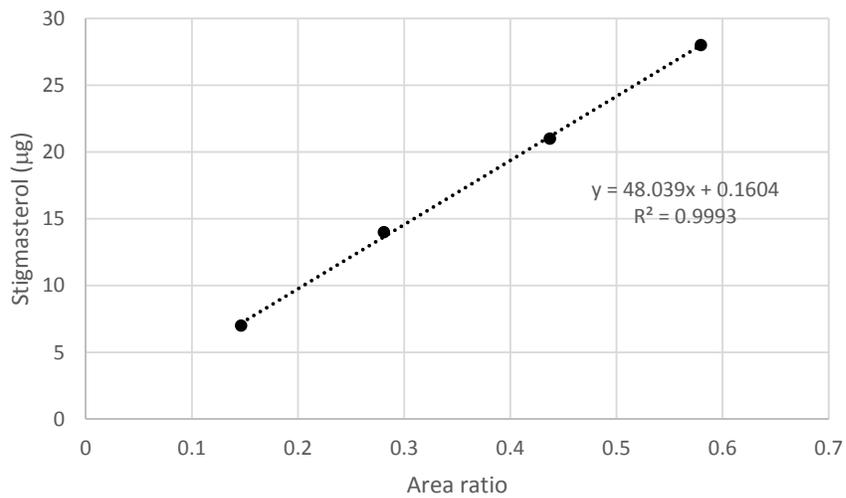
Component	MIP-T-11			MIP-T-12		
	Area ratio	$\mu\text{g}$	ppm	Area ratio	$\mu\text{g}$	ppm
campesterol	0.2282	3.1235	19.64	0.2923	3.9413	20.38
stigmasterol	0.2693	3.6951	23.24	0.3549	4.8557	25.11
$\beta$ -sitoserol	0.4685	6.4138	40.34	0.5972	8.0821	41.79
Total	0.9660	13.2299	83.21	1.2445	16.8693	87.22

Component	MIP-T-13			MIP-T-14		
	Area ratio	$\mu\text{g}$	ppm	Area ratio	$\mu\text{g}$	ppm
campesterol	0.3304	4.4273	34.06	0.2892	3.9016	21.33
stigmasterol	0.3828	5.2342	40.26	0.3426	4.6895	25.64
$\beta$ -sitoserol	0.6594	8.8872	68.36	0.5895	7.9821	43.64
Total	1.3726	18.5440	142.65	1.2214	16.5675	90.58

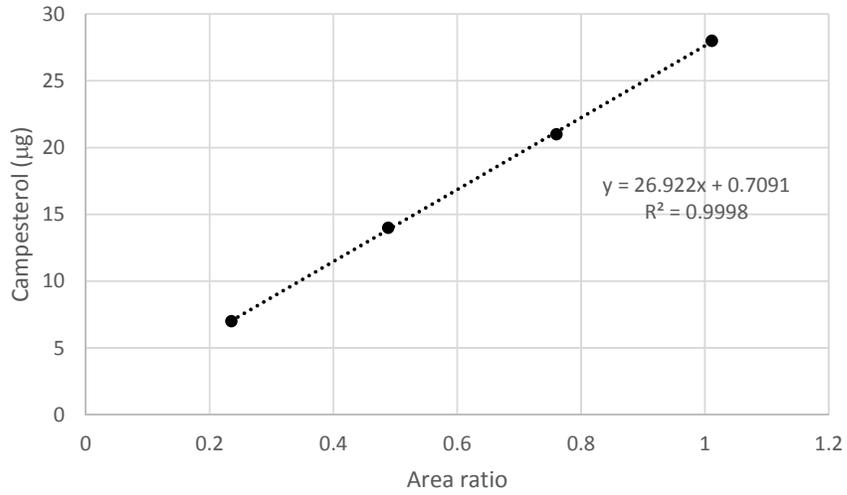
กราฟมาตรฐานสำหรับปริมาณวิเคราะห์ (Standard calibration curve)



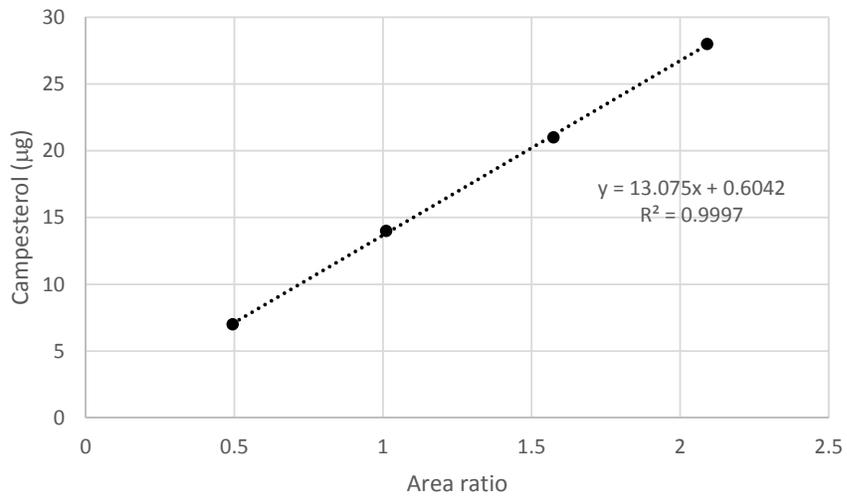
รูปที่ ก-4 กราฟมาตรฐานสำหรับ campesterol



รูปที่ ก-5 กราฟมาตรฐานสำหรับ stigmasterol



รูปที่ ก-6 กราฟมาตรฐานสำหรับ  $\beta$ -sitosterol



รูปที่ ก-7 กราฟมาตรฐานสำหรับสเตอรอลผสม

ภาคผนวก ข.  
หลักฐานอ้างอิงของผลผลิตในบทที่ 6

**Kinetics, isotherm and thermodynamics of sterol adsorption on styrene-divinylbenzene anion exchange resins**

**Chinakrit Ladadok, Duangkamol Na-Ranong\***

Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering,  
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang,  
1, Chalongkrung 1, Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

\* Corresponding author, e-mail: dnaranong@hotmail.com, duangkamol.na@kmitl.ac.th

**ABSTRACT:** Phytosterols can be recovered from natural resources using molecular adsorption, cold crystallization, which require large energy consumption. Adsorption was considered as a feasible alternative methods. In this study, kinetics, isotherm and thermodynamics of phytosterols adsorption on styrene-divinylbenzene with two different functional groups, strong base (SB-R) and weak base (WB-R), were investigated using a model solution of stigmasterol in n-heptane. Isothermal adsorption experiments were performed in temperature range of 298-313 K and concentration range of 0.3 – 6.0 mg/g<sub>sol</sub>. For both SB-R and WB-R cases, kinetics of adsorption were analyzed based on pseudo-first-order and pseudo-second-order models and the results revealed that pseudo-second-order model agreed with the experimental data much better than pseudo-first-order model. Analysis of isotherm data based on Langmuir, Freundlich and linear models showed that Freundlich was the best model that could predict behavior of sterol adsorption for both SB-R and WB-R cases. In addition, thermodynamics parameters ( $\Delta G$ ,  $\Delta H$  and  $\Delta S$ ) indicated that the sterol adsorptions on these adsorbents were spontaneous, exothermic and favorable at low temperature.

**KEYWORDS:** phytosterols, separation, adsorption process

## INTRODUCTION

Deodorizer distillate (DD) is a major byproduct from vegetable oil refining process. It consists of various hydrocarbons including free fatty acids (FFA), monoglycerides (MG), diglycerides (DG), triglycerides (TG) and small amount of some bioactive compounds<sup>1</sup>. The amount of FFA in DD varies around 25-82.5 wt% depending on type of vegetable oil, refining method and condition<sup>2</sup>. In recent years, large amount of DD has been annually generated due to high demand of biodiesel. Based on the amount of crude palm oil produced in 2014-2016 in Thailand, Indonesia and Malaysia (53 million ton per year), annually generated amount of palm fatty acid distillate (PFAD) was about 3 million ton per year<sup>3-9</sup>. To make overall process of biodiesel production become more economical reasonable and environmental friendly, DD has been utilized as a low cost raw material for production of biodiesel<sup>9</sup> and as a natural resource of phytonutrients such as tocopherols, squalene and sterols<sup>2</sup>.

Sterols have several beneficial bioactivities and have been therefore widely used in food, cosmetics and pharmaceutical industries<sup>10</sup>. As summarized in an excellent review<sup>10</sup>, in an industrial scale production, sterols have been successfully recovered from DD by several methods. In general, these methods consisted of several steps of chemical and physical treatments. Since removal of undesired compounds (FFA and glycerides) from DD by distillation requires relatively high temperature and extremely low pressure, it is necessary to transform these undesired compounds to the forms that can be separated more easily. In one approach, FFA in DD was saponified and the resulted soap was removed from the obtained mixture by simple solid-liquid separation. In the last step, sterols were separated from the liquid mixture of unsaponifiable components by using either vacuum distillation or cold crystallization<sup>11-13</sup>. In the other approach, FFA and glycerides were chemically transformed to fatty acid alkyl esters (FAAE) by esterification and transesterification, respectively<sup>14-18</sup>. Then, either vacuum distillation or molecular distillation was applied to remove large fraction of FFAE. In this sterol preconcentration step, multiple steps of these physical treatments were usually applied to obtain high yield of sterol recovery and to reduce the size of the equipment used in the downstream process. Similar to the former approach, cold crystallization was also applied as the last step of sterol isolation.

Moreira and Baltanás<sup>16</sup> focused on cold crystallization process and investigated effects of process variables on the quality and yield of sterol recovered from DD of sunflower oil. In their work, FFA and TG in DD were transformed to fatty acid ethyl esters (FAEE) and FAEE was removed by performing vacuum distillation at 1.3 mbar,  $\leq 200$  °C. Crystallization of the sterols in the obtained preconcentrated mixture was optimized by varying type of solvent (hexane single solvent, hexane with cosolvent), type of co-solvent (water, ethanol or both), mass ratio of solvent to preconcentrated mixture (3 to 5), cooling rate (-20 °C/h or brisk chilling from 40 to -5 °C), crystallization temperature (-20 to 0 °C) and ripening time (4 to 96 h). Based on the experimental results, the optimized yield (84%) with purity (36 %) of sterol was obtained at solvent to preconcentrated mixture mass ratio of 4 with cooling rate of -20°C/h to -5 °C and ripening time = 22 h using co-solvent of 2.5 wt% of ethanol in hexane. Carmona et al<sup>18</sup> pointed that the preconcentration of sterol in FAME matrices required large amount of energy and also destroyed some sterols present in the matrices. Therefore, they proposed an alternative method for isolation of sterols from FAME matrices with no requirement of vacuum distillation. Crystallization was performed in FAME, which was formed from esterification and/or transesterification, without either additional FAME or partial distillation. The obtained isolated solid was then washed with hexane and gave the end-product of sterols. By using this proposed method, at the best condition of crystallization (-5 °C, 24 h), 35-42% of sterols were recovered from sunflower

oil deodorizer distillate and had high purity of more than 92 %. In addition, some cases resulted in the end-product of sterols with the purity higher than 99 %.

Although these approaches have been successfully applied to recover sterols from DDs, the processes face major problem of extensive energy requirement; vacuum distillation is usually operated at  $1 \times 10^{-3}$  – 1.33 mbar and 140 – 300 °C to vaporize large quantity of the undesired compounds<sup>13, 15-17, 19</sup> and cold crystallization is usually operated at low temperature in the range of -20 to 15 °C<sup>11, 12, 14-18, 20-22</sup>. Therefore, a method with high efficiency and more economical value should be developed to serve rapid growth of recent sterol market.

Adsorption is widely used in separation of minor components from liquid or gas mixture under mild conditions. It was successfully applied to recovery of sterols from natural resources<sup>23-25</sup>. Barder et al<sup>23-25</sup> described an adsorption-desorption process using activated carbon, carbonaceous pyropolymer or magnesium silicate as an adsorbent and chlorobenzene, toluene or methyl-t-butyl ether as a desorbent. The described process could recover sterols from feed mixtures with wide range of sterol concentration (14-84 wt%), with high recovery portion (50-95%). The obtained sterols had reasonably high purity 58-78%, or even as high as 95% when the feed mixture was appropriately pretreated by liquid-liquid extraction.

Based on chemical resistance and simplicity of operation, two types of commercial grade styrene-divinylbenzene copolymer ion exchange resin were considered as attractive adsorbents in the sterol recovery process. As reported by Anasthas and Gaikar<sup>26</sup>, sterol adsorption on polymeric adsorbent occurred through a weak hydrogen bond between amino group on polymer matrix and hydroxyl group of sterol. Therefore, a strong base resin (SB-R) with quaternary amine functional group and a weak base resin (WB-R) with both quaternary and tertiary amine groups were selected in this study. The objective of this study was to comparatively investigate behavior of sterol adsorption on these resins. Isothermal batch adsorption was performed using stigmasterol in n-heptane as a model solution in order to evaluate adsorption capacities of SB-R and WB-R. Kinetics of sterol adsorption for both cases were evaluated based on pseudo-first-order and pseudo-second-order models. In addition, adsorption data at equilibrium were analyzed based on Langmuir, Freundlich and linear isotherms and three important thermodynamics parameters (i.e. Gibb's free energy change:  $\Delta G$ , enthalpy change:  $\Delta H$  and entropy change:  $\Delta S$ ) were calculated and the adsorption behavior was discussed based on the calculated thermodynamics parameters.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Materials**

To comparatively evaluate performance of phytosterol adsorption on a weak base and a strong base adsorbents, styrene-divinylbenzene copolymer anion-exchange resins with quaternary amine (Lewatit® Monoplus MP 800) and tertiary-quaternary amine (Lewatit® Monoplus MP 68) functional groups provided by Lanxess, Germany were selected as representatives of a weak- and a strong base ion exchange resins (WB-R and SB-R), respectively. Table 1 summarized characteristic properties of these two adsorbents. To remove moisture from the adsorbents, the adsorbents were dried in an oven at 60 °C under vacuum condition for 6 h and stored in a desiccator before being used in adsorption experiment. Prior to the adsorption experiment, the adsorbents were washed with n-propanol and n-hexane.

Stigmasterol supplied by Tama Biochemical Co. Ltd. and n-heptane (AR grade) supplied by Apex Chemicals Co. Ltd. were used in preparation of a model solution of phytosterol containing mixture. Cholesterol supplied from Sigma-Aldrich Inc. was used as an internal standard (ISTD) in quantitative analysis of stigmasterol. HPLC grade organic

solvents (methanol, acetonitrile and water supplied from RCI Labscan Ltd. and acetic acid supplied from Merck Ltd.) were used in the quantification of stigmaterol without purification.

### Batch adsorption

To study kinetics, isotherm and thermodynamics of stigmaterol adsorptions on WB-R and SB-R, isothermal batch adsorption was performed using a model solution of stigmaterol in n-heptane. Adsorption temperature and stigmaterol concentration were varied in the ranges of 298 – 313 K and 0.3 - 6.0 mg/g<sub>sol</sub>, respectively. The model solution (50 ml) and the adsorbent (5 wt%) were heated and shaken in an orbital shaker (4000ic; IKA) at 200 rpm for 2 h. Before and after the adsorption, samples (200 µl) were taken and filtered through a 0.45 µm nylon filter and used for the quantitative analysis of stigmaterol content.

### Quantitative analysis

The content of stigmaterol in the sample was analyzed using a high performance liquid chromatograph (HPLC) connected with a UV detector. An injection valve connected with a 20 µl of sample loop was used to introduce the sample into the HPLC. Peak separation was achieved using a reverse-phase column (Inertsil C8-3; 5 µm particle diameter, 250 mm length, 4.6 mm i.d., GL Sciences Inc, Japan). Composition of mobile phase and condition of analysis were adapted from the work reported by Chang et al.<sup>27</sup>. Mobile phase was a mixture of acetonitrile (85%), methanol (5%), and water containing 1% of acetic acid (10%) and flowed at the rate of 1.3 ml/min, the analysis was performed at the wavelength of 210 nm.

Since the sample was not dissolved well in the mobile phase, n-heptane in the sample was removed and an appropriate solvent was added to the solid sample as a solvent in the quantitative analysis. The solvent exchange was performed as follows; n-heptane was completely removed from the sample by evaporation at room temperature, methanol (800µl) was then added and the mixture was shaken in the orbital shaker at 200 rpm for 1 h. As an internal standard, cholesterol in methanol (4.0 mg/g<sub>sol</sub>, 200 µl) was added in the sample.

Amount of stigmaterol adsorbed on the adsorbent at time “*t*” ( $q_t$ ) was calculated according to Eq. (1).

$$q_t = \frac{(C_0 - C_t)W_{sol}}{W_{ads}} \quad (1)$$

Where  $C_0$  and  $C_t$  are liquid-phase concentration of stigmaterol at initial and at time  $t$ , respectively.  $W_{sol}$  is the weight of the solution and  $W_{ads}$  is the weight of adsorbent used.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Adsorption capacities

Fig. 1 shows time dependences of adsorption capacity of SB-R and WB-R at 303 K and 5 wt% of adsorbent loading for various initial concentrations of stigmaterol. For both SB-R and WB-R cases, adsorption rapidly occurred in the initial period and after 5 minutes of adsorption the rate of adsorption gradually decreased while the adsorption equilibrium was approached. In the tested range, adsorption reached the equilibrium within 30 min for all the initial concentrations. Comparison of the profiles obtained at different initial concentrations revealed that the rates of adsorption on both resins increased with the increase of concentration of stigmaterol. This observation could be explained as a result of the increase of concentration leading to increase in the driving force to overcome overall mass transfer resistance of adsorption process<sup>28</sup>. By increasing the initial concentration of stigmaterol from 0.3 to 6.0 mg/g<sub>sol</sub>, in the case of SB-R, the adsorption capacity at the equilibrium ( $q_e$ ) increased from 2.15 to 39.96 mg/g<sub>ads</sub>. On the other hand, in the case of WB-R,  $q_e$  increased from 2.51 to 47.44 mg/g<sub>ads</sub>. The adsorption capacity at the equilibrium of WB-R was approximately 1.2 times higher than SB-R.

### Adsorption kinetics

To study the kinetics of adsorption, the experimental data were comparatively analyzed based on pseudo-first-order and pseudo-second-order models which are expressed as Eqs. (2) and (3), respectively<sup>29, 30</sup>.

$$\frac{dq_t}{dt} = k_1(q_e - q_t) \quad (2)$$

$$\frac{dq_t}{dt} = k_2(q_e - q_t)^2 \quad (3)$$

Where  $q_e$  and  $q_t$  are the amounts of stigmasterol adsorbed at equilibrium and at time  $t$ , respectively.  $k_1$  and  $k_2$  are the adsorption rate constant of pseudo-first-order and pseudo-second-order model, respectively. Linearized forms of these two models obtained by integrating Eqs. (2) and (3) with the boundary conditions of  $q_t = 0$  at  $t = 0$  and  $q_t = q_t$  at  $t = t$  are expressed as Eqs. (4) and (5), respectively.

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 t \quad (4)$$

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e} \quad (5)$$

Linear plots corresponding to pseudo-first-order and pseudo-second-order models for SB-R are shown in Figs. 2(a) and 2(b), respectively. The parameters,  $k$  and  $q_e$ , of each model were calculated from the slope and the y-intercept of the corresponding linear plot and summarized in Table 2. As shown in the table, the correlation coefficients ( $R^2$ ) of pseudo-second-order model were higher than those of pseudo-first-order model for all conditions. The lowest value of  $R^2$  obtained from pseudo-second-order model was 0.9986 while the highest value of  $R^2$  obtained from pseudo-first-order model was 0.9899. Furthermore,  $q_{e,cal}$  from pseudo-second-order model agreed reasonably well with  $q_{e,exp}$  ( $\Delta q_e < 7.5\%$ ) while pseudo-first-order model could not well predict the value of  $q_{e,exp}$ . Based on the correlation coefficients and  $\Delta q_e$ , pseudo-second-order model was selected to describe the kinetics of stigmasterol adsorption on SB-R. In the case of adsorption on WB-R, similar linear plots corresponding to the two kinetics models were obtained, as shown Fig. 3. The calculated parameters of each model were also summarized in Table 2. The results revealed that  $R^2$  of pseudo-second-order model was higher than  $R^2$  of pseudo-first-order model and  $\Delta q_{e, pseudo-second-order}$  was less than  $\Delta q_{e, pseudo-first-order}$  for all conditions. Therefore, pseudo-second-order model was selected as the suitable model for describing the kinetics of stigmasterol adsorption on WB-R as well.

For both SB-R and WB-R cases,  $k_2$  depended on the initial concentration of stigmasterol ( $C_0$ ). When  $C_0$  was increased from 0.3 to 6.0 mg/g<sub>sol</sub>,  $k_{2,SB-R}$  decreased from 0.0585 to 0.0115 while  $k_{2,WB-R}$  decreased from 0.1012 to 0.0115 g<sub>ads</sub>/(mg min). This dependence of  $k_2$  on initial concentration was previously reported in several adsorption systems<sup>31-33</sup>. Theoretically analysis by Azizian<sup>34</sup> clearly showed that  $k_2$  is not an intrinsic rate constant of adsorption, but it is a complex function of adsorption rate constant, desorption rate constant and initial concentration of adsorbate.

### Adsorption isotherm

Adsorption isotherm was investigated at 298, 303, 308 and 313 K and discussed based on the data taken after 1 h of adsorption, which were reasonably considered as the performance at the equilibrium of adsorption according to the discussion in section of adsorption capacities. Fig. 4 shows dependence of adsorption capacity at the equilibrium ( $q_e$ ) on concentration of stigmasterol at the equilibrium ( $C_e$ ) at 303 K. For both SB-R and WB-R, in the tested range of  $C_e$ ,  $q_e$  increased with  $C_e$  and saturation of adsorption were not observed. Fig. 5 shows effect of temperature on  $q_e$  for various initial concentrations. For both SB-R and WB-R,  $q_e$  decreased when the temperature was increased. This result indicated

that stigmasterol adsorption was exothermic for both SB-R and WB-R cases. It should be noted that this dependence was significant in the case of high initial concentration and became less significant when the initial concentration was lower.

Equilibrium adsorption data were analyzed based on Langmuir, Freundlich and linear isotherm models using the corresponding linearized form of each model, listed in Table 3. Langmuir model was considered as an inappropriate model for prediction of isotherm of stigmasterol adsorption for both SB-R and WB-R since the value of  $R^2$  was extremely low, the obtained  $q_m$  (saturated adsorption capacity) and  $K_{La}$  (Adsorption equilibrium constant in Langmuir model,  $g_{sol}/mg$ ) were negative, which had no physical meaning for adsorption process. Since  $R^2$  of Freundlich model were larger than  $R^2$  of linear model for all conditions, excepting SB-R at 313 K, Freundlich model was considered as the most suitable model to be used to predict the performance of adsorption at the equilibrium for both SB-R and WB-R. However, it should be noted that the calculated values of  $1/n$  were nearly equal to 1 for all conditions, indicating that the concentration of stigmasterol in overall tested range in this study was low and the adsorption behaved like linear model. In addition, for both SB-R and WB-R cases, the calculated  $K_F$  (Adsorption equilibrium constant in Freundlich model,  $mg/(g_{ads}(mg/g_{sol})^{1/n})$ ) decreased when the temperature of adsorption was increased.

Fig. 4 shows good resemblances of the calculated curves and the experimental data for both Freundlich and linear models. Similar plots (not shown) were obtained at the other temperatures (298, 308 and 313 K) and showed good resemblances of the calculated curves and the experimental data, as well. In the case of SB-R (Fig. 4a), nonlinear regression analysis was performed for both Freundlich and linear models and gave the same  $R^2$  (0.9438). Based on regression analysis, Freundlich model was the most suitable model for prediction of effect of  $C_e$  on  $q_e$  in the tested range of  $0 < C_e < 4.5 \text{ mg}/g_{sol}$  and  $298 < T < 313 \text{ K}$ .

In the case of WB-R, similar results were obtained. Fig. 4b shows that both models show good resemblances of the calculated curves and the experimental data, as well. Regression analysis revealed that Freundlich model was slightly better than linear model (Freundlich model:  $R^2 = 0.9706$ ; liner model:  $R^2 = 0.9557$ ). Therefore, Freundlich model was also the most suitable model for prediction of effect of  $C_e$  on  $q_e$  in stigmasterol adsorption on WB-R.

### Adsorption thermodynamics

In order to obtain useful information for the design of adsorption process, thermodynamics parameters of adsorption (Gibb's free energy change:  $\Delta G$ , enthalpy change:  $\Delta H$  and entropy change:  $\Delta S$ ) were evaluated for both SB-R and WB-R cases. Based on the discussion in section of adsorption isotherm, adsorption equilibrium constants at various temperatures were calculated using Freundlich model and  $\Delta G$  and  $\Delta S$  were calculated using Eqs. (6) and (7), respectively.

$$\Delta G = -RT \ln K_F \quad (6)$$

$$\ln K_F = \frac{\Delta S}{R} - \frac{\Delta H}{RT} \quad (7)$$

By performing linear regression analysis of the plot between  $\ln K_F$  and  $1/T$ , as shown in Fig. 6, enthalpy change ( $\Delta H$ ) and entropy change ( $\Delta S$ ) were calculated from the slope and the y-intercept of the obtained straight line. As summarized in Table 4, for both SB-R and WB-R, adsorption had negative values of  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  and  $\Delta S$ . The negative value of  $\Delta G$  indicates that the adsorption is spontaneous and feasible. The increase of  $\Delta G$  with respect to temperature indicates that the adsorption is more favorable at lower temperatures<sup>35</sup>. Since the calculated values of  $\Delta G$  for both SB-R and WB-R cases were in the range of -20 to 0 kJ/mol,

stigmasterol adsorption on SB-R and WB-R could be considered as physical adsorption<sup>36</sup>. The negative value of  $\Delta H$  indicates that the adsorption is exothermic and agreed well with the effect of temperature on adsorption capacity at the equilibrium discussed in section of adsorption isotherm. Comparison of  $\Delta H_{SB-R}$  (-24.97 kJ/mol) and  $\Delta H_{WB-R}$  (-14.03 kJ/mol) indicates that the interaction between stigmasterol and SB-R is stronger than the interaction between stigmasterol and WB-R. The negative value of  $\Delta S$  indicates associative adsorption and decrease of the randomness between the solid/liquid interface due to the adsorption<sup>37, 38</sup>.

## CONCLUSIONS

Analysis of kinetics, isotherm and thermodynamics of stigmasterol adsorption on commercial anion exchange styrene-divinylbenzene resin with strong and weak base functional group (SB-R and WB-R) revealed that both SB-R and WB-R were promising for separation of phytosterols from sterol containing mixture. Adsorption capacity at equilibrium of stigmasterol on WB-R was higher than SB-R. The adsorption rate of phytosterols on SB-R and WB-R could be described by pseudo-second-order kinetics model. Equilibrium data was well fitted with Freundlich isotherm ( $R^2 \geq 0.9510$ ) and better than Langmuir and linear isotherm models. The thermodynamics parameters indicated that the adsorption on both resins were exothermic and spontaneous processes.

## Acknowledgements:

Authors gratefully acknowledge financial supports from Thailand Research Fund (TRF) and King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMUTL) under Royal Golden Jubilee Ph.D. program (PHD/0021/2555) and from National Research Councils of Thailand (NRCT).

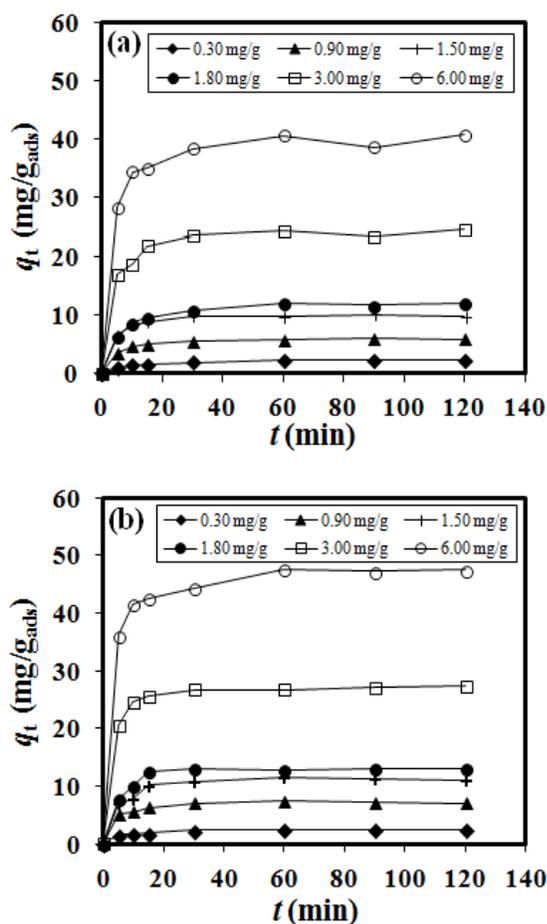
## REFERENCES

1. Verleyen T, Verhe R, Garcia L, Dewettinck K, Huyghebaert A, Greyt WD (2001) Gas chromatographic characterization of vegetable oil deodorization distillate. *J Chromatogr A* **921**, 277–85.
2. Gunawan S, Ju YH (2009) Vegetable oil deodorizer distillate: characterization, utilization and analysis. *Sep Purif Rev* **38**, 207–41.
3. Wright T, Wiyono E (2014) Indonesia oilseed and products update July 2014. *United States Department of Agriculture* **ID1427**.
4. Abdi A, Wright T, Rahmanulloh A (2017) Oilseeds and products annual report 2017. *United States Department of Agriculture* **ID1705**.
5. Malaysian Palm Oil Board (2016) Overview of the Malaysian oil palm industry.
6. Malaysian Palm Oil Board (2017) Overview of the Malaysian oil palm industry.
7. Richey B, Preechajarn S (2015) Thailand palm oil production supply demand update. *United States Department of Agriculture* **TH5074**.
8. Santella R, Preechajarn S (2016) Thailand Oilseed and Product Annual 2016. *United States Department of Agriculture* **TH6049**.
9. Echim C, Verhé R, Greyt WD, Stevens C (2009) Production of biodiesel from side-stream refining products. *Energy Environ Sci* **2**, 1131–41.
10. Fernandes P, Cabral JMS (2007) Phytosterols: applications and recovery methods. *Biores Technol* **98**, 2335–50.
11. Yang H, Yan F, Wu D, Huo M, Li J, Cao Y, Jiang Y (2010) Recovery of phytosterols from waste residue of soybean oil deodorizer distillate. *Bioresour Technol* **101**, 1471–76.

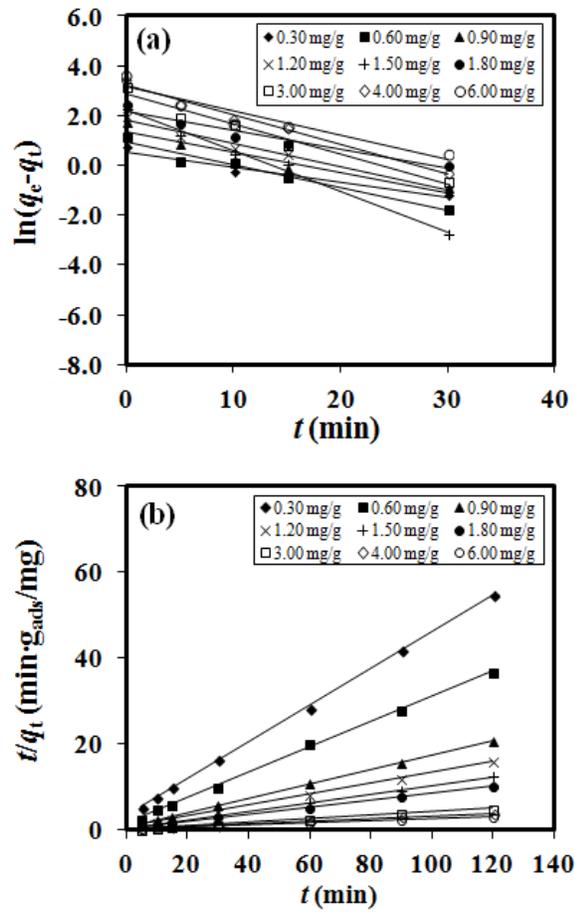
12. Khatoon S, Rajan RGR, Krishna AGG (2010) Physicochemical characteristics and composition of Indian soybean oil deodorizer distillate and the recovery of phytosterols. *J Am Oil Chem Soc* **87**, 321–26.
13. Rohr R (2003) Process for separation unsaponifiable valuable products from raw materials. *US Patent 2003/0120095 A1*.
14. Brown W, Smith FE (1964) Process for separating tocopherols and sterols from deodorizer sludge and the like. *US Patent 3153055*.
15. Fizet C (1996) Process for tocopherols and sterols from natural sources. *US Patent 5487817*.
16. Moreira EA, Baltanás MA (2004) Recovery of Phytosterols from sunflower oil deodorizer distillates. *JAOCs* **81**, 161-67.
17. Wollmann G, Schwarzer J, Gutsche B (2005) Processes for producing sterols from fatty acid production residues. *US Patent 6956125 B2*.
18. Carmona MA, Jiménez C, Sanchidrián CJ, Peña F, Ruiz JR (2010) Isolation of sterols from sunflower oil deodorizer distillate. *J Food Eng* **101**, 210–13.
19. Watanabe Y, Nagao T, Hirota Y, Kitano M, Shimada Y (2004) Purification of tocopherols and phytosterols by a two-step *in situ* enzymatic reaction. *JAOCs* **81**, 339-45.
20. Yan F, Yang H, Li J, Wang H (2012) Optimization of phytosterols recovery from soybean oil deodorizer distillate. *J Am Oil Chem Soc* **89**, 1363–70.
21. Smith FE (1967) Separation of tocopherols and sterols from deodorizer sludge and the like. *US Patent 3335154*.
22. Lin KM (2003) Separation of sterols from deodorizer distillate by crystallization. *J Food Lipids* **10**, 107-27.
23. Barder TJ (1989) Purification of sterols with activated carbon as adsorbent and chlorobenzene as desorbent. *US Patent 4882065*.
24. Barder TJ, Johnson P (1989) Adsorption separation of sterols from tall oil pitch carbon adsorbent. *US Patent 4849112*.
25. Barder TJ, Bedwell WB, Johnson SP (1990) Separation of sterols from low-acid feeds with magnesium silicate and methyl-tert-butyl ether desorbent. *US Patent 4977243*.
26. Anasthas HM, Gaikar VG (1999) Adsorptive separations of alkylphenols using ion-exchange resins. *React Funct Polym* **39**, 227–37.
27. Chang CJ, Chang YF, Lee HZ, Lin JQ, Yang PW (2000) Supercritical carbon dioxide extraction of high-value substances from soybean oil deodorizer distillate. *Ind Eng Chem Res* **39**, 4521–5.
28. Aksu Z (2001) Biosorption of reactive dyes by dried activated sludge: equilibrium and kinetic modelling. *Biochem Eng J* **7**, 79–84.
29. Lin J, Wang L (2009) Comparison between linear and non-linear forms of pseudo-first-order and pseudo-second-order adsorption kinetic models for the removal of methylene blue by activated carbon. *Front Environ Sci Engin China* **33**, 320–24.
30. Ho YS, McKay G (1999) Pseudo-second order model for sorption processes. *Process Biochem* **34**, 451–65.
31. Ho YS, McKay G (1999) Batch lead (II) removal from aqueous solution by peat: equilibrium and kinetics. *Trans IChemE* **77**, 165–73.
32. Hameed BH, Ahmad AL, Latiff KNA (2007) Adsorption of basic dye (methylene blue) onto activated carbon prepared from rattan sawdust. *Dyes Pigm* **75**, 143–9.
33. Chen H, Zhao J (2009) Adsorption study for removal of congo red anionic dye using organo-attapulgate. *Adsorption* **15**, 381–9.

34. Azizian S (2004) Kinetic models of sorption: a theoretical analysis. *J Colloid Interf Sci* **276**, 47–52.
35. Chu BS, Baharin BS, Man YBC, Quek SY (2004) Separation of vitamin E from palm fatty acid distillate using silica: I equilibrium of batch adsorption. *J Food Eng* **62**, 97–103.
36. Yu Y, Zhuang YY, Wang ZH (2001) Adsorption of water-soluble dye onto functionalized resin. *J Colloid Interf Sci* **242**, 288–93.
37. Scheckel KG, Sparks DL (2001) Temperature effects on nickel sorption kinetics at the mineral-water interface. *Soil Sci Soc Am J* **65**, 719–28.
38. Rattanaphani S, Chairat M, Bremner JB, Rattanaphani V (2007) An adsorption and thermodynamic study of lac dyeing on cotton pretreated with chitosan. *Dyes Pigm* **72**, 88–96.

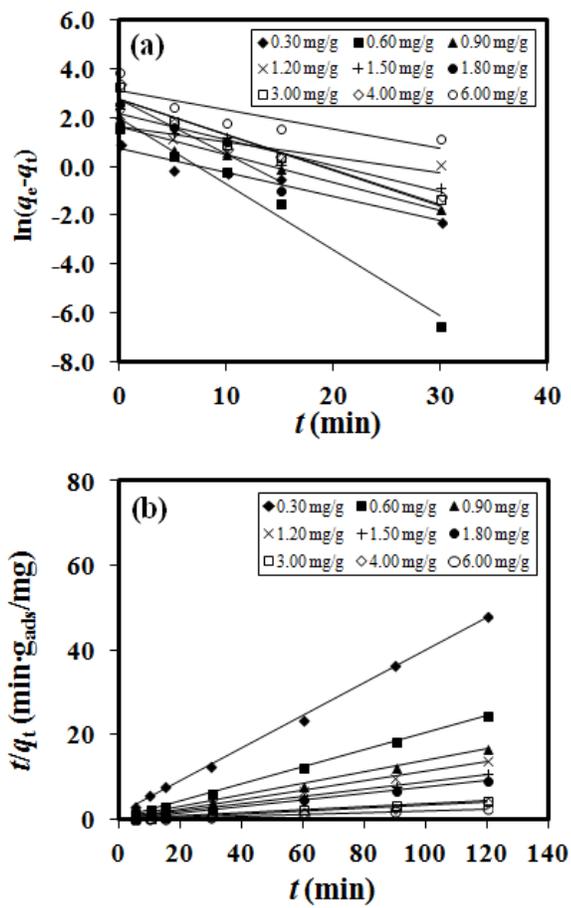
## FIGURE LEGENDS



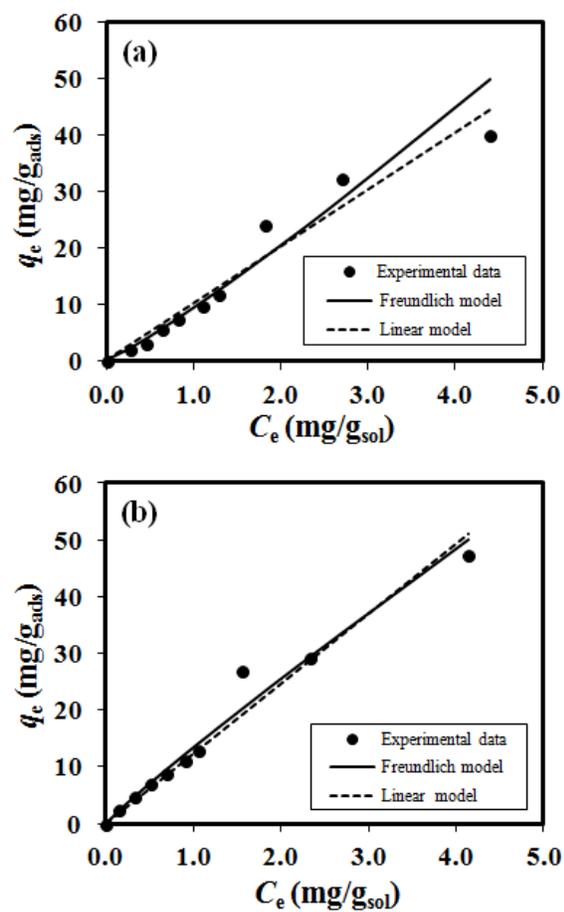
**Fig. 1** Adsorption capacities of stigmasterol on (a) SB-R and (b) WB-R versus adsorption time at 303 K and 5 wt% of adsorbent loading for various initial stigmasterol concentrations.



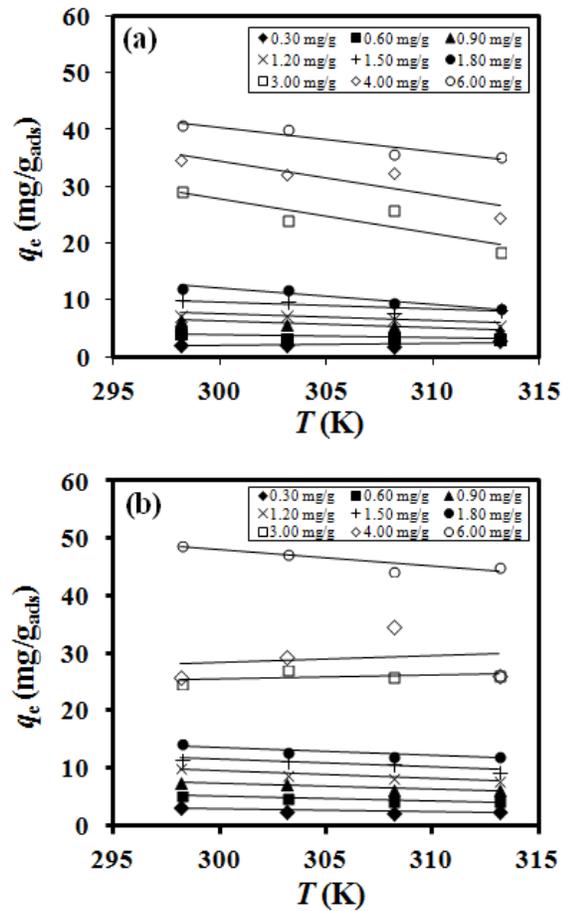
**Fig. 2** Linear plots of (a) pseudo-first-order and (b) pseudo-second-order kinetics models for SB-R at 303 K and 5 wt% of adsorbent loading for various initial stigmasterol concentrations.



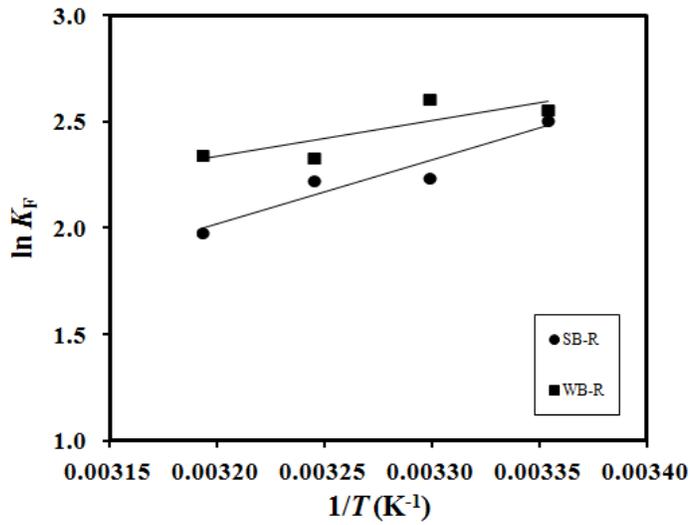
**Fig. 3** Linear plots of (a) pseudo-first-order and (b) pseudo-second-order kinetics models for WB-R at 303 K and 5 wt% of adsorbent loading for various initial stigmasterol concentrations.



**Fig. 4** Dependences of  $q_e$  on  $C_e$  calculated using Freundlich and linear model comparing with the experimental data for adsorption of stigmasterol on (a) SB-R and (b) WB-R, ( $T = 303$  K, adsorbent loading = 5 wt%).



**Fig. 5** Effect of temperature on the adsorption capacity of (a) SB-R and (b) WB-R at the equilibrium ( $q_e$ ) for various initial stigmasterol concentrations, ( $T = 298\text{--}313$  K, adsorbent loading = 5 wt%).



**Fig. 6** Plot of  $\ln K_F$  versus  $1/T$  for SB-R and WB-R.

#### TABLE LEGENDS

**Table 1** Properties of adsorbents

Properties	SA-R	WB-R
<i>Commercial name</i>	Lewatit® Monoplus MP 800	Lewatit® Monoplus MP 68
Type	Strong base macroporous	Weak base macroporous
Functional group	Quaternary amine, type I	Tertiary/quarternary amine
Matrix structure	Crosslinked polystyrene	Crosslinked polystyrene
Bead size (mm)	0.65 (± 0.05)	0.54 (± 0.05)
Total exchange capacity (min.eq/l)	0.8	1.3
Operating pH range	0 – 12	0 - 7
Operating temperature (max. °C)	70	70

**Table 2** Kinetic parameters of stigmasterol adsorptions on SB-R and WB-R at 303 K with different initial concentrations.

Adsorbents	$C_0$ (mg/g <sub>sol</sub> )	$q_{e,exp}$ (mg/g <sub>ads</sub> )	Pseudo-first-order				Pseudo-second-order			
			$k_1$ (min <sup>-1</sup> )	$q_{e,cal}$ (mg/g <sub>ads</sub> )	$\Delta q_e$ (%)	$R^2$	$k_2$ (g <sub>ads</sub> /(mg min))	$q_{e,cal}$ (mg/g <sub>ads</sub> )	$\Delta q_e$ (%)	$R^2$
SB-R	0.3	2.1529	0.0605	1.7319	19.6	0.9475	0.0585	2.3272	7.5	0.9997
	0.6	3.1703	0.0911	2.5199	20.5	0.9628	0.0588	3.3898	6.5	0.9988
	0.9	5.7515	0.0832	3.9240	31.8	0.9121	0.0446	6.0168	4.4	0.9998
	1.2	7.4262	0.0943	6.1688	16.9	0.9804	0.0312	7.7640	4.4	0.9996
	1.5	9.7616	0.1637	9.0948	6.8	0.9899	0.0531	9.9502	1.9	0.9993
	1.8	11.8279	0.0772	8.8401	25.3	0.9413	0.0179	12.4069	4.7	0.9994
	3.0	24.0448	0.1209	17.4842	27.3	0.9694	0.0175	24.6914	2.6	0.9986
	4.0	32.1690	0.1200	25.4191	21.0	0.9829	0.0121	33.0033	2.5	0.9995
	6.0	39.9560	0.0970	23.3617	41.5	0.8892	0.0115	40.8163	2.1	0.9987
WB-R	0.3	2.5126	0.0984	2.1308	15.2	0.9607	0.1012	2.6001	3.4	0.9984
	0.6	4.8633	0.2711	7.5210	35.3	0.9765	0.1199	4.9628	2.0	0.9998
	0.9	7.2292	0.1151	5.1841	28.3	0.9623	0.0787	7.2939	0.9	0.9990
	1.2	8.8029	0.0635	5.0957	42.1	0.7450	0.0405	8.9445	1.6	0.9973
	1.5	11.2957	0.1059	8.6331	23.6	0.9437	0.0377	11.4286	1.2	0.9979
	1.8	12.8865	0.2255	15.5615	17.2	0.9333	0.0348	13.2450	2.7	0.9994
	3.0	27.0299	0.1458	16.2031	40.1	0.9529	0.0263	27.5482	1.9	0.9999
	4.0	29.4413	0.1429	15.4113	47.7	0.9208	0.0429	29.5858	0.5	0.9997
	6.0	47.4444	0.0792	22.2202	53.2	0.7337	0.0115	48.3092	1.8	0.9998

**Table 3** Parameters and correlation coefficients for Langmuir, Freundlich and linear models for isotherms of stigmasterol adsorption on SB-R and WB-R.

Models	Langmuir: $q_e = \frac{q_m K_{La} C_e}{1 + K_{La} C_e}$				Freundlich: $q_e = K_F C_e^{1/n}$			Linear: $q_e = K_{Li} C_e$	
Linearized Equation; Parameters	$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{K_{La} q_m} + \frac{1}{q_m} C_e; K_{La}, q_m$				$\log(q_e) = \log(K_F) + \frac{1}{n} \log(C_e); K_F, 1/n$			$q_e = K_{Li} C_e; K_{Li}$	
Adsorbents	$T$ (K)	$K_{La}$ (g <sub>sol</sub> /mg)	$q_m$ (mg/g <sub>ads</sub> )	$R^2$ (-)	$K_F$ (mg/(g <sub>ads</sub> (mg/g <sub>sol</sub> ) <sup>1/n</sup> ))	$1/n$ (-)	$R^2$ (-)	$K_{Li}$ (g <sub>sol</sub> /g <sub>ads</sub> )	$R^2$ (-)
SB-R	298	-0.0094	-1,250.0	0.0055	12.11	1.0690	0.9698	11.91	0.8822
	303	-0.0552	-153.8	0.2036	9.30	1.1333	0.9794	10.09	0.9438
	308	-0.0524	-158.7	0.1732	9.12	1.1131	0.9744	9.89	0.9121
	313	-0.0491	-131.6	0.1356	7.10	1.0337	0.9510	7.88	0.9752
WB-R	298	0.0104	1,250.0	0.0142	12.83	0.9727	0.9887	12.87	0.9797
	303	0.0613	238.1	0.2782	13.48	0.9258	0.9836	12.34	0.9557
	308	-0.0785	-114.9	0.3173	10.25	1.1785	0.9845	11.53	0.9589
	313	-0.0452	-212.8	0.1966	10.35	1.0721	0.9811	11.20	0.9611

**Table 4** Thermodynamics parameters of stigmasterol adsorptions on SB-R and WB-R.

<i>T</i> (K)	SB-R			WB-R		
	$\Delta G$ (kJ/mol)	$\Delta H$ (kJ/mol)	$\Delta S$ (kJ/(mol K))	$\Delta G$ (kJ/mol)	$\Delta H$ (kJ/mol)	$\Delta S$ (kJ/(mol K))
298	-6.22			-6.20		
303	-5.65			-6.43		
308	-5.69	-24.97	-0.06	-5.85	-14.03	-0.03
313	-5.15			-5.97		

## **Molecular imprinted silica for the recovery of sterols synthesized by the acid-catalyzed sol-gel gelation method**

### **Abstract**

Molecular imprinted silica (MIS) was synthesized by the acid-catalyzed sol-gel gelation method using sterols as a template molecule. Tetraethyl orthosilicate (TEOS) was hydrolyzed and polymerized in the presence of sterols and HCl catalyst. The preliminary experiment show that the adsorption capacity of MISs was higher than nonimprinted silicas (NISs) when MISs and NISs were synthesized at pH of 0.6, 1.0, and 2.0. It suggested that the imprinted of sterols created additional pores in silica matrix. The highest imprinting-induced promotion of binding (IPB) value was obtained from MIS synthesized at pH 2.0. However, the results show that the sterols could not be desorbed from MIS and NIS synthesized at pH 2.0, and the highest percentage desorption of sterols was obtained from MIS and NIS synthesized at pH 0.6. Central composite design was used to determine the effect of three synthesis factors of MIS such as pH of sol-gel solution, temperature, and the sterols:tetraethyl orthosilicate molar ratio (S/TEOS). The response surface methodology was used to optimize the independent factor of MIS synthesis condition for percentage recovery of sterols. The results revealed that the pH of sol-gel solution and temperature were found to have significant effect on the sterols recovery, and pH of solution had the largest effect on the sterols recovery of MIS. The response surface model showed the highest percentage recovery of sterols was observed for MIS, which was synthesized at pH of sol-gel solution of 0.6, the temperature of 50 °C and the S/TEOS molar ratio of  $6.25 \times 10^{-3}$ .

**Keywords:** Sterols, Molecular imprinted silica, Sol-gel process, Adsorption, Desorption

### **1. Introduction**

Sterols have several beneficial bioactivities that can be decreased the risk of coronary heart disease and anti-cancer [1]. For this reason, it was employed as starting material in food, cosmetics and pharmaceutical industries [2]. Sterols are found in small amounts naturally in many vegetable oils. Over the past several decades, deodorizer distillate (DD) became one of the most important sources of sterols. DD is a by-product of deodorization. It is composed of free fatty acids (FFA), monoglycerides (MG), diglycerides (DG), triglycerides (TG) and small amount of some bioactive compounds [3].

Sterols have been successfully recovered from DD by two main methods. These methods were designed to remove undesired compounds (FFA and glycerides) from DD, followed by sterols separation. In one method, FFA in DD was saponified and then the resulting soap was removed from the mixture by simple solid-liquid separation. After that, sterols were separated from the resulting concentrate mixture by crystallization or vacuum distillation [4-6]. The other method, FFA and other glycerides were transformed to fatty acid alkyl ester (FAEE) by esterification and transesterification, respectively [7-10]. In the sterols preconcentration step, FAEE fraction was removed by either fractional liquid-liquid extraction or vacuum distillation to obtain high yield of sterols. And similar to the former method, crystallization was applied as the last step for sterols separation.

Brow and Smith [7] reported that a process including esterification, fractional liquid-liquid extraction and crystallization to separate sterols from soybean oil deodorizer distillate (SODD). FFA was transformed to fatty acid methyl ester (FAME) by esterification. After

that, fractional liquid-liquid extraction was applied to separate FAME, glycerides, and other compounds from resulting mixture, and they were presented in the raffinate fraction. The free sterols presented in the extract fraction were separated by crystallization in acetone at -20 °C, and total recovery of 73 % could be obtained in final product.

Moreira and Baltanás [8] proposed an alternative method for separation of sterols from fatty acid ethyl ester (FAEE) matrices by using vacuum distillation. Moreover, crystallization was performed in the purification of sterols, and they investigated effect of operating variables on purity and yield of sterols product. In this method, FFA and triglyceride in sunflower oil deodorizer distillate (SODD) were transformed to FAEE. After that, FAEE was removed from resulting mixture by vacuum distillation at 1.3 mbar and  $\leq 200$  °C. Crystallization of sterols in obtained preconcentrated mixture was performed by varying type of solvent (hexane single solvent, hexane with co-solvent), type of co-solvent (water, ethanol and both of them), mass ratio of solvent to preconcentrated mixture (3 to 5 mass ratio), cooling rate (-20 °C/h or brisk chilling from 40 to -5 °C), final ripening temperature (-20 to 0°C), and ripening time (4 to 96 h). By the using this method, sterols product with a recovery of 84 % and purity of 36 % was obtained by using hexane and 2.5 wt% of ethanol as a co-solvent, the solvent to preconcentrated mixture mass ratio of 4, cooling rate of 20 °C/h, final ripening temperature of -5 °C, and ripening time of 22 h. Wollmann et al. [9] described a process for the separation of sterols from soybean oil deodorizer distillate (SODD). In their process, FFA and glycerides in SODD were transformed to fatty acid methyl ester (FAME), and then FAME was removed by using vacuum distillation at 1.0 mbar and 180 °C. After that, the sterol esters concentrated in the residue of the distillation was transformed to free sterols by transesterification. Finally, sterols product with a purity of 93.9 % was obtained by crystallization at 15 °C.

Although these methods have been successfully applied to recover sterols from DDs, whereas the major problem of these methods was the high energy requirement. In general, vacuum distillation was operated at  $1 \times 10^{-3}$ -1.33 mbar and 140-300 °C to removed undesired compounds in the resulting mixture from chemical treatment [6, 8, 9, 11], and cold crystallization was used to separate sterols from the remaining mixture at low temperature between -20 to 15 °C [4, 8-10]. Therefore, the simple, efficient, and economical method should be developed to serve the growth of sterols demand.

Adsorption has been widely used to separate the minor compound from liquid or gas phase under mild condition. The important factor for the success of the recovery of sterols by adsorption is selectivity of the adsorbent towards sterols.

Molecular imprinted technique has been widely used to develop molecular recognition of adsorbent for the separation of target molecules present in liquid solution. This technique utilizes the interaction between functional monomer and template molecule employed in the polymerization, followed by the template removal from the obtained polymer matrix to create a template fitted cavities. Concerning the development of molecular imprinted materials with sterols as a template molecule, polymeric materials have been studied for more recent years.

Zhang et al. [12] synthesized a  $\beta$ -sitosterol magnetic molecularly imprinted polymer ( $\beta$ -sitosterol mag-MIP) using a suspension polymerization method through microwave heating. This method has many advantages, especially the shorter polymerization time as compared with conventional method. The results showed that the obtained  $\beta$ -sitosterol mag-MIPs have a higher adsorption capacity and the higher selectivity for  $\beta$ -sitosterol than that of magnetic non imprinted polymers (mag-NIPs).

Hashim et al. [13] reported the comparison of non-covalent and covalent imprinting methods for the synthesis of stigmasterol imprinted polymers (MIPs). The results revealed that MIPs synthesized by the non-covalent imprinting method showed the low stigmasterol

affinity and selectivity regardless. In contrast, the MIPs synthesized by covalent imprinting method demonstrated much higher stigmasterol selectivity and binding recognition. These results suggest that the covalent imprinting method has potential for the increased stability of the interaction between template and functional monomer during the formation of the binding site cavities.

Although molecular imprinted polymers demonstrated the high affinity and selectivity for the target molecule. However, polymeric materials have some disadvantage in the instability caused by pH of solution. Turner et al. [14] reported that the variation of pH of organic solvent had the effect on the swelling or shrinking of polymer, this result was a significant effect on the recognition properties of polymer. For this reason, the molecular imprinting based on silica is an interesting choice due to silica-based materials have a several advantages over polymer-based materials, such as chemical inertness, negligible swelling in organic solvents, and high phytochemical and thermal stability [15].

The sol-gel process is a commonly method for synthesis of molecular imprinted silica (MIS). In this process, the template molecule interacts with alkoxysilanes precursor in presence of acid or base catalyst and the template molecule was encapsulated in silica matrix. Then, the specific adsorptive sites are created after the removal of template molecule of the obtained silica matrix. There are many reports involve the use of sol-gel in producing molecular imprinted silica for selective recognition of steroid hormones. Fujiwara et al. [16] reported the synthesis of molecular imprinted silica by sol-gel method using acetic anhydride as the alternative to water. The result indicated that progesterone and other analogous compounds were well adsorbed by silicas synthesized in the presence of cholesterol in organic solution. In addition, the complicated processes that have been used to prepare the molecular imprinted silica to use as chemical sensor, biosensors, and tailor-made purification materials.

Hsu and Yang [17] reported the synthesis of cholesterol MIP from a hydrophobic monomer using covalent method. The monomer, (cholesteryl propylcarbamate) triethoxysilane (Cho-TEICPS) was prepared by the reaction of cholesterol with triethoxy(3-isocyanato-propyl)silane to provide the hydrophobic interactions of cholesterol binding. Cho-TEICPS was polymerized with tetraethyl orthosilicate (TEOS) in the presence of cholesterol with HCl or NH<sub>4</sub>OH catalyst. The results demonstrated that, the largest imprinting-induced promotion of binding value was obtained when cholesterol MIP synthesized with HCl = 0.01 M in sol-gel solution. In addition, it showed higher selectivity towards cholesterol in comparison with other steroid compounds.

Gupta and Kumar [18] fabricated a molecular imprinting of cholesterol (cholesterol MIP) using both non-hydrolytic and hydrolytic method for cholesterol recognition. The results showed that the percentage of adsorption was found to be higher for the cholesterol MIP synthesized by hydrolytic method using HCl catalyst with phenyltriethoxysilane (PhTEOS) as a functional monomer. The studies in literatures indicated that the acid-catalyzed sol-gel gelation method was an effective way that could produce a material with a higher surface area. According to the previous reports, this method was satisfactory in the synthesis of the pharmaceuticals imprinted silica [19, 20].

In this study reported the results on the application of the acid-catalyzed sol-gel gelation method for the synthesis of molecular imprinted silica with sterols as the template molecule. The effect of synthesis factors such as pH of sol-gel solution, temperature, and the template molecule (sterols):alkoxysilanes precursor (tetraethyl orthosilicate) molar ratio (S/TEOS) were studied simultaneously to obtain a high percentage recovery of sterols from model solution using central composite design.

## 2. Materials and method

## 2.1. Materials

Sterol mix was supplied from Acinopeptide Co., Ltd., (Chengdu, China, and composition analysis using a gas chromatograph with flame ionized detector (GC-FID) revealed that the sterol mix consisted campesterol (24%), stigmasterol (31%), and  $\beta$ -sitosterol (45%). Tetraethyl orthosilicate (TEOS) and cholesterol were supplied from Sigma-aldrich chemical Co., Ltd., (Milwaukee, USA). Hydrochloric acid 37% was supplied from Merck Ltd., (Darmstadt, Germany). Methanol, acetonitrile and water supplied from RCI Labscan Ltd., (Bangkok, Thailand) and acetic acid supplied from Merck Ltd., (Darmstadt, Germany) were HPLC grade and used without purification. Ethanol (AR grade) supplied from RCI Labscan Ltd., (Bangkok, Thailand). N-heptane (AR grade) supplied from Apex Chemicals Co., Ltd., (Bangkok, Thailand).

## 2.2. Preliminary molecular imprinted silica synthesis

In this study, molecular imprinted silica (MIS) synthesis method was adapted from the work reported by Morais et al. [19]. In order to represent the possibility of the synthesis of MIS using sterols as a template molecule, the preliminary MISs were prepared to employ in the sterols recovery process comparing with the non-imprinted silicas (NISs). Following the procedure for MISs synthesis, solution A was prepared by adding 0.14 mmol sterol mixture into 10 ml TEOS in a 25 ml Erlenmeyer flask. The S/TEOS molar ratio was  $3.2 \times 10^{-3}$ . The mixture was stirred vigorously to completely dissolve sterol mixture and form a homogeneous solution. Solution B was prepared by adding the desired amount of 37% hydrochloric acid into deionized water with different concentrations (0.02, 0.2 and 0.5 M). Solution B (10 ml) was added to solution A and mixed to sol-gel solution at ambient temperature for 96 h. The effect of pH of sol-gel solution was investigated. The pH of sol-gel solution was calculated according to Eq. (1).

$$\text{pH} = -\log(C_{\text{HCl}}) \quad (1)$$

Where  $C_{\text{HCl}}$  is the concentration of hydrochloric acid in the sol-gel solution. After 96 h, the silica xerogel was dried at ambient temperature for 48 h, and the obtained silica xerogel was ground by ceramic mortar. The template molecule was removed by solvent extraction using two steps procedure. The first step, 1 g of silica powder was shaken in 10 g of n-heptane at ambient temperature for 20 min. Then the sample was centrifuged at 4000 rpm for 10 min in order to remove n-heptane. This procedure was repeated 4 times, mixing extracted sample with fresh n-heptane. The second step, the similar procedure was performed using 1 g of the silica previously extracted and 10 g of ethanol.

To ensure that the template molecule was completely removed, the n-heptane and ethanol after template extraction were taken for analysis of sterols using a high performance liquid chromatography. Non imprinted silica (NIS) was prepared in a similar procedure without the addition of the template molecule.

## 2.3. The design of experiment for the synthesis of molecular imprinted silica

The design of experiment and statistical analysis of results were investigated using the software MINITAB (version 16.0). The central composite design (CCD) was used to design the experiment, and the response surface methodology (RSM) was used to optimize the independent factor of MIS synthesis condition for percentage recovery of sterols. The independent factors were pH (A), temperature (B), and S/TEOS molar ratio (C) as shown in Table 1. The CCD used an alpha value of 2.0 including to the factorial, axial, and center points for each independent factors were showed in Table 2. The percentage recovery of sterols was selected as the response factor, and the relationship between response factor and independent factors were approximated by quadratic model equation. The quality of fitted quadratic model was express by coefficient of determination ( $R^2$ ), and the terms of model were selected based on the p-value with 95% confidence. The statistical of fitted quadratic

model was analyzed by analysis of variance (ANOVA). The optimum condition for MIS synthesis was estimated using the response optimizing function of the software MINITAB 16.0.

#### 2.4. Adsorption and desorption experiments

The adsorption experiment was carried out in n-heptane solution containing sterol mixture at concentration 4.0 mg/g-solution as a model solution. In all tests, 2.5 g of model solution was mixed with 0.133 g of adsorbent (MIS or NIS) and then the mixture was shaken at 200 rpm and 30 °C for 10 h. At the end of adsorption, adsorbent was separated from solution by filtration and the concentration of sterols in liquid phase was analyzed by HPLC. The adsorbent separated from solution was dried at room temperature.

In the desorption experiment, the dried adsorbent was mixed with ethanol with the ratio of adsorbent to ethanol of 10 g-ethanol/g-adsorbent. The mixture was then shaken in the orbital shaker at 200 rpm, 60 °C for 2 h. After 2 h of desorption, samples were taken and heated to 60 °C for 3 h to evaporate ethanol. The mixture obtained after ethanol evaporation were used for analysis of sterols.

#### 2.5. Analytical method

Concentration of sterol mixture was measured using a high performance liquid chromatograph (HPLC) connected with a UV detector. An injection valve with a 20 µl of sample loop was used to introduce a sample into the HPLC. Peak separation was achieved using a reverse-phase column (Inertsil C8-3; 5µm particle diameter, 250 mm length, 4.6 mm i.d., GL Sciences Inc, Japan). Conditions and mobile phase were adapted from the work reported by Chang et al. [21]. The measurement condition was at absorbance of 210 nm, and mobile phase was a mixture of acetonitrile (85%), methanol (5%), and water containing 1% of acetic acid (10%). Flow rate of the mobile phase was 1.3 ml/min.

Cholesterol in methanol (4.0 mg/g-solution) was used as an internal standard (ISTD) in the quantification of sterol mixture. The quantification of sterol mixture in both of adsorbed and desorbed samples, n-heptane or ethanol were evaporated from the 100 µl of samples in the first step and methanol (800µl) was added into the vial as a solvent. The sample was shaken at 200 rpm for 1 h, and then 200 µl of ISTD was added. 100 µl of the prepared solution was injected into the HPLC through the injection valve.

#### 2.6. Evaluation of adsorption and desorption properties of adsorbents

The adsorption performance of adsorbent was evaluated from the adsorption capacity at equilibrium ( $q_e$ ) followed by Eq (2), and the percentage adsorption of sterols (% Ad) was calculated according to Eq. (3).

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e)W_{sol}}{W_{ads}} \quad (2)$$

$$\%Ad = \left( \frac{C_0 - C_e}{C_0} \right) \times 100 \quad (3)$$

Where  $C_0$  and  $C_e$  (µmol/g-solution) are liquid-phase concentration of sterol at initial and at equilibrium, respectively.  $W_{sol}$  is the weight of the solution (g) and  $W_{ads}$  is the weight of adsorbent used (g).

In addition, the molecular imprinting effect can be evaluated in terms of the imprinting-induced promotion of binding (IPB) [22]. The IPB value is calculated by Eq. (4).

$$IPB = \frac{(q_{e,MIS} - q_{e,NIS})}{q_{e,NIS}} \quad (4)$$

Where  $q_{e,MIS}$  and  $q_{e,NIS}$  (µmol/g-adsorbent) are the adsorption capacity of MIS and NIS, respectively.

The desorption performance of adsorbent was evaluated from the percentage desorption of sterols (% *De*) followed by Eq (5). The percentage recovery of sterols (% *Re*) was quantified according to the following Eq (6).

$$\%De = \left( \frac{W_{st,de}}{W_{st,ad}} \right) \times 100 \quad (5)$$

$$\%Re = \left( \frac{W_{st,de}}{W_t} \right) \times 100 \quad (6)$$

Where  $W_{st,ad}$  and  $W_{st,de}$  (mg) are the weight of sterols adsorbed and desorbed, respectively.  $W_t$  is the total weight of sterols in the model solution (mg).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. The recovery of sterols using molecular imprinted silica

Sterol consists of a rigid steroid skeleton part and a long alkyl chain part. The steroid skeleton part was expected to imprint in the silica matrix during the sol-gel process. And after the removal of sterols by solvent extraction, the specific pores in silica matrix will be created. Before starting the design of experiment for optimization, the preliminary molecular imprinted silica (MIS) synthesis was performed to reveal the possibility of the synthesis of MIS using sterols as a template molecule. The effect of pH of sol-gel solution on the performance of MIS and non-imprinted silica (NIS) were investigated. Fig. 1 shows the adsorption capacity of MISs and NISs, synthesized under various pH of sol-gel solution. The results showed the adsorption capacities of MISs were higher than NISs for all conditions. It suggested that the imprinted of sterols created additional pores in silica matrix. The adsorption capacity of MIS synthesized at low pH value was higher than that a high pH value. However, the imprinting-induced promotion of binding (IPB) for MIS synthesized at high pH value was higher than that at low pH value. The result showed that the MIS synthesized at pH 2.0 had the maximum IPB (0.70). It indicated that the MIS had molecular recognition capability. The IPB decreased when the pH of soli-gel solution was increased, this result indicated that low imprinting effect due to increasing of the porosity network in silica matrix. The resemblance of the adsorption capacity of MIS and NIS synthesized at pH 0.6 were probably due to the point that the large portion of non-specific adsorption was occurred in silica matrix [17]. Table 3 shows the percentage adsorption, the percentage desorption and the percentage recovery of sterols by MISs and NISs, synthesized under various pH of sol-gel solution. The results show the percentage adsorption of MISs was higher than NISs for all conditions, and the MIS synthesized at pH 0.6 had the maximum percentage adsorption of sterols (89.20%). Considering the percentage desorption of sterols of MISs and NISs, the results show that the sterols could not be desorbed from the MIS and NIS synthesized at pH 2.0. Meanwhile, the MIS and NIS synthesized at pH 1.0 were shown the percentage desorption of sterols at 73.27 and 52.77 %, respectively and the percentage desorption of sterols increased when the pH was 0.6 especially, in the case of NIS. In addition, they gave a high percentage recovery of sterols. The results showed more than 67% of percentage recovery of sterols was obtained by the MIS and NIS synthesized at pH 0.6.

For both the MIS and NIS synthesized at pH 2.0, they were very small adsorption capacity, and sterols were unable to desorb from these materials. It is possible that the small pore volume in these materials was formed at the pH reached the point of zero charge (PZC) of silica (pH ~2) [23]. At the pH lower than the PZC, this may give the larger pore volume in the materials, as indicated by the increase of adsorption capacity and desorption of sterols of MISs and NISs synthesized at pH lower than 2.0.

#### 3.2. Effect of synthesis factors on performance of on molecularly imprinted silica

The preliminary experiment was shown that the possibility of the synthesis of MIS using sterols as a template molecule by acid-catalyzed sol-gel gelation method. And the influence of pH of sol-gel solution on the performance of MISs was investigated. In this part, the effect of synthesis factors such as pH of sol-gel solution, temperature, and the S/TEOS molar ratio were studied simultaneously to reveal the impact of factor change on performance of MISs synthesized under various conditions.

Fig. 2 shows a comparison of the percentage adsorption and percentage desorption of sterols by MISs synthesized under various conditions. Considering the effect of pH of sol-gel solution, the condition number of 9, 10, 15, 16, and 17 were chosen. These MISs were synthesized with a similar temperature (37.5 °C) and S/TEOS ( $3.24 \times 10^{-3}$ ). The condition number 9 synthesized at pH 0.6 was shown highest percentage adsorption of sterols and has highest adsorption capacity at 175.85  $\mu\text{mol/g-adsorbent}$  as shown in Fig.3. In addition, it was provided the high sterols desorbed that resulted in the high recovery of sterols. On the other hand, the condition number 10 synthesized at pH 2.0 was showed lowest percentage adsorption of sterols, and sterols desorption was not found. It accorded with the results in section 3.1.. The condition number of 11, 12, 15, 16, and 17 synthesized at a similar pH (1.3) and the S/TEOS molar ratio ( $3.24 \times 10^{-3}$ ) were chosen to investigate the effect of temperature. The result showed that the condition number 12 synthesized at temperature 50 °C was shown highest percentage adsorption (adsorption capacity = 165.42  $\mu\text{mol/g-adsorbent}$ ) and the highest percentage desorption. Meanwhile, the condition number 11 synthesized at temperature 25 °C was shown lowest percentage adsorption and the lowest percentage desorption. The condition number of 13, 14, 15, 16, and 17 synthesized at a similar pH (1.3) and temperature (37.5 °C) were chosen to investigate the effect of S/TEOS. The result showed that the condition number 14 synthesized at high S/TEOS molar ratio ( $6.25 \times 10^{-3}$ ) was shown higher percentage adsorption. The result indicated that more template molecule gave a greater chance to create a lot of additional pores in silica matrix. In addition, it was showed highest percentage desorption.

### 3.3. Statistical analysis

The result of the percentage recovery of sterols from central composite design (CCD) was selected to statistical analysis in order to identify significant effect of factors on the percentage recovery of sterols by synthesized molecular imprinted silica (MIS). The CCD with three factors in three levels was shown in Table 2. An approximate regression model of the percentage recovery of sterols based on the experimental results was expressed by following equation:

$$\text{Recovery (\%)} = 91.70 - 63.74A - 1.16B + 5,228.84C + 11.71A^2 + 0.04B^2 + 1,324,892C^2 - 0.20AB - 3,549.74AC - 215.99BC \quad (7)$$

$$(R^2 = 90.32 \%, R^2(\text{adj}) = 77.78 \%)$$

where A, B, and C are corresponding coded factor of pH, temperature and S/TEOS molar ratio, respectively.

The regression coefficient, standard error, and *p*-value for Eq. (7) were shown in Table 4. It was found that the quadratic model fitted the experimental result with  $R^2$  of 90.32 %. This result indicated that the regression model had a satisfactory for prediction of the percentage recovery of sterols. In addition, the  $R^2(\text{adj})$  value was 77.78 %, indicating that the three factors could explain 77.78 % of the variation in the percentage recovery of sterols. The statistical testing of regression model was justified by the analysis of variance (ANOVA) as shown in Table 4. The *p*-value showed that the linear term of pH (A) and temperature (B) were significant (*p*-value < 0.05). Nevertheless, the linear term of S/TEOS molar ratio, quadratic term, and interaction term were insignificant (*p*-value > 0.05). Insignificant terms

were eliminated, and the significant terms were used in the regression model. However, the linear term of S/TEOS molar ratio and the interaction term between pH and temperature could not be eliminated from the regression model. Therefore, the regression model of the percentage recovery of sterols can be expressed by the following equation:

$$\text{Recovery (\%)} = 43.90 - 44.78A + 1.39B + 1,090.69C - 0.20AB \quad (8)$$

$$(R^2 = 86.93 \%, R^2(\text{adj}) = 82.58 \%)$$

The prediction values of the percentage recovery of sterols from Eq. (8) were also performed together with the experimental values in Table 2. The new regression model Eq. (8) showed the  $R^2$  value of 86.93 % and  $R^2(\text{adj})$  of 82.58 %. It indicated that the regression model was able to predict the percentage recovery of sterols. The fitted model was evaluated by ANOVA and shown in Table 5. The  $p$ -values indicated that the linear term of pH (A) and temperature (B) were significant, while the linear term of S/TEOS molar ratio (C) and the interaction term between pH and temperature were insignificant.

According to ANOVA, the normal-probability plot of residuals of the percentage recovery of sterols was shown in Fig. 4. The resulting plot was approximately along a straight line, indicating that the data is normally distributed. The plot of residuals versus fitted value was shown in Fig. 5. It shows that the points on the plot show no pattern or trend, indicating that the mean of the residual is zero. These results showed that the experimental data was distributed as well, and it can be inferred that the data had accuracy and reliability.

### 3.4. Main and interaction effects of factors on the percentage recovery of sterols

The main effect of the independent factors on the percentage recovery of sterols was shown in Fig. 6. The results showed that increasing of pH of sol-gel solution had a negative effect on sterols recovery. The percentage recovery of sterols was decreased when the pH increased. The present result indicated that the pH of sol-gel solution played an important role in the performance of synthesized MIS. As it has reported that the different amount of cholesterol adsorbed by the cholesterol-imprinted microporous silica synthesized under various catalytic conditions [17]. In addition, temperature is also an important synthesis parameter affecting on the sterols recovery. The results showed that increasing of temperature had a positive effect on sterols recovery. The percentage recovery of sterols was increased when the temperature increased. The effect of temperature could be explained by the increase of the porous texture of silica when the temperature was increased. The higher temperature encourages hydrolysis reaction, and results in the shorter gelation time in the sol-gel process. Therefore, the network structure of silica is less compact structure, and the larger pore is occurred [24]. It has significantly influenced on the quantity of adsorption and desorption of sterols. The S/TEOS molar ratio effect has shown a slight effect on the percentage recovery of sterols. The results showed that the increasing of S/TEOS molar ratio had a positive effect on the sterols recovery. The percentage recovery of sterols was increased with an increasing of the S/TEOS molar ratio.

According to the coefficient of Eq. (8), the response surface plot and contour plot of the percentage recovery of sterols as a function of pH of sol-gel solution and temperature were shown in Fig. 7a-b. It indicated that the pH of sol-gel solution had a large effect on the sterols recovery efficiency of MIS. The percentage recovery of sterols increased when decreasing of pH of sol-gel solution. The relationship between prediction and experimental values of the percentage recovery of sterols were shown in Fig 7a. It indicated that the prediction result of the percentage recovery of sterols was in good agreement with the experimental values. The contour plot (Fig. b) showed that the high percentage recovery of sterols was obtained when MIS was synthesized at a pH lower than 0.68 and temperature higher than 47 °C.

### 3.5. Optimization of MIS synthesis condition

The optimization of MIS synthesis condition can be evaluated by the percentage recovery of sterols. The three synthesis factors were optimized to determine the optimal condition. According to the obtained results, the percentage recovery of sterols increased when MIS was synthesized at low pH and high temperature. In addition, the high S/TEOS molar ratio led to increase the sterols recovery of MIS. Therefore, it was possible to suggest the optimal condition to be synthesis of MIS for using in sterols recovery process. The optimum condition of MIS synthesis was the pH of sol-gel solution of 0.6, the temperature of 50 °C and the S/TEOS molar ratio of  $6.25 \times 10^{-3}$ . According to the prediction result, the percentage recovery of sterols was obtained at the highest recovery as the criterion of target (100 %).

#### 4. Conclusions

Acid-catalyzed sol-gel processing was shown to be efficient for the production of molecular imprinted silica (MIS) using sterols as a template molecule. In analysis of response surface, the pH of sol-gel solution and temperature played an important role in the performance of synthesized MIS. The pH of solution was found to have the largest effect on the recovery of sterols of MIS. The response surface model showed the highest percentage recovery of sterols was observed for MIS, which was synthesized at pH of sol-gel solution of 0.6, the temperature of 50 °C and the S/TEOS molar ratio of  $6.25 \times 10^{-3}$ .

#### Acknowledgement

Financial supports from Thailand Research Fund (TRF) and King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL) under Royal Golden Jubilee Ph.D. program (PHD/0021/2555) is appreciatively acknowledged.

#### References

- [1] Moreau, R.A.; Whitaker, B.D.; Hicks, K.B., Phytosterols, Phytostanols, and Their Conjugates in Foods: Structural Diversity, Quantitative Analysis, and Health-Promoting Uses. *Prog. Lipid Res.*, 41 (2002) 457-500.
- [2] Fernandes, P.; Cabral, J.M.S., Phytosterols: Applications and Recovery Methods. *Biores. Technol.*, 98 (2007) 2335–2350.
- [3] Verleyen, T.; Verhe, R.; Garcia, L.; Dewettinck, K.; Huyghebaert, A.; Greyt, W. D., Gas Chromatographic Characterization of Vegetable Oil Deodorization Distillate. *J. Chromatogr. A*, 921 (2001) 277–285.
- [4] Khatoon, S.; Rajan, R. G. R.; Krishna, A. G. G., Physicochemical Characteristics and Composition of Indian Soybean Oil Deodorizer Distillate and the Recovery of Phytosterols. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 87 (2010) 321–326.
- [5] Yang, H.; Yan, F.; Wu, D.; Huo, M.; Li, J.; Cao, Y.; Jiang, Y., Recovery of Phytosterols from Waste Residue of Soybean Oil Deodorizer Distillate. *Bioresour. Technol.*, 101 (2010) 1471–1476.
- [6] Rohr, R., Process for Separation Unsaponifiable Valuable products from Raw materials. *US Patent* 2003/0120095 A1 (2003).
- [7] Brown, W.; Smith, F. E., Process for Separating Tocopherols and Sterols from Deodorizer Sludge and the Like. *US Patent* 3,153,055 (1964).
- [8] Moreira, E. A.; Baltanas, M. A., Recovery of Phytosterols from Sunflower Deodorizer Distillates. *JAACS.*, 81 (2004) 161-167.
- [9] Wollmann, G.; Schwarzer, J.; Gutsche, B., Processes for Producing Sterols Fatty Acid Production Residues. *US Patent* 6,956,125 B2, (2005).
- [10] Carmona, M.A.; Jiménez, C.; Sanchidrian, C. J.; Pena, F.; Ruiz, J. R., Isolation of Sterols from Sunflower Oil Deodorizer Distillate. *J. Food Eng.*, 101 (2010) 210–213.

- [11] Fizet, C., Process for Tocopherols and Sterols from Natural Sources. *US Patent* 5,487,817 (1996).
- [12] Zhang, Z.; Tan, W.; Hu, Y.; Li, G., Simultaneous Determination of Trace Sterols in Complicated Biological Samples by Gas Chromatography–Mass Spectrometry Coupled with Extraction Using  $\beta$ -Sitosterol Magnetic Molecularly Imprinted Polymer Beads. *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 4275– 4283.
- [13] Hashim, S.N.N.S.; Boysen, R.I.; Schwarz, L.J.; Danylec, B.; Hearn, M.T.W., A Comparison of Covalent and Non-Covalent Imprinting Strategies for the Synthesis of Stigmasterol Imprinted Polymers. *J. Chromatogr. A*, 1359 (2014) 35–43.
- [14] Turner, N.W.; Piletska, E.V.; Karim, K.; Whitcombe, M.; Malecha, M.; Magan, N.; Baggiani, C.; Piletsky, S.A. Effect of the Solvent on Recognition Properties of Molecularly Imprinted Polymer Specific for Ochratoxin A. *Biosens. Bioelectron.*, 20 (2004) 1060–1067.
- [15] Walcarius, A.; Collinson, M.M. Analytical Chemistry with Silica Sol-Gels: Traditional Routes to New Materials for Chemical Analysis. *Annu. Rev. Anal. Chem.*, 2 (2009) 121-143.
- [16] Fujiwara, M.; Nishiyama, M.; Yamamura, I.; Ohtsuki, S.; Nomura, R. A Sol-Gel Method Using Acetic Anhydride in the Presence of Cholesterol in Organic Solution Media: Preparation of Silicas That Recognize Steroid Hormones. *Anal. Chem.*, 76 (2004) 2374-2381.
- [17] Hsu, C.W.; Yang, M.C. Enhancement of the Imprinting Effect in Cholesterol-Imprinted Microporous Silica. *J. Non Cryst. Solids*, 354 (2008) 4037–4042.
- [18] Gupta, R.; Kumar, A. Synthesis and Characterization of Sol-Gel-Derived Molecular Imprinted Polymeric Materials for Cholesterol Recognition, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 58 (2011) 182–194.
- [19] Morais, E.C.; Correa, G.G.; Brambilla, R.; Dos Santos, J.H.Z.; Fisch, A.G. Selective Silica-Based Sorbent Materials Synthesized by Molecular Imprinting for Adsorption of Pharmaceuticals in Aqueous Matrices. *J. Sep. Sci.*, 36 (2013) 636–643.
- [20] Morais, E.C.; Brambilla, R.; Correa, G.G.; Dalmoro, V.; Dos Santos, J.H.Z. Imprinted Silicas for Paracetamol Preconcentration Prepared by the Sol–Gel Process. *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 83 (2017) 90–99.
- [21] Chang, C. J.; Chang, Y.F.; Lee, H.Z.; Lin, J.Q.; Yang, P.W. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of High-Value Substances from Soybean Oil Deodorizer Distillate, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 39 (2000) 4521-4525.
- [22] Lee, J.C.; Kim, C.R.; Byun, H.S. Synthesis and Adsorption Properties of Carbamazepine Imprinted Polymer by Dispersion Polymerization in Supercritical Carbon Dioxide. *Korean J. Chem. Eng.*, 31(12) (2014) 2266-2273.
- [23] Curran, M.D.; Stiegman, A.E. Morphology and Pore Structure of Silica Xerogels Made at Low pH. *J. Non-Cryst. Solids*, 249 (1999) 62-68.
- [24] Estella, J.; Echeverría J.C.; Laguna, M.; Garrido J.J. Silica xerogels of tailored porosity as support matrix for optical chemical sensors. Simultaneous effect of pH, ethanol:TEOS and water:TEOS molar ratios, and synthesis temperature on gelation time, and textural and structural properties. *J. Non-Cryst. Solids*, 353 (2007) 286–294.

Table 1. Factor levels in the central composite design.

Factors	Name	Low	High
A	pH	0.60	2.00
B	Temperature (°C)	25	50
C	S/TEOS molar ratio	$2.23 \times 10^{-4}$	$6.25 \times 10^{-3}$

Table 2. The experimental designs of central composite design (alpha value = 2.0).

Order	pH	T (°C)	S/TEOS	Recovery (%)	
				Experiments	Prediction
1	0.95	31.25	$1.73 \times 10^{-3}$	$45.12 \pm 0.75$	41.25
2	1.65	31.25	$1.73 \times 10^{-3}$	$7.11 \pm 0.57$	4.60
3	0.95	43.75	$1.73 \times 10^{-3}$	$56.11 \pm 0.93$	55.39
4	1.65	43.75	$1.73 \times 10^{-3}$	$17.68 \pm 0.45$	18.72
5	0.95	31.25	$4.74 \times 10^{-3}$	$53.65 \pm 1.16$	44.53
6	1.65	31.25	$4.74 \times 10^{-3}$	$9.51 \pm 0.73$	7.87
7	0.95	43.75	$4.74 \times 10^{-3}$	$57.86 \pm 0.69$	58.67
8	1.65	43.75	$4.74 \times 10^{-3}$	$10.58 \pm 0.28$	22.00
9	0.60	37.50	$3.24 \times 10^{-3}$	$62.74 \pm 1.40$	68.29
10	2.00	37.50	$3.24 \times 10^{-3}$	$0.00 \pm 0.00$	-5.04
11	1.30	25.00	$3.24 \times 10^{-3}$	$10.85 \pm 0.80$	17.49
12	1.30	50.00	$3.24 \times 10^{-3}$	$53.98 \pm 10.23$	45.76
13	1.30	37.50	$2.23 \times 10^{-4}$	$32.49 \pm 2.62$	28.34
14	1.30	37.50	$6.25 \times 10^{-3}$	$42.84 \pm 1.46$	34.91
15	1.30	37.50	$3.24 \times 10^{-3}$	$33.93 \pm 3.92$	31.62
16	1.30	37.50	$3.24 \times 10^{-3}$	$32.60 \pm 0.75$	31.62
17	1.30	37.50	$3.24 \times 10^{-3}$	$10.59 \pm 0.98$	31.62

Table 3. The percentage adsorption, the percentage desorption and the percentage recovery of sterols by MISs and NISs, synthesized under various pH of sol-gel solution.

pH condition	Type of adsorbent	% Adsorption	% Desorption	% Recovery
0.6	NIS	86.88 ± 0.56	77.19 ± 0.70	67.07 ± 1.04
	MIS	89.20 ± 1.01	78.31 ± 2.59	69.89 ± 3.10
1.0	NIS	58.22 ± 0.86	52.77 ± 1.20	30.73 ± 1.15
	MIS	82.31 ± 0.80	73.27 ± 0.20	60.31 ± 0.75
2.0	NIS	12.30 ± 2.13	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	MIS	21.70 ± 2.44	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

Table 4. The estimated response surface coefficients for the percentage recovery of sterols by MIS.

Terms	Coefficient	S.E. coefficient	<i>p</i> -value
Constant	91.70	5.488	0.002
pH (A)	-63.74	2.487	0.000
Temperature (B)	-1.16	2.487	0.025
S/TEOS (C)	5,228.84	2.487	0.530
A × A	11.71	2.260	0.546
B × B	0.04	2.260	0.546
C × C	1,324,892.00	2.260	0.225
A × B	-0.20	3.517	0.903
A × C	-3,549.74	3.517	0.611
B × C	-215.99	3.517	0.581

Table 5. The estimated response surface coefficients for new model equation of the percentage recovery of sterols by MIS.

Terms	Coefficient	S.E. coefficient	<i>p</i> -value
Constant	43.905	2.141	0.000
pH (A)	-44.785	2.207	0.000
Temperature (B)	1.394	2.207	0.008
S/TEOS (C)	1,090.69	2.207	0.471
A × B	-0.203	3.121	0.889



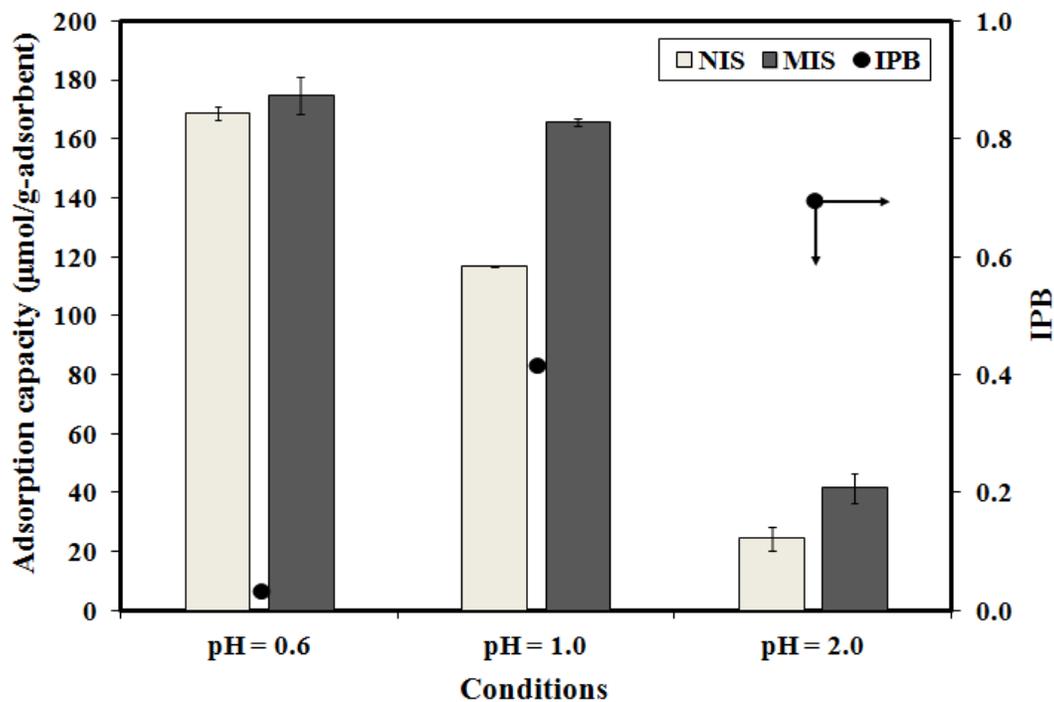


Fig. 1. A comparison of the adsorption capacity and the imprinting induced promotion of binding (IPB) by the molecular imprinted silica (MIS) and the non-imprinted silica (NIS) synthesized under various pH of sol-gel solution.

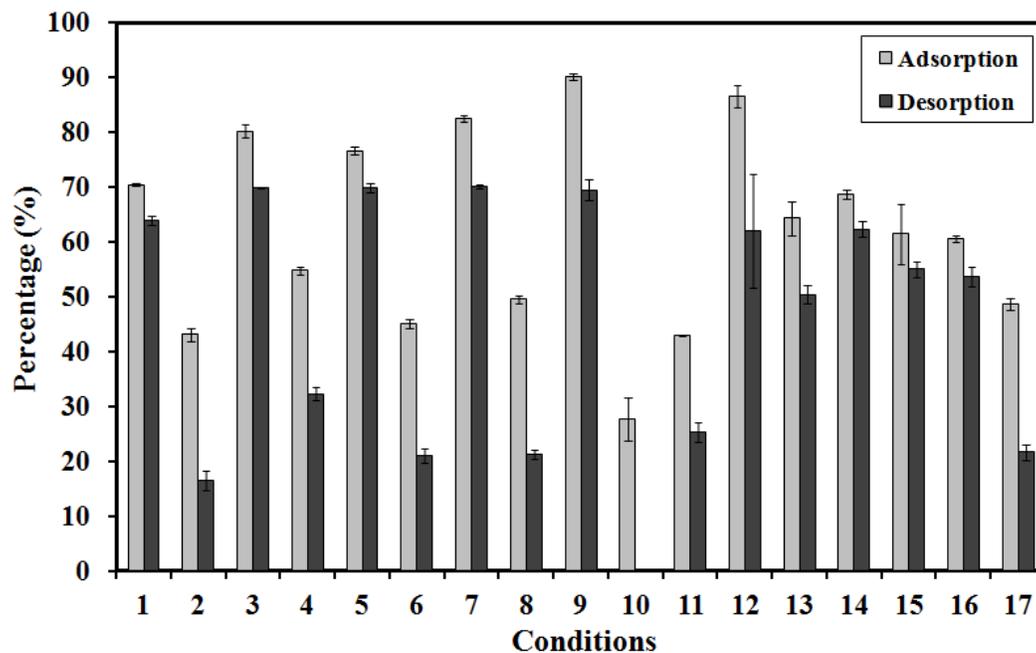


Fig. 2. A comparison of the percentage adsorption and percentage desorption of sterols by MISs synthesized under various conditions.

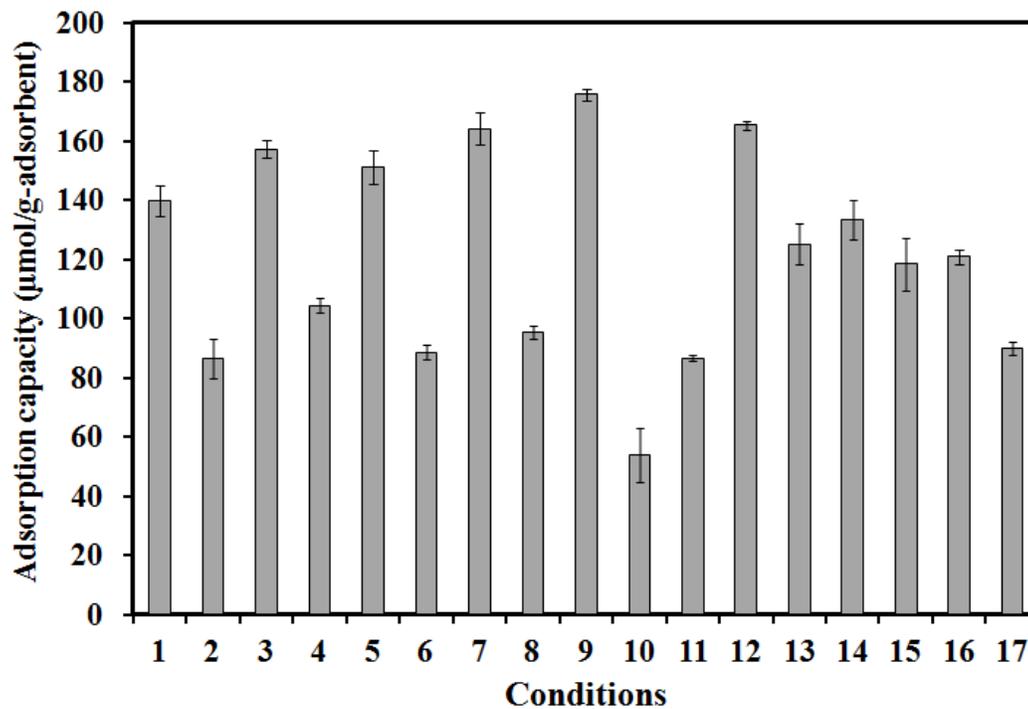


Fig.3. Adsorption capacity of MISs synthesized under various conditions.

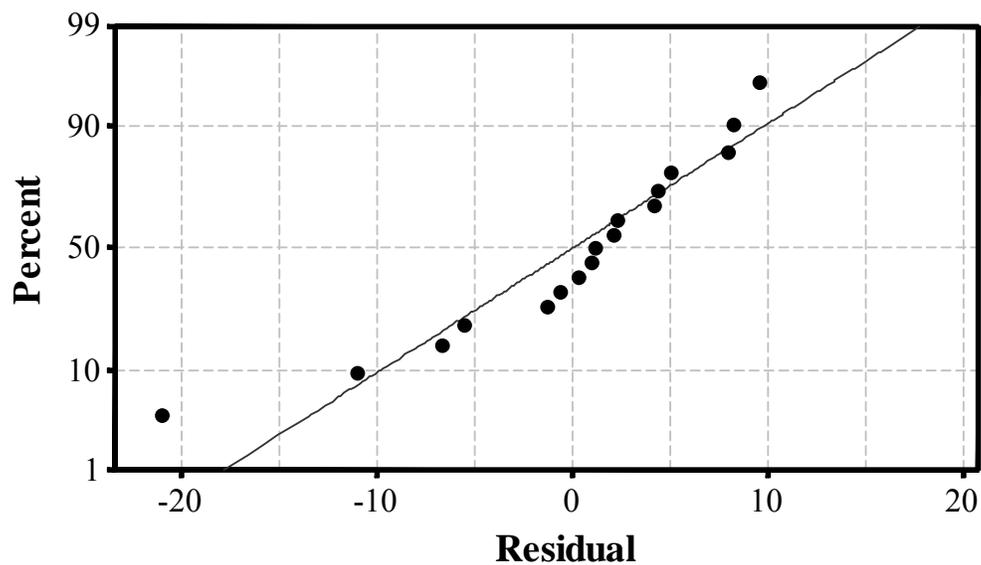


Fig.4. Normal probability plot of residuals (response is the percentage recovery of sterols).

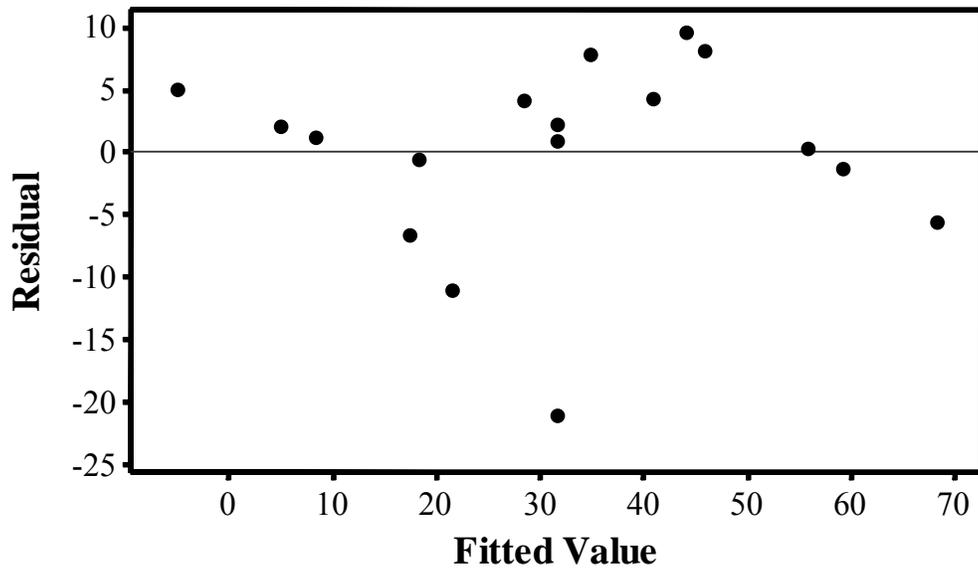


Fig.5. Plot of residuals versus fitted value (response is the percentage recovery of sterols).

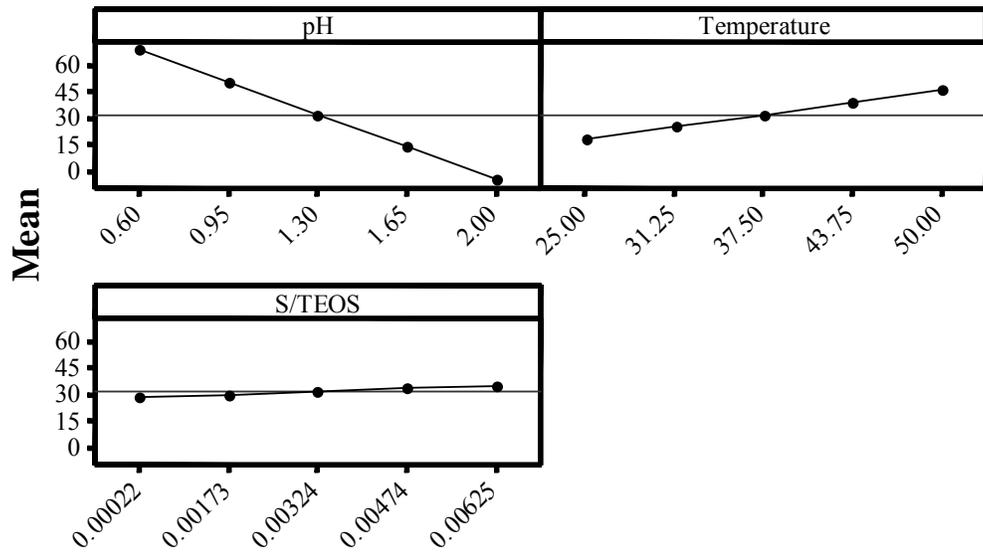


Fig.6. The main effect plot for the percentage recovery of sterols.

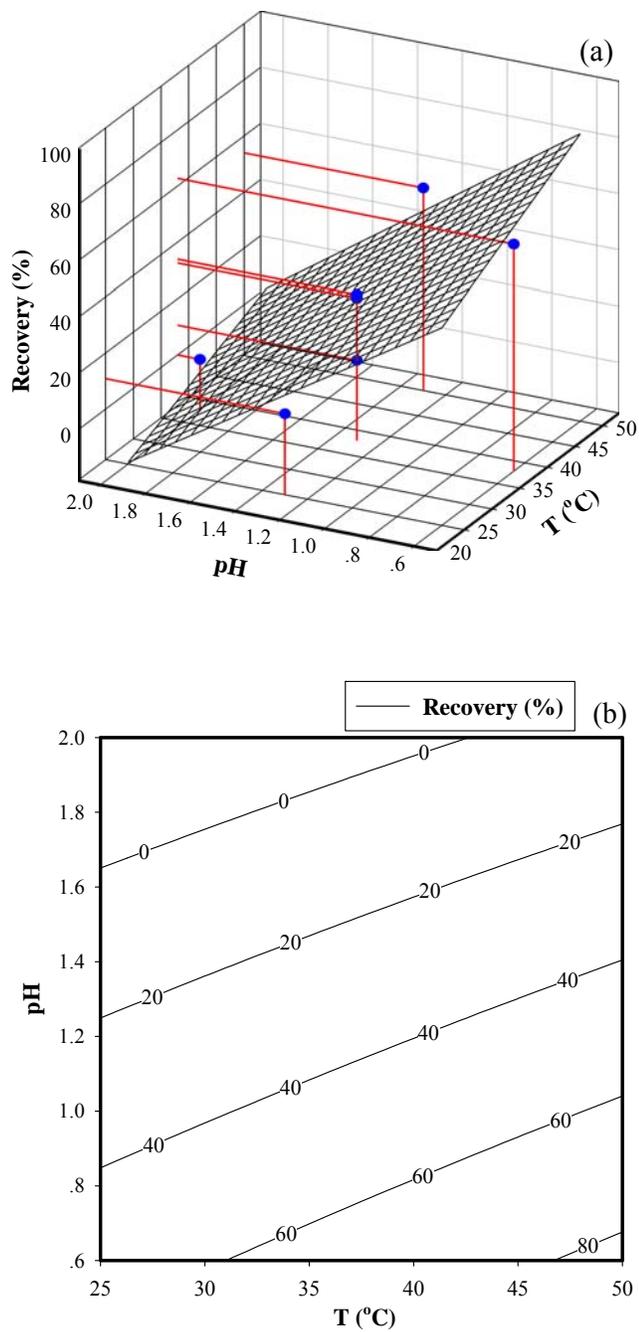


Fig.7. Three-dimensional response surface plot (a) and contour plot (b) of the percentage recovery of sterols as a function of temperature and pH comparing with the experimental data at S/TEOS molar ratio constant =  $3.24 \times 10^{-3}$ .

บทความวิชาการลำดับที่ 6.2.1.

## **Synthesis and Characterizations of Molecularly Imprinted Polymer for Sterol Separation**

Duangkamol Na-Ranong\*, Nattawat Nonthanasin, Krittin Binabdullah  
Faculty of Engineering, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang,  
1, Chalongkrung 1, Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

\*Corresponding author: dnaranong@hotmail.com, knduangk@kmitl.ac.th

### **Abstract**

Molecular imprinted polymer (MIP) was prepared by bulk polymerization using 2-(trifluoromethyl)acrylic acid as a functional monomer, trimethylolpropane trimethacrylate as a crosslinker, stigmasterol as a template, benzoyl peroxide as an initiator and acetone as solvent. Different MIPs were synthesized by varying ratios of crosslinker, template and solvent to functional monomer according to Central Composite Design method, in the ranges of 0.5 – 1.5 : 1.0 (mmol : mmol), 0.1 – 0.1375 : 1.0 (mmol : mmol) and 10 – 20 : 1 mmol : ml, respectively. For comparison, a nonimprinted polymer (NIP) was also synthesized by the same procedure under the standard condition without adding template. Properties of the obtained MIPs were characterized by SEM, FT-IR and BET techniques. Adsorption of phytosterols in heptane was performed to investigate the efficiency of each MIP and NIP. Statistical analysis revealed that the amounts of crosslinker and template strongly affected the performance of MIP whereas the amount of solvent slightly affected the performance of MIP. Optimal condition for the synthesis of MIP was monomer : crosslinker : template : solvent = 1 mmol : 0.5 mmol : 0.1 mmol : 12.5 ml. The MIP synthesized at the optimal condition had phytosterol adsorption capacity about 1.31 times 1.13 times of NIP.

**Keyword:** Molecularly Imprinting Polymer, Adsorption, Sterol Separation

### **1. Introduction**

Phytosterols have several biological activities including cholesterol lowering effect, anti-inflammatory, anti-atherogenicity, anti-cancer and anti-oxidation. Application of phytosterols in pharmaceutical, food and cosmetics industries is therefore promising [1]. Phytosterols are a group of several sterols with similar structures and present as minor contaminants in natural resources. Several processes including chemical transformation and physical separation steps have been developed mainly to recover phytosterols from soybean oil fatty acid distillate and tall oil [2]. However, these processes usually include the step with high energy consumption such as molecular distillation, crystallization, recovery of solvent from the solvent extraction and supercritical fluid extraction. It is necessary to develop the more environmental friendly and energy saving process for recovering phytosterols from natural resources.

Adsorption is widely applied in an industrial process to separate minor contaminants from liquid and gas. One of the key factors for the success of separation by adsorption is selectivity of the adsorbent towards the desired component. Molecularly imprinted polymers have been applied in various fields requiring high selectivity to particular molecules such as biosensor development, chromatography and catalysis [3-4].

Since fatty acid distillates, by-product from vegetable oil refinery process, consist of several fatty acids, glycerides and other contaminants [2], recovery of phytosterols is impossible by application of non-selective adsorbent. In the present work, molecularly imprinted polymers (MIPs) were synthesized by bulk polymerization of acrylamide functional monomer and ethylene glycol dimethacrylate crosslinker using stigmasterol as a template under various conditions. Amounts of crosslinker, template and solvent were varied as synthesis parameters. Performance of the obtained MIP in sterol adsorption was investigated using a model solution of phytosterols in heptane and compared with a non-imprinted polymer (NIP).

## 2. Experimental

### 2.1 Synthesis of Molecularly Imprinted Polymers

2-(trifluoromethyl)acrylic acid (monomer), trimethylolpropane trimethacrylate (crosslinker), stigmasterol (template), benzoyl peroxide (initiator) and acetone (solvent) were mixed in a glass bottle. Nitrogen gas was purged through the solution to remove oxygen. The solution was shaken in an orbital shaker at 220 rpm. After 1 h of prepolymerization, the temperature in the shaker was raised to 60 °C and the polymerization was allowed to proceed at this condition for 24 h. The obtained solid was washed with distilled water to remove all unreacted reagents. To extract the template from the obtained solid, a solution consisting of acetonitrile (85 vol%), water (9.9 vol%), methanol (5 vol%) and acetic acid (0.1 vol%) was used. To ensure that all the unreacted reagents and the template were completely removed from MIP, the obtained MIP was stirred in heptane for 3 h and the heptane solution was taken for analysis of these contaminants using a gas chromatograph with flame ionized detector (GC-2010plus; Shimadzu).

Different MIPs were prepared by varying ratios of crosslinker, template and solvent to functional monomer in the ranges of 0.5:1 to 1.5:1 (mol:mol), 0.1:1 to 0.1375:1 (mol:mol) and 10:1 to 20:1 (l:mol), respectively. Amount of benzoyl peroxide was fixed at 0.32 per mole of monomer. Conditions for MIPs synthesis were determined according to Central Composite Design method (CCD). For further discussion, MIP synthesized using monomer:crosslinker:template:solvent ratio of 1:3:0.2:6 was named as “MIP-STD”. The solid sample obtained under this condition before extraction of template was named as “T-MIP-STD”. Nonimprinted polymer (NIP) was prepared using this ratio by the same procedure without addition of stigmasterol template.

### 2.2 Characterization of Molecularly Imprinted Polymers

SEM images were taken to observe morphology of the samples using EVO<sup>®</sup>MA10 (ZEISS). Fourier transform infrared spectra were measured using IRPrestige-21 (Shimadzu, Japan) equipped with MIRacle ATR (PIKE Technologies, Inc.) with a resolution of 4 cm<sup>-1</sup>.

### 2.3 Adsorption

Model solution was prepared from sterol mixed, containing campesterol (23.6 wt%), stigmasterol (28.2 wt%) and  $\beta$ -sitosterol (48.2 wt%), and heptane. Concentration of total sterols was 140 ppm. 20 ml of the prepared model solution was mixed with 1 wt% of MIP or NIP and then shaken at 220 rpm, 30 °C for 6 h. Samples (c.a. 0.1 g) before and after adsorption were taken for analysis of campe-, stigma- and  $\beta$ -sitosterol using GC-FID. Performance of the adsorbent was evaluated from adsorption capacity ( $g_{sterols}/g_{ads}$ ) and selectivity ( $S_i$ ) calculated based on stigmasterol by using Eq. (1).

$$S_i = \left( \frac{W_{i,0} - W_i}{W_{i,0}} \right) \left( \frac{W_{\text{stigma},0}}{W_{\text{stigma},0} - W_{\text{stigma}}} \right) \quad (1)$$

$W_{i,0}$  and  $W_i$  represent weight of species “i” in the model solution at  $t=0$  and 6 h, respectively. Species “i” means campesterol, stigmasterol or  $\beta$ -sitosterol.

### 3. Results and discussion

#### 3.1 Polymer Characterization

All the synthesized MIPs and NIP were white fine powder and were not dissolved in water or heptanes. Figure 1(a) and 1(b) show SEM images of typical MIP with the magnifications of 500 and 20,000, respectively. SEM images reveal that most of the particles had the size smaller than 100  $\mu\text{m}$  and the surface of MIP was not uniformed. Pores with the diameter less than 1  $\mu\text{m}$  and cavities with the size in the order of 2 $\mu\text{m}$  or larger are observed. Since no large cavity was observed in NIP, these cavities in MIP should be formed after extraction of template molecules.

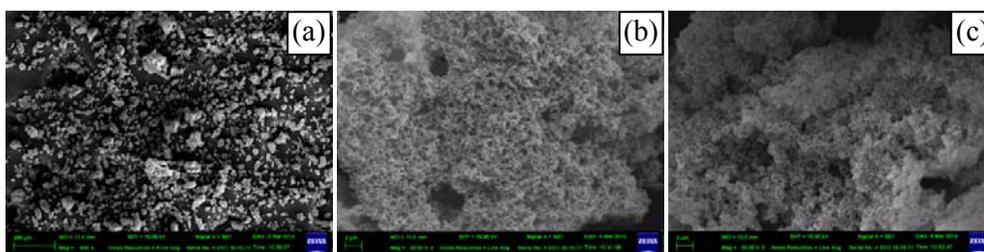


Fig. 1 Typical SEM images of (a) MIP-STD  $\times 500$ , (b) MIP-STD  $\times 20,000$  and (c) NIP  $\times 20,000$ .

Figure 2 shows FT-IR spectra of NIP and T-MIP-STD. Identification of absorbed peaks was performed by comparing with literature [5, 6]. Characteristics of both spectra were similar. Both spectra had small broad peaks of N-H vibrations around 3460  $\text{cm}^{-1}$ , small sharp peak of C-H vibration at 2960  $\text{cm}^{-1}$ , large sharp peak of C=O at 1730  $\text{cm}^{-1}$  and peak of C-N vibration at 1400  $\text{cm}^{-1}$ . No peak attributed to C=C group, indicating acrylamide and EGDMA was observed. These results indicated that NIP and T-MIP-STD had almost the same chemical structures and no unreacted monomer and crosslinker was found in NIP and T-MIP-STD. However, the relative intensity of C-H peak to other peaks in the spectrum of NIP was less than the relative intensity observed in the spectrum of T-MIP-STD. This result indicated existing of stigmasterol, containing C-H bond, in T-MIP-STD.

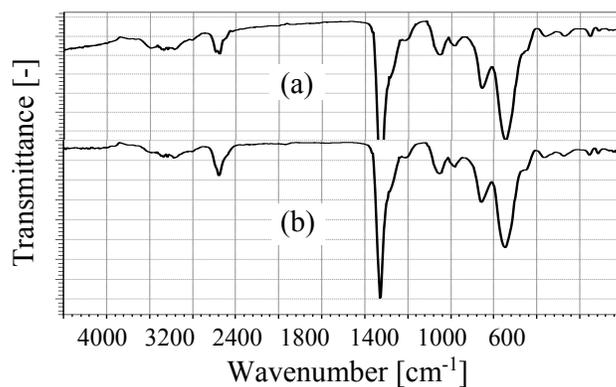


Figure 2 FT-IR spectra of (a) NIP-STD and (b) T-MIP-STD.

### 3.2 Performance of Phytosterols Adsorption

Adsorption experiment revealed that all the prepared MIPs adsorbed campe-, stigma- and  $\beta$ -sitosterol with almost the same percentage of the original amounts presenting in the model solution;  $S_{\text{campesterol}} \approx S_{\beta\text{-sitosterol}} \approx 1$ . No specific selectivity to stigmasterol adsorption should be a result of very similar molecular structures of these sterols. This result should be considered as the possibility of applying MIP in recovery of all types of sterol from fatty acid distillates. Therefore, adsorption capacity was calculated from total amount of campesterol, stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol adsorbed on the adsorbents.

The relation between adsorption capacity and the amounts of crosslinker, template and solvent obtained from statistical analysis revealed that the amounts of crosslinker and template used in the preparation of MIP strongly affected the performance of the obtained MIPs. Increase in the amount of crosslinker resulted in higher adsorption capacity. As for the amount of template, increase in the amount of template from 0.1 to 0.2 mmol resulted in decreasing the adsorption capacity while further increase of the amount of template from 0.2 to 0.3 mmol resulted in improving the performance of MIP in sterol adsorption. In addition, effect of the amount of solvent on the performance of MIP in sterol adsorption was insignificant. Increase in the amount of solvent slightly increased adsorption capacity of MIP. According to response analysis, the optimal amounts of crosslinker, template and solvent were 3.5 mmol, 0.3 mmol and 7 ml, respectively. In addition, the MIP synthesized under this optimized condition had adsorption capacity of 1.28 mg<sub>sterols</sub>/g<sub>ads</sub> or 1.13 times of NIP.

### Acknowledgement

The authors would like to acknowledge financial support from National Research Council of Thailand.

### References

- [1] Fernandes P, Cabral, J M S. Phytosterols: applications and recovery methods. *Bioresour. Technol.*, 2007, 98: 2335–2350.
- [2] Dumont M-J, Narine S S. Soapstock and deodorizer distillates from North American vegetable oils: Review on their characterization, extraction and utilization. *Food Res. Int.*, 2007, 40: 957–974.
- [3] Turiel E, Martín-Esteban A. Molecularly imprinted polymers for sample preparation: A review. *Analytica Chimica Acta*, 2010, 668: 87–99.
- [4] Ramström O, Ansell R J. Molecular imprinting technology: Challenges and prospects for the future. *Chirality*, 1998, 10: 195–209.
- [5] Jin Y-F, Zhang Y-J, Zhang Y-P, Chen J, Zhou X-M, Bai L-Y. Synthesis and evaluation of molecularly imprinted polymer for the determination of the phthalate esters in the bottled beverages by HPLC. *J. Chem.*, 2013, 2013: 1-9.
- [6] Zakaria N D, Yusof A, Haron J and Abdullah A H. Synthesis and evaluation of a molecularly imprinted polymer for 2,4-Dinitrophenol. *Int. J. Mol. Sci.*, 2009, 10: 354-365.



OCTOBER 19-22, 2014  
6th Asia-Pacific  
Engineering Conference

\*dnaranong@hotmail.com, knduangk@kmitl.ac.th; King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMUTL), 1, Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

# SYNTHESIS AND CHARACTERIZATIONS OF MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER FOR STEROL SEPARATION

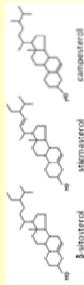
\*Duangkamol Na-Ranong, Nattawat Nonhanasin and Krittin Binabulillah

\*Duangkamol Na-Ranong, Nattawat Nonhanasin and Krittin Binabulillah



## INTRODUCTION

Phytosterols and their applications:



Biological activities: cholesterol lowering effect, anti-inflammatory, anti-atherogenicity, anti-cancer and anti-oxidation

Conventional methods to recover phytosterols:

- Sources: Fatty acid distillate from soybean oil refinery, Tall oil
  - Processes: Chemical transformation and/or physical separation (molecular distillation, crystallization, solvent extraction, supercritical fluid extraction)
- Disadvantage:** High energy consumption, Energy saving & Environmental friendly process is required.

Idea for developing the new technique:

Adsorption using a molecularly imprinted polymer that has high selectivity towards phytosterols should be a promising technique to separate phytosterols from fatty acid distillates or tall oils.

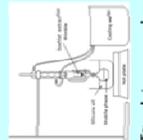
## OBJECTIVES

- To synthesize a molecularly imprinted polymer (MIP) by bulk polymerization using 2-(trifluoromethyl)acrylic acid as a functional monomer, trimethylolpropane trimethacrylate as a crosslinker and stigmasterol as a template in acetone.
- To investigate effect of synthesis parameters (the ratios of crosslinker, template and solvent to functional monomer) on performance of the obtained MIP in sterol adsorption.

## METHODOLOGY

Polymer synthesis:

- Bulk polymerization in acetone
- Polymerization time = 24 hr, T = 60 °C



- Template removal: Washing with a mixture of acetonitrile, methanol, water and acetic acid

Characterization of polymers:

- Physical properties
- Scanning Electron Microscope
- Nitrogen adsorption-desorption Isotherm
- Functional groups
- Fourier Transform-infrared Spectroscopy
- Sterol binding efficiency
- Batch adsorption

Batch adsorption:

- Model solution: Mixture of sterols in n-heptane
- Conditions: T = 30 °C, t = 6 h, W<sub>sd</sub> = 1 %, C<sub>so</sub> = 200 ppm
- Performance evaluation:
  - Selectivity towards adsorption of each sterol

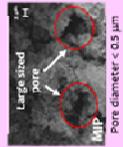
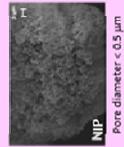
$$S_i = \frac{(W_{i,s} - W_i)}{(W_{i,s} - W_i)_{\text{template}}} \times 100$$

- Adsorption amount of each sterol adsorption capacity (q<sub>i</sub>)

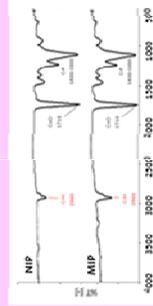
$$\%Ad_i = \frac{W_{i,s} - W_i}{W_{i,s} - W_i} \times 100$$

Polymer characterizations:

SEM images



FT-IR spectrum:

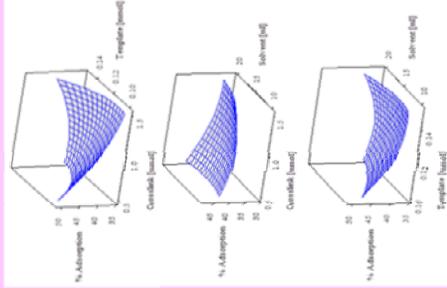


Adsorption efficiencies of MIPs comparing with NIP



## RESULTS & DISCUSSION

Effect of synthesis parameters on %Ad:



## CONCLUSIONS

- Molecularly imprinted polymer for sterol adsorption was successfully synthesized via bulk polymerization method.
- Response analysis showed that the optimum ratio for MIP synthesis was: monomer : crosslinker : template : solvent = 1 mmol : 0.5 mmol : 0.1 mmol : 12.5 ml.
- The MIP synthesized at the optimal condition had phytosterol adsorption capacity of about 1.31 times of NIP.

Financial supports from National Research Council of Thailand and Faculty of Engineering, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMUTL) are gratefully acknowledged.

## Synthesis of Molecularly Imprinted Polymer for Sterol Separation

Ratanaporn Yuangsawad<sup>1</sup>, Nuengruthai Chuayrueng<sup>2</sup>, Nattawat Nonthanasin<sup>2</sup>, Krittin Binabdullah<sup>2</sup> and Duangkamol Na-Ranong<sup>2,a</sup>

<sup>1</sup>Division of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Rajamangala University of Technology Krungthep, 2 Nanglinchii, Sathorn, Bangkok 10120, Thailand

<sup>2</sup>Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, 1 Chalongsong 1, Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

**Abstract.** Molecular imprinted polymer (MIP) was prepared by bulk polymerization in acetone using acrylamide as a functional monomer, ethylene glycol dimethacrylate as a crosslinker, stigmasterol as a template and benzoyl peroxide as an initiator. The obtained MIPs were characterized using a scanning electron microscope and a fourier transform infrared spectrophotometer. Performance in sterol adsorption of MIPs prepared under various conditions was investigated using a model solution of phytosterols in heptane, comparing with a nonimprinted polymer (NIP). Statistical analysis revealed that the amounts of crosslinker and template strongly affected the performance of MIP while the amount of solvent slightly affected the performance of MIP. MIP synthesized under the optimal condition had adsorption capacity of 1.28 mgsterols/gads which were 1.13 times of NIP.

### 1 Introduction

Due to high energy consumption and depletion of fossil fuel, demand of biodiesel has been increased for several decades. Palm oil and palm fatty acid distillate (PFAD) are mainly used as raw materials for biodiesel production in many countries, especially in South East Asia [1-4]. However, biodiesel producers are suffering from high cost of production. In order to increase the competency of biodiesel in the market, it is necessary to increase economical value of the overall process including oil refinery and biodiesel production.

PFAD is a by-product from palm oil refinery. It consists of free fatty acids (81.7 %), glycerides (14.4 %) and several high valuable bioactive compounds such as vitamin E, phytosterols and squalene [5]. Phytosterols have several biological activities such as cholesterol lowering effect, anti-inflammatory, anti-atherogenicity, anti-cancer and anti-oxidation. Therefore, applications of phytosterols in pharmaceutical, functional food and cosmetics industries are promising [6].

Recovery of phytosterols from PFAD with reasonable cost should increase economical value of overall process of palm oil refinery and biodiesel production. Several processes including chemical transformation and physical separation steps have been developed mainly to recover phytosterols from soybean oil fatty acid distillate and tall oil [6-9]. These processes usually include the step with high energy consumption such as molecular distillation under high vacuum condition, crystallization at low temperature, recovery of solvent from the solvent extraction and supercritical fluid extraction. Therefore, it

is necessary to develop the more environmental friendly and energy saving process for phytosterols recovery.

Adsorption has been widely applied in an industrial process to separate minor contaminants from liquid and gas. It has high potential for application of phytosterols recovery. Since PFAD consists of several types of minor components [5], one of the key factors for the success of the separation of phytosterols by adsorption is selectivity of the adsorbent towards phytosterols.

Molecularly imprinted polymers (MIPs) have been applied in various fields requiring high selectivity to particular molecules such as biosensor development, chromatography and catalysis [10-12]. In this work, MIPs were synthesized from acrylamide (monomer), ethylene glycol dimethacrylate (crosslinker) and stigmasterol (template) by bulk polymerization under various conditions. Amounts of crosslinker, template and solvent were selected as synthesis parameters. Properties of the obtained MIPs were observed using SEM and FT-IR techniques. Batch adsorption was performed to evaluate the performance of the obtained MIPs in sterol adsorption using a model solution of phytosterols in n-heptane. Performance of MIPs was compared with a non-imprinted polymer (NIP).

### 2 Experimental

#### 2.1 Synthesis of molecularly imprinted polymers

Acrylamide (monomer), ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA, crosslinker), stigmasterol (template), benzoyl

<sup>a</sup> Corresponding author: dnananong@hotmail.com, duangkamol.na@kmitl.ac.th

peroxide (initiator) and acetone (solvent) were mixed in a 60 ml glass bottle. In order to remove oxygen, nitrogen gas was purged through the solution for 10 min. Then the solution was prepolymerized at 60 °C for 1 h by shaking in an orbital shaker at 220 rpm. After prepolymerization, the temperature in the shaker was raised to 60 °C and the polymerization was allowed to proceed at this condition for 24 h. The obtained solid was washed several times with distilled water to remove all unreacted reagents. To ensure that all the unreacted reagents were completely removed from the obtained solid, water was separated from the solid by centrifugation at 4,000 rpm for 30 min and its absorbance was measured using UV-spectrophotometer. To remove the stigmasterol template from the obtained solid, Soxhlet extraction was performed at 120 °C for 24 h using solution consisting of acetonitrile (85 vol%), water (9.9 vol%), methanol (5 vol%) and acetic acid (0.1 vol%) as extracting solvent. To ensure that the template was completely removed, the obtained MIPs mixed with n-heptane and stirred at 30 °C for 3 h and the solution was taken for analysis of stigmasterol using a gas chromatograph with flame ionized detector (GC-2010plus; Shimadzu).

Different MIPs were prepared by varying ratios of EGDMA, stigmasterol and acetone to acrylamide in the ranges of 2:1 to 4:1 (mol:mol), 0.1:1 to 0.3:1 (mol:mol) and 4:1 to 8:1 (mol:mol), respectively. Amount of benzoyl peroxide was fixed at 0.32 mole per mole of acrylamide. Conditions for the MIPs synthesis were determined using a MINITAB program according to Central Composite Design (CCD) method. The result is summarized in Table 1.

**Table 1.** Condition for MIP synthesis determined by CCD method. (1 mmol of monomer, initiator 0.32 mmol)

No.	crosslink (mmol)	template (mmol)	solvent (ml)
1	2.5	0.15	5
2	3.5	0.15	5
3	2.5	0.25	5
4	3.5	0.25	5
5	2.5	0.15	7
6	3.5	0.15	7
7	2.5	0.25	7
8	3.5	0.25	7
9	2	0.2	6
10	4	0.2	6
11	3	0.1	6
12	3	0.3	6
13	3	0.2	4
14	3	0.2	8
Std	3	0.2	6

For further discussion, the MIP obtained at the condition of monomer: crosslinker : template : solvent = 1 : 3 : 0.2 : 6 was named as “MIP-STD”. The solid sample obtained under this condition before extraction of template was named as “T-MIP-STD”. Nonimprinted

polymer (NIP) was prepared using this ratio by the same procedure without addition of stigmasterol template.

## 2.2 Characterization of molecularly imprinted polymers

SEM images were taken to observe morphology of the samples using EVO®MA10 (ZEISS). Extra high tension voltage level was 15.00 kV. Fourier transform infrared spectra were measured using IRPrestige-21 (Shimadzu, Japan) equipped with MIRacle ATR (PIKE Technologies, Inc.) with a resolution of 4 cm<sup>-1</sup>.

## 2.3 Adsorption test

Model solution was prepared from sterol mixed, containing campesterol (23.6 wt%), stigmasterol (28.2 wt%) and β-sitosterol (48.2 wt%), and n-heptane. Concentration of total sterols in the model solution was set at 140 μg·g<sup>-1</sup>. Batch adsorption was performed as follows. 20 ml of the prepared model solution was mixed with 1 wt% of MIP or NIP and then the mixture was shaken at 220 rpm, 30 °C for 6 h.

Samples (c.a. 0.1 g) before and after adsorption were taken for quantitative analysis of campe-, stigma- and β-sitosterol. Analysis was performed using a gas chromatograph connected with flame ionized detector (GC-2010plus; Shimadzu). Peak separation was achieved using a ZB-5HT capillary column (30 m in length, 0.32 mm in internal diameter, 0.1 μm in film thickness; Phenomenex). Tricaprin was used as an internal standard. Calibration curve of sterols in n-heptane was made in the range of 0 – 120 μg. The obtained calibration curve was expressed as  $W_{sterol} = 13.075 (A_{sterol}/A_{Tricaprin}) + 0.6042$  with  $R^2 = 0.9997$ .

Performance of the adsorbent was evaluated from percentage of sterol adsorption (%Ads: %, Eq. (1)), adsorption capacity ( $q_i$ : g<sub>sterols</sub>/g<sub>ads</sub>, Eq. (2)) and selectivity based on stigmasterol ( $S_i$ : %, Eq. (3)).

$$\%Ads = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100 \quad (1)$$

$$q = \frac{(C_0 - C)W_{solution}}{W_{ads}} \quad (2)$$

$$S_i = \left( \frac{W_{i,0} - W_i}{W_{i,0}} \right) \left( \frac{W_{stigma,0}}{W_{stigma,0} - W_{stigma}} \right) \quad (3)$$

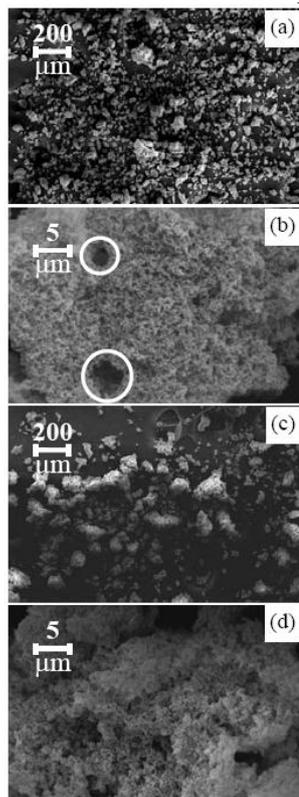
## 2.4 Statistical analysis

ANOVA analysis was performed in order to investigate effects of the synthesis parameters on the adsorption performance of the obtained MIP and to predict the optimum condition of MIP synthesis.

## 3 Results and Discussion

### 3.1 Polymer characterization

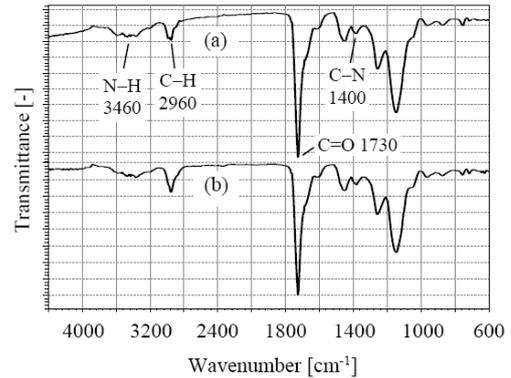
All the synthesized MIPs and NIP were white fine powder and were not dissolved in water and n-heptane. Figures 1(a) and 1(b) show SEM images of MIP-STD with the magnifications of 500 and 20,000, respectively. SEM images reveal that most of the particles had the size smaller than 100  $\mu\text{m}$  and the surface of MIP-STD was not uniformed. Pores with the diameter less than 1  $\mu\text{m}$  and cavities with the size in the order of 2  $\mu\text{m}$  or larger are observed. SEM images of MIP synthesized under other conditions (not shown) had characteristic similar to those of MIP-STP. Figures 1(c) and 1(d) show SEM images of NIP. No large cavity is observed. Therefore, the large cavities in MIP-STP should be considered as a result of existing of stigmasterol during the polymerization and they were formed after removal of the template.



**Figure 1.** Typical SEM images of MIP-STD (a, b), NIP (c, d).

Figure 2 shows FT-IR spectra of NIP and T-MIP-STD. Identification of absorbed peaks was performed by using database of FT-IR equipment. Characteristics of both spectra were similar. Both spectra had small broad peaks of N-H vibration around 3460  $\text{cm}^{-1}$ , small sharp peak of C-H vibration at 2960  $\text{cm}^{-1}$ , large sharp peak of C=O vibration at 1730  $\text{cm}^{-1}$  and peak of C-N vibration at 1400  $\text{cm}^{-1}$ . These peaks were identified as the N-H, C=O, C-N and C-H in the structure of acrylamide-EGDMA polymer. Since no absorption band of C=C (at 1600  $\text{cm}^{-1}$ ) was observed in these spectrum and both acrylamide monomer and EGDMA have C=C in their structures, this result indicates that unreacted acrylamide and EGDMA were completely removed from the obtained NIP-STD and T-MIP-STD by water washing. Comparison of the spectra of NIP and T-MIP-STD reveals that NIP and T-MIP-STD had almost the same chemical structures.

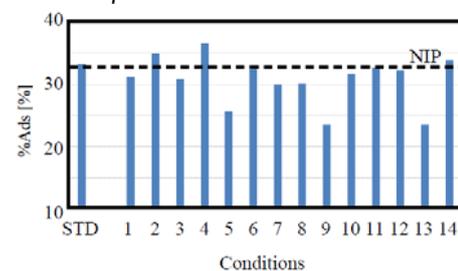
However, the relative intensity of C-H peak to other peaks in the spectrum of NIP was less than the relative intensity observed in the spectrum of T-MIP-STD. This result indicated existing of stigmasterol, containing C-H bond, in T-MIP-STD.



**Figure 2.** FT-IR spectra of (a) NIP-STD and (b) T-MIP-STD.

### 3.2 Performance of phytosterols adsorption

Figure 3 shows the performance in sterol adsorption of MIPs comparing with NIP. As shown in the figure, MIPs prepared at the condition number of 2, 4, 14 and STD adsorbed larger amount of sterols comparing with NIP. Moreover, adsorption experiment revealed that all the prepared MIPs adsorbed campe-, stigma- and  $\beta$ -sitosterol with almost the same percentage of the original amounts presenting in the model solution;  $S_{\text{campesterol}} \approx S_{\beta\text{-sitosterol}} \approx 1$ . No specific selectivity towards stigmasterol adsorption should be a result of very similar molecular structures of these sterols. This result should be considered as the possibility of applying MIP in recovery of all types of sterol from fatty acid distillates. Therefore, adsorption capacity was calculated from total amount of campesterol, stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol adsorbed on the adsorbents.



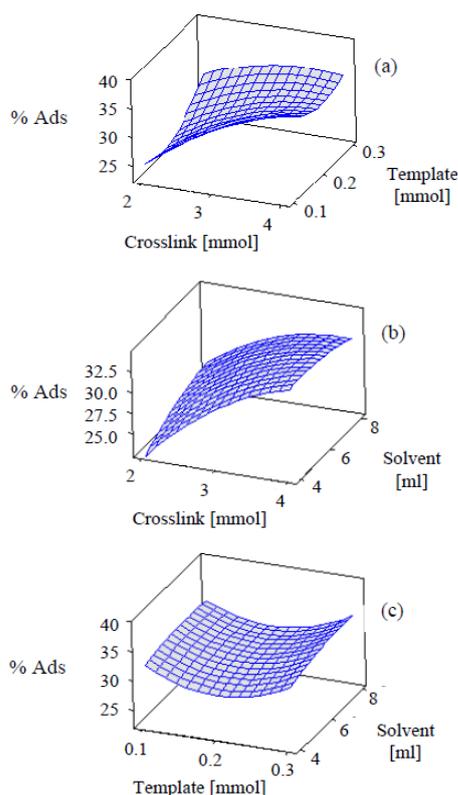
**Figure 3.** Performance of molecularly imprinted polymers in sterol adsorption at 30 °C, 6 h; (- - -) NIP.

### 3.3 Effect of synthesis parameters on adsorption performance of MIP

The relation between percentage of sterol adsorption and amounts of crosslinker, template and solvent obtained from statistical analysis are shown in Figure 4(a) – 4(c).

As shown in Figure 4(a), in the investigated range, increasing the amount of crosslink improved the performance in sterol adsorption of the obtained MIPs. The effect was more significant when the amount of template was low. However, increasing the amount of

template (0.1 to 0.3 mmol) non-monotonously affected adsorption performance of the obtained MIPs. The lowest efficiency was observed from the MIP synthesized at the template (0.1 to 0.3 mmol) non-monotonously affected adsorption performance of the obtained MIPs. The lowest efficiency was observed from the MIP synthesized at the template (0.1 to 0.3 mmol) non-monotonously affected adsorption performance of the obtained MIPs. The lowest efficiency was observed from the MIP synthesized at the amount of template around 0.15 mmol. Figure 4(b) shows that increase of the amount of crosslink improved the performance in sterol adsorption of the obtained MIPs whereas the amount of solvent insignificantly affected the performance in sterol adsorption of the obtained MIPs. Effect of the amount of template on the performance in sterol adsorption of the obtained MIPs shown in Figure 4(c) agrees well with the same effect shown in Figure 4(a).



**Figure 4.** Effects of synthesis parameters on performance of MIPs. Synthesis conditions: (a) volume of solvent = 5 ml, (b) amount of template = 0.20 mmol, amount of crosslink = 3 mmol.

According to response analysis, the optimal amounts of crosslinker, template and solvent were 3.5 mmol, 0.3 mmol and 7 ml, respectively and the MIP synthesized under this optimized condition had adsorption capacity of  $1.28 \text{ mg}_{\text{sterols}}/\text{g}_{\text{ads}}$  or 1.13 times of NIP.

## 4 Conclusions

Molecularly imprinted polymer (MIP) using for sterol separation was successfully synthesized by bulk

polymerization of acrylamide and EGDMA using stigmaterol as template, acetone as solvent and benzoyl peroxide as initiator. MIP had large cavity formed from stigmaterol in its structure. Performance of MIP in sterol adsorption was significantly affected by the amounts of crosslinker and template but slightly affected by the amount of solvent used in the preparation of MIP. MIP synthesized at the optimal condition had adsorption efficiency of 1.13 times of NIP.

## Acknowledgement

The authors would like to acknowledge financial support from National Research Council of Thailand.

## Nomenclature

%Ads	percentage of sterol adsorption
$C$	total concentration of campesterol, stigmaterol and $\beta$ -sitosterol in the model solution at 6 h
$C_0$	total concentration of campesterol, stigmaterol and $\beta$ -sitosterol in the model solution at 0 h
$C_i$	concentration of species "i" in the model solution
$q$	capacity of sterols adsorption
$W_i$	weight of species "i" in the model solution at 6 h
$W_{i,0}$	weight of species "i" in the model solution at 0 h
$W_{\text{sol}}$	weight of model solution

## Subscript

$i$  campesterol, stigmaterol or  $\beta$ -sitosterol

## References

1. E.N. Ali, C.I. Tay, *Procedia Engineering*, **53**, 7 (2013)
2. V.V. Kuss, A.V. Kuss, R. G. Rosa, D.A.G. Aranda, Y.R.Cruz, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, **50**, 1013 (2015)
3. M.H. Mosarof, M.A.Kalam, H.H. Masjuki, A.M. Ashraf, M.M. Rashed, H.K. Imdadul, I.M. Monirul, *Energ. Convers. Manage.*, **105**, 617 (2015)
4. S. Mekhilef, S. Siga, R. Saidur, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, **15**, 1937 (2011)
5. A.G.M. Top, *Lipid Technol.*, **22**, 11 (2010)
6. P. Fernandes, J.M.S. Cabral, *Bioresour. Technol.*, **98**, 2335 (2007)
7. M.-J. Dumont, S. S. Narine, *Food Res. Int.*, **40**, 957 (2007)
8. H. Yang, F. Yan, D. Wu, M. Huo, J. Li, Y. Cao, Y. Jiang, *Bioresour. Technol.*, **101**, 1471 (2010)
9. C. J. Chang, Y.-F. Chang, H. Lee, J. Lin, P.-W. Yang, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **39**, 4521 (2000)
10. W. J. Cheong, S. H. Yang, F. Ali, *J. Sep. Sci.*, **36**, 609 (2013)
11. N. Verma, A. Bhardwaj, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **175**, 3093 (2015)
12. W. Li, S. Li, *Adv. Polymer Sci.*, **206**, 191 (2007)

## ข้อมูลประวัติคณะผู้วิจัย

### 1. หัวหน้าโครงการ

รศ.ดร.ดวงกมล ณ ระนอง  
ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

### สาขาวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษ

Heterogeneous Catalytic Reaction Engineering, Catalytic Reactor Design

### รางวัลด้านวิชาการ/ด้านวิจัย/งานสร้างสรรค์ (ด้านศิลปะ หรืออื่นๆ) ที่ได้รับ

ปี พ.ศ.	ชื่อรางวัล	สถาบันที่ให้
2542	การเสนอผลงานดีเด่นในงานประชุมวิชาการของสมาคมวิศวกรรมเคมีสาขาคันโต	สมาคมวิศวกรรมเคมีประเทศญี่ปุ่น (สาขาคันโต)

### ทุนการศึกษาและทุนวิจัยที่เคยได้รับ

ปี พ.ศ.	ทุนการศึกษาและทุนวิจัย	สถาบันที่ให้ทุน
2537	ทุนศึกษาต่อระดับปริญญาโทและเอก โครงการพัฒนาอาจารย์	ทบวงมหาวิทยาลัย
2547	Hitachi Research Scholarship	The Hitachi Scholarship Foundation
2548-2549	JSPS Postdoctoral Fellowship	Japan Society for the Promotion of Science

### ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์

#### ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่ (ระดับนานาชาติ)

1. Duangkamol Na-Ranong, Pattarin Laungthaleongpong, Sutirat Khambung “Removal of steryl glucosides in palm oil based biodiesel using magnesium silicate and bleaching earth” *Fuel*, 143 (2015) 229-235 (ISI, Scopus; IF2013 = 3.406)
2. Duangkamol Na-Ranong, Prakob Kitchaiya “Precipitation above cloud point in palm oil based biodiesel during production and storage” *Fuel*, 122 (2014) 287 – 293 (ISI, Scopus; IF2012 = 3.357)
3. Yoshikawa, T., Na-Ranong, D., Tago, T., Masuda, T. “Oxidative Cracking of Aromatic Compounds Related to Lignin Constituents with Steam Using  $ZrO_2-Al_2O_3-FeO_x$  Catalyst” *Journal of the Japan Petroleum Institute*, 53 (2010) 178-183. (IF = 0.541 )
4. Duangkamol Na-Ranong, Ratanaporn Yuangsawad, Prakob Kitchaiya and Takashi Aida, "Application of Periodic Operation to Kinetic Study of NO-CO Reaction over  $Rh/Al_2O_3$ " *Chemical Engineering Journal*, 146 (2009) 275-286. (IF = 1.707)

5. Duangkamol Na-Ranong, Ratanporn Yuangsawad, Teruoki Tago, and Takao Masuda "Recovery of useful chemicals from oil palm shell-derived oil using zirconia supporting iron oxide catalysts" Korean Journal of Chemical Engineering, 25 (2008) 426-430. (IF = 0.747)
6. Piyawat Supphasrirongjaroen, Piyasan Praserttham, Joongjai Panpranot, Duangkamol Na-Ranong, Okorn Mekasuwandumrong "Effect of quenching medium on photocatalytic activity of nano-TiO<sub>2</sub> prepared by solvothermal method" Chemical Engineering Journal, 138 (2008) 622-627. (IF = 1.707)
7. Duangkamol Na-Ranong, Yuichi Saito, Takanori Yotsumoto, Mohammad Kazemeini and Takashi Aida, "A simulated countercurrent moving bed reactor for oxidation of CO at low concentration of Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>" Studies in Surface Science and Catalysis, 159 (2006) 805-808. (IF = 0.489)
8. Duangkamol Na-Ranong, Attasak Jaree, Robert R. Hudgins, Hector M. Budman, Peter L. Silveston and Michael Menzinger, "Amplification of Periodic Temperature Disturbances in a Packed-Bed Reactor: CO Oxidation over CuO-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Catalyst" Canadian Journal of Chemical Engineering, 81 (2003) 1215-1221. (IF = 0.463)
9. Takao Ohmori, Duangkamol Na-Ranong, Takuji Yamamoto, Akira Endo, Takaji Akiya, and Masaru Nakaiwa, "Periodic and Recycling Operations in a Chemical Reaction Process for Production of Light Olefins" Kagaku Kougaku Ronbunshu, 29 (2003) 374-377. (IF = 0.327)
10. Duangkamol Na-Ranong, Takashi Aida, and Hiroo Niiyama, "Application of Periodic Operation to Kinetic Study for NO-CO Reaction over Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>" Applied Catalysis A: General, 234 (2002) 103-110. (IF = 3.166)
11. Takashi Aida, Duangkamol Na-Ranong, Ryuichi Kobayashi, and Hiroo Niiyama, "Effects of diffusion and adsorption-desorption on periodic operation performance of NO-CO reaction over supported noble metal catalysts" Chemical Engineering Science, 54 (1999) 4449-4457. (IF = 1.775)

#### การเสนอผลงานวิชาการ (ระดับนานาชาติ)

1. Duangkamol Na-Ranong, Nattawat Nonthanasin and Krittin Binabdullah Synthesis and characterizations of molecularly imprinted polymer for sterol separation, 64<sup>th</sup> Canadian Chemical Engineering Conference, Niagara Falls, ON, Canada, October 19-22, 2014
2. Kaori Nakamura, Shinichi Koguchi and Duangkamol Na-Ranong, "Esterification of alcohols (or steryl glucosides) with carboxylic acids using ionic liquids as a solvent/catalyst", the 23<sup>rd</sup> International Symposium on Chemical Reaction Engineering (ISCRE23) and 7<sup>th</sup> Asia-Pacific Chemical Reaction Engineering Symposium (APCRE7), Bangkok, Thailand, 2014.

3. Duangkamol Na-Ranong, Launghaleongpong Pattarin, Khambung Sutirat “Comparing efficiencies of selected ion exchange resins in removing steryl glucosides in biodiesel”, the 17th Conference on Process Integration, Modelling and Optimisation for Energy Saving and Pollution Reduction (PRES 2014), Prague, Czech Republic, August, 2014.
4. Ratiporn Chantayapaibool, Pasinee Saeng-arayakul, Nuntaporn Trisinsomboon, Ratanaporn Yuangsawad and Duangkamol Na-Ranong “Synthesis of CeO<sub>2</sub>ZrO<sub>2</sub> Nanofibers by Electrospinning Technique” *the 22<sup>nd</sup> International Symposium on Chemical Reaction Engineering (ISCRE 22)*, Maastricht, the Netherlands, Sep, 2012
5. D. Na-Ranong, P. Kitchaiya and R. Yuangsawad “Removal of steryl glucosides in palm oil based biodiesel by adsorption on an acid treated resin” *the anniversary 20<sup>th</sup> International Congress of Chemical and Process Engineering CHISA 2012 and the 15<sup>th</sup> Conference on Process Integration, Modelling and Optimisation for Energy Saving and Pollution Reduction PRES 2012*, Prague, Czech Republic, Aug, 2012
6. D. Na-Ranong, R. Yuangsawad, “Removal of phosphate in wastewater using an oyster shell derived CaO” *the anniversary 20<sup>th</sup> International Congress of Chemical and Process Engineering CHISA 2012 and the 15<sup>th</sup> Conference on Process Integration, Modelling and Optimisation for Energy Saving and Pollution Reduction PRES 2012*, Prague, Czech Republic, Aug, 2012
7. Preeyaporn Puangkamlai, Ratanaporn Yuangsawad, Duangkamol Na-Ranong, “Preparation of CaO Catalysts from Oyster Shell Waste for Transesterification of Palm Oil with Methanol” *The 17th Regional Symposium on Chemical Engineering (RSCE)*, Thailand, 2010

**ผลงานสิทธิบัตร/สิ่งประดิษฐ์/งานสร้างสรรค์ (ศิลปะ หรือ อื่นๆ)**

1. สิ่งประดิษฐ์ "เครื่องแยกและนำกลับโพลีเมอร์ที่ไวต่อความร้อนแบบต่อเนื่อง"

เลขที่คำขอ 0901000967

ผู้ร่วมประดิษฐ์ สุรพิชญ ลอยกุลนันท์, ฉวีวรรณ คงแก้ว, ดวงกมล ณ ระนอง, ชัยวุฒิ สายแสงธรรม