การเตรียมอนุภาคพอลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลของวิตามินอี โดยการสังเคราะห์แบบตกตะกอน

Preparation of Molecularly Imprinted Polymer Particles of Vitamin E by Precipitation Polymerization

มณจิรา ลัทธปรีชา ปรียาภรณ์ ไชยสัตย์ และ อมร ไชยสัตย์*

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี คลองหก

อ. ธัญบุรี จ. ปทุมธานี 12110

*E-mail: a_chaiyasat@mail.rmutt.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ ศึกษาการเตรียมอนุภาคพอลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลด้วยการสังเคราะห์แบบตกตะกอน โดยใช้ไดไวนิลเบนซีนเป็นสารเชื่อมร่างแห กรดเมทาคริลิกเป็นฟังก์ชันนอลมอนอเมอร์ในการจับวิตามินอีซึ่งเป็นสารแม่แบบและใช้เบนโซอิลเปอร์ออกไซด์เป็นตัวเริ่มปฏิกิริยา ละลายไดไวนิลเบนซีน กรดเมทาคริลิก วิตามินอี และเบนโซอิลเปอร์ออกไซด์ ที่อัตราส่วนโดยโมล 0.0283 : 0.0079 : 0.0007 ของไดไวนิลเบนซีน : กรดเมทาคริลิก : วิตามินอี แล้วเติมลงในอะซิโตไนไทรล์ที่เป็นวัฏภาคต่อเนื่อง ทำการสังเคราะห์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของตัวเริ่มปฏิกิริยาที่เหมาะสม พบว่า %Conversion เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของเบนโซอิลเปอร์ออกไซด์ โดยเมื่อใช้เบนโซอิลเปอร์ออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ได้ % Conversion 100 อนุภาคพอลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลที่เตรียมได้มีรูปร่างเป็นทรงกลมผิวด้านนอกเรียบ จากรูปที่ถ่ายโดยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดพบว่าอนุภาคมีขนาดประมาณ 5 ไมโครเมตร และมีการกระจายตัวของขนาดค่อนข้างแคบ อนุภาคที่เตรียมได้มีความสามารถในการจับวิตามินอีเท่ากับ 4.56 กรัม-วิตามินอีต่อกรัม-พอลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุล

คำสำคัญ วิตามินอี พอลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุล การสังเคราะห์แบบตกตะกอน

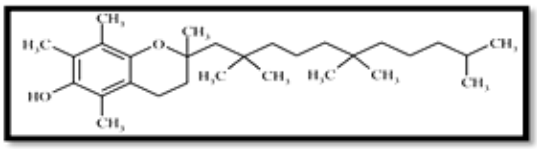
Abstract

In this research, molecularly imprinted polymer (MIP) particles of vitamin E were prepared by precipitation polymerization using divinylbenzene (DVB) as a crosslinking monomer, methacrylic acid (MAA) as a functional monomer, vitamin E as a template, and benzoyl peroxide (BPO) as an initiator. DVB, MAA, vitamin E, and BPO were firstly mixed with the mole ratio of DVB: MAA: vitamin E of 0.0283:0.0079:0.0007 respectively. This mixture was then added into the continuous phase as acetonitrile and subsequently polymerized at 70°C for 24h. The initiator concentration was optimized. It was found that the increase of BPO concentration increased % conversion of monomers. Using BPO at 1% wt of monomer, 100% conversion was obtained. The prepared MIP was spherically shaped with a smooth outer surface. Scanning electron micrographs clearly showed the comparatively mono-dispersed MIP particles approximately 5 μm in diameter. The MIP particles were able to bind the vitamin E for 4.56 g-vitamin E/ g-MIP.

Keywords: Vitamin E, Molecularly imprinted polymer, Precipitation polymerization

บทนำ

ในปัจจุบันได้มีการนำวิตามินอี (รูปที่ 1) มารับประทาน หรือใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตเครื่องสำอางหลายชนิด เนื่องจากวิตามินอีมีสารออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (Antioxidation) จึงช่วยปกป้องเซลล์จากการถูกทำลายของอนุมูลอิสระ (Free radicals) ทำให้เซลล์ต่างๆ ทำงานได้อย่างสมบูรณ์ สามารถลดความรุนแรงของโรคเรื้อรังต่างๆ ได้ นอกจากนี้ ยังช่วยบำรุงผิวพรรณและ ชะลอความชราอีกด้วย และด้วยเหตุนี้ จึงได้มีการศึกษาถึงประโยชน์ต่างๆของวิตามีนอีกันอย่างกว้างขวาง จากการศึกษาพบว่าหากปริมาณวิตามินอีในเลือดต่ำ จะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตอันเนื่องมาจากโรคหัวใจขาดเลือด (Ischemicheart disease) ในทางตรงกันข้าม หากในเลือดมีปริมาณวิตามินอีสูง จะลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็ง [1, 2]



รูปที่ 1 โครงสร้างของวิตามินอี

ในกรณีการวิเคราะห์สารต้านออกซิเดชัน เช่น วิตามินอี ที่อยู่ในตัวอย่างต่างๆ โดยทั่วไปจะวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High-performance liquid chromatography; HPLC) แต่เนื่องจากว่ามีการปนเปื้อนของสารอื่นๆ ซึ่งอาจทำให้ผลการวิเคราะห์คลาดเคลื่อน รวมทั้งอาจทำให้อายุการใช้งานของคอลัมน์วิเคราะห์ของเครื่อง HPLC สั้นลงได้ ดังนั้น การสกัดสารเพื่อให้สารบริสุทธิ์ขึ้นก่อนการวิเคราะห์จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง [3, 4] ในกรณีของวิตามินอี การสกัดที่นิยมมีอยู่ 2 วิธี คือ การสกัดด้วยตัวทำละลาย และการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็ง วิธีแรกจะเป็นการสกัดสารโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณมากในการดึงเอาวิตามินอีออกมาจากตัวอย่าง โดยจะอาศัยสมบัติการละลายที่เหมือนกันของสาร ในกรณีของการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็ง จะสกัดสารโดยใช้วัสดุของแข็งที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ วัสดุของแข็งจะจับกับวิตามินอีไว้ ในขณะที่สารอื่นๆจะถูกล้างออกมาก่อน สุดท้ายจะชะวิตามินอีออกมาด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม กลไกการแยกสารของวิธีนี้จะเหมือนกับการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เพียงแต่จะลดปริมาณการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ลง เนื่องจากวัสดุของแข็งที่ใช้ในปัจจุบัน (ทางการค้า) จะเป็นชนิดกลับเฟส (Reversed phase; C8 หรือ C18) ซึ่งจะจับกับสารที่ไม่มีขั้วได้ดี ดังนั้น การสกัดทั้งสองวิธีจึงยังมีประสิทธิภาพต่ำในการกำจัดสารปนเปื้อน โดยเฉพาะสารปนเปื้อนชนิดที่มีความมีขั้วใกล้เคียงกับวิตามินอี อย่างไรก็ตาม กระบวนการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็งยังเป็นวิธีสกัดที่น่าสนใจเนื่องจากใช้ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณน้อย เพียงแต่ต้องพัฒนาวัสดุที่จะนำมาสกัดสารให้มีความจำเพาะกับสารมากขึ้น

จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการศึกษาวัสดุที่มีความจำเพาะกับสารที่ใช้ในกระบวนการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็งอยู่หลายชนิด แต่ที่นิยมและให้ประสิทธิภาพสูง คือ พอลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุล (Molecularly imprinted polymer; MIP) โดยวัสดุชนิดนี้จะมีความจำเพาะเจาะจงสูง ซึ่งเหมาะที่จะนำมาเป็นวัฏภาคของแข็งในกระบวนการสกัดแบบวัฏภาคของแข็ง หลักการการจับสารของวัสดุชนิดนี้ คือ จะจับเฉพาะสารที่มีขนาดและรูปร่างโมเลกุลเหมือนกับรอยพิมพ์ที่อยู่บนผิวของวัสดุ [5] , 6] การเตรียมวัสดุชนิดนี้ทำได้โดยนำสารมาตรฐานที่ต้องการวิเคราะห์หรือสกัด ผสมกับมอนอเมอร์เพื่อใช้เป็นแม่แบบ แล้วสังเคราะห์เป็นพอลิเมอร์ หลังจากนั้น สกัดเอาแม่แบบออกด้วยวิธีที่เหมาะสม ก็จะได้ MIP ที่มีความจำเพาะต่อสารนั้น [7] , [8] กลไกดังรูปที่ 2 MIP สามารถเตรียมได้หลายเทคนิคขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์การใช้งาน หากแบ่งตามลักษณะการจับกันระหว่างฟังก์ชันนอลมอนอเมอร์กับสารแม่แบบ สามารถแบ่งได้สองวิธี คือ แบบเกิด [9] และไม่เกิด [10] พันธะโควาเลนท์ (Covalent bond) โดยกรณีแรก การจับกันระหว่างสารแม่แบบกับ MIP จะมีความแข็งแรงมากกว่าแบบไม่เกิดพันธะ แต่ขั้นตอนในการกำจัดสารแม่แบบออกจากพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ค่อนข้างยุ่งยาก[8] ในขณะที่วิธีการเตรียม MIP แบบไม่เกิดพันธะโควาเลนท์จะเป็นที่นิยมมากกว่าเพราะสามารถกำจัดสารแม่แบบได้ง่ายกว่าและใช้มอนอเมอร์ได้หลากหลายกว่า แรงที่ใช้จับระหว่างสารแม่แบบกับมอนอเมอร์จะเป็นแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุล เช่น แรงวาลเดอวาวล์ และพันธะไฮโดรเจน แต่หาก

พิจารณาจำแนกการเตรียม MIP ตามกระบวนการการสังเคราะห์ อาจแบ่งออกเป็นสองกลุ่ม คือ กระบวนการสังเคราะห์แบบสารเนื้อเดียว/แบบเอกพันธ์ (Homogeneous polymerization) เช่น การสังเคราะห์แบบบัลค์ [11] และการสังเคราะห์แบบสารเนื้อผสม/แบบวิวิธพันธ์ (Heterogeneous polymerization) เช่น แบบตกตะกอน [11-17] แบบกระจาย [18] แบบอิมัลชัน[19] และแบบมินิอิมัลชัน[20] กรณีการสังเคราะห์แบบบัลค์ มอนอเมอร์ สารแม่แบบ สารเชื่อมร่างแหและตัวเริ่มปฏิกิริยาจะผสมเป็นเนื้อเดียวกัน เมื่อสังเคราะห์เสร็จพอลิเมอร์ที่ได้จะเป็นผลึก หากต้องการนำไปใช้งาน จำเป็นต้องทำการบดเพื่อให้ได้ผงของพอลิเมอร์ ทำให้ได้ขนาดของอนุภาคที่มีการกระจายตัวในช่วงที่กว้าง มีรูปร่างไม่สม่ำเสมอ รอยพิมพ์ประทับโมเลกุลจำนวนมากอาจถูกทำลายในระหว่างการบด [21] เพื่อลดขั้นตอนการบดพอลิเมอร์ การเตรียมอนุภาคพอลิเมอร์โดยตรงจึงน่าจะเหมาะสมกว่า นอกจากนี้อนุภาคที่เตรียมได้จะมีพื้นที่ผิวมากขึ้น ซึ่งจะเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการวิเคราะห์และสภาพไวในการวิเคราะห์ ดังนั้นกระบวนการเตรียมพอลิเมอร์แบบวิวิธพันธ์จึงนิยมนำมาใช้ในการเตรียมอนุภาค MIP หากพิจารณาลงไปในแต่ละกระบวนการพบว่าประสิทธิภาพของ MIP ที่เตรียมได้มีความแตกต่างกัน โดยจะมีประสิทธิภาพต่ำในกรณีกระบวนการสังเคราะห์ที่ใช้สารลดแรงตึงผิวในการสังเคราะห์ เช่น กระบวนการแบบกระจาย แบบอิมัลชันและแบบมินิอิมัลชัน เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวที่เคลือบอยู่บนผิวของอนุภาคพอลิเมอร์ อาจไปบดบังการจับกันของสารที่ต้องการวิเคราะห์กับตำแหน่งรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลได้ ดังนั้น กระบวนการสังเคราะห์ที่ไม่ใช้สารลดแรงตึงผิว เช่น การสังเคราะห์แบบตกตะกอน จึงเป็นเทคนิคที่น่าสนใจ

ในงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจในการพัฒนาวัสดุที่มีสมบัติที่เหมาะสมและมีความจำเพาะกับวิตามินอี โดยจะทำการสังเคราะห์อนุภาค MIP โดยกระบวนการแบบตกตะกอน โดยจะทำการศึกษาชนิดของตัวทำละลาย และอัตราส่วนของฟังก์ชันนอลมอนอเมอร์ต่อสารเชื่อมร่างแห

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. สารเคมี

กรดเมทาคริลิก (Methacrylic acid; MAA; Merck, Munich, Germany; purity, 99%) ทำให้บริสุทธิ์ก่อนใช้โดยการตกตะกอนที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ไดไวนิลเบนซีน (Divinylbenzene; DVB; Aldrich: purity, 80%) ทำให้บริสุทธิ์โดยการล้างด้วย 1 นอร์มอล สารละลายโซเดียม-ไฮดรอกไซด์ และน้ำกลั่นเพื่อกำจัดสารยับยั้งปฏิกิริยาก่อนที่จะนำมาใช้ จากนั้นเก็บไว้ในตู้เย็น เบนโซอิลเปอร์-ออกไซด์ (Benzoyl peroxide; BPO; Aldrich: purity, 75%) ทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอน วิตามินอี (Vitamin E; α-tocopherol; Aldrich: purity, 95.5%) เมทานอล (Methanol; RCI Labscan: purity, 99.9%) และกรดอะซิ-ติก (Acetic acid; Merck chemicals: purity, 96%) ใช้โดยไม่ต้องทำให้บริสุทธิ์

2. การเตรียมอนุภาคพอลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุล

การเตรียม MIP จะเตรียมโดยการสังเคราะห์แบบตกตะกอน ซึ่งมีสภาวะที่ใช้ในการเตรียมตามตารางที่ 1 โดยมีวิธีการเตรียมคร่าว ๆดังนี้ ละลาย DVB MAA BPO และวิตามินอี ในอัตราส่วนที่เหมาะสม (DVB : MAA : Vitamin E; 0.0283 : 0.0079 : 0.0007 โดยโมล) ให้เป็นเนื้อเดียวกันในตัวทำละลายที่เหมาะสม (สารละลายผสมเอทานอล โทลูอีน หรืออะซิโตไนไทรล์) ทำให้อยู่ในระบบสุญญากาศ โดยการไล่ออกซิเจนเป็นเวลา 5 นาที ทำการสังเคราะห์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไดอะแกรมการเตรียมอนุภาค MIP แสดงดังรูปที่ 2 หลังจากนั้น นำอิมัลชันไปกรองแยกตัวทำละลายออกจะได้อนุภาค MIP ของวิตามินอี นอกจากนี้ ได้ทำการสังเคราะห์อนุภาคพอลิเมอร์ที่ไม่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุล (Non-molecularly imprinted polymer; NIP) เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบโดยทำการสังเคราะห์เช่นเดียวกับอนุภาค MIP แต่ไม่ใส่วิตามินอีลงไป

3. การหาลักษณะเฉพาะของอนุภาคพอลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุล

ศึกษาลักษณะรูปร่างของอนุภาค MIP ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบแสง (Optical Microscope; OM; SK-100EB & SK-100ET, Seek, Thailand) โดยการนำอนุภาค NIP และ MIP ที่ได้มากระจายตัวในเมทานอล เขย่า 2 ชั่วโมง ก่อนหยดลงในแผ่นสไลด์ ในขณะที่ลักษณะพื้นผิวภายนอกของอนุภาค NIP และ MIP สามารถตรวจสอบได้ด้วยด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM; JSM-6510; JEOL, Japan) โดยนำอนุภาค NIP และ MIP ที่กระจายตัวอยู่ในวัฏภาคต่อเนื่องมาทำการกรองด้วยกระดาษกรองที่มีรูพรุน 0.45 ไมครอน เพื่อแยกเอาเฉพาะอนุภาค และล้างด้วยเมทานอล ก่อนนำไปอบในตู้อบสุญญากาศที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้น โรยผงอนุภาค MIP ลงบน nickel SEM stub แล้วไล่ความชื้นที่อุณหภูมิห้องด้วยตู้อบสุญญากาศ (Vacuum drying oven; DZF-6051; DZF) ก่อนเคลือบด้วยทอง

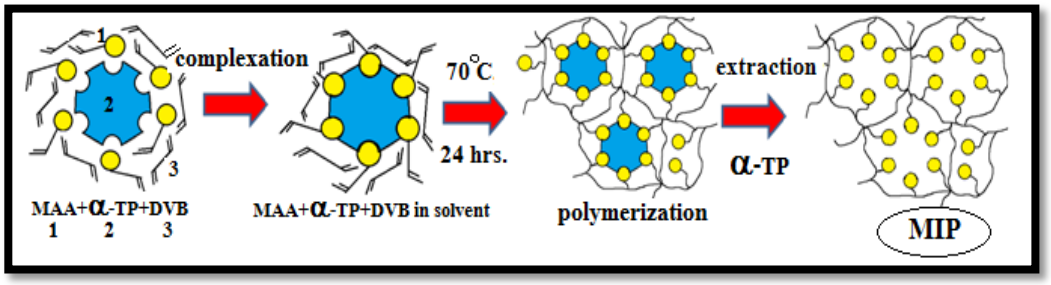
4. ประสิทธิภาพในการจับวิตามินอีของอนุภาค MIP

ในการศึกษาประสิทธิภาพในการจับวิตามินอี จะทำการศึกษาอยู่สองส่วน คือ การสกัดวิตามินอีที่เป็นแม่แบบรวมทั้งขจัดมอนอเมอร์ที่เหลืออยู่และโอลิโกเมอร์ที่ไม่สามารถเปลี่ยนไปเป็นพอลิเมอร์ได้ออกจากอนุภาค MIP และการศึกษาประสิทธิภาพของอนุภาค MIP ในการจับวิตามินอี โดยในกรณีการสกัดวิตามินอีออกจากอนุภาค MIP เริ่มต้นนำผงอนุภาค MIP 0.5 กรัม ที่สังเคราะห์ได้ แช่ลงใน 5% กรดอะซิติกในเอทานอล 10 มิลลิลิตร ปั่นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น นำตะกอนของอนุภาค MIP ไปแช่ในเมทานอล 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วนำไปกรองก่อนนำชั้นของเมทานอลไปตรวจหาวิตามินอี เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีวิตามินเหลืออยู่ในอนุภาค MIP ด้วยเครื่อง HPLC ที่ใช้คอลัมน์ยี่ห้อ Dionex Acclaim ® Polar Advantage 2 ชนิด C18 3 µm 120 A˚ 2.1 × 150 mm ที่อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ (เมทานอล) เท่ากับ 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที โดยเทียบพื้นที่ใต้พีกของวิตามินอีกับกราฟมาตรฐานของวิตามินอีที่ความเข้มข้นต่างๆ (25 50 100 150 200 พีพีเอ็ม) ในกรณีการศึกษาประสิทธิภาพของอนุภาค MIP ในการจับวิตามินอี จะศึกษาโดยแช่อนุภาค MIP ที่ได้สกัดวิตามินอีแม่แบบแล้วลงในสารละลายมาตรฐานของวิตามินอีความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม ปั่นเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นกรองแยกอนุภาคแล้วนำสารละลายมาตรฐานวิตามินอีไปวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเทคนิค HPLC เช่นเดียวกับการสกัดวิตามินอีที่เป็นแม่แบบออกจากอนุภาค ปริมาณของวิตามินอีที่อนุภาค MIP จับได้ คือ ปริมาณของวิตามินอีที่หายไป

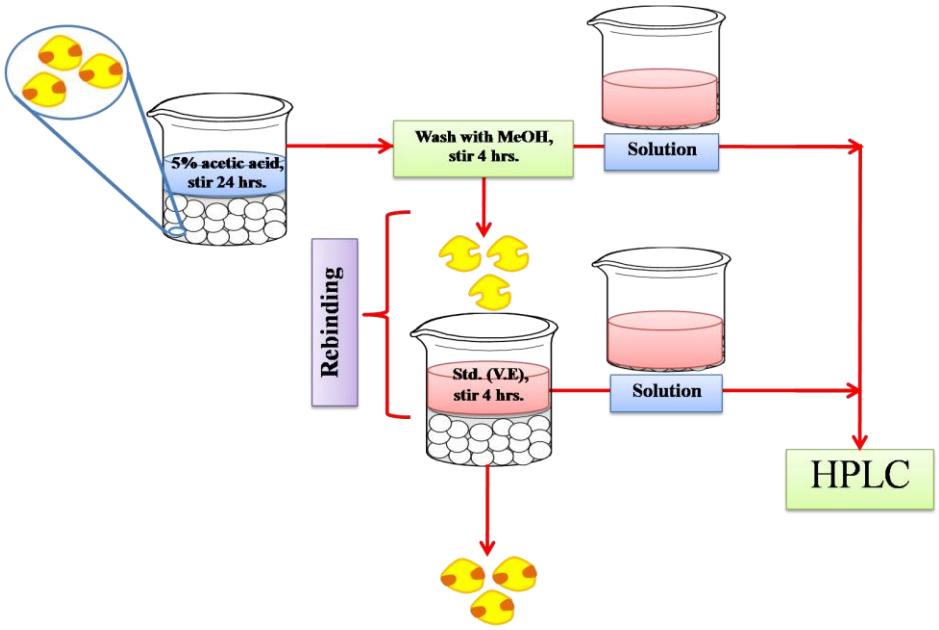
ตารางที่ 1 สภาวะที่ใช้ในการเตรียมอนุภาคพอลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลของวิตามินอี

การทดลอง	MAA (โมล)	DVB (โมล)	BPO (โมล)	วิตามินอี (โมล)	วัฏภาคต่อเนื่อง*	
					เอทานอล- โทลูอีน	อะซิโตไนไทรล์
1	0.0079	0.0283	0.0011	-	75 : 25	-
2	0.0079	0.0283	0.0011	0.0007	75 : 25	-
3	0.0079	0.0283	0.0022	0.0007	75 : 25	-
4	0.0079	0.0283	0.0033	0.0007	75 : 25	-
5	0.0079	0.0283	0.0045	0.0007	75 : 25	-
6	0.0151	0.0283	0.0045	0.0007	75 : 25	-
7	0.0174	0.0283	0.0045	0.0007	75 : 25	-
8	0.0151	0.0283	0.0045	0.0007	0 : 100	-
9	0.0151	0.0283	0.0045	0.0007	25 : 75	-
10	0.0151	0.0283	0.0045	0.0007	50 : 50	-
11	0.0151	0.0283	0.0045	0.0007	100 : 0	-
12	0.0151	0.0283	0.0045	0.0007	-	100

หมายเหตุ: * 100 กรัม ของวัฏภาคต่อเนื่อง



รูปที่ 2 กระบวนการเตรียมพอลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุล



รูปที่ 3 ขั้นตอนการสกัดวิตามินอีที่เป็นแม่แบบและทดสอบประสิทธิภาพในการจับวิตามินอีของอนุภาคพอลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลของวิตามินอี

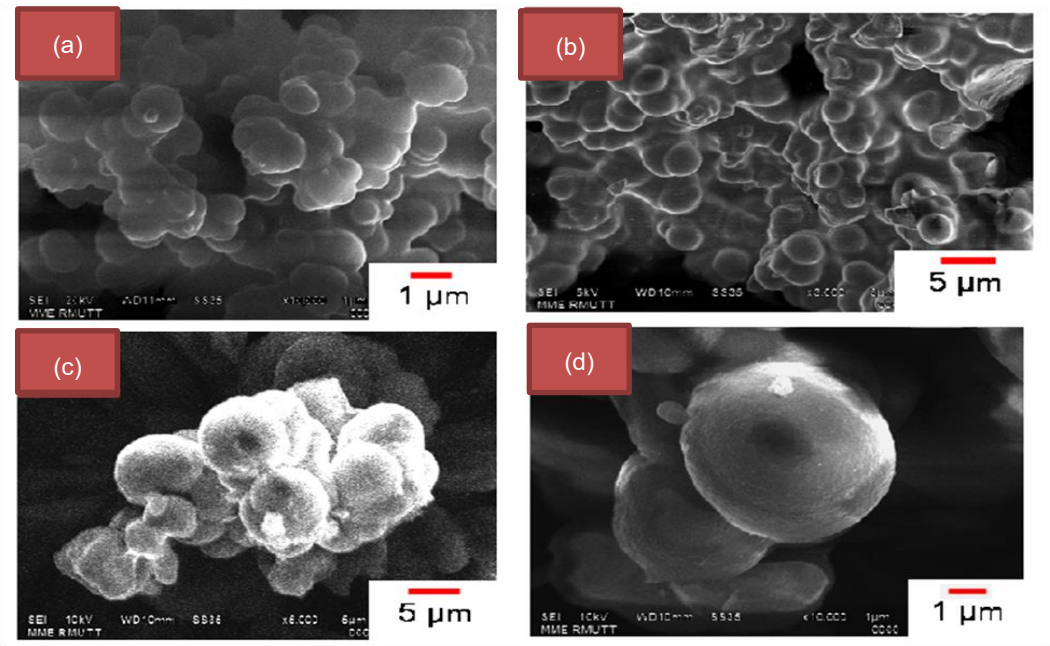
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ในงานวิจัยนี้ ได้ทำการเตรียมอนุภาค MIP โดยกระบวนการสังเคราะห์แบบตกตะกอน ซึ่งเป็นกระบวนการที่สามารถเตรียมอนุภาคได้โดยตรง ไม่ต้องนำพอลิเมอร์ มาบดหลังจากการสังเคราะห์ ทำให้สะดวกในการนำไปประยุกต์ใช้งาน นอกจากนี้ การสังเคราะห์ด้วยกระบวนการนี้ ไม่มีการใช้สารลดแรงตึงผิว ซึ่งอาจจะไปลดประสิทธิภาพในการจับสารที่ต้องการวิเคราะห์ของอนุภาค MIP โดยในงานนี้จะใช้ MAA DVB และ BPO เป็นฟังก์ชันนอลมอนอ-เมอร์ สารเชื่อมร่างแห และตัวเริ่มปฏิกิริยา ตามลำดับ โดยนำสารทั้งสามชนิด รวมทั้งวิตามินอีละลายในวัฏภาคต่อเนื่อง (เอทานอล-โทลูอีน หรืออะซิโตไนไทรล์) การสังเคราะห์จะเริ่มขึ้นเมื่อให้อุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส

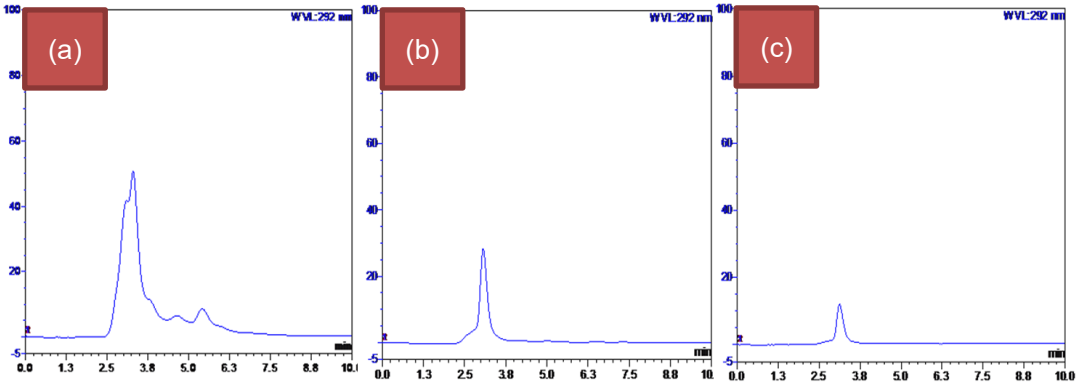
โดย BPO จะแตกตัวเป็นอนุมูลอิสระ แล้วต่อสายโซ่กับ MAA และ DVB เมื่อสายโซ่พอลิเมอร์ยาวขึ้น (ความไม่มีขั้วเพิ่มขึ้น) จนถึงความยาววิกฤต ($J_{crit.}$) ที่ไม่สามารถละลายในวัฏภาคต่อเนื่องได้อีก สายโซ่พอลิเมอร์จะประกอบตัวเอง (Self-assemble) เป็นอนุภาค และเนื่องจากวิตามินอีละลายอยู่ในระบบซึ่งสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับ MAA ดังนั้นในระหว่างการประกอบตัวเองของสายโซ่พอลิเมอร์ วิตามินอีจึงสามารถเข้าไปอยู่ในอนุภาค MIP ได้ และเมื่อทำการสกัดเอาวิตามินอีออก จะทำให้อนุภาคพอลิเมอร์มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลของวิตามินอี ที่มีความจำเพาะสูงทั้งขนาดและรูปร่าง

ในขั้นตอนแรก ได้ทำการศึกษาผลของตัวเริ่มปฏิกิริยาต่อการเกิดพอลิเมอไรเซชัน โดยทำการปรับเปลี่ยนปริมาณของ BPO จาก 0.0011 โมล (การทดลองที่ 2) เป็น 0.0022 โมล (การทดลองที่ 3) 0.0033 โมล (การทดลองที่ 4) และ 0.0045 โมล (การทดลองที่ 5) ดังตารางที่ 1 ในขณะที่องค์ประกอบอื่นๆ คงที่ เนื่องจากวิตามินอีเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้น ในกรณีที่ใช้ BPO จำนวน 0.0011 โมล การเกิดพอลิเมอไรเซชันช้ามากจนไม่สามารถหา % Conversion ได้ ในขณะที่เมื่อใช้ในปริมาณที่เท่ากันในกรณีการเตรียมอนุภาค NIP ที่ไม่มีวิตามินอี (การทดลองที่ 1) การเกิดพอลิเมอไรเซชันเกิดได้ดีขึ้น และได้ %Conversion สูงถึง 82.13% อย่างไรก็ตาม ในกรณีการเตรียมอนุภาค MIP % Conversion จะค่อยๆ เพิ่มตามปริมาณของ BPO ที่ใช้ โดยจะได้ 30.60% 61.68% และ 86.28% สำหรับ 0.0022 โมล 0.0033 โมล และ 0.0045 โมล ของ BPO ตามลำดับ ขนาดของอนุภาค NIP และ MIP มีค่าประมาณ 1-5 ไมโครเมตร โดยมีลักษณะเป็นทรงกลมผิวเรียบและมีการเกาะตัวกันบางส่วน ดัง SEM micrograph ในรูปที่ 4 เมื่อพิจารณาถึงประสิทธภาพในการสังเคราะห์ที่ทำให้ได้ปริมาณของพอลิเมอร์มากที่สุด จึงได้เลือกใช้ BPO ที่ 0.0045 โมล ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

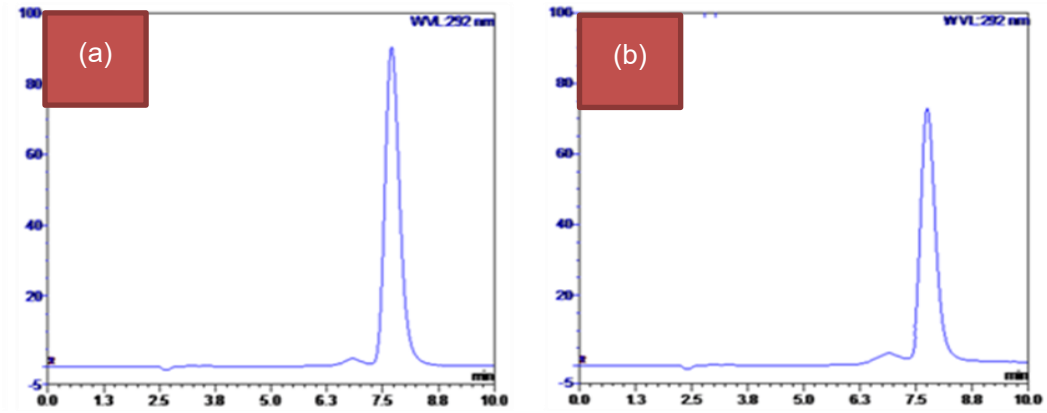
ก่อนจะศึกษาการเตรียมอนุภาค MIP ในพารามิเตอร์ต่อไป ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของ MIP ของการทดลองที่ 5 ในการจับวิตามินอี โดยในขั้นแรกทำการสกัดวิตามินอีออกจากอนุภาค MIP โดยใช้ 5% กรด อะซิติกในเอทานอล 10 มิลลิลิตร แล้วตามด้วยเมทานอลครั้งละ 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ก่อนนำสารละลายที่ล้างไปหาปริมาณวิตามินอี โดยเทคนิค HPLC แต่เนื่องจากสารละลายกรดอะซิติกอาจจะทำลายวัฏภาคคงที่ของคอลัมน์วิเคราะห์ได้ ดังนั้น จึงนำเฉพาะเมทานอลที่เวลาต่างๆไปวิเคราะห์ จากโครมาโทแกรมของเมทานอลที่จำนวนครั้งการล้างต่างๆดังรูปที่ 5 พบว่าไม่มีพีกของวิตามินอี (เวลาคงอยู่ประมาณ 7.5 นาที) เหลืออยู่เลยตั้งแต่การล้างด้วยเมทานอลครั้งที่ 1 ดังรูปที่ 5a ดังนั้นจะใช้สารละลาย 5% ของกรดอะซิติกในเอทานอล 10 มิลลิลิตรตามด้วย 10 มิลลิลิตรของเมทานอลในการสกัดวิตามินอีออกจากอนุภาค MIP และเมื่อนำอนุภาค MIP ที่ผ่านการสกัดแล้วไปแช่ในสารละลายมาตรฐานของวิตามินอีเพื่อหาประสิทธิภาพในการจับวิตามินอี โดยนำสารละลายมาตรฐานวิตามินอีก่อนและหลังจากแช่ด้วยอนุภาค MIP ไปตรวจวัดด้วย HPLC พบว่าปริมาณของวิตามินอีในสารละลายหลังแช่ลดลง ดังขนาดพีกที่ลดลงเมื่อเทียบกับพีกก่อนแช่ในโครมาโทแกรมรูปที่ 6 และจากปริมาณของวิตามินอีที่หายไป สามารถคำนวณหาปริมาณวิตามินอีที่อนุภาค MIP จับได้ โดยพบว่าอนุภาค MIP จากการทดลองที่ 5 สามารถจับวิตามินอีได้ 3.67 มิลลิกรัมต่อกรัมของอนุภาค MIP



รูปที่ 4 SEM micrographs ของ (a) อนุภาค NIP ที่เตรียมโดยใช้ BPO 0.0011 โมล (การทดลองที่ 1) และอนุภาค MIP ที่ใช้ปริมาณ BPO ในปริมาณ (b) 0.0022 โมล (การทดลองที่ 3) (c) 0.0033 โมล (การทดลองที่ 4) และ (d) 0.0045 โมล (การทดลองที่ 5)



รูปที่ 5 โครมาโทแกรมของเมทานอลที่ใช้ในการสกัดวิตามินอีออกจากอนุภาค MIP: (a) ล้างเมทานอลครั้งที่ 1 (b) ล้างเมทานอลครั้งที่ 3 และ (c) ล้างเมทานอลครั้งที่ 4



รูปที่ 6 โครมาโทแกรมของสารละลายวิตามินอี: ก่อน (a) และ หลัง (b) แช่ด้วยอนุภาค MIP

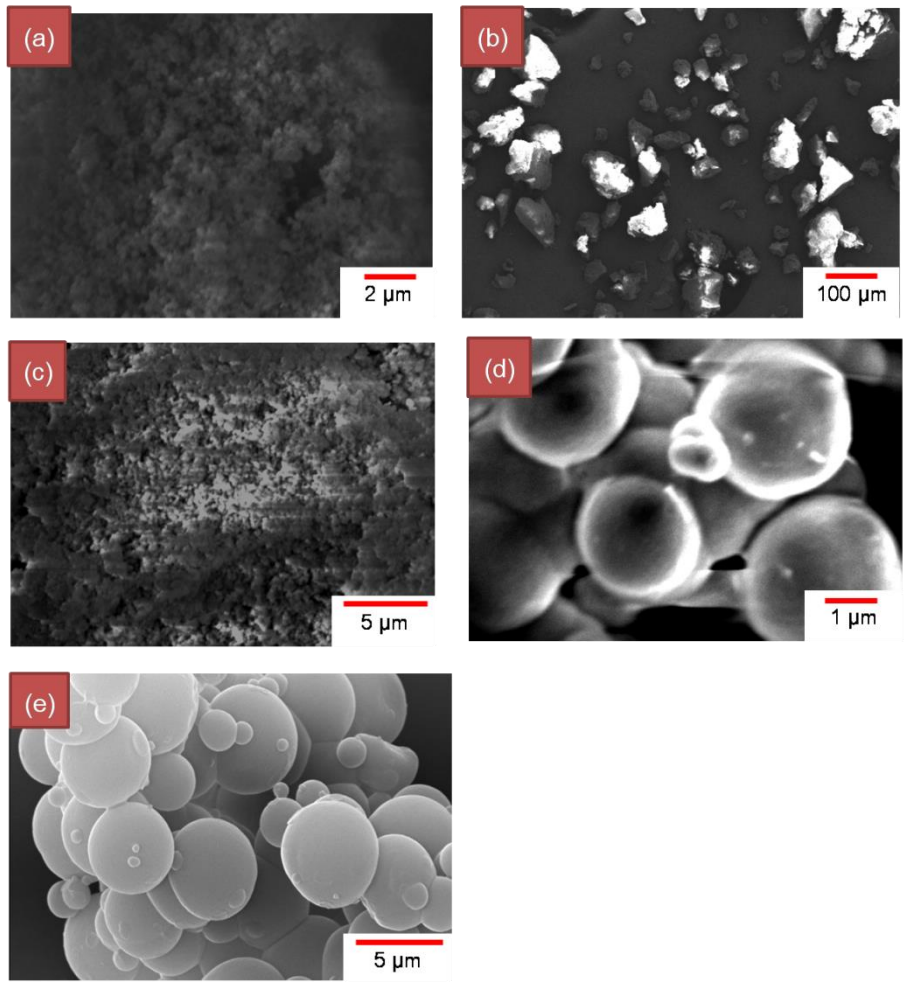
ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพในการจับวิตามินอีของอนุภาคพอลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลที่เตรียมโดยการสังเคราะห์แบบตกตะกอนที่สภาวะต่างๆ

การทดลองที่	ประสิทธิภาพในการจับวิตามินอี (มิลลิกรัมต่อกรัม-MIP)
1	0.110
5	3.670
6	4.200
7	3.260
8	0.009
9	0.360
10	0.260
11	1.720
12	4.560

ในการเพิ่มความไวในการวิเคราะห์จำเป็นต้องเพิ่มประสิทธิภาพในการจับวิตามินอีของอนุภาค MIP ให้ได้มากที่สุด และจากการศึกษาขั้นที่ผ่านมา อนุภาค MIP สามารถจับวิตามินอีได้ 3.67 มิลลิกรัมต่อกรัม MIP ดังนั้นในขั้นตอนนี้จะทำการศึกษาผลของปริมาณ MAA ในการเตรียมอนุภาค MIP โดยจะเพิ่มปริมาณจาก 0.0079 mol (การทดลองที่ 5) เป็น 0.0151 mol (การทดลองที่ 6) และ 0.0174 mol (การทดลองที่ 7) ตามลำดับ ซึ่งคาดว่าปริมาณของ MAA ที่เพิ่มขึ้น จะช่วยจับวิตามินอีได้มากขึ้นในระหว่างการสังเคราะห์และส่งผลให้อนุภาค MIP มีประสิทธิภาพในการจับวิตามินอีมากขึ้น จากผลการทดลองพบว่าวิตามินอีจะจับกับอนุภาค MIP มากขึ้นเมื่อใช้ MAA ในปริมาณที่มากขึ้นตามสมมติฐาน ดังตารางที่ 2 แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้ MAA ที่ 0.0174 โมล (การทดลองที่ 7) ประสิทธิภาพในการจับวิตามินอีกลับลดลงเมื่อเทียบกับการทดลองที่ 6 อาจเนื่องมาจากการประกอบตัวเองของสายโซ่พอลิเมอร์ในสารละลาย 75:25 ของเอทานอล:โทลูอีน เกิดได้ช้าและยากขึ้นตามปริมาณของ MAA และอาจส่งผลถึงการจับกับ

วิตามินอีในระหว่างการเกิดอนุภาค ดังนั้น จึงได้เลือกใช้ MAA ที่ 0.0151 โมล (การทดลองที่ 6) ในการทดลองขั้นต่อไป

ในการเตรียมอนุภาคพอลิเมอร์โดยกระบวนการสังเคราะห์แบบตกตะกอน วัฏภาคต่อเนื่องเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกปัจจัยหนึ่ง เนื่องจากสภาพขั้วของวัฏภาคต่อเนื่องจะมีผลต่อค่าการละลายของสายโซ่พอลิเมอร์ อันจะส่งผลต่อการประกอบตัวของสายโซ่พอลิเมอร์เกิดเป็นอนุภาค นอกจากนี้ ในกรณีการเตรียมอนุภาค MIP ของวิตามินอี MAA ซึ่งเป็นฟังก์ชันนอลมอนอเมอร์จะจับกับวิตามินอีด้วยพันธะไฮโดรเจน ดังนั้น สภาพขั้วของวัฏภาคต่อเนื่องจะมีผลต่อการจับกันระหว่าง MAA กับวิตามินอี ในขั้นตอนนี้จึงได้ศึกษาสภาพขั้วของวัฏภาคต่อเนื่อง โดยจะทำการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนระหว่างโทลูอีนกับเอทานอลที่อัตราส่วนต่างๆ รวมทั้งเปลี่ยนมาใช้อะซิโตไนไทรล์ ดังการทดลองที่ 8 ถึง 12 ในตารางที่ 1 จากรูปที่ 5 ขนาดของอนุภาคพอลิเมอร์จะลดลงตามการเพิ่มขึ้นของอัตราส่วนของโทลูอีน แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการละลายของสายโซ่พอลิเมอร์ในวัฏภาคต่อเนื่องจะลดลงเมื่อสภาพขั้วของวัฏภาคต่อเนื่องลดลง ทำให้ความยาววิกฤตของสายโซ่พอลิ-เมอร์สั้นลงเมื่อประกอบเป็นอนุภาค ส่งผลให้ขนาดของอนุภาค MIP ลดลง นอกจากนี้การมีปริมาณโทลูอีนเพิ่มขึ้น โทลูอีนจะสามารถซึมเข้าไปในอนุภาค MIP ที่เกิดขึ้นในระหว่างการสังเคราะห์ได้มากขึ้น ทำให้อนุภาคมีความอ่อนนุ่มและสุดท้ายจะเกาะตัวกัน ดังรูป 5a และ 5b แต่เมื่อลดปริมาณ โทลูอีนลง อนุภาค MIP จะเริ่มเกาะตัวกันน้อยลง รวมทั้งอนุภาคเริ่มมีขนาดใหญ่ขึ้น ดังรูป 5c (25:75; เอทานอล:โทลูอีน) และ 5d (100:0; เอทานอล:โทลูอีน) เนื่องมาจากความยาววิกฤตของสายโซ่พอลิเมอร์เมื่อประกอบตัวเองเป็นอนุภาคจึงมีขนาดใหญ่ขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม อนุภาคก็ยังมีการเกาะตัวกันบางส่วน ซึ่งเมื่อนำไปใช้งานจริงจะทำให้ประสิทธิภาพในการจับวิตามินอีลดลง เนื่องจากพื้นที่ผิวลดลง ดังนั้น จึงได้เปลี่ยนชนิดของวัฏภาคต่อเนื่องเป็นอะซิโตไนไทรล์ (การทดลองที่ 12) ซึ่งพบว่าอนุภาค MIP ที่ได้มีความเสถียรทางคอลลอยด์สูงโดยไม่มีการรวมกันของอนุภาคและมีขนาดอนุภาคประมาณ 5 ไมโครเมตร รวมทั้งมีการกระจายตัวของขนาดอนุภาคแคบ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ [22] ที่ทำการเตรียมอนุภาคโคพอลิเมอร์ของไดไวนิลเบนซีนและสไตรีนในกระบวนการสังเคราะห์แบบตกตะกอนและพบว่าเมื่อใช้เมทานอลเป็นวัฏภาคต่อเนื่องอนุภาคพอลิเมอร์ที่เตรียมได้จะเกิดการเกาะตัวกัน ในขณะที่เมื่อใช้อะซิโตไนไทรล์อนุภาคพอลิเมอร์มีความเสถียรทางคอลลอยด์สูง แม้ว่าสารทั้งสองชนิดจะมีค่าพารามิเตอร์การละลายของฮิลเดอแบรนด์ (Hildebrand solubility parameter) ใกล้เคียงกันก็ตาม (เมทานอล และอะซิโตไนไทรล์เท่ากับ 29.62 และ 24.43 $MPa^{1/2}$ ตามลำดับ) โดยงานวิจัยดังกล่าวรายงานว่ายังไม่มีเหตุผลแน่ชัดเกี่ยวกับการใช้อะซิโตไนไทรล์ทำให้อนุภาคพอลิเมอร์ไม่มีการเกาะตัวกัน เมื่อทำการศึกษาประสิทธิภาพในการจับวิตามินอีของอนุภาค MIP ที่เตรียมจากวัฏภาคต่อเนื่องชนิดต่างๆ พบว่า การใช้อะซิโตไนไทรล์จะให้อนุภาคที่สามารถจับวิตามินอีได้มากที่สุด (4.56 มิลลิกรัมต่อกรัม-MIP) ดังตารางที่ 2 ซึ่งเนื่องมาจากอนุภาค MIP ไม่มีการรวมตัวกันทำให้มีพื้นที่ผิวมาก นอกจากนี้ จากการกระจายตัวของขนาดอนุภาคที่แคบจะช่วยเพิ่มความสม่ำเสมอในการวิเคราะห์ด้วย



รูปที่ 7 SEM micrographs ของอนุภาคพอลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลของวิตามินอีที่เตรียมโดยใช้วัฏภาคต่อเนื่องเอทานอล:โทลูอีน (%v/v): (a) 0:100 (b) 25:75 (c) 50:50 (d) 100:0 และ (e) อะซิโตไนไทรล์ 100% ตามลำดับ

สรุปและเสนอแนะ

ในงานวิจัยนี้ สามารถเตรียมอนุภาค MIP สำหรับจับวิตามินอีด้วยกระบวนการสังเคราะห์แบบตกตะกอน โดยใช้ MAA เป็นฟังก์ชันนอลมอนอเมอร์ ใช้ DVB เป็นสารเชื่อมร่างแห และ BPO เป็นตัวเริ่มปฏิกิริยา สภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมอนุภาค MIP ที่ให้ประสิทธิภาพในการจับวิตามินอีได้สูงที่สุด (4.56 มิลลิกรัม/กรัม-MIP) คือ ใช้ MAA 0.0283 โมล DVB 0.0079 โมล และ BPO 0.0007 โมล โดยใช้อะซิโตไนไทรล์เป็นวัฏภาคต่อเนื่อง อนุภาค MIP ที่ได้จะมีลักษณะเป็นทรงกลมผิวเรียบ มีขนาดประมาณ 5 ไมโครเมตร และมีการกระจายตัวของขนาดอนุภาคที่แคบ อย่างไรก็ตาม ก่อนนำอนุภาค MIP ที่เตรียมได้ไปใช้แยกวิตามินอีจากตัวอย่างจริง จำเป็นต้องทำการศึกษาผลของสารรบกวนต่างๆ ที่อาจมีผลต่อการวิเคราะห์วิตามินอีต่อไป

เอกสารอ้างอิง

[1] Qian, J.; Morley, S.; K.Wilson; Nava, P.; Atkinson, J.;Manor, D. 2005. "Intracellular trafficking of vitamin E in hepatocytes: the role of tocopherol transfer protein". **J. Lipid Res.** 46 2072-2082.

[2] Bruggemann, O.; Visnjevski, A.; Burch, R.;Patel, P. 2004. "Selective extraction of antioxidants with molecularly imprinted polymers". **Anal. Chim. Acta**. 504: 81-88.

[3] Lechner, M.; Reiter, B.;Lorbeer, E. 1999. "Determination of tocopherols and sterols in vegetable oils by solid-phase extraction and subsequent capillary gas chromatographic analysis". **J. Chromatogr. A**. 857: 231-238.

[4] Cho, I.K.; Rima, J.; Chang, C.L.;Li, Q.X. 2001. "Spectrofluorometric and high-performance liquid chromatographic determination of all-rac-α-tocopheryl acetate in virgin olive oil". **J. Food Comp. Anal.** 20: 57-62.

[5] Haupt, K. 2003. "Imprinted polymers—Tailor-made mimics of antibodies and receptors". **Chem Commun**. 2: 171-178.

[6] Zhang, H.; Ye, L.;Mosbach, K. 2006. "Non-covalent molecular imprinting with emphasis on its application in separation and drug development". **J Mol Recognit**. 19: 248-259.

[7] Salian, V.D.; Vaughan, A.D.;Byrne, M.E. 2012. "The role of living/controlled radical polymerization in the formation of improved imprinted polymers". **J. Mol. Recognit.** 25: 361-369.

[8] Chen, L.; Xu, S.;Li, J. 2011. "Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications". **Chem. Soc. Rev.** 40: 2922-2942.

[9] Wulff, G. 1995. "Molecular Imprinting in Cross-Linked Materials with the Aid of Molecular Templates— A Way towards Artificial Antibodies". **Angew. Chem., Int. Ed. Engl.** 34: 1812-1832.

[10] Mosbach, K. 1994. "Molecular imprinting". **Trends Biochem. Sci.** 19: 9-14.

[11] Mohajeri, S.A.; Karimi, G.; Aghamohammadian, J.;Khansari, M.R. 2011. "Clozapine recognition via molecularly imprinted polymers; bulk polymerization versus precipitation method". **J. Appl. Polym. Sci.** 121: 3590-3595.

[12] Shi, Y.; Lv, H.; Lu, X.; Huang, Y.; Zhanga, Y.;Xue, W. 2012. "Uniform molecularly imprinted poly(methacrylic acid) nanospheres prepared by precipitation polymerization: the control of particle features suitable for sustained release of gatifloxacin". **J. Mater. Chem.** 22: 3889-3898.

[13] Esfandyari-Manesh, M.; Javanbakht, M.; Atyabi, F.;Dinarvand, R. 2012. "Synthesis and Evaluation of Uniformly Sized Carbamazepine-Imprinted Microspheres and Nanospheres Prepared with Different Mole Ratios of Methacrylic Acid to Methyl Methacrylate for Analytical and Biomedical Applications". **J. Appl. Polym. Sci.** 125: 1804-1813.

[14] Xiao, P.; Dudal, Y.; Corvini, P.F.-X.; Spahr, P.;Shahgaldian, P. 2012. "Synthesis and characterization of fluoroquinolone-imprinted polymeric nanoparticles". **React Funct Polym**. 72: 287-293.

[15] Ara, B.; Chen, Z.; Shah, J.; Jan, M.R.;Ye, L. 2012. "Preparation and Characterization of Uniform Molecularly Imprinted Polymer

Beads for Separation of Triazine Herbicides". **J. Appl. Polym. Sci.** in press.

[16] Yoshimatsu, K.; Yamazaki, T.; Chronakis, I.S.;Ye, L. 2012. "Influence of Template/Functional Monomer/Cross-Linking Monomer Ratio on Particle Size and Binding Properties of Molecularly Imprinted Nanoparticles". **J. Appl. Polym. Sci.** 124: 1249-1255.

[17] Chen, Z.;Ye, L. 2012. "Controlling size and uniformity of molecularly imprinted nanoparticles using auxiliary template". **J. Mol. Recognit.** 25: 370-376.

[18] Sellergren, B. 1994. "Direct Drug Determination by Selective Sample Enrichment on an Imprinted Polymer". **Anal. Chem.** 66: 1578-1582.

[19] Dvorakova, G.; Haschick, R.; Chiad, K.; Klapper, M.; Müllen, K.; Biffis, A. 2010. "Molecularly Imprinted Nanospheres by Nonaqueous Emulsion Polymerization". **Macromol Rapid Comm**. 31: 2035-2040.

[20] Ji, Y.; Yin, J.; Xu, Z.; Zhao, C.; Huang, H.; Zhang, H.;Wang, C. 2009. "Preparation of magnetic molecularly imprinted polymer for rapid determination of bisphenol A in environmental water and milk samples". **Anal Bioanal Chem**. 395: 1125-1133.

[21] Bruggemann, O.; Haupt, K.; Ye, L.; Yilmaz, E.;Mosbach, K. 2000. "New configurations and applications of molecularly imprinted polymers". **J Chromatogr A**. 889: 15-24.

[22] Cui, H.; Chen, H.; Qu, R.; Wang, C.; Sun, C.; Zhou, W.; Yu, M.;Jiang, H. 2009. "Highly Crosslinked Poly(styrene-co-divinylbenzene) Microspheres Prepared by Precipitation Polymerization: Effects of the Polymerization Parameters on the Characteristics of the Particles". **J Appl Polym Sci**. 111: 3144-3149.